

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

**KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİDE KROMOZOM
(1-9 nolu Kromozomlar) DÜZENSİZLİKLERİNİN
MLPA YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Can KILINÇARSLAN
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN**

Ocak, 2009

**Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından TF08.06
proje numarası ile desteklenmiştir.**

Teşekkür

Çalışmamın belirlenmesinde bana yol gösteren, laboratuvar çalışmalarımda 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, yazım aşamalarında yanımda olan sevgili ekip arkadaşım Tuğçe SEVER'e,

Sıcak bir çalışma ortamı ve ekip ruhu ile tez dönemimde desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma,

Ve yanımda olduklarını daima hissettiren, kaprislerimi ve sıkıntılarımı en özverili şekilde çeken güzel aileme,

*En içten teşekkürlerimi sunarım,
Sonsuz Sevgilerimle.*

Can KILINÇARSLAN

Önsöz;

İnsanlık tarihinde belirli yüzyıllar bazı bilimler için altın çağ olmuştur. İçinde bulunduğumuz yüzyılın ise Biyoloji biliminin lehine geçmiş olduğu ve bu alandaki gelişmelerin bu yüz yılda ardı ardına geldiği aşikârdır. Son dönemde Biyoloji alanındaki en önemli gelişmeler Moleküler Genetik Dalında gerçekleştirilmiştir. 1990 yılında resmi olarak başlayan İnsan Genom Projesinin, 15 yıl içinde sonlanması hedeflenmiş ancak daha erken bir tarih olan 2003 yılında proje tamamlanmıştır. Bu proje ile gerçekleştirilen araştırmalar sayesinde; yeni yöntemler, yeni bilgiler ve yeni teknolojilere sahip olunmuştur. Sonuç olarak da insan DNA'sında tahmin edilen 100.000 – 150.000 gen yerine 20.000 - 25.000 genin olduğu saptanmıştır. Bulunan bu genler ile yapılan çalışmalar sonucunda her gene ait çeşitli yeni bulgular elde edilmiştir.

Bu çalışma ile biz de; hala fonksiyon ve etkileşimleri tam olarak çözülememiş bu geniş çaplı gen havuzundan, bazı genlerin Kronik Myeloid Lösemi ile ilişkilerini incelemek amacıyla kromozomal düzensizliklerin taramasını gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar ile KML ve bu genler arasındaki ilişkinin Türk toplumunda olup olmadığı konusunda bir yargıya varmak ve literatüre katkı sağlamak amacındayız. Bu tür çalışmaların artması ve geniş çaplı olarak yapılabilmesi, toplumumuzun genetik yapısını öğrenmede önemli olduğu kadar birçok hastalığın tanı ve tedavisinde bizlere yol gösterme açısından da büyük önem arz etmektedir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
KISALTMALAR	X
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. LÖSEMİ	1
1.2. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ (KML)	2
1.2.1. Kronik Faz	4
1.2.2. Akselere Faz	5
1.2.3. Blastik Faz	5
1.3. MİTOZ UYARI İLETİ YOLLARININ AKTİVASYONU	6
1.3.1. RAS ve MAP kinaz yolları	6
1.3.2. Jak-Stat Yolağı	6
1.3.3. PI-3 Kinaz Yolağı	7
1.3.4. Myc Yolağı	7
1.3.5. Apoptoz Önlenmesi	8
1.4. MLPA Yöntemi	8
1.5. Taranan Genler	11
1.5.1. BCAR3	12
1.5.2. F3	12
1.5.3. NRAS	13

1.5.4. IL10	14
1.5.5. IL1A	15
1.5.6. TANK	16
1.5.7. PIK3CA	17
1.5.8. IL13	17
1.5.9. IL4	18
1.5.10.CDKN1A	19
1.5.11. MYB	20
1.5.12.ABCB1	20
1.5.13. FGFR1	21
1.5.14. MYC	22
1.5.15. PTP4A3	23
1.5.16. RECQL4	23
1.5.17. CDKN2A	24
1.5.18. WFS1	24
1.5.19. OCIAD1	25
1.5.20. GNRHR	26
1.5.21. IL2	26
1.5.22. KLKB1	27
1.5.23. PMS2	28
1.5.24. GHRHR	28
1.5.25. EGFR	29
1.5.26. ELN	30
1.5.27. KRIT1	31
1.5.28. IMPDH1	31
1.5.29. SHH	32
1.5.30. PTPRD	33
1.5.31. TJP2	33
1.5.32. TGFBR1	34

1.5.33. TSC1	34
2. MATERYAL VE METOD	36
2.1. DNA İZOLASYONU	37
2.1.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi	37
2.1.2. Tuzla Çöktürme Yönteminde kullanılan araç ve kimyasallar	38
2.1.3. Ticari Kit ile DNA İzolasyonunun Aşamaları	39
2.1.4. Ticari Kit ile DNA İzolasyonu işleminde kullanılan araç ve kimyasallar	40
2.2. MLPA YÖNTEMİ İLE ANALİZLERİN YAPILMASI	41
2.2.1. Yöntem	41
2.2.2. Analiz	42
3. SONUÇLAR	47
3.1. MLPA ANALİZİ	47
3.2. MLPA SONUÇLARININ KLİNİK PARAMETRELERLE KARŞILAŞTIRILMASI	56
4. TARTIŞMA	61
5. KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1	Kan hücrelerinin farklılaşması	2
Şekil 2	Kemik iliğinde üretilen kan hücreleri	2
Şekil 3	KML’de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu	3
Şekil 4	Uzun olan M13 türevi MLPA oligonükleotid probunun hazırlanması	10
Şekil 5	Taranan genlerin kromozomlar üzerinde yerleşimleri	11
Şekil 6	GeneXpert DX System PH pozitif sonuç	36
Şekil 7	GeneXpert DX System PH negatif sonuç	36
Şekil 8	DNA izolasyonunun aşamaları	39
Şekil 9	Denatürasyon ile ayrılan DNA çift ipliği	43
Şekil 10	ABI9700 Thermal Cycler cihazının görünümü	43
Şekil 11	MLPA reaksiyonları	43
Şekil 12	P253 kiti ile konmuş sağlıklı kadın DNA’sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	47
Şekil 13	P253 kiti ile konmuş sağlıklı erkek DNA’sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	48
Şekil 14	P005 kiti ile konmuş sağlıklı kadın DNA’sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	48
Şekil 15	P005 kiti ile konmuş sağlıklı erkek DNA’sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	49
Şekil 16	P005 kiti ile konmuş H13 kodlu hastaya ait DNA amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	50
Şekil 17	P005 kiti ile konmuş H26 kodlu hastaya ait DNA amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	50

Şekil 18	P253 kiti ile konmuş H3 kodlu hastaya ait DNA amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	51
Şekil 19	P253 kiti ile konmuş H2 kodlu hastaya ait DNA amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	52
Şekil 20	P253 kiti ile konmuş H6 kodlu hastaya ait DNA amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	52
Şekil 21	P253 kiti ile konmuş H11 kodlu hastaya ait DNA amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	53
Şekil 22	P253 kiti ile konmuş H28 kodlu hastaya ait DNA amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi	54
Şekil 23a	P005 kiti ile çalışılmış olan hastaların ve kontrol DNA'larının birlikte analizi	55
Şekil 23b	P253 kiti ile çalışılmış olan hastaların ve kontrol DNA'larının birlikte analizi	55
Şekil 24	Duplikasyonun ilerlemesiz sağkalım üzerine etkisi	59

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1	Salsa MLPA P253 kiti ile taranan genlerin prob isimleri, nükleotid uzunlukları ve kromozomal yerleşimleri	45
Tablo 2	Salsa MLPA P005 kiti ile taranan genlerin prob isimleri, nükleotid uzunlukları ve kromozomal yerleşimleri	46
Tablo 3	Kronik faz Kronik Myelositer Lösemili hastaların tanıda klinik özellikleri	57
Tablo 4	İmatinib tedavisi alan Kronik Myeloid Lösemili hastaların klinik özellikleri	58
Tablo 5	KF-KML’de klinik parametrelerin sağkalım üzerine etkisi (Logrank Testi)	59
Tablo 6	Duplikasyonlar ile klinik parametrelerin karşılaştırılması	60

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik Asit
mtDNA	Mitokondrial DNA
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
KML	Kronik Myelositer Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
ALL	Akut Lenfoid Lösemi
KLL	Kronik Lenfoid Lösemi
KF-KML	Kronik Faz Kronik Myelositer Lösemi
ABL*	Akut Bazofilik Lösemi
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
PV	Polisitemia Vera
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	Ardışık DNA Tekrarı

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
RDS	Respiratuvar Distres Sendromu
SSPE	Subacute Sclerosing Panencephalitis
MRP	Multi Drug Direnci
UV	Ultraviyole
WFS	Wolfram Sendromu
ER	Endoplazmik Retikulum
NK	Doğal Öldürücü (Natural Killer)
LAK	Lenfokinle Aktive Edilmiş Öldürücü Hücreler
APTT	Uzun Süreli Kısmi Tromboplastin Zamanı
Mm	Mismatch = Yanlış Eşleşme
HNPCC	Kalıtsal Polipsiz Kolon Kanseri
SVAS	Supravalvular Aortic Stenosis
WBS	Williams-Beuren Sendromu
Del	Delesyon
Dup	Duplikasyon
RP	Retinis Pigmentosa
adRP	Otozomal Dominant Retinis Pigmentosa
LCA	Leber Konjenital Amaurosis
VACTERL	Vertebral, Anal, Kardiak, Trakeoösefageal, Renal ve Ekstremité Anomalileri
TS	Tüberöz Skleröz
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
WBC	Beyaz Kan Hücreleri

WBCL	Beyaz Kan Hücreleri Parçalanması
TE	Tris EDTA
U	Ünite
CI	Confidence Interval
OR	Odds Oranı
LN	Lot Numarası
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
bcl-xL	Bazal hücre lenfoma – ekstra büyük
STL	Sitotoksik T lenfosit
IL	İnterlökin
LPS	Lipopolisakkarit
PTCH	Patched, <i>Drosophila</i> , homolog 1 geni
SMOH	Smoothened, <i>Drosophila</i> , homolog geni
BMP	Bone morphogenetic protein
RD	RD RNA-binding protein; RDBP

ÖZET

Bu çalışmada; Kronik Myelositer Lösemi'deki (KML) kromozomal düzensizliklerin MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) yöntemi ile özellikle onkogen (MYB, MYC, NRAS vb.), transkripsiyon faktörü (RENT2, NFKBIA vb.), uyarı iletimi (PIK3CA, IMPDH1, PTPRD vb.), sitokin (IL1, TANK, IL13 vb.), bağışıklık sistemi (TGFB1, PTP4A3) ve apoptoz (MOAP1, BAX, PDCD8 vb.) ile ilgili yaklaşık 33 genin yer aldığı kromozom bölgelerindeki düzensizliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada BCR-ABL pozitif (p210 kimerik proteini) 48 hasta ile 15 sağlıklı kontrol yer almış ve 33 genin bulunduğu 9 kromozoma ait farklı bölgelerdeki düzensizlikler araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar hem kendi içinde hem de klinik parametrelerle karşılaştırılarak analiz edilmiştir. MLPA analizleri sonucunda; 2 KML hastasının Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1 (FGFR1) geninde, 4 KML hastasının inozin 5' monofosfat dehidrogenaz 1 (IMPDH1) geninde ve 1 KML hastasının postmayotik artmış segregasyon, *S. Cerevisiae*, 2 (PMS2) geninde duplikasyon saptanmıştır. Klinik parametrelerle (Sokol risk derecelendirmesi; periferik eosinofil; kemik iliği retiküler lif derecesi; hemoglobin, lökosit ve trombosit sayıları; 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım ve imatinib tedavisine yanıt) yapılan karşılaştırma sonucunda duplikasyonların 7 yıllık ilerlemesiz sağ kalım olasılığını düşürdüğü anlaşılmış ve hasta grubumuzda duplikasyon ile imatinib tedavisine yanıt arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu tez çalışmasında; KML'de, 7 ve 8. kromozomda yer alan 3 gendeki duplikasyonlar ilk kez saptanmış olup 7 ve 8 nolu kromozomların daha ayrıntılı çalışmaların merkezi olması gerektiğini ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kronik myelositer lösemi, KML, MLPA, PCR, DNA, Kromozomal değişimler, FGFR1, IMPDH1, PMS2.

ABSTRACT

In this study, it is aimed at investigating chromosomal aberrations in Chronic Myeloid Leukemia (CML) and particularly the aberrations on chromosome regions of nearly 33 genes related with oncogenes (MYB, MYC, NRAS and etc.), transcription factor (RENT2, NFKBIA and etc.), signal transmission (PIK3CA, IMPDH1, PTPRD and etc.), cytokines (IL1, TANK, IL13 and etc.), immune system (TGFB1, PTP4A3) and apoptosis (MOAP1, BAX, PDCD8 and etc.) by method of MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). BCR-ABL positive (p210 chimeric protein) 48 patients and 15 healthy individuals were included in the study. The aberrations on different regions of 9 chromosomes, which carried 33 genes, were investigated. Results were analyzed by comparing both among each other and with clinical parameters. As a result of MLPA analyses, duplication was detected in fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) gene in 2 CML patients, in inosine 5' monophosphate dehydrogenase 1 (IMPDH1) gene in 4 CML patients and in Postmeiotic Segregation Increased, *S. Cerevisiae*, 2 (PMS2) gene in 1 CML patient. As a result of comparison with clinical parameters, it was understood that presence of duplications reduce percentage of survival without progression for 7 years and a significant relationship is found between duplication and the response to imatinib therapy in our patient group. In this study, the duplications of 3 genes in chromosome 7 and 8 were detected for the first time in CML and it was shown that chromosomes 7 and 8 should be the center of more detailed studies.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, CML, MLPA, PCR, DNA, Chromosomal aberrations, FGFR1, IMPDH1, PMS2.

1. Genel Bilgiler

1.1. Lösemi

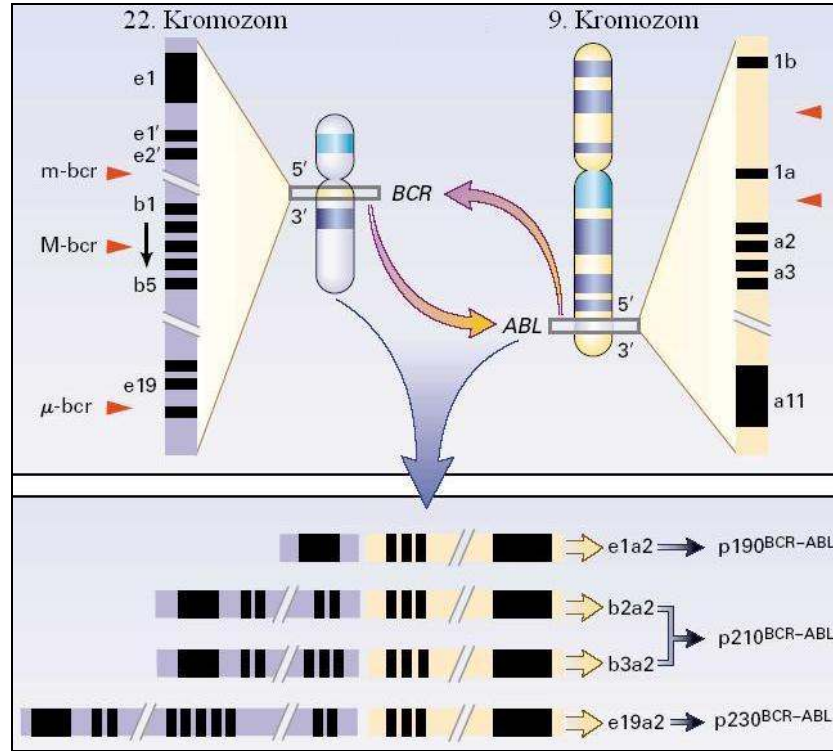
Kemik iliğindeki öncü hücrelerden; kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve plateletler oluşur (Şekil 1) ⁽¹⁾. Lösemi, kan ve kemik iliği hücrelerinde gözlenen bir kanser tipidir. Kemik iliği kök hücrelerinin kontrolsüz gelişmesi olarak tanımlanır. Özellikle beyaz kan hücrelerinin mutasyona uğrayarak, kontrol dışı çoğalmaları sonucu ortaya çıkan löseminin dört geçerli çeşidi vardır; Akut Myeloid Lösemi (AML), Kronik Myeloid Lösemi (KML), Akut Lenfoid Lösemi (ALL) ve Kronik Lenfoid Lösemi (KLL). Myeloid ve lenfoid tanımlaması, etkilenmiş hücre tipini temsil eder ⁽²⁾.

19.yy'da Avrupalı hekimler, beyaz hücre miktarında belirgin artışa sahip hastaların en erken gözlemcileridir. 'Beyaz Kan' terimi hastalık için bir isim olarak ortaya çıkmıştır. Sonradan Yunanca'da, beyaz anlamına gelen 'leukas' ve kan anlamına gelen 'haima'dan türeyen 'leukemia' terimi bu hastalığı belirtmek için kullanılmıştır ⁽³⁾.

Lösemik hücreler; kök hücre (kanser kök hücre) kaynaklıdır, mutasyon veya kromozomali anomaliye sahiptirler, genetik kararsızlık gösterirler, önemli hücresel fonksiyonlarda (çoğalma, farklılaşma ve apoptozis) bozulmadan ve özellikle farklılaşmadan kaçış gösterirler. Lösemik hücreler büyüme avantajı kazanmışlardır ve klonal baskınlık ile yayılım gösterirler. ⁽³⁾

Akut lösemi, kronik hastalıktan çok daha hızlı gelişim gösterir. Hücrelerde gerçekleşen genetik mutasyonlar, kemik iliği ve kandaki hücrelerin olgunlaşmamasına ve kullanılamaz durumda olmalarına neden olur. Özellikle de sağlıklı kemik iliği hücrelerinin üretilmesi baskılanır. Sonuç olarak bireyde, iliğin yeterli kırmızı kan hücresi ve beyaz kan hücresinin birçok çeşidini (Şekil 2) ⁽⁴⁾ üretememesinden, enfeksiyonlara, kanamaya karşı dayanıksızlık ve anemi gözlenir. Kronik Lösemide buna oranla daha çok sayıda olgun ve çalışan hücreler yapılır ⁽²⁾.

genin kodladığı kimerik proteinler olan p190^{BCR-ABL}, p210^{BCR-ABL}, p230^{BCR-ABL} proteinleri (190, 210 ve 230 kd) oluşur (Şekil 3)⁽⁸⁾. BCR-ABL füzyon geni tarafından kontrol edilen malign transformasyon mekanizmaları, ABL tirozin kinaz işlevinin kontrolünde; BCR/ABL pozitif hücrelerin biyolojik özellikleri ve işlevsel uyarı ileti yollarında; bozulmuş adhezyon özelliklerinde; mitoz uyarı ileti yollarının aktivasyonunda (Ras ve MAP Kinaz yolları, JAK/STAT yolağı, PI-3 Kinaz yolağı ve Myc yolağı gibi); Apoptozun engellenmesinde ve ABL Gen işlevini engelleyen proteinlerin parçalanmasında rol oynamaktadır⁽⁸⁾.



Şekil 3. KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu⁽⁸⁾.

KML'de çok önemli olan t(9,22) translokasyon çeşidi hastaların %95'inde saptanmaktadır⁽¹⁰⁾. En sık yaşamın ileri evrelerinde 50-60 yaşları arasında görülür. Küçük çocuklarda, KML hızlı seyrederek ve Ph kromozomu yani BCR-ABL negatiftir (Juvenil KML)⁽¹⁰⁾. Ayrıca ALL hastası çocukların %5'i ile erişkinlerin %15-30'unda ve yeni AML tanısı konan hastaların %2'sinde t(9;22) saptanmıştır⁽⁸⁾.

Ph kromozomu haricinde KML ile ilişkili olarak çeşitli kromozomal düzensizlikler de saptanmıştır. KML hastalarının imatinib tedavisi sonrasında Ph kromozomu negatif olanlarında 6. ve 7. kromozomlar arasında translokasyon t(6;7)(p21;q23) gözlemlendiği gösterilmiştir⁽¹¹⁾. Ayrıca t(7;17)(p15;q23) ve

t(7;17)(q32-34;q23) gibi dengeli translokasyonlar, akselere faz ve blastik fazda olan KML hastalarında saptanmıştır ⁽¹²⁾. AML hastalarının KML belirtilerine benzer olan Ph kromozomu negatif vakalarında t(7;11)(p15;p15) translokasyonu gösterilmiştir ⁽¹¹⁾. Ph kromozomu pozitif hastaların bazılarında ise monozomi 7 gözlenmektedir ⁽¹³⁾. Başka bir çalışmada KML hastalarında gözlenen 5 farklı translokasyon çeşidi t(4;12;7;9;22) olarak tanımlanmıştır ⁽¹⁴⁾. Atipik KML olarak tanımlanan 4 Ph kromozomu negatif hastada BCR ekzon 5 ile FGFR1 ekzon 9 ve 8 arasında gerçekleşen t(8;22) (p12;q11) translokasyon tanımlanmıştır ⁽¹⁵⁾. KML olduğu düşünülen Ph kromozomu negatif 11 yaşındaki bir kız çocuğunda t(8;21) translokasyonunun bir çeşidi olan t(8;10;21)(q22;q24;q22) bileşeni görülmüştür ⁽¹⁶⁾. Ayrıca Ph kromozomu pozitif blastik fazdaki 2 KML hastasında t(8;21)(q22;q22) translokasyonu gösterilmiştir ⁽¹⁷⁾. Blastik fazda Trizomi 8 de gözlenebilmektedir ⁽¹⁸⁾.

KML, yıllık olarak 100.000 insanda 1-2 vaka olarak ortaya çıkmakta ve erişkinde lösemilerin %15 kadarını oluşturmaktadır. Ortalama vaka yaşı 45-55 olarak saptanmıştır. Hastaların %12-30'u 60 yaş veya üzerindedir. Genel klinik bulgular; halsizlik, kilo kaybı, abdominal şişkinlik, kanama, purpura, splenomegali, lökositoz, anemi ve trombositozdur ⁽⁸⁾.

KML, myeloproliferatif hastalıklar grubu içinde sınıflandırılır. Diğer myeloproliferatif hastalıklar polisitemia vera (PV), myelofibrozis (AMM), ve esansiyel trombositemi (ET)'dir. KML, üç fazlı bir hastalıktır. KML klinikopatolojik seyri; kronik faz, akselere faz ve blastik faz olarak adlandırılır ⁽⁹⁾. KML hastalarının %80'i kronik fazda, %10'u akselere fazda ve %10'u da blastik fazda tanı almaktadır ⁽¹⁹⁾.

1.2.1. Kronik faz

Myeloblast oranı %3'den küçük, mutlak bazofili genellikle gözlenir ve buna eozinofilide eşlik edebilir. Mutlak monositoz olmasına karşın nötrofiller çok yüksek olduğundan relatif monositopeni olarak görülür. Trombositoz da genellikle gözlemlenir ⁽¹⁸⁾. Kronik fazda t(9;22)(q34;q11) varlığı tanıyı doğrulamaktadır. Hastaların %1'inden azında Ph kromozomu yoktur. Bu Ph

kromozomu negatif (-) KML veya atipik KML olarak adlandırılır, daha ağır seyreder⁽¹⁸⁾.

Dalak ve karaciğer miyeloid hücreler tarafından infiltre edildiği ve sinüsoidlerde ikincil olarak hematopoez odaklarının gözlendiği ekstramedüller hastalık bu evrede ve blastik fazda gözlenir. Kronik faz genellikle 2-4 sene sonra akselere veya blastik faza geçer. Blastik faza geçiş ani veya yavaş olabilir. Kronik fazın blastik faza ilerlemesi ilk yıl %5 ve sonraki yıllarda %20-25'dir. Blastik faza ilerleyen hastaların morfolojik olarak 2/3'ü akut miyeloblastik lösemi ve 1/3'ü akut lenfoblastik lösemidir⁽¹⁸⁾.

1.2.2. Akselere faz

Kemik iliğinde blast oranı %5-20'dir. %20'nin üzerinde bazofili olabilir. Sıklıkla hemoglobin düzeyi 7,0 gr/dL'nin altındadır⁽¹⁸⁾. Devamlı ateş, kemik ağrısı ve kemik iliğinde retikülün artışı ile karakterizedir. Tedaviye rağmen lökosit sayısının azalmaması gözlenebilmektedir⁽¹⁸⁾.

1.2.3. Blastik faz

Kemik iliğinde blast oranı %20'nin üzerindedir. Anemi ve trombositopeni derinleşir, ilerleyici splenomegali gözlenir. Ekstramedüller hastalık ve miyelofibrozis sıktır. Hastaların %70-80'inde trizomi 8, iso (17q), +19 ve Y kaybı gibi ek kromozomal anomaliler ortaya çıkar. Bazı hastalarda ani bir fibrotik faz görülebilir, agnojenik miyeloid metaplazinin son dönemini andırır. Bu durum ya blast fazına geçişte kısa bir dönemi içerebilir ya da hastalar akut lösemiye dönüşmeksizin kaybedilebilir⁽¹⁸⁾.

İyonize radyasyona maruz kalma ile KML gelişimi arasında bir ilişki saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda da radyasyona maruz kalma ile ilişkilendirilen diğer malign hastalıklar arasında yer almıştır. Radyoterapi ile tedavi edilmiş Hodgkin lenfoma, kronik lenfositer lösemi, non-Hodgkin lenfoma, Wilms tümörü, meme kanseri, testis kanseri öykülü vakalarda KML geliştiği bildirilmiştir. KML'nin klinik olarak saptanmasından önceki preklinik dönemin süresi kesin olarak bilinmemektedir⁽²⁰⁾. Ancak atom bombasından sonra

yaşayanlarda yapılan incelemelerde genetik değişikliklerden sonra klinik bulguların gelişimine kadar geçen sürenin yaklaşık 6 yıl olduğu belirtilmektedir ⁽²⁰⁾. Tedavi ilişkisiz KML vakalarında kronik faz ortalama 2-7 yıl sürerken, hastaların yaklaşık yarısı bu süreç boyunca kronik fazdan blastik faza ya da akselere faza geçiş gösterirler ⁽²⁰⁾.

1.3. Mitoz uyarı ileti yollarının aktivasyonu

1.3.1. RAS ve MAP kinaz yolları

Tirozin 177'nin otofosforilasyonu ile adaptör molekül olan growth faktör reseptör bağlanma proteini (Grb-2) için bağlanma bölgesi oluşur ⁽³⁾. Grb-2'nin SOS proteinine bağlanmasından sonra Ras, işlevsiz GDP bağlı durumdan işlevsel GTP bağlı duruma geçer ⁽³⁾. Ph kromozomu pozitifliğinin 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'ye bağlanırlar ⁽³⁾. Ras'ın aktivasyonu Ph kromozomu pozitif lösemilerin patogeneğinde önemlidir ⁽³⁾. İnterlökin-3 gibi sitokin reseptörlerinin uyarılması Ras'ın aktivasyonuna neden olur ve işlevsel Ras proteini serin-threonin kinaz Raf'a bağlanır ⁽³⁾. Raf proteini hücre zarında toplanır ve işlevsel hale geçer ⁽³⁾. Raf, gen transkripsiyonunun aktivasyonuna neden olan Mek1/Mek2 ve Erk üzerinden uyarı yolağını başlatır ⁽³⁾. Ayrıca Jnk/Sapk yolağının da Ph kromozomu pozitifliği üzerinde etkili olduğu ve malign transformasyon için gerekli olduğu görülmüştür ⁽³⁾. Böylece Ras üzerinden gelen uyarı GTP-GDP değişim faktörü Ras tarafından Gckr'e (germinal center kinase related) iletilir ve buradan da Jnk/Sapk yolağı aktive edilir ⁽³⁾. MAP kinaz yolağının üçüncü kolu p38'in, Ph kromozomu pozitif hücrelerde ve diğer mitojenik potansiyeli olan yollarda işlevsel olduğuna dair kanıtlar vardır ⁽³⁾.

1.3.2. Jak-Stat Yolağı

Normal hücre uyarı-iletiminde sitokinlerin reseptörsüz tirozin kinaza bağlanması ile reseptör aktive olur ve hücre içi bölgesi ile ilişki kuran Janus ailesi kinazları (JAKs) tirozin fosforilasyonu ile işlevselleşir ⁽²¹⁾. Jak'ın fosforile olmuş bölgelerine Stat (Signal transducer and activator of transcription) proteini

bağlanır ve fosforillenir ⁽²¹⁾. Fosforillenmiş Stat proteinleri birbirine bağlanarak dimer oluşturur, nukleusa geçer ve DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatır ⁽²¹⁾. Stat transkripsiyon faktörlerinin (Stat1 ve Stat5) sürekli fosforilasyonu birkaç Ph kromozomu pozitif hücre serisinde ve öncü KML hücrelerinde rapor edilmiştir ve Stat5 aktivasyonunun malign transformasyon ile ilişkili olduğu görülmüştür ⁽²¹⁾. Ph kromozomu pozitif hücrelerde Stat5'in etkisinin anti-apoptotik olduğu ve Bcl-xL'in transkripsiyonel aktivasyonuna karıştığı görülmüştür ⁽²¹⁾. Fizyolojik uyarı tarafından Jak/Stat yolağının aktivasyonunun aksine BCR-ABL, Jak proteinlerinin fosforilasyonu olmadan direkt olarak Stat1 ve Stat5'i aktive edebilir ⁽²¹⁾. P210^{BCR-ABL}, un aksine P190^{BCR-ABL}, da özellikle Stat6 aktivasyonu söz konusudur ⁽²¹⁾.

1.3.3. PI-3 Kinaz Yolağı

Fosfatidilinositol-3 (PI-3) kinaz enzim işlevi Ph kromozomu pozitif hücrelerin çoğalması için gereklidir ⁽²¹⁾. BCR-ABL füzyon proteini, Cbl, Crk ve Crkl gibi aktivatör moleküllerle birleşerek PI-3 kinazın aktivasyonuna neden olur. PI-3 kinaz yolağının aktivasyonu bir serin-threonin kinaz olan Akt silsilesini işlevselleştirir ⁽²¹⁾. Akt anti-apoptotik sinyalizasyona karışır ve işlevsel Akt, Bad, MDM2, IκB-kinaz alfa ve birtakım transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu ve hücre içi yerleşimini düzenler ⁽²¹⁾. IL-3 reseptörü ve pro-apoptotik protein olan Bad, Akt'nin önemli ara maddeleridir ⁽²¹⁾. Fosforile Bad, Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinlere ve sitoplazmik 14-3-3 proteinlerine bağlanamadığından işlevsiz hale gelir ⁽²¹⁾.

1.3.4. Myc Yolağı

Birçok insan malignitesinde myc onkoproteininin aşırı ifade edildiği gösterilmiştir ⁽²²⁾. Myc'in transkripsiyon faktörü gibi etki yaptığı düşünülmekte ancak hedef genleri geniş çapta tam olarak bilinmemektedir ⁽²²⁾. Myc'in aktivasyonu BCR-ABL'nin SH2 bölgesine bağlanmasıyla sağlanır ⁽²²⁾. V-abl-transforme hücrelerde elde edilen sonuçlar göstermiştir ki uyarıcı Ras/Raf, siklin bağımlı kinazlar (cdck) ve E2F transkripsiyon faktörü üzerinden Myc promotorunu aktive etmektedir ⁽²²⁾.

1.3.5. Apoptoz Önlenmesi

Ph kromozomu pozitif hücre serileriyle yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin DNA hasarı tarafından uyarılan apoptozise karşı dirençli oldukları gözlemlenmiş, ancak altında yatan mekanizmalar tam anlamıyla anlaşılamamıştır ⁽²²⁾. Önemli görüşlerden biri BCR-ABL'nin kaspazları aktive ederek mitokondriden sitokrom c salınımı engellemesidir ⁽²²⁾. Silsile şeklinde gerçekleşen kaspaz aktivasyonuna Bcl-2 ailesi üyelerinin aracılık ettikleri düşünülmektedir ⁽²²⁾. 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 ⁽²²⁾. Ayrıca Ph kromozomu pozitif hücrelerde Stat5'in aktivasyonu ile antiapoptotik bir protein olan BclxL'nin transkripsiyonel olarak işlevsel hale geçtiği belirlenmiştir ⁽²²⁾. Diğer bir görüş ise, proapoptotik bir protein olan Bad'in fosforilasyonudur ⁽²²⁾. Bad'in iki serin aminoasidinden Akt, Raf ve Ras proteinleri tarafından fosforile edildiği, ayrıca interferon uyuşum dizilerine bağlanma proteini'nin (ICSBP) düzenlenmesini değiştirerek apoptozisi inhibe ettiği düşünülmektedir ⁽²²⁾.

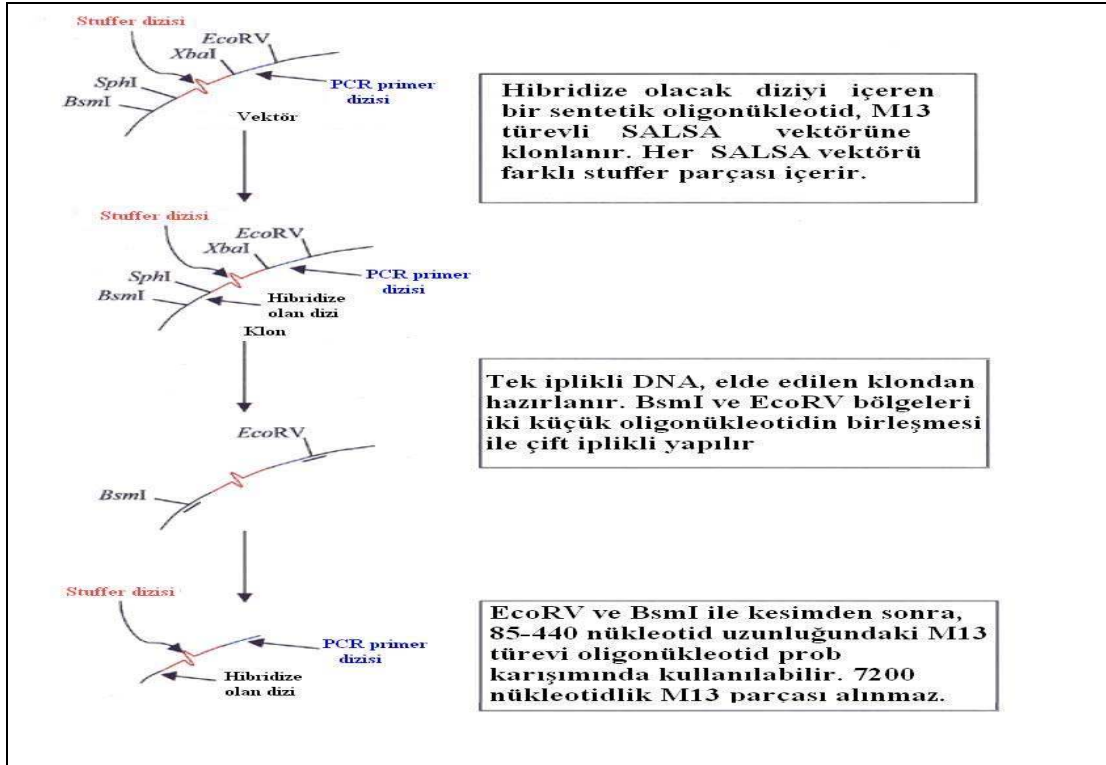
1.4. MLPA Yöntemi

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) ilk olarak J. Shouten ve arkadaşları tarafından 2002 yılında tanımlanan bir yöntemdir ⁽²³⁾. 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 ve Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) mutasyon tespiti gerçekleştirilebilmektedir ⁽²³⁾. MLPA yönteminde örnek nükleik asitleri değil, örneğe bağlanan probler amplifiye edilir ve ölçülür ⁽²³⁾. Probların, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR = Polymerase Chain Reaction) ile amplifiye olması probun hedef dizisinin örnekte bulunmasına dayalıdır ⁽²³⁾. Her prob, bir tanesi sentetik diğeri M13'den türemiş, hedef dizinin bitişik bölgesine hibridize olan iki oligonükleotid içermektedir ⁽²³⁾. Bu hibridize olan prob oligonükleotidleri, alt dizilerin amplifikasyonuna engel olmayacak şekilde yapışır (ligate edilir). Yapışan tüm probler yalnızca bir primer çiftini kullanarak normal

amplifikasyonun gerçekleşmesine müsaade edecek belirli bir sonlanma dizisine sahiptir ⁽²³⁾. Her prob 130 bç ve 480 bç (baz çifti) arasında oranlara sahip amplifikasyon ürününe göre farklı farklı pik verir ve analiz edilir ⁽²³⁾. Prob hedef dizileri küçüktür (50-70 nt=nükleotid). Ligasyon reaksiyonunun uygulanmış olması, tek nükleotid farklılıklarının ayırt edilmesinde avantaj sağlamaktadır ⁽²³⁾.

Kromozomlarda bulunan özgül kromozom dizi tekrarları (STR) kopya sayıları farklılıkları ile insan hastalık ve sendromları araştırılabilmektedir ⁽²³⁾. 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 prob kullanılmasıyla bir reaksiyonda DNA parçalarının amplifiye olmasında PCR'ın kullanılabileceğini göstermişlerdir ⁽²³⁾. 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 ⁽²³⁾. MLPA yöntemi MAPH ile benzer olmasının yanı sıra bu yöntemden daha hassas ve kolay uygulanabilir ⁽²³⁾. MAPH yönteminde örnek nükleik asitlerinin amplifiye olmasından farklı olarak eklenen oligonükleotid problemler amplifiye olur ⁽²³⁾. Örnek nükleik asitlerin tesbitlenmesi ve fazla problemlerin çıkarılması MLPA'da önemli değildir ⁽²³⁾. Her MLPA probu bir kısa sentetik oligonükleotid ve bir M13 fajından türetilmiş uzun oligonükleotid probu içermektedir ⁽²³⁾. 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 ⁽²³⁾. Uzun olan MLPA probunun hazırlanması için, 25-43 nükleotidlik hedefe özgü oligonükleotid, bir M13 türevi SALSA vektörüne klonlanır ⁽²³⁾. Elde edilen klonlar, *Escherichia coli* straini (ırkı) olan TG1 kültürüne alınır ⁽²³⁾. Tek iplikli DNA, faj parçalarını polyethyleneglycol ile çökelterek, virüsü ısı ile bozulup ve DNA'yı cetyl-trimethyl-ammonium bromide ile çökelterek saflaştırılır ⁽²³⁾. 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 ⁽²³⁾. Bu oligonükleotid prob, 5' fosforile ucunda 25-43 nükleotidlik hedefe özgü bölge

dizisini, işaretlenmemiş PCR primerinin tamamlayıcısı olan 36 nükleotidlik diziyi ve değişen uzunluklarda olan stuffer dizisini içerir (Şekil 4)⁽²³⁾. Kullanmadan önce 7200 nükleotidlik M13 parçasını ayırmak çok zor değildir. Tüm hedef diziyi özgü problemlerin erime (melting) sıcaklığı 100 mM NaCl 'de 65°C'nin üzerindedir. Hibridize prob kısımlarının tasarlanmasında geçerli veritabanları kullanılır ⁽²³⁾.

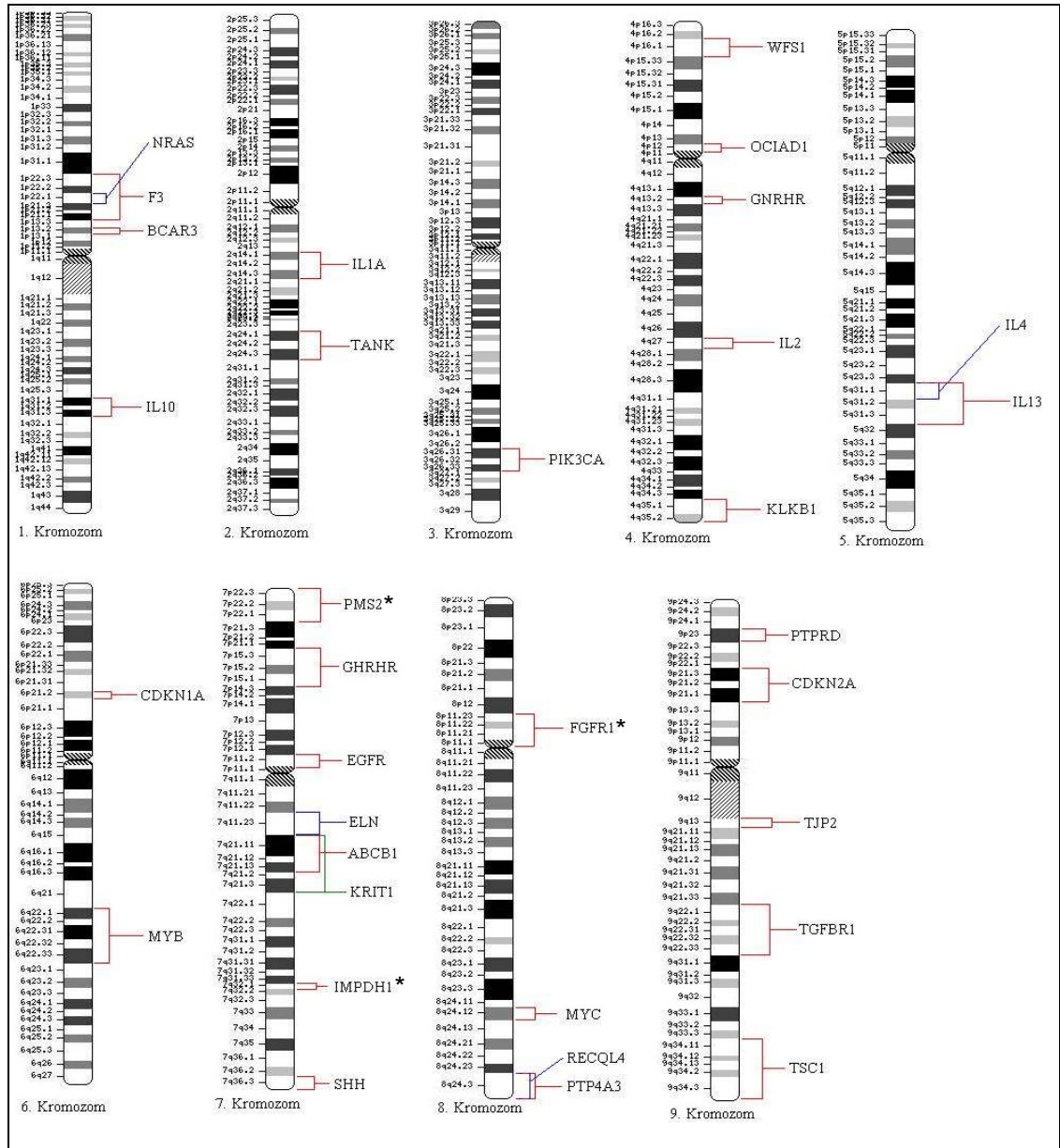


Şekil 4. Uzun olan M13 türevi MLPA oligonükleotid probunun hazırlanması ⁽²³⁾.

MLPA yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve yayınlanmış, pubmed ⁽²⁴⁾ 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 ⁽²⁵⁻²⁷⁾. KML ile ilişkili olarak MLPA yöntemi ile yapılmış bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

1.5. Taranan Genler

KML hastalarında MLPA yöntemi ile; BCAR3, F3, NRAS, IL10, IL1A, TANK, PIK3CA, IL13, IL4, CDKN1A, MYB, ABCB1, FGFR1, MYC, PTP4A3, RECQL4, CDKN2A, WFS1, OCIAD1, GNRHR, IL2, KLKB1, PMS2, GHRHR, EGFR, ELN, KRIT1, IMPDH1, SHH, PTPRD, TJP2, TGFBF1, TSC1 olmak üzere 33 genin bulundukları kromozom bölgelerindeki (1-9. kromozom) düzensizliklerin araştırılması planlanmıştır (Şekil 5) ⁽²⁸⁾.



Şekil 5. Taranan genlerin kromozomlar üzerinde yerleşimleri ⁽²⁸⁾.

* Duplikasyon saptanan genler.

1.5.1 GÖĞÜS KANSERİ ANTİÖSTROJEN DİRENCİ 3 (BCAR3)

Bu gen NSP2 (Novel SH2-Containing Protein 2) olarak da isimlendirilir ⁽²⁴⁾. İnsan 1. kromozomunun p kolunda yer alır (1p22.1) ve 285.359 bazdan oluşmaktadır ⁽²⁴⁾. Göğüs kanserinde, antiöstrojen tamoxifen hem öncü tedavi hemde gelişmiş metastatik hastalığın tedavisi için öngörülmüştür ⁽²⁴⁾. Östrojen reseptör pozitif hastaların çoğunda ilaç tedavisi ile hafifleme tetiklenmiş olsa da tüm hastalar bir süre sonra direnç göstermişlerdir ⁽²⁴⁾. Antiöstrojen direncinin moleküler mekanizmasını çözebilmek için van Agthoven ve arkadaşları 1998 yılında göğüs kanseri hücre hattına bir insersiyonal mutagenез stratejisi uyguladılar ⁽²⁴⁾. Enfekte hücreler; tamoxifen ayırımına tabi tutuldular ve dirençli klonlarda, genel bir integrasyon bölgesinin antiöstrojen direnci ile ilişkili olduğu gösterildi ⁽²⁴⁾. Van Agthoven ve arkadaşları, bölgeye özgü prob ile insan testis cDNA kütüphanesini görüntüleyerek BCAR3 kodlayan cDNA elde ettiler ⁽²⁴⁾. Ortaya çıkan 825 amino asitlik BCAR3 proteini, Src homology 2 (SH2) benzeri bir bölge ve maya CDC48 geni ile homolog bir dizi içermektedir ⁽²⁴⁾. Northern blot analizi, BCAR3'ün 3.4 kilobazlık (kb) transkripsiyonu ile kalpte, plasentada, iskelet kasında, dalakta, prostatta, testiste, ovaryumda, ince bağırsakta, kolonda, fetal böbrekte ve bazı kanser hücre hatlarında aşırı ifadesini tespit etmiştir ⁽²⁴⁾. Bu durum non-malignant göğüs dokusunda gözlenmemiştir ⁽²⁴⁾. Ayrıca iskelet kası ve kalpte, 6 kb BCAR3 transkripsiyonu tespit edilmiştir ⁽²⁴⁾. Integrin ve tirozin kinaz yolağı reseptörü ile BCAR3 geni farklılaşmalarının ilişkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır ⁽²⁹⁻³¹⁾.

1.5.2. PIHTILAŞMA FAKTÖRÜ III (F3)

Doku Faktörü (TF) veya Doku Tromboplastin olarak da adlandırılır ⁽²⁴⁾. İnsan 1. kromozomunun p kolunda yer alır (1p22-p21) ⁽²⁴⁾. 12.4 kb uzunluğunda 6 ekzondan oluşur ⁽²⁴⁾. Kanın pıhtılaşmasında ekstrinsik yolak, plazma faktör 7 (F7) ve F3 etkileşimi ile başlamaktadır ^(32,33). F3/F7 bileşeni, F3 ve enzimatik olarak işlevsel F7 (F7a) bileşenine dönüşür ^(32,33). Bu bileşen faktör 10, faktör 9 ve protrombin aktivasyonuna ve sonrasında fibrin oluşumuna neden olur ^(24,32,33). Bu işlemler, plazma proteaz inhibitörleri ve thrombomodulin-protein C yolağı ile kontrol edilir ⁽²⁴⁾. Ekstrinsik yolakda diğer bir kontrol mekanizması ise

TF yolak inhibitörü olarak adlandırılır ⁽³³⁾. F3 geninin olgun proteinlerinin ifadesinde 3 farklı bölgeye ihtiyaç duyulur (hücre dışı, zarlar arası ve sitoplazmik) ⁽²⁴⁾. F3'ün, fibroblastlar ve kan damarlarında dolaşan vasküler yumuşak kas hücreleri tarafından ifadesi vasküler bütünlük bozulduğunda pıhtılaşmayı başlatan hemostatik bariyer oluşumunu sağlar ⁽³²⁾. F3'ün kalp kasında ifadesi gerçekleşir ancak iskelet kasında gözlenmez ⁽²⁴⁾. Pıhtılaşmadaki proteaz aşamaları, birlikte hemostazı koruyan ekstrinsik (F3/F7a) ve intrinsik (F8a/F9a) yolaklarını kapsamaktadır. Bu genin hemostaz, tromboz, inflamasyon ve hücrel bağışıklık tepkisi ile ilişkili rahatsızlıklarda rolünün olduğu yapılan çalışmalar ile saptanmıştır ^(24,32,33).

1.5.3. NÖROBLASTOMA RAS VİRAL ONKOGEN HOMOLOĞU (NRAS)

Onkogen NRAS (NRAS1) ve Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom Tip 4 (ALPS4 Included) olarak da adlandırılır ⁽²⁴⁾. İnsan 1. kromozomunun p kolunda yer alır (1p13.2) ve 7 ekzon içermektedir ⁽²⁴⁾. RAS gen ailesine dahil bir onkogendir ⁽²⁴⁾.

Ras ailesi, H-ras, K-ras ve N-ras' tan oluşur ⁽³⁴⁾. Kanseri gelişiminde, Ras geni nokta mutasyonları rol oynar ⁽³⁴⁾. Embriyogeneizde, yara iyileşmesinde ve mitozun artmış olduğu durumlarda da genin ifadesi görülür. Ras proteinleri; zarı bulunduran Guanozin trifosfat (GTPase) işlevine sahiptir, hücre zarından nükleusa doğru olan uyarı iletilerinde ve hücre büyümesinde rol oynar ⁽³⁴⁾. Ras proteininin normal hücredeki görevi, uyarıcı uyarıların olduğu durumlarda Guanozin trifosfat (GTP)'a bağlanıp işlevsel hale geçerek uyarıcı uyarıları nükleusa iletmektir ⁽³⁴⁾. Bu sınırlı uyarı iletimi sona erdiğinde de GTP molekülünün GTPase enzimi aracılığıyla hidrolize olması sonucu Guanozin difosfat (GDP) proteinine bağlı işlevsiz formunu oluşturup, istirahat fazına dönmelerini sağlamak ve bir sonraki uyarıyı beklemektir ⁽³⁴⁾. Mutant Ras proteini GTPase işlevini inhibe ettiğinden, gen ürünleri kontrolsüz olarak üretilir ⁽³⁴⁾. H-ras 12. kodonda, K-ras 13. kodonda ve N-ras geni 61. kodonda kodlanır ⁽³⁴⁾. K-ras mutasyonu, en sık 12. kodonda görülür ⁽³⁴⁾. Bu kodonlardaki mutasyonlar, ras ailesinin GTPase işlevini değiştirebilir ve bunun sonucu olarak sürekli uyarı

işlevleri ortaya çıkar ⁽³⁴⁾. Uyarı silsilesinde oluşan bu mitojenik uyarılar, malign transformasyona neden olur ⁽³⁴⁾. En sık K-ras mutasyonu görülür ⁽³⁴⁾. H-ras mutasyonu daha seyrek ve N-ras mutasyonu ise çok nadirdir ⁽³⁴⁾.

N-ras geni, fibrosarkoma ve embriyonal rhabdomyosarcoma (RD) olmak üzere iki farklı insan sarkoma hücre hattında işleve sahiptir ⁽²⁴⁾. Ayrıca promyeloid lösemi hücre hattında ve nöroblastoma hücre hattında da işlevsel olduğu tespit edilmiştir ⁽²⁴⁾. N-ras normal fibroblastlarda ve tümör hücrelerinde aynı seviyelerde bulunmaktadır ⁽²⁴⁾. 4.3 kb ve 2 kb olmak üzere iki önemli transkripsiyon ürünü bulunmaktadır ⁽²⁴⁾. Golgi cisimciği ve plazma zarı arasında mekik dokuyan bir zar proteinini kodlamaktadır ⁽²⁴⁾. K-ras ve N-ras onkogenlerinin kolonda homeostaz ve tümorogenezi kontrol ettiği gösterilmiştir. Kolorektal kanser, tiroid karsinoma ve otoimmün lymphoproliferative sendromu ile N-ras mutasyonları arasındaki ilişkiler çeşitli çalışmalar ile araştırılmıştır ^(24,35). Ayrıca pankreas, akciğer ve myeloid lösemilerde N-ras mutasyonlarının da gerçekleştiği gösterilmiştir ⁽³⁶⁾.

1.5.4. İNTERLÖKİN 10 (IL10)

Sitokin Sentezi İnhibitör Faktörü (CSIF) olarak da isimlendirilir. İnsan 1. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (1q31-q32) ⁽²⁴⁾. Genomik DNA'da 5.2 kb'lık yer kaplayan bu gen 5 ekzon içermektedir ⁽²⁴⁾.

Sitokinler, doğal ve sonradan kazanılan bağışıklık yanıtı oluşumunda, bağışıklık sistemi hücrelerinin karşılıklı ilişkilerini düzenleyen protein veya glikoprotein yapısında maddelerdir ⁽³⁷⁾. Hücreler arası uyarı proteinleri olan sitokinler, bağışıklık ve inflamatuvar yanıt oluşumu, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi farklı birçok olayın düzenlenmesinde rol alırlar ⁽³⁷⁾. Th1 hücreleri interferon-gamma (IFN- γ), tümör nekroz faktör-alfa ve beta (TNF- α , TNF- β) ve interlökin-2 (IL-2) sitokinlerini salgımlarken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 sitokinlerini salgılar ⁽³⁷⁾.

IL-10, 36 kd'luk homodimerik bir sitokindir ⁽³⁸⁾. Sitokin sentezi engelleme faktörü olarak da adlandırılır. Çünkü Th1 hücre klonlarından salgılanan

sitokinlerin salgılanmasını engeller⁽³⁸⁾. IL-10, T ve B hücreleri ve makrofajlardan salgılanır⁽³⁸⁾. Farklı hücre tipleri üzerinde farklı etkileri vardır⁽³⁸⁾. B hücrelerindeki uyarıcı etkisi sonucu, MHC sınıf 2 ifadesi, B hücrelerinin çoğalması ve başkalaşması artar⁽³⁸⁾. Fakat monositlerin yüzeyinde MHC sınıf 1 ifadesini ve B7 ifadesini engelleyerek bunların T hücrelerini aktive etme kapasitesini azaltır⁽³⁸⁾. Ayrıca Sitotoksik T-Lenfosit (STL) yüzeyinde MHC sınıf 1 ifadesini azaltarak, STL aracılı lizise engel olur⁽³⁸⁾. IL-10, monosit ve makrofajlardan IL-1, TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 salgılanmasını ve T hücrelerinden IFN γ ve IL-2 salgılanmasını da engeller⁽³⁸⁾. Bu Th1 sitokinlerini engelleyici özelliklerinden dolayı IL-10 Th2 sitokin olarak sınıflandırılrsa da aslında bazı Th1 klonları da IL-10 salgılarlar⁽³⁸⁾. Ayrıca IL-10'un, IL-2'den yoksun T hücrelerinde ve bcl-2 proteinini arttırarak B hücrelerinde apoptozu engellediği görülmüştür⁽³⁸⁾. IL-10 kollajen I ifadesini azaltır, hücre içi kollajenazı arttırır⁽³⁸⁾. Bu sebeple anti-fibrotik işleve sahiptir⁽³⁸⁾. IL10'daki farklılaşmalar ile KML arasındaki potansiyel ilişki daha önceki çalışmalarda öne sürülmüştür⁽³⁹⁾.

1.5.5. İNTERLÖKİN 1- ALFA (IL1A)

IL1-Alfa olarak da isimlendirilen bu gen insan 2. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (2q14)⁽²⁴⁾. p15'li asidik form ve p17'li doğal form olmak üzere iki ayrı yapısal formu vardır⁽²⁴⁾. IL1A geni, 7 ekzon ve 6 intron içeren 10.206 bp'den oluşur⁽²⁴⁾.

İnterlökin-1 (IL-1) temel olarak monositler, makrofajlar, trombositler ve hasarlanmış endotelden salınan ve hemen hemen tüm doku ve organ sistemlerinde etkili olan polipeptid yapıda bir sitokindir⁽⁴⁰⁾. IL-1 akut ve kronik inflamasyonu indükleyen pro-inflamatuvar sitokinlerin prototipi olup prototipik alarm sitokini olarak da adlandırılır⁽⁴⁰⁾. IL-1; IL-1A ve IL-1B adı verilen biyolojik açıdan farklı iki alt gruptan oluşur⁽⁴⁰⁾. IL-1A genelde dolaşımda bulunmayan ve hücre ölümü esnasında hücrelerden salınan inflamatuvar ajan olarak görev yaparken, IL-1B hücre dışına salınan inflamatuvar ajandır⁽⁴⁰⁾. Bağlandığı hücrede temel olarak gen ifadesini arttırarak veya baskılayarak diğer sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve proteinlerin sentezini düzenler. IL-1, bağışıklık sistemi T lenfositler, B lenfositler, makrofajlar, kemik iliği hücreleri

üzerinden etkiler ⁽⁴⁰⁾. IL-1'in endotel üzerindeki etkileri aterogenez ve trombüs oluşumuna katkıda bulunmaktadır ⁽⁴⁰⁾. IL-1 endotel üzerinde adhezyon moleküllerinin ifadesini, prokoagülan işlevi, trombosit aktive edici faktör sentezini arttırır, vasküler düz kas hücre çoğalmasını uyarır ⁽⁴⁰⁾.

Makrofajlar, keratinositler, uyarılmış B lenfositler ve fibroblastlarında kapsayan çeşitli hücre tipleri tarafından sentezlenen IL1A ve IL1B proteinleri, inflamasyon ve bağışıklık'ta etkili arabulucudurlar ⁽²⁴⁾. Hem IL1A hem de IL1B, in vitroda osteoklast işlevini teşvik eder ⁽²⁴⁾. IL1A ve IL1B hücrenin programlanmış ölümünde (apoptoz) de etkin rol oynamaktadır ⁽²⁴⁾. IL1A geninde intron 6'da bulunan 46 bç uzunluğundaki VNTR (Variable Number Tandem Repeats) bölgesinde çeşitli polimorfizmler gerçekleşebilmektedir ⁽²⁴⁾. IL-1A'nın apoptoz gibi biyolojik işlevlerde rolünün olması kanser ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir ^(24,41).

1.5.6. TRAF AİLESİ ÜYESİ-İLİŞKİLİ NF-KAPPA-B AKTİVATÖRÜ (TANK)

Traf-ilişkili protein (ITRAF) olarak da isimlendirilir. İnsan 2. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (2q24) ⁽²⁴⁾. TRAF proteinleri TNF reseptör süperailisi ile ilişkilidir ⁽²⁴⁾. TNF süperailisi üyelerinden gelen uyarılara uyum gösterirler ⁽²⁴⁾. TRAF proteinleri, TRAF'ın korunmuş C-terminali (TRAF-C) bölgesini paylaşırlar ⁽²⁴⁾. Reseptörlerin etkileşiminde ve oligomerizasyonda işlevleri bulunmaktadır ⁽²⁴⁾. TANK, TRAF1, TRAF2 ve TRAF3'ün TRAF-C bölgesine bağlanır ⁽²⁴⁾. TANK'ın aşırı ifadesi, CD40, TNFR1 ve TNFR2'nin uyarıları ile işlevsel olan NF-kappa-B'yi engeller ⁽⁴²⁾. TANK'ın, sitoplazmada durgun fazda TRAF'ları ayırarak TRAF protein işlevini kontrol eden TRAF fonksiyonunu engellediği de düşünülmektedir ⁽²⁴⁾. TANK insanda TRAF2'nin saklı zar proteini 1 (LMP1)'e bağlanmasını, Epstein-Barr virüs transforme proteinini ve LMP1'in uyardığı NF-kappa-B aktivasyonunu engeller ⁽⁴²⁾. TANK sitoplazma içine bırakılır. LMP1 yokluğunda, TRAF2 benzer bir yerleşim düzenine sahiptir, TRAF2 ve TANK beraber bulunabilirler ⁽²⁴⁾. TANK insan dokularında, 2.3 kb'lık mRNA olarak ifade olur ⁽²⁴⁾. Onkogenik düzenlemeler ile

bağlantılı olan TRK'ya kaynaşmış geni (TFG) proteininin, NF-kappaB yolağında TANK ile ilişkisi gösterilmiştir⁽⁴²⁾.

1.5.7. FOSFATİDİLİNOSİTOL 3-KINAZ KATALİTİK ALFA (PIK3CA)

p110-ALFA olarak da bilinen bu gen, insan 3. kromozomunun q kolunda yer alır (3q26.3)⁽²⁴⁾. Fosfatidilinositol 3-kinaz 85 kd ve 110 kd'lik iki alt üniteden oluşmaktadır⁽²⁴⁾. 85 kd'lik alt ünite PI3-kinaz işlevini engeller ve 110 kd'lik (p110) alt ünite ile birleşmede teşvik rolünü oynayarak tirozin kinazı işlevsel hale getirir⁽²⁴⁾. Bir tümör süpresör geni olan PTEN, hücre büyümesini çeşitli mekanizmalar ile engeller⁽²⁴⁾. PTEN PIK3CA'nın en önemli ürünü olan PIP3'ü de defosforile eder⁽⁴³⁾. PIP3; fosforile olan protein kinaz B (AKT1, PKB) 'nin, hücre zarına geçişinde gereklidir⁽²⁴⁾. Hücre ölümünde PTEN'in etkisinin PIK3CA/AKT1 yolağı ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir⁽²⁴⁾. 3q26'da, PIK3CA'yı da kapsayan bölgede ovaryum ve çeşitli kanserlerle ilişkili tekrar sayısı artışı saptanmıştır⁽²⁴⁾. PIK3CA kopya sayısı ve PI3-kinaz işlevi arasındaki bu ilişki, PIK3CA'nın bir onkogen olabileceğini düşündürmektedir⁽²⁴⁾. Çünkü kanser ile ilişkili fonksiyonların çoğu, PI3-kinaz bağımlı uyarı iletimi ile ilişkilidir⁽²⁴⁾. PIK3CA geni ve kanser arasındaki ilişki, göğüs kanseri, ovaryum kanseri, kolorektal kanser ve hepatoselüler karsinoma çalışmaları ile de araştırılmıştır^(24,43).

1.5.8. İNTERLÖKİN 13 (IL13)

IL13 geni insan 5. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (5q31)⁽²⁴⁾. IL13 yapısal olarak IL3, IL5, IL4 ve GM-CSF (CSF2) genleri ile benzerlik gösterir⁽²⁴⁾. Ayrıca fonksiyon açısından IL-4'e benzer⁽⁴⁴⁾. Aktive T helper 2 lenfositleri ve alveolar makrofajlarda üretilir⁽⁴⁴⁾. Makrofajlarda ve epitelial hücrelerde enflamatuvar sitokinlerin yapımını azaltır ve enflamatuvar bir sitokin olan interlökin-1 reseptör antagonistini düzenler⁽⁴⁴⁾. Böylece IL-13 akciğerdeki enflamasyonu hafifletir⁽⁴⁴⁾. Erişkin fibrotik akciğer hastalıklarında, bronkoalveolar lavaj örneklerinde IL-13 konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir⁽⁴⁴⁾. Hayvan çalışmalarında IL-4 gibi IL-13'ün enflamatuvar akciğer hastalıklarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir⁽⁴⁴⁾. Buna karşın akciğer

hasarlanması olan prematüre bebeklerde IL-13 nadiren tespit edilebilmiş ve tespit edilebilenler ise biyolojik işlev için gerekli düzeyin altında bulunmuştur ⁽⁴⁴⁾.

IL13, alerjik astım, eozinofilik enflamasyon ve mukus sekresyonunda merkezi bir mediyatördür ⁽⁴⁴⁾. İmmünglobulin E üzerinde de güçlü etkileri vardır ⁽⁴⁴⁾. Bronkopulmoner displazinin uzun dönem komplikasyonlarından biri olan bronşiyal hiperreaktivite ile ilişkidir ⁽⁴⁴⁾. Deneysel hayvan çalışmalarında IL13'ün sepsiste önleyici etkileri bildirilmiştir ⁽²⁴⁾. IL10'a benzer yolla fakat ondan bağımsız olarak LPS'ye bağlı letal endotoksemiden koruduğu gösterilmiştir ⁽⁴⁴⁾. Erişkin septik hastalarda IL13 ile TNF- α arasında pozitif ilişki bulunmuştur ⁽⁴⁴⁾. Sepsisli çocuklarda ise zayıf IL13 yanıtının kötü prognozu işaret ettiği saptanmıştır ⁽⁴⁴⁾. Akciğer kanserinde ve T-hücreli lenfoma'da IL13'ün etkisinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır ^(45,46).

1.5.9. İNTERLÖKİN 4 (IL4)

B-cell stimulatory factor 1 (BSF1) olarak da adlandırılan bu gen insan 5. kromozomunun q kolunda yer alır (5q31.1) ⁽²⁴⁾. IL4 geni yaklaşık 10 kb boyutunda ve 4 ekzon içerir ⁽²⁴⁾. IL13 geni bu genin 12 kb kadar upstream bölgesinde yer alır ve yapısal olarak birbirine benzerler ⁽²⁴⁾.

IL-4 başlıca T lenfositlerde ve alveolar mast hücrelerinde sentezlenir ⁽⁴⁴⁾. Bazı sitokin ve büyüme faktörlerinin yapımını uyarırken, bazılarını da (özellikle interferon- γ) inhibe eder ⁽⁴⁴⁾. CD4+ T hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasına neden olur ve Th1 farklılaşmasını baskılar ⁽⁴⁷⁾. B lenfositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır ⁽⁴⁷⁾. B lenfositlerden IgE yapımını artırır ⁽⁴⁷⁾. Hayvan çalışmalarında akciğer enflamasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir ⁽²⁴⁾. Ancak akciğer fibroblastlarının çoğalmasını ve kollajen yapımını arttırma gibi olumsuz etkileri de vardır ⁽²⁴⁾. Erken doğan bebeklerde yeterli gelişmemiş akciğerin yeterli IL-4 sentezleyemediği düşünülmektedir ⁽⁴⁴⁾. RDS'li (Respiratuvar distres sendromu) bebeklerin trakeal aspiratında erken dönemde IL-4 düzeyinde anlamlı artış gösterilememiştir ⁽⁴⁴⁾. B lenfosit yüzey immünoglobülininin mononükleer fagosit zar yüzeyindeki antijen ile bağlanması ve yardımcı T lenfositlerden IL-4 salgılanması, B lenfosit çoğalmasını uyarır ⁽²⁴⁾.

Bunu takiben, bellek hücresi ve plazma hücresi farklılaşması için yardımcı T lenfositlerden IL-5 ve mononükleer fagositlerden IL-6 salgılanması sağlanır ⁽²⁴⁾.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, IL-4 geninin başlatma bölgesindeki T-alleleindeki bi-allellik polimerizasyonu ile SSPE (subacute sclerosing panencephalitis) arasında açık bir ilişki bulunmuştur ⁽⁴⁸⁾. İnterferon- γ , IRF-1 (interferon düzenleyici faktör-1) alleli ve IL-4 promotor gen-589 T genotipinin hareketi ile SSPE gelişimi bağlantılıdır ⁽⁴⁸⁾. IL-4 promotor 589 T genotipi ve IRF-1 alleli, en azından bir allel, SSPE' lerde kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur ⁽⁴⁸⁾. Diğer polimorfizmlerle SSPE arasında bağlantı saptanmamıştır ⁽⁴⁸⁾. Bu nedenle IL-4 promotor ve IRF-1 polimorfizmleri genetik faktör olarak Japonlarda SSPE' e duyarlılıkta katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir ⁽⁴⁸⁾.

1.5.10. SIKLIN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜ 1A (CDKN1A)

CDK geni ile ilişkili protein 1 (CIP1) veya yabanıl tip p53 işlevli kısım 1 (WAF1) olarak da isimlendirilmektedir ⁽²⁴⁾. İnsan 6. kromozomunun p kolunda yer almaktadır (6p21.2) ⁽²⁴⁾. Bu genin proteini olan p21 (21 kd) siklin-kinaz işlevini engeller ⁽²⁴⁾. p21 proteini tümör hücresinin büyümesini baskılamada p53'e aracılık eder ⁽²⁴⁾. p21'in; tümör hücre hattındaki aşırı ifadesi ile baskılanan koloni formu, p53'ün aşırı ifadesi sonucu oluşan baskılanmaya benzemektedir ⁽²⁴⁾. P21'in N-ucu, tümör hücre gelişimini baskılamada daha etkindir ⁽²⁴⁾. C-terminalindeki yarısında ise bu etki gözlenmemiştir ⁽²⁴⁾.

CDKN1A geninin promotor bölgesi, p53 proteinini tanıyan diziler içermektedir ⁽⁴⁹⁾. Ayrıca CDKN1A transkripsiyonu yabanıl tip p53 düzeyi ile kontrol edilir ⁽⁴⁹⁾. p21 proteini bir grup CDK-siklin bileşenini bağlar ⁽⁴⁹⁾. p21 işlevinin kaybı, TP53 mutasyonuna eşdeğer sayılabilir ⁽⁴⁹⁾. Ancak bugüne kadar, CDKN1A geninde somatik mutasyon saptanmamıştır ^(49,50). İmmünohistokimyasal p21 ifadesi, gelişim seviyesi ile ilişkisiz olarak pek çok gliomda saptanmaktadır ^(49,50). CDKN1A geninin 31. kodonundaki C/A transversiyonu sonucu serin yerine arjinin aminoasitinin kodlanmasıyla sonuçlanan bir polimorfizm tanımlanmıştır ⁽⁵¹⁾. AA genotipinin akciğer ve mesane kanser gelişimi ile, CC genotipinin ise özeferangal kanser oluşumu ile ilişkisi gösterilmiştir ⁽⁵¹⁾. Genin 3'

translasyona uğramayan bölgesinde yer alan (stop kodonunun 20 bazçift aşağısında) ve 31. kodon polimorfizmi ile bağlantı gösteren C/T polimorfizmi tanımlanmıştır ⁽⁵¹⁾. Bir çalışmada, CC genotipi ile karşılaştırıldığında, T alleli taşıyıcılarında (CT+TT genotipleri) prostat kanseri gelişim riskinin 2 kat arttığı gösterilmiştir ⁽⁵¹⁾. Cip/Kip aile üyesinden biri olan p27^{KIP1} (CDKN1B) geninin 109. kodonunda T/G değişimi sonucu glisin amino asiti yerine valin amino asiti kodlanmasıyla sonuçlanan bir polimorfizm tanımlanmıştır ⁽⁵¹⁾.

1.5.11. V-MYB AVİAN MİYELOBLASTOZ VİRAL ONKOGEN HOMOLOĞU (MYB)

Onkogen MYB veya onkogen AMV olarak da isimlendirilen bu gen insanda 6 kromozomun q kolunda yer almaktadır (6q22) ⁽²⁴⁾. Avian miyeloblastoz virüsü tavuklarda myeloid lösemiye neden olmaktadır ve MYB ile homolog RNA dizilerinin ifadesi, tüm olgunlaşmamış myeloid ve lenfoid T hücrelerinde tespit edilmiştir ⁽²⁴⁾. 6. kromozomun q kolu ve 7. kromozom arasındaki translokasyon ile tümör hücre hattında c-MYB ifadesi artışı gözlenmektedir ⁽²⁴⁾. MYB onkogeni ile T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) ilişkisi saptanmıştır ⁽²⁴⁾.

1.5.12. ATP-BAĞLAYICI KASET B ALT AİLESİ 1. ÜYESİ (ABCB1)

P-glikoprotein 1 (PGY1) veya multidrug direnç 1 (MDR1) olarak da isimlendirilir ⁽²⁴⁾. İnsan 7. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (7q21.1) ⁽²⁴⁾. ABCB1 4.5 kb'lık mRNA kodlamaktadır ⁽²⁴⁾. Tüm ilaca dirençli insan hücre hatlarında aşırı ifadesine rastlanmaktadır ⁽²⁴⁾.

ABC (ATP-bağlayan protein) taşıyıcı ailesi; ABCB1 tarafından kodlanan p-glikoprotein ve en azından 7 çeşit “multi drug direnci (MRP)” proteinden oluşmaktadır. Taşıyıcı proteinlerin ifadelerini düzenleyen genlerdeki (p53, N-MYC vb.) delesyonlar ya da artışlar bu proteinlerin ifadelerinin artmasına ve tüm hücrelerinin ilaca direnç göstermesine neden olur ⁽⁵²⁾. ABCB1, MRP1 ve MRP2 genleri polimorfik özelliktedir ancak klinik onkoloji ile ilişkileri henüz net olarak gösterilmemiştir ⁽⁵²⁾. ABCB1 geni tarafından kodlanan P-glikoprotein (PGP),

kanser ilaçlarını hücre dışına pompalar ⁽⁵³⁾. Bu nedenle ilaçlar yeterince etki gösteremez. ABCB1 geninde yapılan değişiklikler PGP yapımını engeller ⁽⁵³⁾. Hücrede yeterince PGP bulunmayınca, ilaçlar dışarı atılamaz ve gerekli etkiyi gösterene kadar hücre içinde kalırlar ⁽⁵³⁾. ABCB1 geni mutasyona uğrayan hastaların kemoterapiye cevap verme oranı, diğerlerine göre çok daha yüksektir ⁽⁵³⁾. Gastrik ve kolon kanserinde farklılaşmış ABCB1 mRNA ifadesi gösterilmiştir. Klinik kemoterapi için epigenetik mekanizmaları da tanımlanmıştır ⁽⁵⁴⁾.

1.5.13. FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ 1 (FGFR1)

FMS genine benzer tirozin kinaz 2 (FLT2) veya FMS genine benzer gen (FLG) gibi isimler ile de adlandırılmaktadır ⁽²⁴⁾. İnsan 8. kromozomunun p kolunda yer almaktadır (8p11.2-p11.1) ⁽²⁴⁾. FGFR1 geni fibroblast büyüme faktörü reseptörü olarak adlandırılan proteinin yapımını sağlar ⁽⁵⁵⁾. Bu protein; hücre bölünmesi, büyümesi ve olgunlaşması; kan damarlarının yapısı; yaraların iyileşmesi ve embriyonik gelişimde çok önemli işlevlere sahip birkaç fibroblast büyüme faktöründen birisidir ⁽⁵⁵⁾.

FGFR1 proteini hücre zarında uzanır, bir ucu hücre içinde kalırken diğer ucu hücrenin dış yüzeyine taşar. Bu yerleşim FGFR1 proteinine, hücre dışındaki özgül büyüme faktörleri ile etkileşim kurmaya ve hücrenin çevresine yanıt vermesine yardımcı uyarıları almaya imkân sağlamaktadır ⁽⁵⁵⁾. Büyüme faktörleri FGFR1 proteini ile temasa geçtiklerinde, reseptörler hücre içi kimyasal reaksiyonlar zincirini tetikler ⁽⁵⁵⁾. Bu reaksiyonlar, özgü fonksiyonlara olgunlaşma gibi hücreyi tamamıyla değiştirebilecek farklılıklara neden olabilir ⁽⁵⁵⁾. FGFR1 proteininin sinir sisteminin gelişiminde de önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir ⁽⁵⁵⁾. Ayrıca kemik gelişiminin kontrolünde yardımcı bir protein olarak da işlev görebilir ⁽⁵⁶⁾.

FGFR1; asidik FGF için bir zar reseptörü kodlar ⁽²⁴⁾. Asidik fibroblast büyüme faktörü (FGFA) de in vitro ve in vivo'da FGFR1'in tirozin kinaz işlevini uyarır ⁽²⁴⁾. Asidik ve bazik FGF'lerin her iki tipi de endotel çoğalımını ve hareketliliği arttırarak neovaskülarizasyonu hızlandırır ⁽²⁴⁾. Heparinin etkilerini

güçlendirir ⁽²⁴⁾. Bazik FGF, ayrıca kollajen sentezini de uyarır; yara kontraksiyonunu, epitelizasyonu, fibronektin ve proteoglikan sentezini uyarır ⁽²⁴⁾. Prostat kanseri ile FGFR1 arasındaki ilişki yapılan son bir çalışma ile araştırılmış ve prostat kanseri gelişimini tetikleyebileceği desteklenmiştir ⁽⁵⁷⁾. BCR-ABL baskılanmasının tirozin kinazlarla ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada FGFR1 geninde de farklılaşma olduğu gözlenmiştir ⁽⁵⁸⁾. KML ile ilgili olarak da atipik KML vakalarında gösterilen BCR geni ekzon 5 ile FGFR1 ekzon 9 ve 8 arasında gerçekleşen t(8;22) (p12;q11) translokasyonunda yer almaktadır ⁽¹⁵⁾.

1.5.14. V-MYC AVİAN MİYELOSİTOMATOZ VİRAL ONKOGEN HOMOLOĞU (MYC)

Onkogen MYC veya Avian Miyelositomatoz Viral Onkogen Homoloğu gibi çeşitli isimler alan bu gen insan 8. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (8q24.12-q24.13) ⁽²⁴⁾. MYC geni bir proto-onkogendir ⁽²⁴⁾. Myc genleri, DNA' ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar ⁽³⁴⁾. Bu proteinler hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında etkilidirler ⁽³⁴⁾. DNA sentezinin başlamasında rol alırlar ⁽³⁴⁾. Klonlandıkları kültürlerle ve elde edilme şartlarına göre bu genler, c-myc, N-myc ve L-myc şeklinde sınıflandırılır ⁽³⁴⁾. Bu gen, sıklıkla kazanım olması ve transkripsiyonun düzenlenmesinin bozulması ile onkogen halini alır. c-myc kazanımı olan hücrelerde büyüme faktörü gereksinimi azalır, hücre siklusunda G1 fazı kısalır ve bunun sonucunda çoğalma olur ⁽³⁴⁾. c-myc tümör büyüme hızında artış ve sağ kalımda kısalma ile ilişkilidir ⁽³⁴⁾.

Karsinomların %32'sinde myc proto-onkogeninin 2-15 kat artmış olduğu invazif duktal karsinomlarda ise myc geninin yapısal farklılıklar taşıdığı gösterilmiştir ⁽⁵⁹⁾. Bazen kötü gidiş ve sert klinik gidişe neden olan tümörlerde myc ifadesinin artışı gösterilmiştir ⁽⁵⁹⁾. Ancak myc'in, tümörün histolojik tipi ve derecesi ile ayrıca östrojen reseptörü görevi ile ilişkisi gösterilmemiştir ⁽⁵⁹⁾. Myc ifadesi tek başına meme karsinogenezi için yeterli olabilir ⁽⁵⁹⁾. Hatta myc'in hormona yanıt vermemede veya kemoterapiye dirençten sorumlu olduğu ileri sürülür ⁽⁵⁹⁾. Yaşlı kadınlarda meme kanseri ile c-myc proto-onkogeni arasında yakın bir ilişki bulunmuştur ⁽⁵⁹⁾. c-myc gen amplifikasyonu meme kanserindeki

en sık rastlanan genetik değişikliklerden biridir. Meme kanserlerinin 1/3'i bu genetik değişikliği taşıır⁽⁵⁹⁾.

1.5.15. PROTEİN-TİROZİN FOSFATAZ, TİP 4A (PTP4A3)

PRL3 olarak da bilinen bu gen insan 8. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (8q24.3)⁽²⁴⁾. PRL3 proteini PRL1 (PTP4A1) ile %76 oranında ve farede Prl3 ile %96 oranında özdeştir⁽²⁴⁾. Northern blot analizi ile 2.3 kb transkripsiyon ürününün öncelikle kalp ve iskelet kasında ve düşük olarak da pankreasta ifadesi olduğu gösterilmiştir⁽²⁴⁾. Tris glycine jel analizi ile PRL3'ün 22 kd'lık bir protein olarak ifadesi olduğu hesaplanmıştır⁽²⁴⁾. Artmış hücre büyümesinde PRL3'ün aşırı ifadesi gözlenir⁽²⁴⁾. PRL3, çalışılan 18 kanser metastazında yüksek ifade seviyeleri ile saptanmıştır⁽²⁴⁾. Ancak metastatik olmayan tümörlerde ve normal kolorektal epitelinde düşük seviyelerde saptanmıştır⁽²⁴⁾. Çalışılan 12 metastazın 3'ünde PRL3 geninin, 8q24.3'de yer alan küçük bir ifade bölgesinde, dizi tekrarları bulunmuştur. PRL3 geninin kolorektal kanser metastazında önemli rolü bulunmaktadır⁽²⁴⁾. Mikro-array analizi kullanılarak; fare fibroblastlarında DNA hasarını takiben, Prl3'ün p53(TP53) downstream düzenleyicisi olduğu anlaşılmıştır⁽²⁴⁾. İnsanda da PRL3, hücre döngüsü ilerleyişinde hem pozitif hem de negatif kontrollü olarak çeşitli işlevlere sahiptir^(24,60). PRL3'ün bir onkogen olabileceğine dair çeşitli araştırmalar yapılmıştır; PRL3, kolon karsinom hücreleri ve osteosarkoma hücreleri gibi insan tümör hücre hatlarının bazılarında etkin olamamıştır ancak fibrosarkoma hücrelerinde olduğu gibi bazı hücre hatlarında da bu etkiyi gösterme potansiyeline sahiptir⁽²⁴⁾. PRL3'ün hücre döngüsündeki işlevi tümöröenez sonrasında olmayabilir⁽⁶⁰⁾.

1.5.16. RECQ PROTEİN-BENZERİ 4 (RECQL4)

DNA Helikaz, Recq-benzeri, tip 4 (RECQ4) olarak da adlandırılan bu gen, insan 8. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (8q24.3)⁽²⁴⁾. Werner sendromu ve Bloom sendromundan sorumlu olarak tanımlanmış genler ile, çift iplikli DNA'yı tek iplikli DNA'ya çözen bir DNA helicaz kodlayan *Escherichia coli* RecQ geni homolog genlerdir⁽²⁴⁾. Diğer ökaryotik homologlar arasında RECQL

de bulunmaktadır ⁽²⁴⁾. RECQL4 3,627 baz içerir ve 1.208 amino asitlik bir protein kodlar ⁽²⁴⁾. Bu proteinin sentezi öncelikli olarak timüs ve testislerde gerçekleşmektedir ⁽²⁴⁾. RECQL4 HeLa hücrelerinin sitoplazmik içeriğinde bulunur ⁽²⁴⁾. En çok çalışma Rothmund-Thomson sendromu ile yapılmıştır ⁽²⁴⁾. UV kaynaklı DNA hasarlarının tamirinde RECQL4 geninin rolü olduğu da savunulmaktadır ⁽⁶¹⁾.

1.5.17. SIKLIN-BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜ 2A (CDKN2A)

CDKN2, CDK4 İnhibitörü, Multiple tümör supressör 1 (MTS1) veya TP16 gibi birçok isimle de adlandırılır ⁽²⁴⁾. İnsan 9. kromozomunun p kolunda yer almaktadır (9p21) ⁽²⁴⁾. CDKN2A geni, 2 hayati hücre döngüsü kontrol yolağı olan p53 (TP53) yolağı ve retinoblastoma yolağını kontrol eder ⁽²⁴⁾. CDKN2A geni, bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p16 ve p14 (p53 ifadesini düzenleyici MDM2 proteinine bağlanan) proteinlerini üretir ⁽²⁴⁾. Gen; 125 bç'lik ekzon 1 (E1), 307 bç'lik E2 ve yalnızca 12 bç'lik E3 olmak üzere 3 ekzon içerir ⁽²⁴⁾.

Hücre döngüsünün kontrol mekanizmasında çok çeşitli proteinler yer alır. Özellikle G1 fazının ilerlemesinin kontrolünde etkili proteinlerde meydana gelen değişiklikler pek çok kanserin gelişimine katkıda bulunur ⁽⁶²⁾. Bu proteinler G1 siklinler, G1-CDK işlevini kontrol eden p16 proteini ve G1-CDK tarafından kontrol edilen Rb proteinidir ⁽⁶²⁾. CDKN2A'nın pankreatik kanser, lösemi, özofagal ve gastrik kanserler, mesane kanseri, diyabet ve çeşitli kanser tipleri ile ilişkileri çeşitli çalışmalar ile araştırılmıştır ⁽²⁴⁾. CDKN2A geninde tanımlanan A148T varyantı erken yaşta gelişen meme malign melanom ve akciğer kanserleri ile ilişkilendirilmiştir ⁽⁵¹⁾.

1.5.18. WOLFRAMİN (WFS1)

İnsan 4. kromozomunun p kolunda yer alır (4p16.1) ⁽²⁴⁾. Büyüklüğü 33.4 kb'dır ve 8 ekzon bölgesi içerir ⁽²⁴⁾.

Wolfram sendromu, diabetes mellitus, diabetes insipidus ve optik atrofi ile karakterize, otozomal resesif geçen bir sendromdur ⁽⁶³⁾. 1998'de pozisyonel klonlamayla iki grup, bu sendromu yapan patojen geni belirlemişlerdir ⁽⁶³⁾. Nokta

mutasyonlar, çıkarma ve ekleme gibi en az 40 tane mutasyon şekli vardır ⁽⁶³⁾. İlginç olarak tüm mutasyonlar WFS1'in son ekzonu olan 8. ekzon üzerindedir ⁽⁶³⁾. Bu gen tarafından kodlanan zarlar arası proteinin işlevi henüz bilinmemekle beraber, mitokondrial DNA (mtDNA) ile etkileşimi mitokondriyal hastalıklara benzeyen hastalık belirtilerinden sorumlu tutulur ve bu hastalıkta mtDNA'da (mitodondriyal DNA) çoklu delesyonlar saptanmıştır ⁽⁶³⁾. Psikiyatrik hastalıklar özellikle de depresyon, bu sendromun sık rastlanan bileşenlerindendir ⁽⁶³⁾.

Wolfram sendromu ile bağlantılı olarak 4p16 üzerinde 4 aday gen tespit edilmiştir ⁽²⁴⁾. Bunlardan bir tanesi de wolframin olarak adlandırılan ve 890 amino asitlik bir zarlar arası protein kodlayan WFS1'dir ⁽⁶⁴⁾. Bu protein; beyin ve pankreas dokularında bulunur ⁽²⁴⁾. Wolfram sendromlu hastalarda da işlev kaybına neden olmuş her iki allelindeki mutasyonla ortaya çıkar ⁽⁶⁴⁾. Wolframin, beyin, pankreas, kalp ve pankreatik neoplazmların %35- 40'ını oluşturan insulinoma tümörü beta-hücre hatlarında yüksek seviyelerde ifade olur ⁽²⁴⁾. Biyokimyasal metotlar kullanılarak; WFS1 proteininin öncelikle endoplazmik retikulum'da (ER) yer alan bir H-sensitive zar glikoprotein olduğu gösterilmiştir ⁽²⁴⁾.

1.5.19. OCIA BÖLGESİ TAŞIYICI 1 (OCIAD1)

OCIA, Ociad1 veya TPA018 gibi birçok farklı isimle de adlandırılan bu gen, insan 4. kromozomunun p kolunda yer almakta (4p12) ve 30,817 bazdan oluşmaktadır ⁽²⁴⁾. OCIA bölgesi taşıyıcı protein 1 olarak adlandırılan ve yeni tanımlanmış 245 amino asitlik bir protein kodlamaktadır ⁽⁶⁵⁾.

OCIAD1, ovaryum kanseri ile ilişkilendirilmiştir. 29 kd'lik OCIAD1 proteininin metastatik dokularda, öncü tümör doku ile kıyaslanınca, aşırı ifade olduğu tespit edilmiştir ⁽⁶⁶⁾. Ovaryum kanserindeki fonksiyonunun, hücre yapışmasındaki etkisiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir ⁽⁶⁶⁾. OCIAD1'in hücre metastazındaki potansiyel rolünün engellenmesiyle ilgili olarak çeşitli çalışmalar halen sürdürülmektedir ⁽⁶⁶⁾.

1.5.20. GONADOTROPİN-SALGILAYICI HORMON RESEPTÖRÜ (GNRHR)

GRHR ve Luteinizing Hormon-Salgılayıcı Hormon Reseptörü (LHRHR) olarak da adlandırılır ⁽²⁴⁾. İnsan 4. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (4q21.2) ⁽²⁴⁾. Bu gen 3 ekzon içeren 18.9 kb'den daha büyük bir gen olup mRNA'sı yaklaşık olarak 5 kb uzunluğundadır ⁽²⁴⁾.

Gonadotropin-salgılayıcı hormon (GNRH), çoğalma ile ilgili süreçlerde anahtar bir nöroregülatör olarak işlev gören bir hipotalamik decapeptid'dir ⁽²⁴⁾. Hipotalamik nöronlar tarafından sentezlenir, pulsatil yola salınır ve hipotalamofizyal portal döngü yolu ile hipofiz bezinin anterior lobunda taşınır ⁽²⁴⁾. GNRH'ın hipofiz bezindeki öncü aktivasyon bölgesi gonatrop'dur ⁽²⁴⁾. Hücre, gonadların gametogenik ve hormonal fonksiyonlarını kontrol etmede rol oynayan GNRH reseptörlerinin ifadesini sağlar ve gonatropik hormonları salgılar ⁽²⁴⁾. GNRH reseptörü, G-protein çifti Ca^{2+} bağımlı reseptör ailesinin bir üyesidir ⁽⁶⁷⁾. Hipofiz gonatroplarının hücre yüzeyinde bulunur ⁽⁶⁷⁾. GNRHR, GNRH uyarılarını algılar, luteinizing hormon ile folikül stimüle edici hormon sentez ve salınımı ayarlar ⁽⁶⁷⁾. Cinsiyet hormonları bağımlı tümörlerin gelişiminde luteinizing hormon salgılayıcı hormon analogları tarafından engelleme gözlenir ⁽²⁴⁾. LHRH, prostat ve göğüs kanserlerinde tedavide kullanılabilir ⁽²⁴⁾. Kallmann sendromu ile ilişkili olan hypogonadotropik hypogonadizm ve GNRH geni çalışılan bir çalışmada dört bireyin ikisinin GNRHR geninde bileşik heterozigot missense mutasyon saptanmıştır ⁽⁶⁸⁾. Buna benzer çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır ⁽⁶⁸⁾.

1.5.21. İNTERLÖKİN 2 (IL2)

T-Hücresi Büyüme Faktörü (TCGF) olarak da adlandırılır ve insan 4. kromozomunun q kolunda yer alır (4q26-q27) ⁽²⁴⁾. T hücresi büyüme faktörü de denilen (TCGF) IL-2, T lenfositlerinin hücre siklusunun G1 fazından S fazına ilerlemesinden sorumlu olan sitokindir ⁽²⁴⁾. IL-2, CD4+ T hücreleri tarafından kısmen de CD8+ T hücreleri tarafından üretilir. IL-2, kendisini üreten hücrelere etki edip kendi oluşumunu sağlar, bu onun otokrin büyüme faktörü işlevini

gösterir ⁽⁶⁹⁾. Ayrıca parakrin büyüme faktörü olarak da etkisi mevcuttur ⁽⁶⁹⁾. IL-2, IFN- γ ve lenfotoksin gibi T hücresinden kökenini alan sitokinlerin sentezini uyarır ⁽⁶⁹⁾. IL-2 reseptörü iki polipeptid zincirinden meydana gelir ⁽²⁴⁾. İlk saptanan IL-2R α olup 55 kd'lik bir polipeptittir ve T hücresi aktivasyonunda rol oynar ^(24,69). İkincisi IL-2R β 'dir. 70-75 kd'lik kısmıdır ⁽²⁴⁾. IL-2'nin bu reseptöre bağlanma eğilimi IL-2R α 'dan yüksektir ⁽²⁴⁾. IL-2R β 'nin ifadesi sonucu oluşan 64 kd'lik polipeptide IL-2R γ denir ⁽²⁴⁾. IL-2 sadece IL-2R $\beta\gamma$ 'yı ifade eden hücrelerin büyümesine neden olur ⁽⁶⁹⁾. Tirozin kinazın IL-2 aracılığıyla T hücresi büyümesinin uyarılmasında yer aldığına dair bulgular vardır ⁽⁷⁰⁾. Ancak bunun nasıl olduğu tam olarak belli değildir ⁽⁷⁰⁾.

IL-2, NK (Natural Killer, Doğal öldürücü) hücrelerinin büyümesini uyarır ve onların sitolitik fonksiyonlarını artırır ⁽²⁴⁾. Bunu lenfokinle aktive edilmiş öldürücü hücreler (LAK) üreterek yapar ⁽²⁴⁾. IL-2, diğer sitokinlerle sinerjik etkiyle NK hücreleri tarafından IFN- γ salgısını artırır ⁽²⁴⁾. IL-2 insan B lenfositlerine etki ederek hem büyüme faktörü olarak hem de antikor sentezi uyaranı olarak etki gösterir ⁽⁶⁹⁾. Diğer hücre topluluklarına IL-2'nin etkisi daha az tanımlanmıştır ^(69,70).

1.5.22. PREKALLİKREİN EKSİKLİĞİ (KLKB1)

Fletcher Faktörü Eksikliği (PKK Deficiency) ve KLK3 gibi birçok isimle de isimlendirilir ⁽²⁴⁾. İnsan 4. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (4q35) ⁽²⁴⁾. Doğu Kentucky'de tanımlanamayan pıhtılaşma hasarı nedeniyle ortaya çıkmıştır ⁽²⁴⁾. Anormal bir kanama eğilimi olmamasına ve normal protrombin zamanına rağmen kanda çok uzun süreli kısmi tromboplastin zamanı (APTT) ve ertelenmiş tromboplastin yenilenmesi ile fark edilmiştir ⁽²⁴⁾. Çeşitli çalışmalarda, prekallikrein noksanlığının hemostaz'da, fibrinolizis'te, inflamatuvar tepkide ya da lökosit fonksiyonunda klinik olarak önemli bir etkiye sahip olmadığı savunulmuştur ⁽²⁴⁾. Bunlardan farklı olarak bazı çalışmalar ile de prekallikrein'in tromboz'daki rolü araştırılmıştır ^(24,71). Prekallikrein noksanlığında, KLKB1 geninin 5. ekzonundaki homozigot bir 430 C-T farklılaşması tanımlanmıştır ^(24,71).

1.5.23. POSTMAYOTİK ARTMIŞ SEGREGASYON, *S. Cerevisiae*, 2 (PMS2)

Mismatch Tamir Geni (PMSL2) ya da Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC4) olarak da isimlendirilir ⁽²⁴⁾. İnsan 7. kromozomunun p kolunda yer alır (7p22) ⁽²⁴⁾. PMS2 geni 16kb olup 15 ekzon içerir ⁽²⁴⁾. DNA onarım mekanizmalarından olan DNA mismatch (yanlış eşleşme) tamirinde (MER) rol alan genlerden bir tanesidir ⁽²⁴⁾. Diğerleri ise; MSH2, MLH1 ve PMS1'dir ⁽²⁴⁾. PMS2 ve MLH1'in bir heterodimeri olan MutL-alpha, mismatch tamiri içine gereklidir. PMS2'nin 1'den 5. ekzonuna kadar hepsinin ya da bazılarının kopyalarını taşıyan 14 PMS2 yalancı geni tanımlanmıştır ⁽²⁴⁾. Bir başka pseudogen olan PMS2CL ise PMS2 geninin 9. ekzonu ile 11'den 15. ekzonuna kadar olan ekzon bölgelerini taşır ⁽²⁴⁾.

PMS2 geni, HNPCC (kalıtsal polipozis kolon kanseri) aile öykülü hastalarda kendini delesyonla göstermiştir ^(72,73). Tümörsüz dokularda heterozigot mutasyonlar tespit edilirken tümör dokusunda PMS2 geninde mutasyon tespit edilmiştir ^(72,73). Kolorektal kanserde önemli bir rolü olan PMS2 geninde gerçekleşen mutasyonlar, otozomal resesif kalıtımı olan mismatch tamir kanserinde de (Turcot sendromu olarak da bilinen) önemli rol oynamaktadır ⁽⁷⁴⁾. Erken teşhisli beyin tümörlerinde de PMS2 geninin 14. ekzonunda gerçekleşen homozigot bir mutasyon tanımlanmıştır ⁽²⁴⁾.

1.5.24. BÜYÜME HORMONU SALGILAYICI HORMON RESEPTÖRÜ (GHRHR)

Büyüme Hormonu Salgılayıcı Faktör Reseptörü (GHRFR) olarak da bilinen bu gen insan 7. kromozomunun p kolunda yer almakta (7p15-p14) ve 10'dan fazla ekzonu bulunmaktadır ⁽²⁴⁾. Somatokrin (GHRH), 44 aminoasitli bir peptiddir ⁽²⁴⁾. Büyüme hormonu (GH) salgılanmasını uyarır ⁽²⁴⁾. Fazlalığında gigantizm ve akromegali; eksikliğinde cücelik görülür ⁽²⁴⁾. Hipotalamustan pulsatil bir şekilde salgılanır ve uyku sırasında salgılanması en yüksek düzeye çıkar ⁽²⁴⁾. GHRHR ile GHRH arasındaki yakın ilişkiden dolayı da GHRHR genindeki mutasyonlar büyüme hormonu eksikliği vakalarında ön plana

çıkılmaktadır ⁽²⁴⁾. GHRH reseptörü/G proteini/Adenil-siklaz/cAMP yolunda GTPaz mutasyonu varsa c-AMP yapımı durmaz ⁽⁷⁵⁾. Hücre döngüsünü kontrol eden siklin D1 ve D3 sürekli uyarılır ⁽⁷⁵⁾. Rb proteininin, fosforilasyonu sonucu transkripsiyon faktörü olan E2F serbest kalır ve hücre döngüsü G1 fazından S fazına ilerler ⁽⁷⁵⁾. Ayrıca pRb ile E2F'in birleşmesini engelleyen ras geni de uyarılır ⁽⁷⁵⁾.

1.5.25. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFR)

Onkogen ERBB, ERBB1 ve ya HER1 gibi birçok isimle adlandırılır ⁽²⁴⁾. İnsan 7. kromozomunun p kolunda yer almaktadır (7p12.3-p12.1) ⁽²⁴⁾. EGFR 170 kd'lik, zarlar arası bir tirozin kinaz reseptörüdür ⁽⁴⁹⁾. Ara maddesi olan EGF ve TGF- α (transforming growth factor alpha) ile hücre dışı kısmıyla ilişki kurar, bunu reseptör ara madde internalizasyonu, lizozomal yıkım ve uyarı azalması izler ⁽⁴⁹⁾. EGFR geni hücre çoğalmasının kontrolünde rol almaktadır ve astrositik tümörlerde en sık artış gösteren onkogendir ⁽⁴⁹⁾. Glioblastomların üçte birinde artış gösterdiği veya aşırı ifade olduğu saptanmaktadır ^(49,76,77).

Tirozin kinazlar hem normal hücre büyümesi ile hem de malign dönüşüm ile ilişkili proteinlerdir ⁽³⁴⁾. EGFR, tirozin kinaz işlevine sahip bir zarlar arası glikoprotein olduğundan pek çok çalışmada anormal EGFR uyarı iletimi ve EGFR düzenleme bozukluğunun tümör gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ⁽³⁴⁾. EGFR' nin apoptozun engellenmesi, hücre hareketliliğinde artış, protein salınımında artış, adhezyon, hücre yaşam süresinde artış, farklılaşma, anjiyogenez ve metastaz gelişimi gibi pek çok olayda önemli rol aldığı gösterilmiştir ⁽³⁴⁾. Yüksek düzeyde EGFR ifadesi ileri evre hastalık, metastatik fenotip gelişimi, sağ kalımda azalma ve kötü gidiş ile ilişkili bulunmuştur ⁽³⁴⁾. Özellikle yassı hücreli akciğer kanserlerinde normal dokunun 2-3 katı EGFR ifadesi söz konusudur ⁽³⁴⁾.

Hücre zarı reseptörü olan EGFR ailesi; EGFR, HER2, HER3 ve HER4'den oluşur. Bu aileye ait üyeler transfosforilasyon sonucu bir seri etkileşimler ile heterodimerler oluşturabilirler ve farklı protein ailelerinin işlevini düzenlerler ⁽⁵⁹⁾. EGF'nin reseptörüne bağlanması ile reseptör uyarılır ve EGF

iletisi hücre içine alınır, aynı zamanda EGFR'nin otofosforilasyonuna ve diğer hücre içi substratların fosforilasyonuna yol açar ⁽⁵⁹⁾. Bu yol ile nukleusta transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu artar, hücre bölünmesi uyarılır. Hücre zarından nukleusa doğru uyarı iletiminin aktarılmasında proto-onkogen ailesinden bazı üyeler (ras, src ailesi gibi) buna aracılık etmektedir ⁽⁵⁹⁾. Bu uyarı iletim akışında yer alan birçok proto-onkogen çeşitli kanserlerde etkili bulunmuştur ⁽⁵⁹⁾. Bu akış boyunca ortaya çıkan onkogenik mutasyonlar devamlı olarak mitozu aktive eden uyarıların taşınmasında rol alırlar. EGFR gen ifadesinin artışının kötü gidiş ile ilişkili olduğu birçok karsinomda gösterilmiştir ⁽⁵⁹⁾. Kanser hücrelerinde EGFR gen ifadesi artışının gözlenmesi onun onkogen olduğunun göstergesidir ⁽⁵⁹⁾. Meme kanserlerinde EGFR ifadesi artışı bulgularına karşılık herhangi bir mutasyon bildirilmemiştir ⁽⁵⁹⁾. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık olarak yarısında EGFR'nin aşırı üretimi saptanır ⁽⁵⁹⁾. Çalışmaların çoğunda EGFR ile ER ifadesi ve tekerrürlü yaşamda kalım arasında negatif bir ilişki olduğu bulunmuştur ⁽⁵⁹⁾. 459 hasta ile yapılan prospektif bir çalışmada EGFR ifadesi ile hem hastalıksız dönem hemde yaşam süresi arasında oldukça yakın bir bağlantı olduğu tespit edilmiştir ⁽⁵⁹⁾. EGFR ifadesinin özellikle invazif lobular karsinomlu hastalarda daha önemli olduğu, EGFR ifade seviyesi yüksek olan bu hastalarda diğer meme kanser alt tiplerine göre hayatta kalmanın çok kısa olduğu bildirilmiştir ve bu tip için önemli bir prognostik belirteç olabileceği vurgulanmıştır ⁽⁵⁹⁾.

1.5.26. ELASTİN (ELN)

İnsan 7. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (7q11.2) ⁽²⁴⁾. Genomik DNA'da yaklaşık 45 kb'lik yer kaplar ve 34 ekzon içerir ⁽²⁴⁾. Elastin bağ-doku ve kas iskelet sisteminin normal gelişimi ve fonksiyonu için zorunlu bir gendir ⁽⁷⁸⁾. Genin 28. ekzonunun dâhil olduğu 7q11.23 bölgesinde bulunan bir kırılma noktasından translokasyon meydana gelebilir ⁽⁷⁸⁾. Bu translokasyon ve supravavlar aortik stenosis (SVAS) rahatsızlığı arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir ⁽⁷⁸⁾. Williams-Beuren sendromundan (WBS) ise 7q11.23'de gerçekleşen delesyon sonucu oluşan homozigot mutant ELN geninin sorumlu olduğu bulunmuştur ⁽²⁴⁾. Williams Beuren sendromu tanısı konmuş 65 hastanın 61'inde ELN lokusunda delesyon olduğu rapor edilmiştir ⁽²⁴⁾. Bu niteliğinden

ötürü Williams Beuren sendromunda görülen yüz ifadesi dâhil tüm kas-iskelet sistemi ve kalp-damar anomalilerinin temel sebebinin elastin yetersizliği olduğu düşünülmektedir ^(78,79). ELN geni Williams Beuren Sendromu ve SVAS dışında Cutis Laxa rahatsızlığı ile de ilişkilendirilmiştir ⁽⁷⁹⁾. Bu rahatsızlıkta ise ELN geninin 30. ekzonundaki 1 bç'lik delesyonun (2159delC) varlığı söz konusudur ^(24,78,79).

1.5.27. KREV INTERACTION TRAPPED 1 (KRIT1)

CCM1 Geni (cerebral cavernose malformation 1) olarak da bilinir ve insan 7. kromozomunun q kolunda yer alır (7q11.2-q21) ve 19 ekzon içerir ⁽²⁴⁾. Bu ekzonlardan 3 tanesi kodlanmamaktadır ⁽²⁴⁾. KRIT1, HeLa hücresi cDNA kütüphanesi ile KREV1 (RAP1A)'in işlevini tanımlarken izole edilmiştir ⁽²⁴⁾. KRIT1, KREV1 ile güçlü etkileşim içindedir. KRIT1'in KREV1 işlevlerini kontrol ettiği düşünülmektedir ⁽²⁴⁾. KRIT1 mRNA'sı düşük seviyelerde ifade olmaktadır ⁽²⁴⁾. KRIT1'in, serebral kavernöz malformasyonların (CCM1) patogenezindeki integrin uyarı iletiminde, hücre adhezyonunu etkileyerek rol oynadığı düşünülmektedir ⁽⁸⁰⁾. Ayrıca KRIT1; endotel hücrelerinin yapısının ve fonksiyonunun belirlenmesinde, hücre iskelet yapısını koruyup hücre-hücre ve hücre-matriks iletişimine olanak sağlayarak, yardımcı olabilir ⁽⁸¹⁾.

1.5.28. İNOZİN 5' MONOFOSFAT DEHİDROGENAZ 1 (IMPDH1)

Leber konjenital amaurosis tip XI ve IMPDHL1 Included gibi farklı isimler ile de bilinmektedir ⁽²⁴⁾. İnsan 7. kromozomunun q kolunda yer alır (7q31.3-q32) ⁽²⁴⁾. Pseudogeni olan ve 16. kromozomda bulunan STS ile dizi benzerliği %90, diğer pseudogeni IMPDH2 ile %72 oranındadır ⁽²⁴⁾. Leber congenital amaurosis olarak adlandırılan görme bozukluğu ve retinitis pigmentosa olarak adlandırılan halk arasında "tavuk karası" denen kalıtsal görme bozukluğu ile ilişkili olarak yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır ⁽²⁴⁾.

IMPDH1 geninde, adRP (otozomal dominant retinitis pigmentosa) hastalarında yapılan mutasyon tarama çalışmalarında vakaların %2'si bu gende mutasyon taşımaktadır ⁽⁸²⁾. İzole LCA (Leber konjenital amaurosis) vakalarında

da mutasyon gösterilmiştir. Crx-/Crx- nakavt fare ile yapılan çalışmalar bu genin retinadaki transkriptinin normal faredeki transkriptine oranla altı kat az olduğunu göstermiştir ⁽⁸²⁾. RP'ye (retinitis pigmentosa) neden olan pek çok fotoreseptörlere özgül gen CRX'in kontrolü altındadır ⁽⁸²⁾. Bu nedenle bu farede IMPDH1'in az sentezlenmesi, bu geni retina tahribatları için iyi bir aday haline getirmektedir. IMPDH1 mutasyonlarının enzim işlevini etkilemekten çok proteinin tek zincirli nükleik asit bağlama özelliğini değiştirdiği gösterilmiştir ⁽⁸²⁾.

1.5.29. SONIC HEDGEHOG (SHH)

İnsan 7. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (7q36) ⁽²⁴⁾. Gelişen embriyonun organizasyon ve morfolojisinde, yapımsal iletişim serileri söz konusu olmaktadır ⁽²⁴⁾. SHH erken embriyonun biçimlenmesinde rol alan bir uyarı kodlar ⁽²⁴⁾. Bu, Hensen nodunda, nöral tüpün ventral plağında, erken gut endoderminde, uzuv tomurcuklarının posterior kısmında ve notokorda boyunca ifade olur ⁽²⁴⁾. Omurgalılarda motor nöron kimliğinin oluşumunda da SHH uyarı yolağının rolü olduğu belirlenmiştir ⁽²⁴⁾. Ayrıca SHH ve reseptörleri olan PTCH (9q22.3) ile SMOH (7q31-q32) ifadeleri, öncü ve farklılaşmış hematopoetik hücrelerde (miyeloid, B ve T hücreleri) tespit edilmiştir ⁽²⁴⁾. SHH; BMP uyarı iletimine dayalı olarak öncü hematopoetik hücrelerde önemli bir düzenleyicidir ⁽²⁴⁾.

SHH yolağının mutasyonlarında akciğerler dâhil birçok organı etkileyen sendromik konjenital malformasyonlar olur ⁽⁸³⁾. SHH uyarı yollarının bozulmasının Pallister- Hall, VACTERL (vertebral, anal, kardiak, trakeoösefageal, renal ve ekstremité anomalileri) ve Smith-Lemli-Opitz sendromuna yol açtığı gösterilmiştir ⁽⁸³⁾. Pallister-Hal sendromu otozomal dominant geçen bir bozukluk olup kromozom 7p13'deki Gli3 genindeki mutasyonlara bağlıdır. Smith-Lemli-Opitz sendromunda kolesterol yapımı için gerekli olan Δ -7-dehidrokolesterol redüktaz enzimi yoktur; bu enzimin yapılamaması, muhtemelen SHH işlevinde değişikliğe neden olarak farelerde akciğerlerde hipoplaziye ve solunum yetmezliğine neden olmaktadır ⁽⁸³⁾.

1.5.30. PROTEİN-TİROZİN FOSFATAZ RESEPTÖR-TİP DELTA (PTPRD)

İnsan 9. kromozomunun p kolunda yer almaktadır (9p24.3-p23) ⁽²⁴⁾. Northern blot analizi ile farede 3 mRNA türünün beyin, böbrek ve kalpte ifade olduğu gösterilmiştir ⁽²⁴⁾. Beyin örneklerinde uygulanan in situ hibridizasyon tekniği ile de mRNA'nın hipokampus, talamik retiküler nukleus ve piriform korteks'te ifadesinin varlığı tespit edilmiştir ⁽²⁴⁾. Farede bulunan bu genin PTPRD geni ile çok yakın homolog olduğu bulunmuştur ⁽²⁴⁾. Ayrıca farede tespit edilen bu bulgular ile faredeki gene yapısal olarak çok benzeyen insan LAR (PTPRF, Leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase) geninin, PTPRD gen ürünlerine benzer olabileceği düşüncesi güçlenmiştir ⁽²⁴⁾. Ancak LAR geni öncelikli olarak epitelyum orijinli hücrelerde ve T-hücrelerinde eksprese olmaktadır. PTP-delta ise beyin, böbrek, kalp ve bazı B-hücre hatlarında sınırlanmıştır ⁽²⁴⁾. Ayrıca LAR insan 1. kromozomunun p kolunda yer alır (1p34-p32) ⁽²⁴⁾.

1.5.31. TIGHT JUNCTION PROTEİN 2 (TJP2)

Zona Occludens 2 (ZO2) olarak da adlandırılan bu gen insan 9. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (9q12-q13) ⁽²⁴⁾. 25 ekzon içeren bu gen genomik DNA'da 90 kb'dan fazla yer kaplamaktadır ⁽²⁴⁾. Tight junction proteinleri (TJPs) epitelyal ve endotelial hücre içi bağlantıların organizasyonunu kapsayan zar-ilişkili guanilat kinaz (MAGUK) homologları ailesine dayanmaktadır ⁽²⁴⁾. TJP'ler bağlantısal zarlar arası proteininin sitoplazmik C ucuna bağlanır ve onları aktin hücre iskeletine bağlar ⁽²⁴⁾.

TJP2, bazı ribonükleer proteinlerle yapısal benzerlik gösterir ve insan RD proteini ile %38 oranında bir benzerliği paylaşır ⁽²⁴⁾. Köpeklerden izole edilen ZO2 geni insan ZO2 geni ile karşılaştırıldığında insan ve köpek proteinlerinin %87 oranında aminoasit kimliği benzerliği gösterdiği anlaşılmıştır ⁽²⁴⁾. ZO2 geninin ZO2A ve ZO2C olmak üzere iki izoformu tanımlanmıştır ⁽²⁴⁾. Bazı göğüs adenokarsinomalarında, göğüs kanseri hücre hattında ve duktal tip pankreatik adenokarsinomada ZO2A ifadesi baskılanır ⁽²⁴⁾. Hiperkolanemi

(hypercholanemia) ile ZO2 ilişkili çalışmalar bulunmaktadır ⁽⁸⁴⁾. Bu çalışmalarda TJP2 geninin homozigot değişimi ve BAAT geni mutasyonu ile hastalık ilişkisi araştırılmıştır ^(24,84).

1.5.32. TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-BETA RESEPTÖR, TİP I (TGFB1)

Aktivin Reseptör- benzeri Kinaz 5 (ALK5) olarak da isimlendirilen bu gen insan 9. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (9q33-q34) ⁽²⁴⁾. 31 kb uzunluğunda olup 9 ekzon içermektedir ⁽²⁴⁾. Büyüme faktörü reseptörlerinin çoğu, zarlar arası tirozin kinazdır ya da sitoplazmik tirozin kinaz ile ilişkilidir ⁽²⁴⁾. Diğer zarlar arası reseptörler sınıfının ise serine/threonine kinaz olarak fonksiyon gösterdikleri öngörülür ⁽²⁴⁾. Çeşitli biyolojik işlevlerinden en önemlisi olarak, TGFB1'in farklı türlerinin hücre çoğalma ve farklılaşmasında, etkin bir biçimde yapı oluşumunu kontrol ettiği düşünülmektedir ⁽²⁴⁾. TGF-beta'nın proteinlere bağlanmasında tip1 ve tip2 reseptörlerinin birlikte rol oynadığı ve biyolojik işlevlerde etkin oldukları bulunmuştur ⁽⁸⁵⁾. TGFB1, TGFB2'ye bağlanarak ve TGFB1 aktivasyonunun gerçekleştiği nadir bir uyarı mekanizması ile hücre döngüsü ilerleyişini düzenlemektedir ^(24,85). TGFB1 reseptörü birçok insan tümör hücresinde işlevsiz durumda olabilir ^(24,85).

TGF-Beta peptidleri, hücre büyümesini, farklılaşmasını, adhezyonu, göçü, angiogenezi, hücre dışı matriks yapısını ve bağışıklık işlevlerini etkileyen çok yönlü polipeptidlerdir. TGF- β , in vitro olarak kanserli hücre çoğalmasını baskılar ⁽³⁴⁾. İn vivo olarak ise kanser gelişimini arttırdığı gösterilmiştir. Kanserli hücreler engelleyici işlevlere karşı direnç geliştirirler ⁽³⁴⁾.

1.5.33. HAMARTİN (TSC1)

Bu gen 23 ekzon içerir ve insan 9. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (9q34) ⁽²⁴⁾. Proteini 1.164 aminoasitten oluşur ve hesaplanmış ağırlığı 130 kd'dir ⁽²⁴⁾. Hamartin proteini tuberöz skleroz-1'de hasarlı olarak bulunur ⁽²⁴⁾. Tuberöz skleroz 2'de hasarlı olarak bulunan ve RAP1, RAB5 için GTPaz işlevi olan Tüberin (TSC2) proteini ile homolojisi bulunmamaktadır ⁽²⁴⁾.

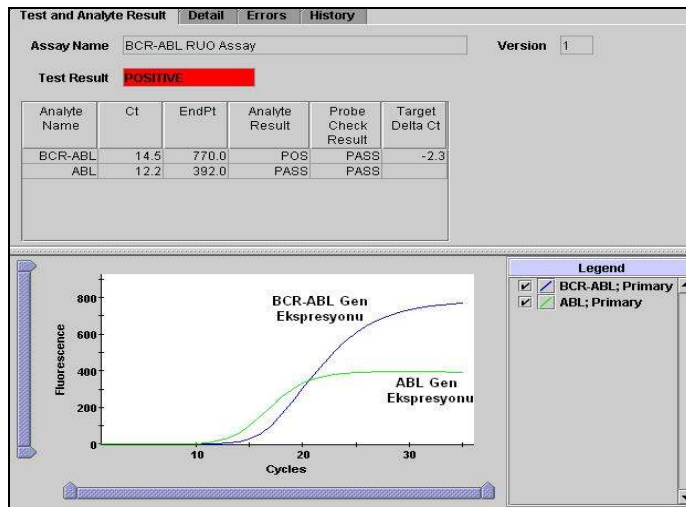
TSC1 geninin aşırı ifadesi fare fibroblastlarının büyümesini engeller ve hücre morfolojisinde değişimlere neden olur ⁽²⁴⁾. Hamartin, G1 fazının kontrolünü serbest bırakarak hücre biçimlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir ⁽²⁴⁾. Ayrıca tuberoz skleroz ile TSC1 gen mutasyonları ilişkisi birçok çalışmada araştırılmıştır ⁽²⁴⁾. Bu çalışmalardan bazılarında TSC1'in bir tümör süpresör gen olarak davrandığı bildirilmiştir ⁽²⁴⁾.

Tüberöz skleröz bileşeni ektodermal ve mezodermal dokuların kontrolsüz çoğalmasına bağlı kalıtsal bir hastalıktır ⁽⁸⁶⁾. Geçişli otozomal dominant olmasına karşın olağan mutasyonlar nedeniyle sporadik olgulara da oldukça sık rastlanmaktadır ⁽⁸⁶⁾. Tüberöz skleröz bileşenine yol açan iki adet gen lokusu tarif edilmiştir; TSC-1 geni ve 16. kromozomun p kolunda bulunan Tüberöz skleröz bileşen-2 geni ⁽⁸⁶⁾. Bu gen tüberin adı verilen guanozin trifosfatı aktive eden bir proteini tanımlar ⁽⁸⁶⁾. Bu rahatsızlık, en çok merkezi sinir sistemi, deri, retina, böbrek ve kalbi tutar ⁽⁸⁶⁾. Akciğerler, dalak, lenf nodları, gonadlar, endokrin bezler ve kemik daha az oranda etkilenebilir ⁽⁸⁶⁾.

KML'de, Ph kromozomunun rolünün yanı sıra diğer gen düzensizliklerinin de rolü olabileceğinden, başka genlerin de araştırılması önemlidir. Bu düşünceden yola çıkılarak yapılan çalışmamızda MLPA yöntemi ile KML tanısı konmuş hastalarda kromozomal düzensizlikler taranması amaçlanmıştır. Özellikle onkogen (MYB, MYC, NRAS vb.), transkripsiyon faktörü (RENT2, NFKBIA vb.), uyarı iletimi (PIK3CA, IMPDH1, PTPRD vb.), sitokin (IL1, TANK, IL13 vb.), bağışıklık sistemi (TGFB1, PTP4A3) ve apoptoz (MOAP1, BAX, PDCD8 vb.) ile ilişkili yaklaşık 33 genin yer aldığı kromozom bölgelerindeki düzensizlikler araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların klinik parametrelerle ilişkili olup olmadığı karşılaştırılmıştır.

2. Materyal ve Metod

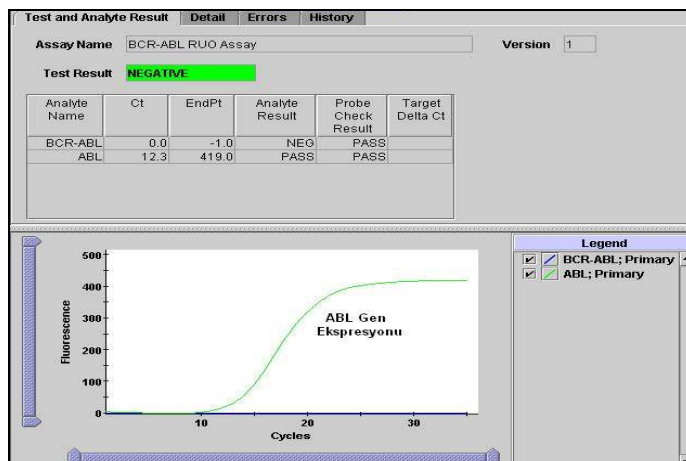
Periferik kan yayması veya kemik iliği incelemesi ile birlikte RT-PCR (GeneXpert DX system) yöntemi kullanılarak Ph pozitif ya da negatif tanısı konan 63 birey çalışmaya dâhil oldu (Şekil 6,7) ⁽⁸⁷⁾. Kronik Myelositer Lösemi tanısı konmuş Ph pozitif 48 hasta ve kontrol olarak alınan 15 sağlıklı bireyden 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. Saklanan periferik kan örnekleri izole edildikten sonra 33 genin yer aldığı kromozom bölgelerindeki düzensizlikler MLPA yöntemi ile analiz edilip klinik parametrelerle (Sokol risk derecelendirmesi; periferik eosinofil; kemik iliği retiküler lif derecesi; hemoglobin, lökosit ve trombosit sayıları; 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım ve imatinib tedavisine yanıt) karşılaştırılarak değerlendirildi.



Şekil 6. GeneXpert DX System
Ph pozitif sonuç.

ABL: İnternal PCR kontrolü

BCR-ABL:Transkript PCR ürünü ⁽⁸⁷⁾



Şekil 7. GeneXpert DX System
Ph negatif sonuç.

ABL: İnternal PCR kontrolü

BCR-ABL:Transkript PCR ürünü ⁽⁸⁷⁾

2.1. DNA İzolasyonu

Edta'lı tüplere alınmış kandan DNA izolasyonu yapabilmek için birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlardan çoğunun temeli aynı esasa dayanmaktadır. Tuzla çöktürme metodu en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir ⁽⁸⁸⁾;

2.1.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi

1. EDTA'lı tüpte bulunan 1 ml periferik kan 15 ml'lik falkon tüpüne aktararak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu (0.155M NH_4Cl ; 10mM KHCO_3 ; 0.1mM Na_2EDTA ; pH 7.4) eklenir. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
2. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atılır. Pellet üzerine 2 ml eritrosit lizis tamponu eklenir. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
3. Pelet üzerine 200 μl %10'luk SDS (Sodium dodecyl sulphate), 20 μl proteinaz K (20mg/ml) ve 1 ml WBCL (White Blood-Cell Lysis) tamponu (75mM NaCl; 25 mM Na_2EDTA ; pH 8.0) eklenerek 56°C'de su banyosunda gece boyunca bekletilir.
4. İnkübasyon sonrası üzerine 400 μl Amonyum asetat (9.5 M) eklenip iyice karıştırılır. 20 dakika +4°C ve 4500 rpm'de santrifüj edilir.
5. Süpernatant yeni bir falkon tüpe alınır, pellet atılır. Ayrı tüpe aktarılan supernatantın üzerine -20°C'de beklemekte olan %99'luk etanol'den 2 ml eklenir ve DNA'nın yüzeyde toplanması sağlanır.
6. Toplanan DNA pipet yardımıyla alınarak, 100 μl %70 etanol içeren bir eppendorf tüpüne aktarılır.
7. Maksimum hızda (13.000 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülür ve süpernatant atılır.
8. Etüvde kapakların ağzı açık bırakılarak DNA üzerinde kalan alkol uzaklaştırılır.

9. Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100–300 µl kadar TE (Tris-EDTA) tamponu (1M Tris-HCl; 0.5M EDTA; pH 8.0) eklenir.
10. 56°C'de 1 saat bekletilerek DNA'nın TE tampon içerisinde iyice çözülmesi sağlanır.
11. Elde edilen stok DNA'lar -20°C saklanır.

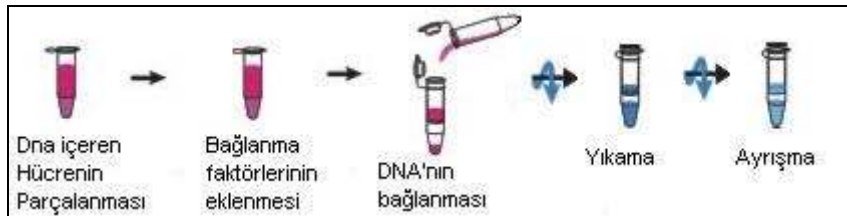
2.1.2. Tuzla Çöktürme Yöntemi ile Kandan DNA İzolasyonu İşleminde Kullanılan Araç ve Kimyasallar

1. 15 ml'lik Falcon Tüp
2. EDTA (Sigma)
3. SDS (Merck)
4. Amonyum Asetat (Merck)
5. Mezür
6. Erlen
7. Etanol (Sigma)
8. Mikropipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 Scorex, Rainin, Eppendorf)
9. Steril sarı ve beyaz pipet uçları (Eppendorf)
10. 1.5 ml'lik Eppendorf tüpleri (Axygen)
11. Eppendorf tüp taşıyıcıları
12. Vorteks (Heidolph Reaks Top)
13. Santrifüj Aleti (Sigma 1-15)
14. Su banyosu (Nüve BM 302)
15. Steril lateks eldiven

2.1.3. Ticari Kit ile 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, filtreler 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 (Şekil 8) ⁽⁸⁹⁾.



Şekil 8. DNA izolasyonunun aşamaları ⁽⁸⁹⁾.

2.1.4. Ticari Kit ile 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 (Ayrıştırma 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

2.2. MLPA Yöntemi ile Analizlerin Yapılması

2.2.1. Yöntem

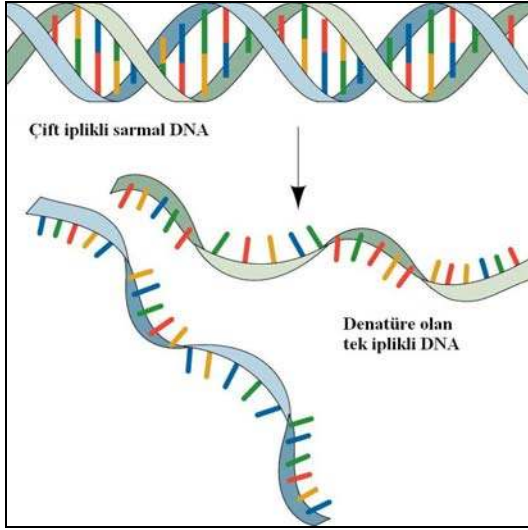
Çalışmamızda Salsa MLPA (Mrc-Holland Salsa MLPA P005 LN:0308, P253 LN:0407) kitleri kullanılarak hedef DNA dizisi ile prob hibridizasyonu, ligasyon ve amplifikasyon gerçekleştirildi (Tablo1,2).

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 5 dakika ABI-9700 thermal cycler ile denature edilir (Şekil 9 ve 10)^(89,90).
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. Birleşmiş oligonükleotidler, 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. Bu basamaktaki tamponlar kullanım öncesinde taze olarak hazırlanıp, kullanılır.
5. Ligaz enzimi 98°C'de 5 dakika ısıtılarak işlevsiz hale getirilir ve ligasyon ürünleri PCR ile amplifiye edilir (Şekil 11)⁽²³⁾.
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 tüp kabı 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.

2.2.2. Analiz

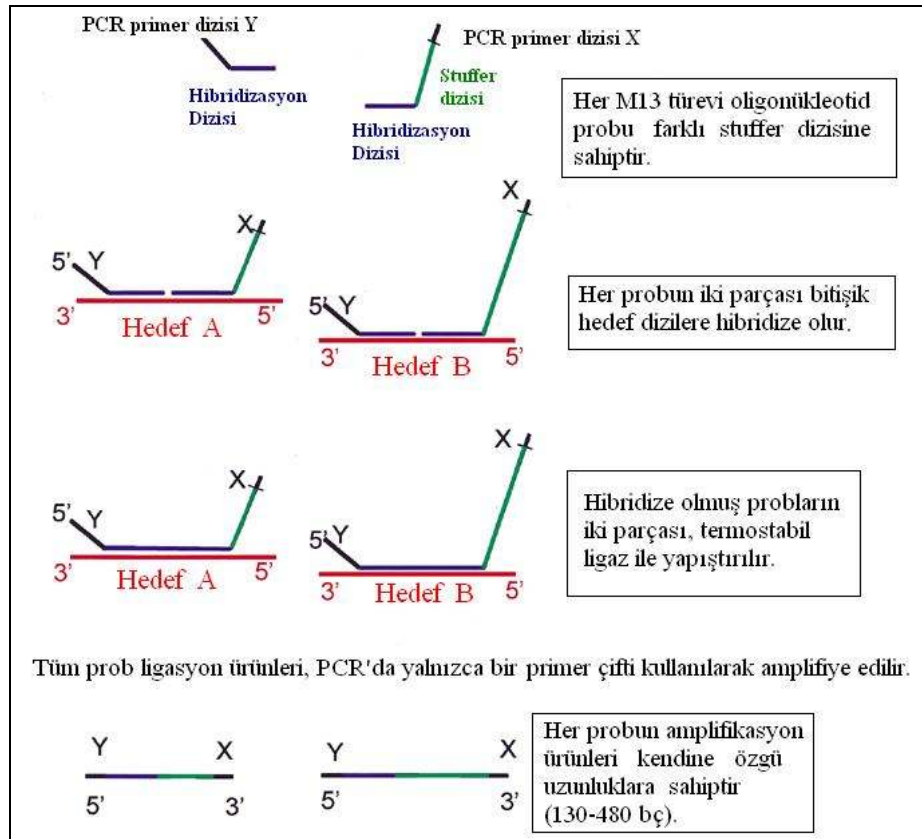
Cihazda yürümüş örneklerin analizi GeneScan® yada GeneMapper® ile analiz edildikten sonra Microsoft Excel tabanlı bir program olan MRC Coffalyser programı ile hesaplanır. BCAR3, F3, NRAS, IL10, IL1A, TANK, PIK3CA, IL13, IL4, CDKN1A, MYB, ABCB1, FGFR1, MYC, PTP4A3, RECQL4, CDKN2A, WFS1, OCIAD1, GNRHR, IL2, KLKB1, PMS2, GHRHR, EGFR, ELN, KRIT1, IMPDH1, SHH, PTPRD, TJP2, TGFR1, TSC1 olmak üzere 33 genin bulundukları kromozom bölgeleri (1-9. kromozom) üzerindeki düzensizlikleri, hedef dizinin kopya sayısının kontrol ile karşılaştırılmasıyla belirlenir (Tablo 1,2). Ligasyonu gerçekleşmeyen (hedef dizi ile tam olarak birbirini karşılamadıkları için birleşmeyen) problemler, primer çiftlerinden ikisini birden taşımadıkları için amplifiye olamazlar.



Şekil 9. Denatürasyon ile ayrılan DNA çift ipliği ⁽⁸⁹⁾.



Şekil 10. ABI 9700 thermal cycler cihazının görünümü ⁽⁹⁰⁾.



Şekil 11. MLPA Reaksiyonları ⁽²³⁾.

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.

SALSA MLPA P253

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Gen	Kromozomdaki Yeri
4. Kromozom			
229	5376-L4767	WFS1	4p16.1 / 04-006.3
310	8307-L5155	OCIAD1	4p12 / 04-048.5
178	4446-L4183	GNRHR	4q13.2 / 04-068.3
445	0627-L0183	IL2	4q27 / 04-123.6
382	1136-L0694	KLKB1	4q35 / 04-187.4
7. Kromozom			
355	1186-L0901	PMS2	7p22 / 07-006.0
418	7215-L6865	GHRHR	7p15 / 07-031.0
301	5961-L5378	EGFR	7p11.2 / 07-055.2
346	1335-L0879	ELN	7q11.23 / 07-073.1
400	4349-L3769	KRIT1	7q21 / 07-091.7
190	6989-L6591	IMPDH1	7q32.1 / 07-127.8
136	6358-L5874	SHH	7q36.3 / 07-155.3
9. Kromozom			
257	8333-L8202	PTPRD	9p23 / 09-008.7 / exon 44
172	8332-L8201	PTPRD	9p23 / 09-008.7 / exon 27
142	8331-L8200	PTPRD	9p23 / 09-008.7 / exon 11
463	8330-L8199	PTPRD	9p23 / 09-008.7 / exon 4
364	8329-L8198	PTPRD	9p23 / 09-008.7 / exon 1
274	1291-L0835	CDKN2A	9p21 / 09-022.0 / exon 3
265	2238-L0961	CDKN2A	9p21 / 09-022.0 / 5' of exon1
211	8308-L5164	TJP2	9q13 / 09-071.0
409	4653-L4037	TGFBR1	9q22 / 09-100.9
427	1234-L5678	TSC1	9q34 / 09-134.8

Tablo 1. Salsa MLPA P253 (LN:0407) kiti ile taranan genlerin prob isimleri, nükleotid uzunlukları ve kromozomal yerleşimleri.

SALSA MLPA P005

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Gen	Kromozomdaki Yeri
1. Kromozom			
328	0346-L0172	F3	01p22-p21 / 01-094.8
418	0714-L0140	BCAR3	01p22.1 / 01-093.9
472	1032-L0604	NRAS	01p13.2 / 01-115.1
193	0612-L0050	IL10	01q31 / 01-205.0
2. Kromozom			
256	0518-L0098	IL1A	02q14 / 02-113.3
220	0670-L0379	TANK	02q24 / 02-161.8
3. Kromozom			
265	0840-L0588	PIK3CA	03q26.3 / 03-180.4
5. Kromozom			
274	0468-L0051	IL13	05q31 / 05-132.0
154	0513-L0093	IL4	05q31.1 / 05-132.0
6. Kromozom			
427	0585-L0150	CDKN1A	06p21.2 / 06-036.8
247	0841-L0359	MYB	06q22 / 06-135.6
7. Kromozom			
166	0429-L0640	ABCB1	07q21.1 / 07-087.1
8. Kromozom			
373	1046-L0624	FGFR1	08p11.2-p11.1 / 08-038.4
346	01044-L00607	PTP4A3	08q24.3 / 08-142.5
211	1036-L0609	RECQL4	08q24.3 / 08-145.7
238	0672-L0169	MYC	08q24.12 / 08-128.8
9. Kromozom			
202	00602-L09528	CDKN2A	09p21 / 09-022.0

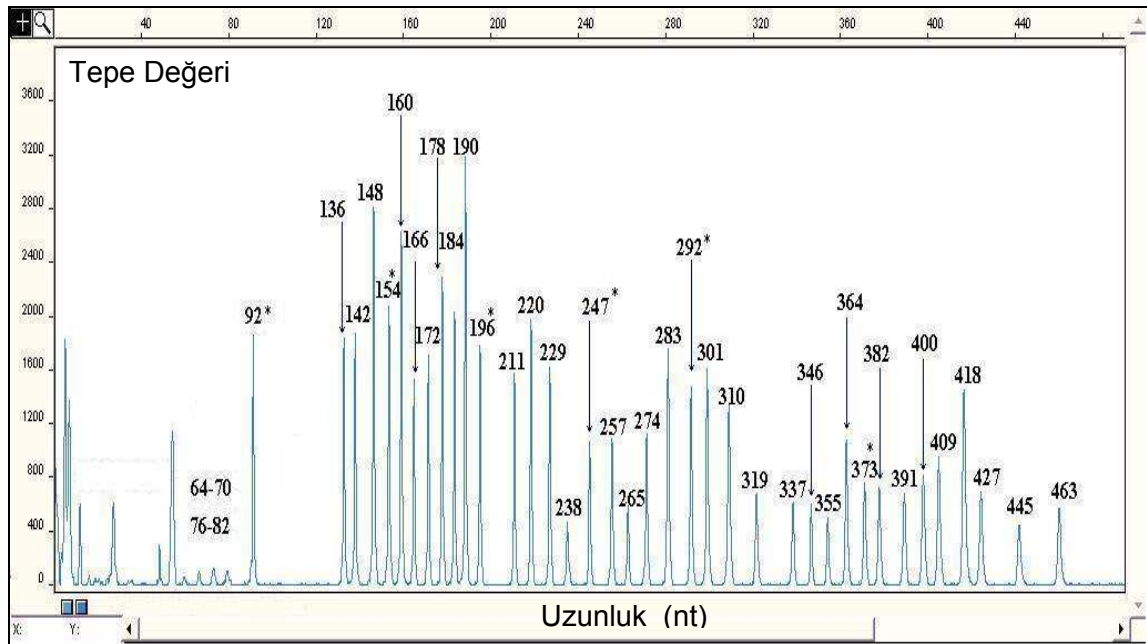
Tablo 2. Salsa MLPA P005 (LN:0308) kiti ile taranan genlerin prob isimleri, nükleotid uzunlukları ve kromozomal yerleşimleri.

3. Sonuçlar

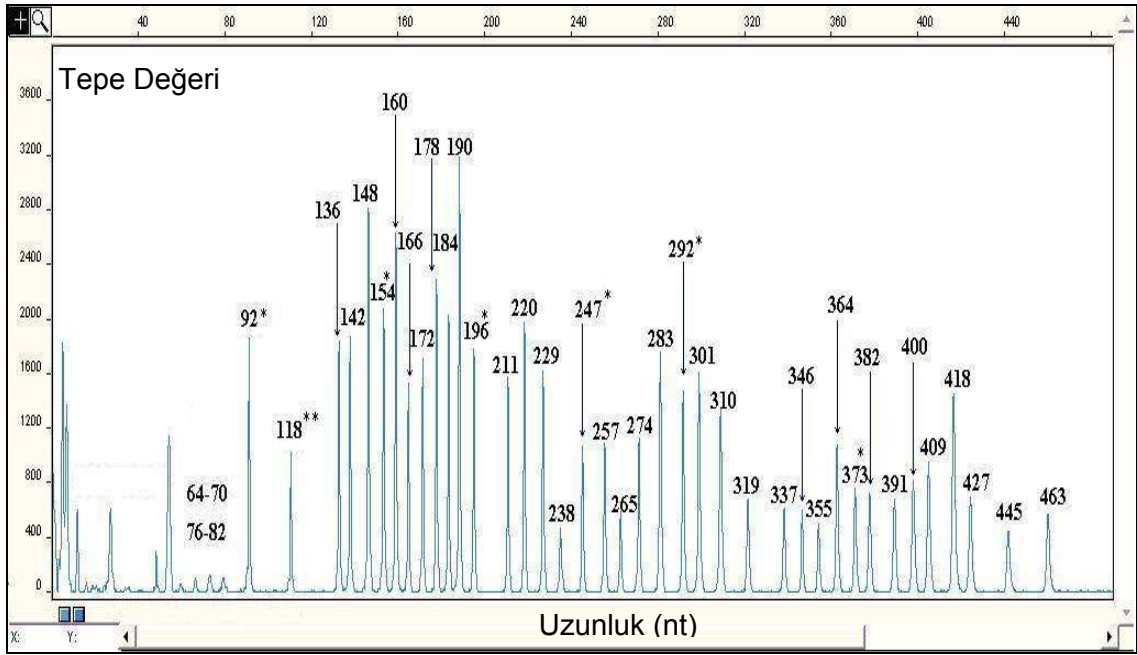
3.1. MLPA Analizi

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 kullanılmıştır. Hastaların 40'ı kadın 8'i erkek olup medyan yaş 47.5'dur (19-74).

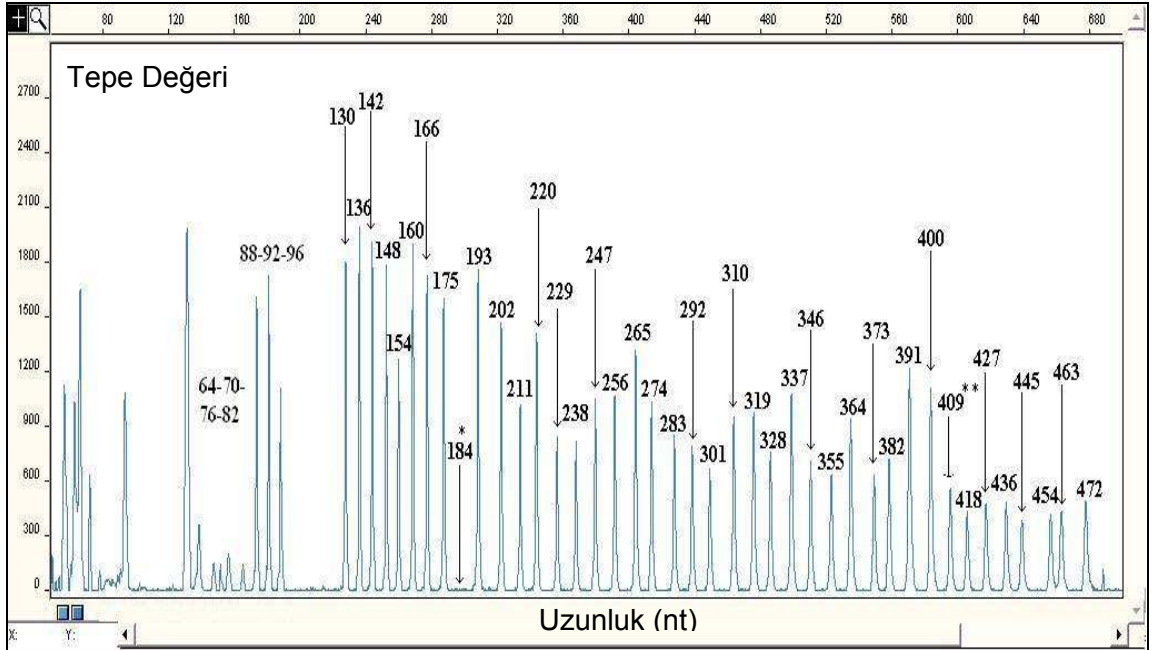
Sağlıklı bireylere ait DNA örneklerinin Salsa MLPA kiti ile amplifikasyonu sonrasında, elde edilen ürünlerin kapiler elektroforezde yürütülüp GeneScan® ya da GeneMapper® ile yapılan analizi, sinyal uzunlukları ile birlikte şekil 12-13 ve şekil 14-15'te gösterilmektedir.



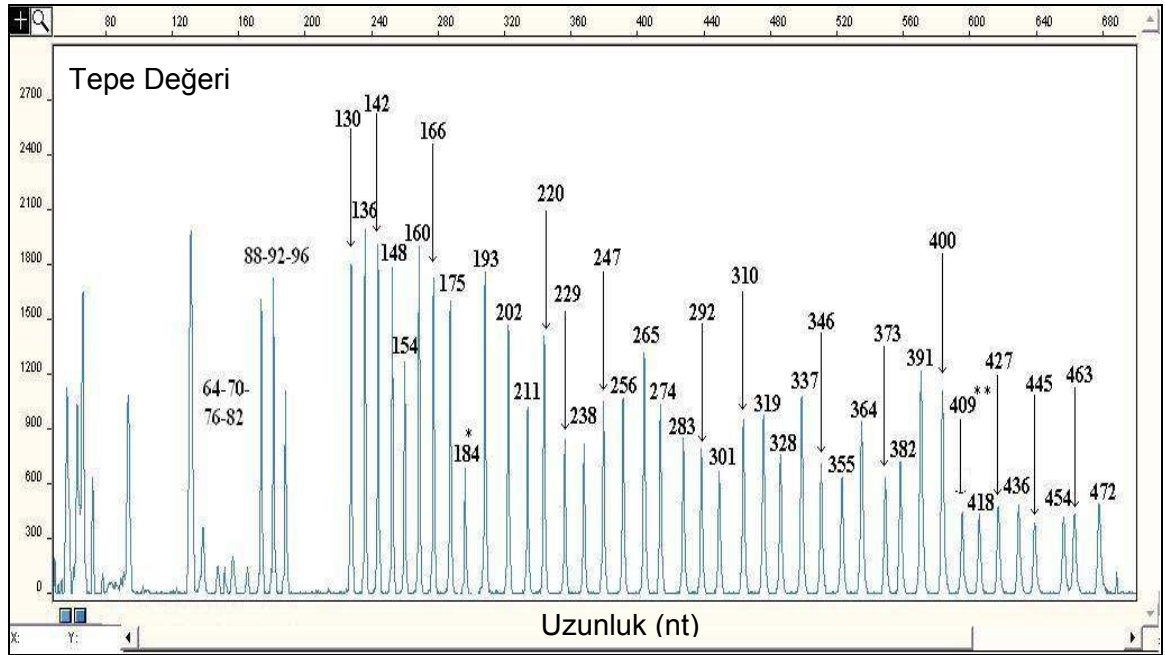
Şekil 12. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş 100 ng sağlıklı kadın insan DNA'sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürütmesi. Sırası ile sinyal veren problemlerin uzunlukları; 64-70, 76-82, 92, 118, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 211, 220, 229, 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 problemleridir *. Diğer sinyaller genlere özgü olup çalıştığımız genlerin uzunlukları Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 13. 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 **. Şekil12'den farklı olarak, bireyin erkek olduğunu gösteren 118 nt'de sinyal alınmaktadır.



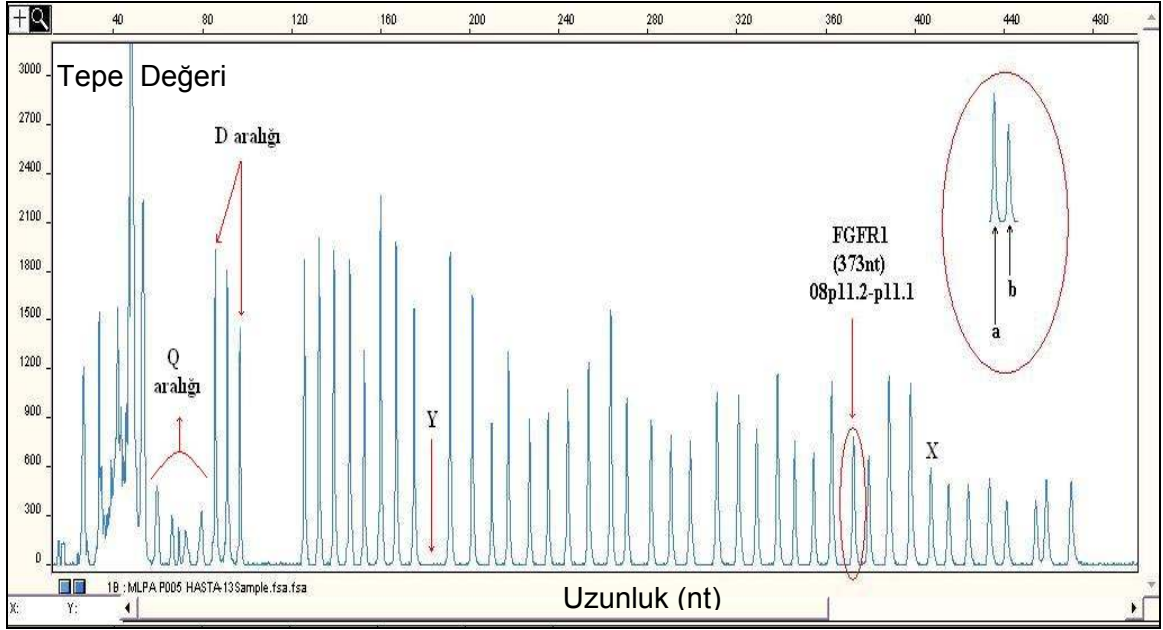
Şekil 14. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş 100 ng sağlıklı kadın insan DNA'sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sırası ile sinyal veren problemlerin uzunlukları; 64-70-76-82, 88-92-96, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 175, 184, 193, 202, 211, 220, 229, 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 2'de verilmiştir.



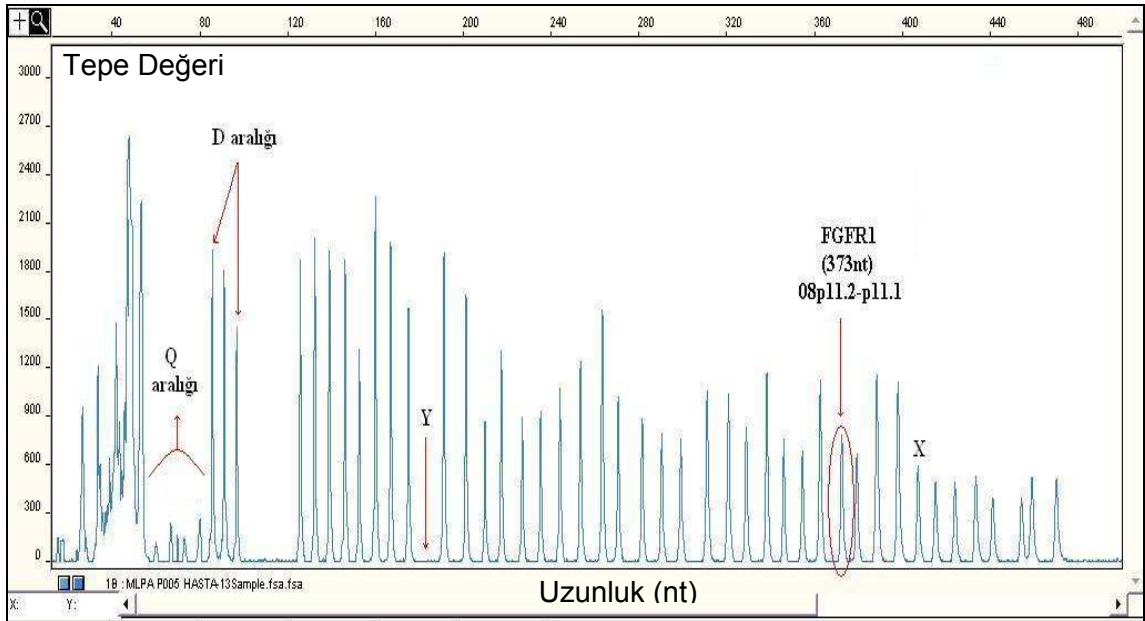
Şekil 15. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş 100 ng sağlıklı erkek insan DNA'sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. 184 nt Y kromozomunun UTY geninin Yq11.21 bölgesine özgüdür * ve 409 nt X kromozomunun PDCD8 geninin Xq25 bölgesine özgü olup örnek bireyin cinsiyetini belirlemektedir **. Şekil 14'ten farklı olarak 184 nt'de sinyal alınmaktadır. Ayrıca 409 nt'de alınan sinyal kadın bireylerdekini $\frac{1}{2}$ oranında alınmaktadır.

Ph pozitif olan 48 hastanın MLPA yöntemi ile taranması ile 2 hastada (H13 ve H26) FGFR1 geninde duplikasyon, 4 hastada (H2, H3, H6 ve H11) IMPDH1 geninde duplikasyon ve 1 hastada (H28) PMS2 geninde duplikasyon saptanmıştır.

P005 kiti kullanılarak çalışılan H13 kodlu hastada saptanan FGFR1 genindeki duplikasyon Şekil 16'da gösterilmektedir. Kapiler elektroforezde, bu hastaya ait alınan sinyaller ile diğer hasta ve kontrol grubu bireylerinin sinyalleri oranlandığında yalnızca FGFR1 genine özgü olan sinyalde farklılık saptanmıştır. Alınan sinyal diğer bireylerin ortalamasından 2 kat daha büyüktür. Bu sonuç bize bu bölgede bir duplikasyon olduğunu göstermektedir. Aynı durum H26 kodlu hasta içinde geçerlidir (Şekil 17). Her iki hastanın da diğer genlere özgü sinyalleri ortalamaya yakın değerlerde olup bir farklılık göstermemektedir.

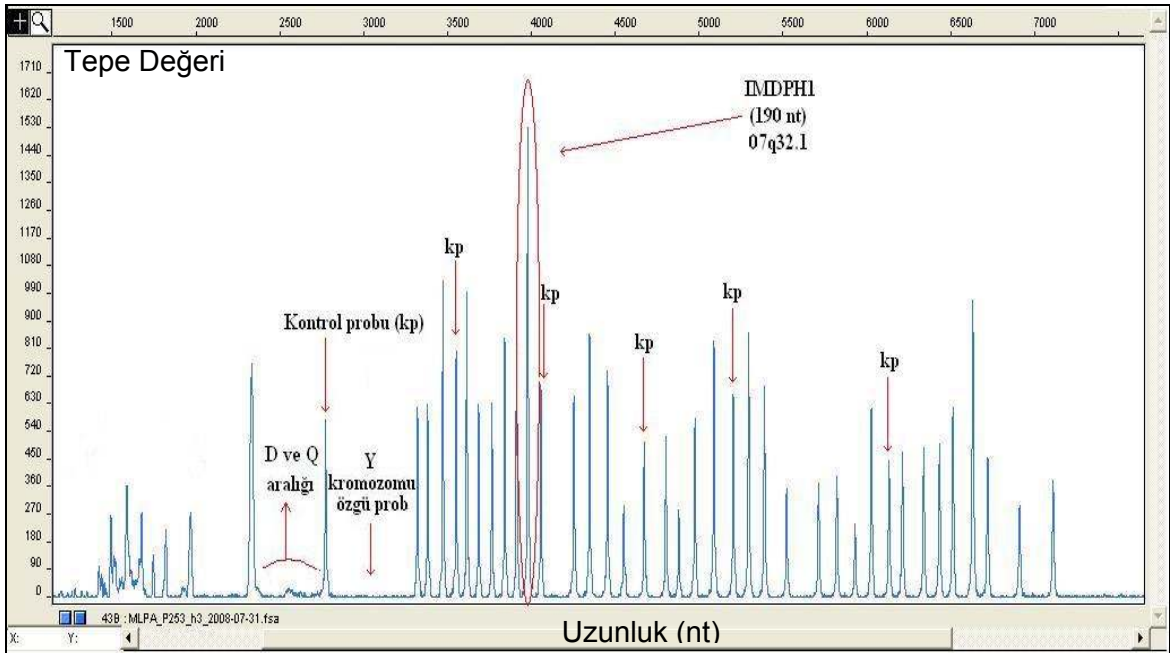


Şekil 16. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş H13 kodlu hastaya ait DNA (85 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 12 ve 13'teki uzunluk sırası ile aynıdır. Q aralığında alınan sinyaller 100 ng'ın biraz altındaki DNA oranı nedeniyle 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. 373 nt uzunlukta alınan sinyal FGFR1 genine özgüdür. Bu bireyde bu uzunlukta alınan sinyal (a) diğer normal bireylerde alınan sinyallerin (b) 2 katı büyüklüğündedir.

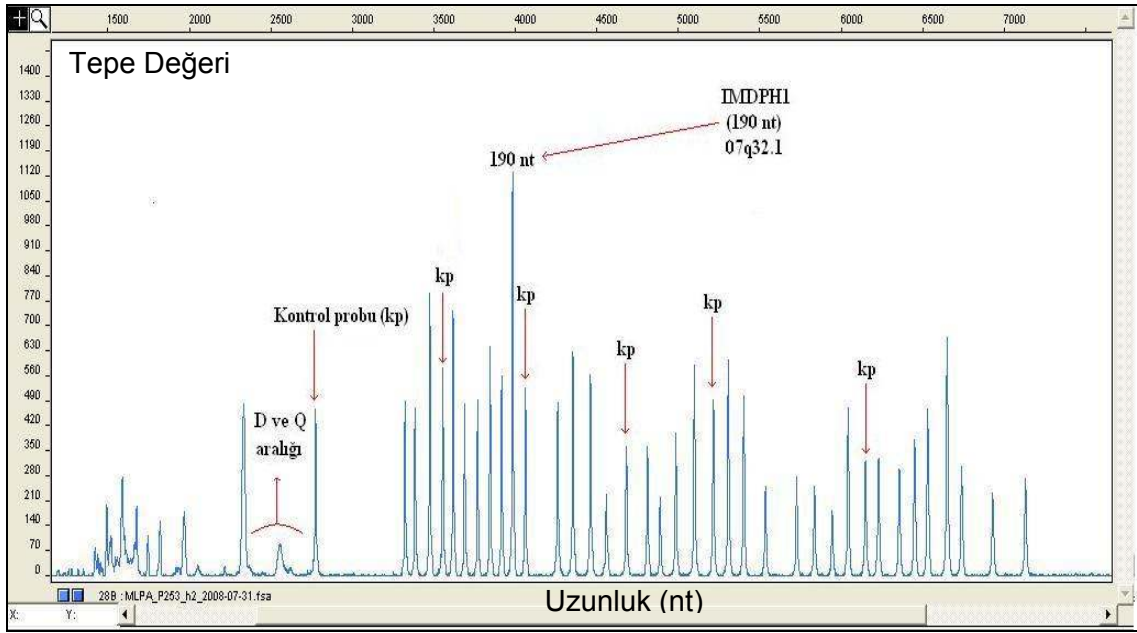


Şekil 17. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş H26 kodlu hastaya ait DNA (100 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. 373 nt'de FGFR1 geninde duplikasyon gözlenmiştir.

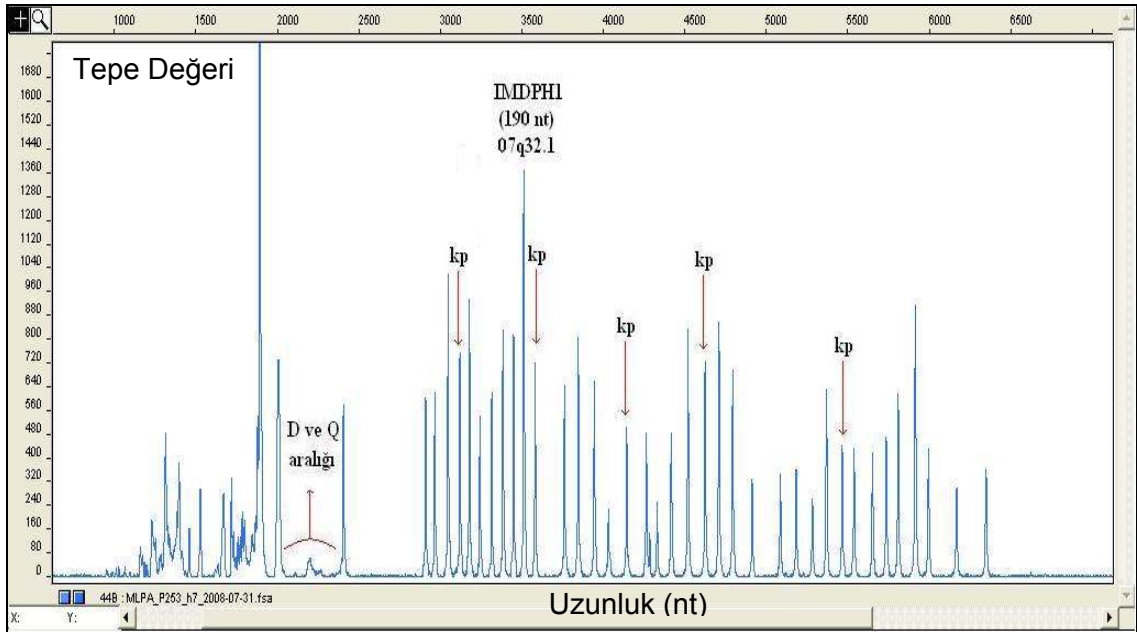
P253 kiti kullanılarak çalışılan H3 kodlu hastada saptanan IMDPH1 genindeki duplikasyon şekil 18'de gösterilmektedir. Alınan sinyal şekilde de görüldüğü gibi hastaya ait diğerk sinyallerden daha büyüktür ancak bu analizimizde önemsizdir. Diğerk hasta ve kontrollere ait eş uzunluktaki sinyallerin alanları ile hesaplanan ortalamadan daha büyük olması nedeniyle bu bölgede bir duplikasyon olduğ rapor edilmiştir. Aynı şekilde H2, H6 ve H11 kodlu hastalarda da bu gende duplikasyon saptanmıştır (şekil 19-21). Bu bireylere ait diğerk genlerin sinyalleri normal bireylere ait genlerin sinyalleri ile kıyaslandığında ise yakın değerklerde olduklarından herhangi bir duplikasyon veya delesyon saptanmamıştır. Yalnızca cinsiyet ile ilgili genlere ait sinyallerde farklılıklar gözlemlenmiştir. Cinsiyete özgü bu farklılıklar kadın bireylerde P005 kitinde X kromomundaki genin duplikasyonu ve hem P005 hemde P253 kitlerinde Y kromozomundaki genlerin delesyonu şeklinde ortaya kmıştır.



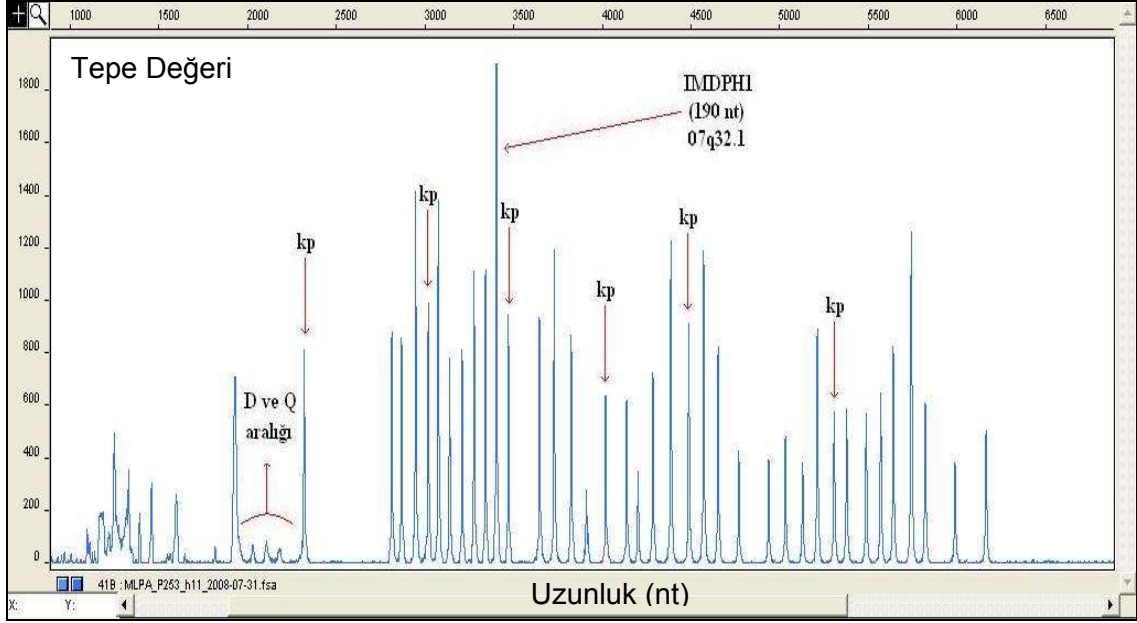
şekil 18. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H3 kodlu hastaya ait DNA (92 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası şekil 12'deki uzunluk sırası ile aynıdır. D ve Q aralığında alınan sinyaller DNA'nın 100 ng'a yakın olmasından dolayı sinyaller çok düşük gözlenmiştir. 118 nt' deki sinyalin alınmaması Y kromozomunun DBY geninin Yq11.21 bölgesinin bulunmadığını göstermektedir. 190 nt uzunlukta alınan sinyal IMDPH1 genine özgüdür. Bu bireyde bu uzunlukta alınan sinyal diğerk normal bireylerde alınan sinyallerin 2 katı büyüklüğündedir. 92, 154, 196, 247, 292 ve 373 nt uzunluklarında alınan sinyaller kontrol problelerini işaret etmektedir.



Şekil 19. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H2 kodlu hastaya ait DNA (70 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 12'deki uzunluk sırası ile aynıdır.



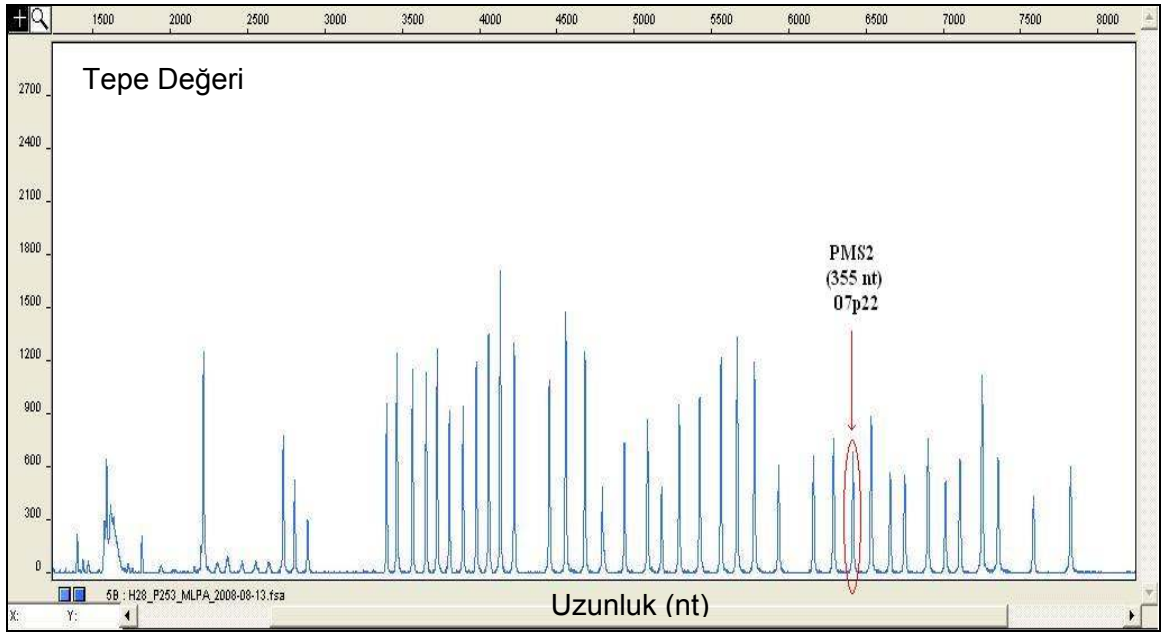
Şekil 20. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H6 kodlu hastaya ait DNA (82 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 12'deki uzunluk sırası ile aynıdır.



Şekil 21. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H11 kodlu hastaya ait DNA (76 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 12'deki uzunluk sırası ile aynıdır.

Yine, P253 kiti kullanılarak çalışılan H28 kodlu hastada saptanan PMS2 genindeki duplikasyon Şekil 22'de gösterilmektedir. Diğer duplikasyon saptanan genlerde de olduğu gibi bu gende de alınan sinyal oranı ortalamanın üzerinde saptanmıştır. Gene ait sinyal şekil üzerinde işaret edilmektedir.

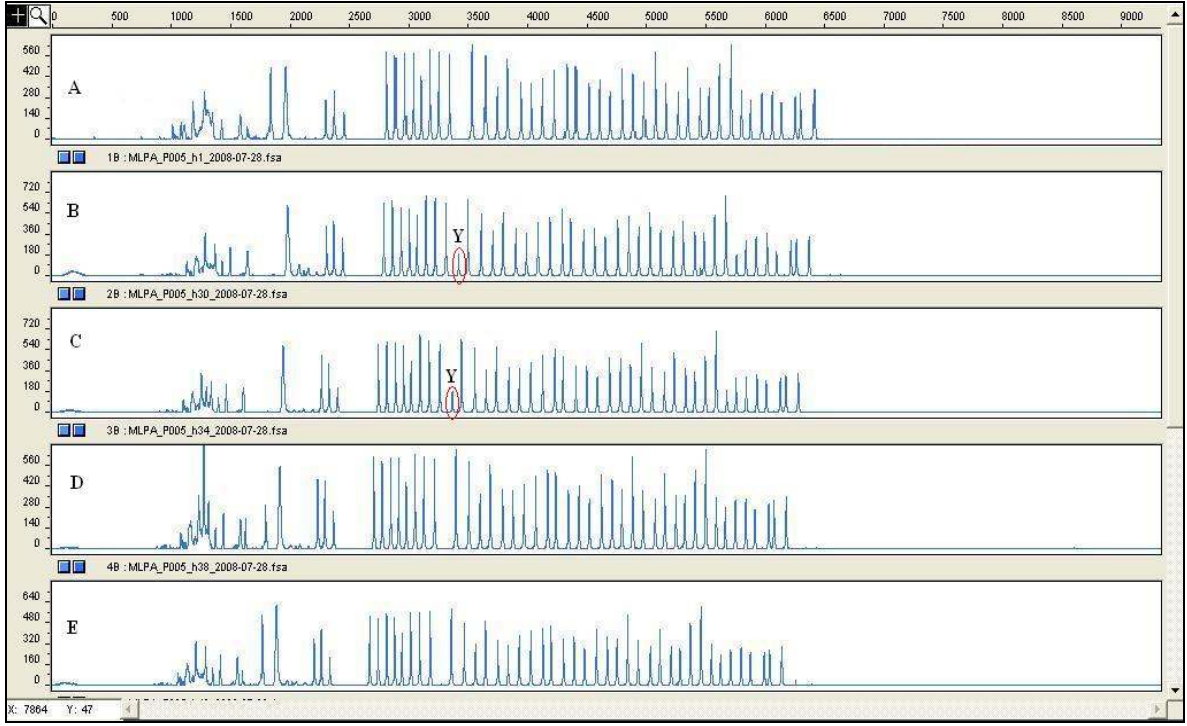
Her bireyde saptanan kontrol problemleri, diğer bireylerin eş uzunlukta alınan sinyallerindeki kontrol problemleri ile oranlanarak elde edilen oranların doğruluğu kontrol edilmektedir. Ayrıca bu problemlerde sinyal alınmadığında çalışma tekrarlanır. Çalışmamızda alınan kontrol problemlerine ait sinyallerin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



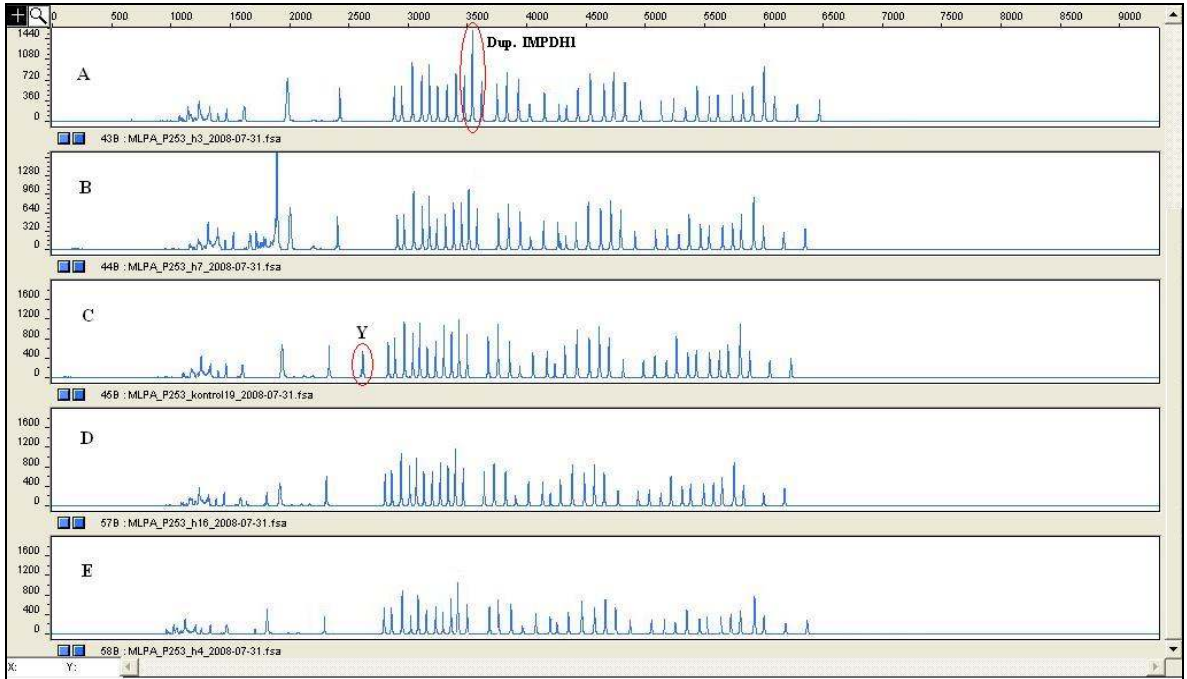
Şekil 22. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H28 kodlu hastaya ait DNA (90 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 13 ve 15'deki uzunluk sırası ile aynıdır. 355 nt uzunlukta alınan sinyal PMS2 genine özgüdür. Bu bireyde bu uzunlukta alınan sinyal diğer normal bireylerde alınan sinyallerin 2 katı büyüklüğündedir.

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 23). 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 2'sinde (H13 ve H26) FGFR1 geninde duplikasyon, 4'ünde (H2, H3, H6 ve H11) IMPDH1 geninde duplikasyon ve 1 tanesinde (H28) PMS2 geninde duplikasyon saptanmıştır. Bu hastalarda yalnızca bir kromozomal farklılık saptanmıştır; hiçbir hastada iki veya daha fazla genin birlikte duplikasyonu saptanmamıştır. Diğer 30 gende ise hiçbir hastada herhangi bir kromozomal düzensizlik saptanmamıştır.



Şekil 23a. 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 23b. 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 A ekranında gözlenen sinyallere sahip bireyde IMPDH1 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.

3.1. MLPA Sonuçlarının Klinik Parametrelerle Karşılaştırılması

MLPA yöntemi ile 33 genin yer aldığı kromozom bölgelerindeki düzensizlikler analiz edildikten sonra elde edilen veriler klinik parametrelerle (Sokol risk derecelendirmesi; periferik eosinofil; kemik iliği retiküler lif derecesi; hemoglobin, lökosit ve trombosit sayıları; 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım ve imatinib tedavisine yanıt) karşılaştırılarak değerlendirildi.

KML tanısında 33 (% 68.7) hastada splenomegali olup medyan splenomegali 4 cm'dir (0-15). Medyan hemoglobin (Hg) değeri 10.2 gr/dL (6.7-15.2) olup, Hgb değeri 11 gr/dL'nin altında olan hasta sayısı 28'dir (%58.3). Medyan lökosit değeri 73210 / μ L (4290-335000) olup, lökosit değeri 10000/ μ L'nin üzerinde olan hasta sayısı 47 (%97.9) ve lökosit değeri 100000/ μ L'nin üzerinde olan hasta sayısı 13'dür (%27.1). Medyan trombosit (Plt) değeri 485x103/ μ L (58-1400) olup, Plt değeri 450x103/ μ L'nin üzerinde olan hasta sayısı 26 (%54.2) ve plt değeri 100x103/ μ L'nin altında olan hasta sayısı 2'dir (%4.6). Sokol risk sınıflamasına göre; hastaların 10'u (%20.8) düşük riskli, 23'ü (% 47.9) orta riskli ve 15'i (%31.3) yüksek riskli gruptadır. Hastaların %16.6'sında periferik eozinofil sayısı > %3'ün üstündedir. Periferik promyelosit sayısı medyan %5 (1-30) olup, periferik blast sayısı medyan %2.0'dir (1-5). Kemik iliği blast sayısı medyan %2.0'dir (1-5). Retikülin lif derecesi 1 olan 12 (%60), 2 olan 6 (%30) ve 3 olan 2 (%10) hasta bulunmaktadır. Hastaların imatinib tedavisine yanıt değerlendirmesinde hedef (optimal) yanıt sağlanan hasta sayısı 22 (%45.8), yetersiz (suboptimal) yanıt sağlanan hasta sayısı 8 (%16.6) ve yanıtızsız hasta sayısı 9'dur (%18.8). Taranan genlerde, hastaların 7'sinde (%14.6) duplikasyon saptanmıştır. FGFR1 geni duplikasyonu 2 (%4.2), IMPDH1 geni duplikasyonu 4 (%8.3) ve PMS2 geni duplikasyonu 1 (%2.1) hastada saptanmıştır. Bu hastalarda diğer genlerin duplikasyonu saptanmamıştır. Hiçbir hastada herhangi bir gen delesyonu da gözlenmemiştir. (Tablo 3).

Tablo 3. Kronik faz kronik myelositer lösemili hastaların tanıda klinik özellikleri.			
		N	
Hasta sayısı		48	
Yaş (medyan)			47.5 (19-74)
Cinsiyet Erkek/Kadın		8 /40	
Splenomegali	cm*	33 (% 68.7)	4 (0-15)
Hemoglobin	gr/dL *		10.2 (6.7-15.2)
	<11 gr/dL	28 (%58.3)	
Lökosit	µL*		73210 (4290-335000)
	>10000/µL	47 (%97.9)	
	>100000/µL	13 (%27.1)	
Trombosit	10 ³ /µL*		485 (58-1400)
	>450x10 ³ /µL	26 (%54.2)	
	<100x10 ³ /µL	2 (%4.6)	
Sokol Risk Sınıflandırması	0 (Düşük risk)	10 (%20.8)	
	1 (Orta risk)	23 (%47.9)	
	2 (Yüksek risk)	15 (%31.3)	
Periferik Eosinofil	>3% n=18	3 (%16.6)	
Periferik Promyelosit	%* n=23		5 (1-30)
Periferik blast	%* n=25		2.0 (1-5)
Kemik iliği blast	%* n=54		2.0 (1-5)
Kemik iliği retikülin lif derecesi	n=20		
	1	12 (%60)	
	2	6 (%30)	
	3	2 (%10)	
İmatinib tedavisine yanıt (<i>hematolojik,sitogenetik ve moleküler yanıt birlikte</i>)	Hedef (optimal)	22 (%45.8)	
	Yetersiz (suboptimal)	8 (%16.6)	
	Yanıtsız	18 (%37.5)	
Duplikasyon	Tüm	7 (%14.6)	
	FGFR1	2 (%4.2)	
	IMPDH1	4 (%8.3)	
	PMS2	1 (%2.1)	
Delesyon	0	0	
* =medyan			

Tablo 4. İmatinib tedavisi alan kronik myeloid lösemili hastaların klinik özellikleri.		
		%
İmatinib öncesi Hastalık Durumu		
Kronik faz	48	100
7 Yıllık Total Sağkalım Olasılığı	%100	
İmatinib alanlarda İzlem Süresi (yıl)	1.75 (0.3-7.2)	
İmatinib sonrası 7 Yıllık Total Sağkalım Olasılığı	%100	
İmatinib sonrası 7 Yıllık İlerlemesiz Sağkalım Olasılığı	%76	
Toplam Mortalite	0	
Progresyon	6	
Optimal suboptimal yanıtla izlenen	30	
Yanıtsız yaşayan	18	

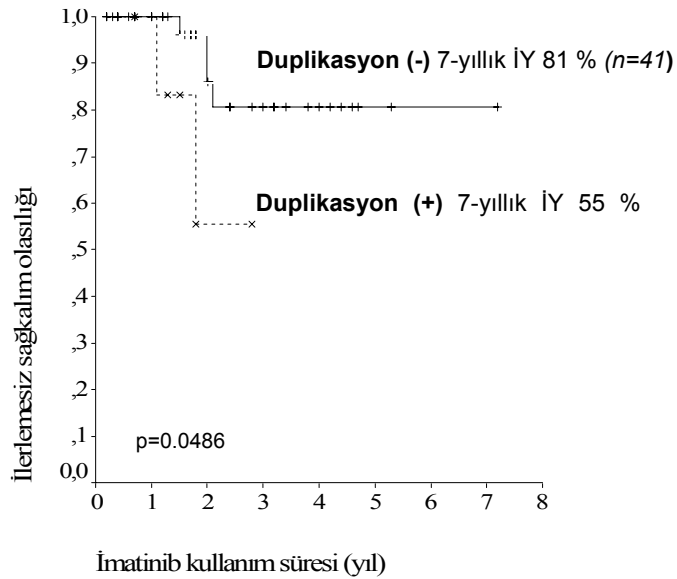
Tüm hastalar kronik fazdadırlar. İmatinib tedavisi alan hastalarda medyan izlem süresi 1.75 yıldır (0.3-7.2). İmatinib tedavisi sonrası 7 yıllık total sağkalım olasılığı %100'dür. İmatinib sonrası 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım olasılığı %76'dır. Toplam mortalite görülmemiştir. İmatinib tedavisi altında 6 hastada ilerleme görülürken, imatinib tedavisi altında tam ve yetersiz yanıtla izlenen hasta sayısı 30, yanıtsız izlenen hasta sayısı 18'dir (Tablo 4) ⁽⁸⁷⁾.

Sokol risk sınıflandırmasına göre düşük riskli grupta 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım %68'dir. Orta riskli grupta %83'tür. Yüksek riskli grupta ise %64'tür (p=0,6926). Erkek hastalarda 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım %75, kadın hastalarda ise %83'tür (p=0,6584). Periferik eosinofil sayısı $\leq$ %3 altında olan grupta 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım %72 olup, $\geq$ %3 üstünde olan grupta %100'dür. (p=0.7518). Kemik iliğinde retiküler lif derecesi 1 olan grupta 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım %68 olup, >1 olan grupta ise 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım %68'dir (p=0.8055). İmatinib tedavisi altında optimal yanıt ve yetersiz yanıt elde edilen gruplarda 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım %100 ve yanıtsız grupta ise %50'dir (p=0,0158). Duplikasyon saptanan grupta 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım %55, duplikasyon olmayan grupta ise %81'dir (0,0486) (Şekil 24) (Tablo 5).

Duplikasyonun saptanmadığı 41 hastada 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım oranı %81 olup duplikasyon saptanan 7 hastada oran %55'dir. Hasta grubumuzda, duplikasyonun varlığının 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım olasılığını düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 24).

Tablo 5. KF-KML'de klinik parametrelerin sağkalım üzerine etkisi (Logrank test).

	N	7-y İY (%)	Log Rank (p)
Hasta Sayısı	48	76	
Sokol			
0 (Düşük risk)	10	68	0,6926
1 (Orta risk)	23	83	
2 (Yüksek risk)	15	64	
Cinsiyet			
Kadın	40	75	0,6584
Erkek	8	83	
Periferik eosinofil			
≤%3	15	72	0,7518
>%3	3	100	
Kemik iliğinde retiküler lif derecesi			
1	12	68	0.8055
>1	8	68	
İmatinib tedavisine yanıt			
Hedef (optimal)	22	100	0,0158
Yetersiz (suboptimal)	8	100	
Yanıtsız	18	50	
Duplikasyon			
Var	7	55	0,0486
Yok	41	81	
Sokol: hasta yaş, dalak büyüklüğü, periferik kanda blast yüzdesi ve trombosit sayısı			
*() median yıl, Y:yıl			
İY: ilerlemesiz yaşam			

**Şekil 24.** Duplikasyonun ilerlemesiz sağkalım üzerine etkisi.

Duplikasyon ile sokol risk derecelendirmesi, periferik eosinofil, kemik iliği retiküler lif derecesi, hemoglobin, lökosit ve trombosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Duplikasyon ile imatinib tedavisine yanıt arasında bizim hasta grubumuzda anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p=0.049) (Tablo 6).

Tablo 6. Duplikasyonlar ile klinik parametrelerin karşılaştırılması.

	n	Duplikasyon negatif	Duplikasyon pozitif	Exp (B) *	95% Interval *	P *
Hasta Sayısı	48					
Sokal						
0-1 (<i>Düşük-Orta risk</i>)	33	27	6	0.181	0.015- 2.127	0.174
2 (<i>Yüksek risk</i>)	15	14	1			
Periferik eosinofil						
≤%3	15	11	4	0.870	0.048- 15.814	0.925
>%3	3	2	1			
Kemik iliğinde retiküler lif derecesi						
1	12	9	3	1.845	0.198- 17.182	0.591
>1	8	5	3			
Imatinib tedavisine yanıt						
<i>Hedef (optimal)</i>	22	21	1	0.085	0.007- 0.994	0.049
<i>Suboptimal-Yanıtsız</i>	26	20	6			
Hemoglobin						
<11 gr/dL	28	23	5	2.757	0.415- 18.316	0.294
>11 gr/dL	20	18	2			
Lökosit						
<100x10 ³ /μL	35	30	5	0.867	0.132- 5.683	0.882
>100x10 ³ /μL	13	11	2			
Trombosit						
>450x10 ³ /μL	26	22	4	1.026	0.181- 5.816	0.977
<450x10 ³ /μL	22	19	3			
* Yaş ve cinsiyete göre uyarlanmıştır.						

4. Tartışma

MLPA yöntemi, PCR ile Kısa DNA Tekrarı (STR= Short Tandem Repeat) bölgelerini kullanarak yapılan diğer yöntemlere oranla daha hassas ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir ⁽²³⁾. En fazla 45 değişik DNA dizisinin PCR tabanlı tek bir reaksiyon yardımıyla incelenmesi, sadece 20 ng insan DNA'sının kullanılabilmesi, tek nükleotid değişimlerinin ayrımı, tek ekzon kopya sayısı değişikliklerinin belirlenebilmesi ve 50-70 nükleotid uzunluğundaki dizilerin araştırılabilmesi önemli avantajlarındandır. Doğru sonuç elde edilebilmesi açısından ligasyon gerçekleşmeyen ürünlerde amplifikasyonun olmaması ve kit içerisindeki kontrol problemleri ile hibridizasyon-ligasyon kalitesi (DQ) aralıkları hassasiyeti artırmaktadır. MLPA yönteminin hassasiyeti ile ilgili çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır ⁽⁹¹⁾. Bu yöntem ile 48 hastada 33 genin bulunduğu kromozom bölgeleri araştırılmıştır. Bu metodun kullanımında, tuzla çöktürme metodu ile elde edilen DNA'dan çalışmalarda kullandığımız ticari kit ile izole edilen DNA'ya oranla daha az verim alındığı görüldü ve tüm analizler ticari kit ile yapılan DNA'larla ve en az 2 kez tekrar edilerek yapıldı.

Tümör oluşumunda ve gelişiminde genlerin çeşitli rolleri olduğu bilinmektedir. Genom taramaları ve kanser genomlarında mutasyonların belirlenmesi sayesinde kanser ile ilişkili yeni genler tanımlanabilmektedir. Bu genler üstlendikleri role istinaden tümör süpresör gen, onkogen veya tamir geni gibi isimler alırlar ^(24,92). Hücre döngüsü, apoptoz, tamir mekanizması, transkripsiyon veya uyarı iletimi gibi birçok hayati basamakta rol oynarlar. Birçok rahatsızlıkla da ilişkilendirilmişlerdir ⁽²⁴⁻⁸⁶⁾.

Tümör süpresör genlerin fonksiyon kaybı veya bazı genetik değişimler sonucunda kanser riski artmaktadır ⁽⁹²⁾. Tümörögenез, apoptoz ve hücre döngüsünde etkin olan genlerdeki değişimlerin yol açtığı gen ifadesindeki değişikliklerin bir yansımasıdır. Onkogen RAS ailesi ve tümör süpresör gen olan retinoblastoma RB1 geninin tümörögenезde ve metastazdaki rolleri örnek gösterilebilir ⁽⁹²⁾. Bazı kanser tiplerinde ise özellikle birkaç gendeki değişimler dikkat çekmektedir. Örneğin BRCA1 ve BRCA2 tümör süpresör genlerinin

kalıtsal germline mutasyonları, göğüs ve yumurtalık kanserinde yüksek risk teşkil etmektedir ⁽⁹²⁾. Genlerin tanımlanması, kanser tanısında erken teşhis ve tedavi açısından büyük önem taşımaktadır. Geliştirilen çeşitli yeni yöntemler ve yapılan farklı populasyon çalışmaları, kanser ve genom arasındaki ilişkiyi anlamamızda büyük fayda sağlamaktadır ⁽⁹²⁾. Bu sayede tümörlerin tiplendirilmesi ve biyolojik işaretlerin saptanması gerçekleştirilebilir. Göğüs kanserinde ER, PR ve HER2/neu, KML'de BCR-ABL ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri'nde (KHDAK) EGFR1 gibi biyolojik işaretler ile tümörün tipi, hastalığın evresi ve tedavi şekli belirlenebilmektedir ⁽⁹³⁾.

Taradığımız genlerin de, önceki çalışmalarda bazı kanser tiplerine özgünlükleri ve hücrenin hayati biyolojik işlevlerinde (apoptoz, hücre döngüsü, DNA tamiri vs.) etkinlikleri gösterilmiştir ^(24,28-86).

Tümör süpresör gen olan CDKN1A geninin p21 proteini, tümör hücresinin büyümesini baskılamada p53'e aracılık eder ⁽²⁴⁾. p21'in tümör hücre hattındaki aşırı ifadesi ile baskılanan koloni formu, p53'ün aşırı ifadesi sonucu oluşana benzerdir ⁽²⁴⁾. İmmünohistokimyasal p21 ifadesi, grade ile ilişkisiz olarak pek çok gliomda saptanmaktadır ^(49,50). CDKN2A tümör süpresör geni ise 2 hayati hücre döngüsü kontrol yolağı olan p53 (TP53) yolağı ve retinoblastoma yolağını kontrol eder ⁽²⁴⁾. CDKN2A'nın pankreatik kanser, lösemi, özofagal ve gastrik kanserler, mesane kanseri, diyabet ve çeşitli kanser tipleri ile ilişkileri çeşitli çalışmalar ile araştırılmıştır ⁽²⁴⁾. Çalışmamızda bu genler ile ilgili bir düzensizlik gözlenmemiştir. Hasta grubunda ve kontrol grubunda yer alan tüm bireylerde bu iki gen normal olarak saptanmıştır.

Onkogen olan N-ras, PIK3CA, Myb, Myc ve EGFR genlerinin yanı sıra onkogenlerle etkileşimi bulunan TANK genide çalışmamızda yer almıştır. N-ras geni, fibrosarkoma ve embriyonal rabdomiyosarkoma (RD) olmak üzere iki farklı insan sarkoma hücre hattında işleve sahiptir ⁽²⁴⁾. Ayrıca promyeloid lösemi hücre hattında ve nöroblastoma hücre hattında da işlevsel olduğu tespit edilmiştir ⁽²⁴⁾. K-ras ve N-ras onkogenlerinin kolonda homeostaz ve tümorogenezi kontrol ettiği gösterilmiştir ⁽³⁵⁾. Kolorektal kanser, tiroid karsinoma ve otoimmün limfoproliferatif sendromu ile N-ras mutasyonları arasındaki ilişkiler

çeşitli çalışmalar ile araştırılmıştır ^(24,35). Ayrıca pankreas, akciğer ve myeloid lösemilerde N-ras mutasyonlarının da gerçekleştiği gösterilmiştir ⁽³⁶⁾. PIK3CA geni ve kanser arasındaki ilişki, göğüs kanseri, ovaryum kanseri, kolorektal kanser ve hepatoselüler karsinoma çalışmaları ile araştırılmıştır ⁽²⁴⁾. MYB onkogeni ile T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) ilişkisi saptanmıştır ⁽²⁴⁾. Karsinomların %32'sinde Myc proto-onkogeninin 2-15 kat amplifiye olduğu gösterilmiştir ⁽⁵⁹⁾. Myc ifadesi tek başına meme karsinogenezi için yeterli olabilir ⁽⁵⁹⁾. Hatta Myc'in hormon tedavisine yanıt vermemede veya kemoterapiye dirençten sorumlu olduğu ileri sürülür ⁽⁵⁹⁾. EGFR onkogeni hücre çoğalmasının kontrolünde rol almaktadır ve astrositik tümörlerde en sık ifade artışı olan onkogendir ⁽⁴⁹⁾. Glioblastomların üçte birinde artış gösterdiği veya aşırı ifade olduğu saptanmaktadır ^(49,76,77). EGFR, tirozin kinaz işlevine sahip bir bir zarlar arası glikoprotein olduğundan pek çok çalışmada anormal EGFR uyarı iletimi ve EGFR düzenleme bozukluğunun tümör gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ⁽³⁴⁾. EGFR' nin apoptozun engellenmesi, hücre hareketliliğinde artış, protein salınımında artış, adhezyon, hücre yaşam süresinde artış, farklılaşma, anjiyogenez ve metastaz gelişimi gibi pek çok olayda önemli rol aldığı gösterilmiştir ⁽³⁴⁾. Yüksek düzeyde EGFR ifadesi ileri evre hastalık, metastatik fenotip gelişimi, sağ kalımda azalma ve kötü gidiş ile ilişkili bulunmuştur ⁽³⁴⁾. Onkogenik düzenlemeler ile bağlantılı olan TFG proteinin NF-kappaB yolağında TANK ile ilişkisi gösterilmiştir ⁽⁴²⁾. Hasta ve kontrol grubumuzda bu onkogen ve onkogen ilişkili genlerin hiçbirinde kromozomal düzensizlik saptanmamıştır.

RECQL4 geninin UV kaynaklı DNA hasarlarının tamirinde rolü olduğu savunulmaktadır, bu nedenle tamir geni olduğu düşünülmektedir ⁽⁶¹⁾. PMS2 geni ise DNA onarım mekanizmalarından olan DNA mismatch (yanlış eşleşme) tamirinde (MER) rol alan genlerden bir tanesidir ⁽²⁴⁾. Diğer genler ise; MSH2, MLH1 ve PMS1'dir ⁽²⁴⁾. PMS2 geni, 22 HNPCC (kalıtsal polipozis kolon kanseri) aile öykülü hastaların 2'sinde delesyonla kendini göstermiştir. Tümörsüz dokularda heterozigot mutasyonlar tespit edilirken tümör dokusunda somatik PMS2 mutasyonu tespit edilmiştir ^(72,73). Kolorektal kanserde önemli bir rolü olan PMS2 geninde gerçekleşen mutasyonlar, otozomal resesif kalıtımı olan mismatch tamir kanserinde de (Turcot sendromu olarak da bilinen) önemli rol oynamaktadır ⁽⁷⁴⁾. Erken teşhisli beyin tümörlerinde de PMS2 geninin 14.

ekzonunda gerçekleşen homozigot bir mutasyon tanımlanmıştır⁽²⁴⁾. PMS2'inde yer aldığı bazı DNA hatalı eşleşme tamir genleri ile yapılan bir çalışmada hatalı eşleşme tamirindeki bozuklukların, lösemi hücre hattında ve Akut Lenfoid Lösemi'de (ALL) önceden düşünüldüğünden daha sık geliştiği savunulmaktadır⁽⁹⁴⁾. Çok güç tespit edilebilen PMS2 genindeki mutasyon ve bozukluklar, hem çocuklarda ortaya çıkan (homozigot mutasyon ile veya duplikasyon ile) hemde erişkinlerde ortaya çıkan (heterozigot mutasyon ile) malignansilerde tanımlanmıştır⁽⁹⁵⁾. Çocuklarda primitif nöroektodermal tümör ve diğer çocukluk dönemi kanser senromunda bu genin bozuklukları gösterilmiştir⁽⁹⁶⁾. Çalışmamızda Ph pozitif 1 hastanın PMS2 geninde duplikasyon saptanmış olup ALL'nin yanı sıra KML için de bu gendeki farklılaşmaların araştırılmasının önemli olduğu gösterilmiştir.

Hücre döngüsünde etkili, çalışmamızda araştırılmış 6 gen bulunmaktadır; FGFR1, PTP4A3, IL2, GHRHR, TGFB1 ve TSC1. FGFR1 geni; hücre bölünmesi, büyümesi ve olgunlaşması; kan damarlarının yapısı; yaraların iyileşmesi ve embriyonik gelişimde çok önemli işlevlere sahip birkaç fibroblast büyüme faktöründen birisidir ve KML hastalarında t(8;22) (p12;q11) ile karşımıza çıkmaktadır^(15,55). Çalışmamızda, Ph pozitif olan 2 hastanın (H13,H26) FGFR1 geninde duplikasyon saptanmış ve önceki çalışmalardan farklı olarak bu genin duplikasyonunun KML ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. PTP4A3 geninin kolorektal kanser metastazında önemli rolü bulunmaktadır⁽²⁴⁾. Hücre döngüsü ilerleyişinde de hem pozitif hem de negatif kontrollü olarak çeşitli işlevlere sahiptir^(24,60). PTP4A3'ün bir onkogen olabileceğine dair araştırmalar yapılmıştır; PTP4A3, kolon karsinom hücreleri ve osteosarkoma hücreleri gibi insan tümör hücre hatlarının bazılarında etkin olamamıştır ancak fibrosarkoma hücrelerinde olduğu gibi bazı hücre hatlarında da bu etkiyi gösterme potansiyeline sahiptir⁽²⁴⁾. PRL3'ün hücre döngüsündeki işlevi tümöröenez sonrasında olmayabilir⁽⁶⁰⁾. T hücresi büyüme faktörü de denilen (TCGF) IL-2, T lenfositlerinin hücre siklusunun G1 fazından S fazına ilerlemesinden sorumlu olan sitokindir⁽²⁴⁾. IL-2, CD4+ T hücreleri tarafından kısmen de CD8+ T hücreleri tarafından üretilir⁽²⁴⁾. IL-2, kendisini üreten hücelere etki edip kendi oluşumunu sağlar, bu onun otokrin büyüme faktörü işlevini gösterir⁽⁶⁹⁾. Ayrıca parakrin büyüme faktörü olarak da etkisi mevcuttur

⁽⁶⁹⁾. GHRHR, büyüme hormonu (GH) salgılanmasını uyarır ⁽²⁴⁾. Fazlalığında gigantizm ve akromegali; eksikliğinde cücelik görülür ⁽²⁴⁾. Hücre döngüsüyle dolaylı olarak ilişkili bir gendir ⁽⁷⁵⁾. TGFB1'in farklı türlerinin hücre çoğalma ve farklılaşmasında, etkin bir biçimde yapı oluşumunu kontrol ettiği düşünülmektedir. TGF-beta'nın proteinlere bağlanmasında tip1 ve tip2 reseptörlerinin birlikte rol oynadığı ve biyolojik işlevlerde etkin oldukları bulunmuştur ⁽⁸⁵⁾. TGFB1, TGFB2'ye bağlanarak ve TGFB1 aktivasyonunun gerçekleştiği nadir bir uyarı mekanizması ile hücre döngüsü ilerleyişini düzenlemektedir ^(24,85). TGFB1 reseptörü birçok insan tümör hücresinde işlevsiz durumda olabilir ^(24,85). TSC1 geninin aşırı ifadesi fare fibroblastlarının büyümesini engeller ve hücre morfolojisinde değişimlere neden olur ⁽²⁴⁾. Proteininin G1 fazının kontrolünü serbest bırakarak hücre biçimlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir ⁽²⁴⁾. Ayrıca tuberoz skleroz ile TSC1 gen mutasyonları ilişkisi birçok çalışmada araştırılmıştır ⁽²⁴⁾. Bu çalışmalardan bazılarında TSC1'in bir tümör süpresör gen olarak da davrandığı bildirilmiştir ⁽²⁴⁾. Hücre Döngüsünde etkili olan bu genlerden FGFR1 geni hariç hiçbirinde düzensizlik gözlenmemiştir.

Diğer biyolojik süreçlerde etkin genlerden; BCAR3'ün bazı kanser hücre hatlarında aşırı ifadesi tespit edilmiştir ^(24,29-31). F3 geninin hemostaz, tromboz, inflamasyon ve hücre bağışıklık tepki ile ilişkili rahatsızlıklarda rolünün olduğu yapılan çalışmalar ile saptanmıştır ^(32,33). IL10 geni ile yapılan daha önceki çalışmalarda KML ile IL10 polimorfizmlerinin ilişkisi olabileceği gösterilmiştir ^(24, 39). ABCB1 geni mutasyona uğrayan hastaların kemoterapiye cevap verme oranının, diğerlerine göre çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir ⁽⁵⁴⁾. OCIAD1, ovaryum kanseri ile ilişkilendirilmiştir ve ovaryum kanserindeki fonksiyonunun, hücre adhezyonundaki etkisiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir ⁽⁶⁶⁾. OCIAD1'in hücre metastazındaki potansiyel rolünün engellenmesiyle ilgili olarak çeşitli çalışmalar halen sürdürülmektedir ⁽⁶⁶⁾. Gonadotropin-releasing hormone (GNRH) çoğalma ile ilgili süreçlerde anahtar bir nöroregülatör olarak işlev görür ⁽²⁴⁾. IL-10'un, IL-2'den yoksun T hücrelerinde ve bcl-2 proteinini arttırarak B hücrelerinde apoptozu engellediği görülmüştür ⁽³⁸⁾. IL-10 kollajen I ifadesini azaltır, hücre içi kollajenazı arttırır ⁽³⁸⁾. Bu sebeple anti-fibrotik işleve sahiptir ⁽³⁸⁾. IL10'daki farklılaşmalar ile KML arasındaki

potansiyel ilişki daha önceki çalışmalarda öne sürülmüştür ⁽³⁹⁾. Ancak çalışmamızda KML ile IL10 arasında bir ilişki gözlenmemiştir. IL-1A'nın apoptoz gibi biyolojik işlevlerde rolünün olması kanser ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir ^(24,41). TANK'ın fazla ifadesi, CD40, TNFR1 ve TNFR2'nin uyarıları tarafından aktive olan TRAF2-dolaylı NF-kappa-B'yi engeller ⁽⁴²⁾. TANK'ın, sitoplazmada durgun fazda TRAF'ları ayırarak TRAF protein işlevini kontrol eden TRAF fonksiyonunu engellediği de düşünülmektedir ⁽²⁴⁾. Onkogenik düzenlemeler ile bağlantılı olan TFG proteinin NF-kappaB yolağında TANK ile ilişkisi gösterilmiştir ⁽⁴²⁾. Sepsisli çocuklarda zayıf IL-13 yanıtının kötü prognozu işaret ettiği saptanmıştır ⁽⁴⁴⁾. Akciğer kanserinde ve T-hücreli lenfoma'da IL13'ün etkisinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır ^(45,46). IL-4 Bazı sitokin ve büyüme faktörlerinin yapımını uyarırken, bazılarını da (özellikle interferon-γ) inhibe eder ⁽⁴⁴⁾. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, IL-4 geninin promotor bölgesindeki T-alleledeki bi-allelik polimerizasyonu ile SSPE (subacute sclerosing panencephalitis) arasında açık bir ilişki bulunmuştur ⁽⁴⁸⁾. WFS1 geni Wolfram Sendromu ile ilişkilendirilmektedir ⁽⁶³⁾. Prekallikrein noksanlığında, KLKB1 geninin 5. ekzonundaki homozigot bir 430 C-T farklılaşması tanımlanmıştır ve trombozda rolü olabileceği düşünülmektedir ^(24,71). ELN geni Williams Beuren Sendromu, SVAS ve Cutis Laxa rahatsızlığı ile ilişkilendirilmiştir ^(24,78,79). KRIT1; endotel hücrelerinin yapısının ve fonksiyonunun belirlenmesinde, hücre iskelet yapısını koruyup hücre-hücre ve hücre-matriks iletişimine olanak sağlayarak, yardımcı olabilir ^(24,80,81). adRP (otozomal dominant retinitis pigmentosa) hastalarında yapılan mutasyon tarama çalışmalarında vakaların %2'sinin IMPDH1 geni mutasyonu taşıdığı saptanmıştır ⁽⁸²⁾. İzole LCA (Leber konjenital amaurosis) vakalarında da mutasyon gösterilmiştir ⁽⁸²⁾. IMPDH1 mutasyonlarının enzim işlevini etkilemekten çok proteinin tek zincirli nükleik asit bağlama özelliğini değiştirdiği gösterilmiştir ⁽⁸²⁾. Kan plazmasında ve eritrosit örneklerinde IMPDH1 ve 2 geninin ilacın nakli ve kabulü sırasında baskılandığı tespit edilmiştir ⁽⁹⁷⁾. Azathioprine direnci gösteren inflamatuvar barsak hastalarının (IBH) IMPDH1 veya 2 genlerinde mutasyon taşıdığı öne sürülmektedir ⁽⁹⁸⁾. Çalışmamızda Ph pozitif 4 hastanın IMPDH1 geninde duplikasyon saptanmıştır ve ilk kez bu genin KML ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Diğer genlerde bir düzensizlik saptanmamıştır. Daha önceki çalışmalarda KML ile ilişkili olabileceği düşünülen

IL10, hasta grubumuzda bulunan bireylerde normal olarak saptandığından bu çalışmada KML ile ilişkilendirilmemiştir.

Belirtildiği üzere çalışmamızda duplikasyon saptanan FGFR1, PMS2 ve IMPDH1 genleri, önceki çalışmalarda birçok hücrel fonksiyon ve hastalıkla ilişkilendirilmiştir ^(15,24,55-58,72-74,82). Bu genlerden ikisi (PMS2 ve IMPDH1) 7. kromozom üzerinde, bir tanesi de (FGFR1) 8. kromozom üzerinde yerleşim göstermektedir ⁽²⁸⁾. KML'de Ph pozitifliği haricinde farklı kromozomal değişiklikler de ortaya çıkabilmektedir; bunlardan 7. kromozomun dahil olduğu bazıları $t(4;12;7;9;22)(q33;q24;p13;q34;q11)$, $t(7;14)(p22;q23)$, $t(7;22)(p22;q11)$, $t(7;9;22)(p22;q34;q11)$, $der(7)t(7;14)(p22;q13)$ şeklindedir ^(11-14,99,100). Ayrıca 7. kromozom ile 8. kromozomlar arasında gerçekleşen $t(7;8)(q32;q13)$ translokasyonu; Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yeni tanımlanan ve AML'nin farklı bir formu olan Akut Bazofilik Lösemi'nin (ABL*) bir fazında tanımlanmıştır ⁽¹⁰¹⁾. 8. kromozoma dair en iyi bilinen farklılaşma ise blastik fazda trizomi 8 gözlenmesidir ⁽¹⁸⁾. Bunun yanı sıra $t(8;21)(q22;q22)$, $t(8;10;21)$, $t(8;22)(p12;q11)$ ve $t(8;9)$ KML'de 8. kromozom ile ilgili tanımlanan diğer kromozomal farklılaşmalardır ^(16,17,102-105). KML'de önceki çalışmalar ile saptanan bu iki kromozomun farklılaşmalarına ek olarak çalışmamızda 7. kromozom üzerinde bulunan PMS2 ve IMPDH1 geni duplikasyonu, 8. kromozom üzerinde bulunan FGFR1 geni duplikasyonu gösterilmiştir.

Hücre büyüme ve farklılaşmasından, apoptoza; kanser dokularında aşırı eksprese oluşlarından, baskılanmalarına kadar birçok sebepten ötürü bu genler kanser tipleri ile ilişkilendirilmiştir. Bizim hasta grubumuzda elde edilen sonuçlar; duplikasyon saptanan 7 hasta, duplikasyon saptanmayan 41 hasta ve klinik parametreleri ile istatistiksel olarak kıyaslandığında; duplikasyonun saptanmadığı 41 hastada 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım oranı %81 olup duplikasyon saptanan 7 hastada oran %55'dir. Hasta grubumuzda, duplikasyonun varlığının 7 yıllık ilerlemesiz sağkalım olasılığını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Duplikasyon ile sokol risk derecelendirmesi, periferik eosinofil, kemik iliği retiküler lif derecesi, hemoglobin, lökosit ve trombosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Duplikasyon ile imatinib

tedavisine yanıt arasında bizim hasta grubumuzda anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.049$).

Sonuç olarak elde edilen istatistiksel veriler ile hasta grubumuzda duplikasyonların ilerlemesiz sağkalım ve imatinib tedavisine yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ph (+) olan KML hastalarında gen duplikasyonları özellikle 7 yıllık ilerlemesiz sağ kalımda %26'lık bir düşüşe neden olmaktadır. Takip eden çalışmalar ile imatinip tedavisi öncesi ve sonrası gen duplikasyonları araştırılarak anlamlı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca daha geniş bir hasta grubu veya farklı populasyonlarda yapılacak benzer araştırmalar ile KML ve gen duplikasyonlarının ilişkisi net olarak ortaya konabilir.

5. Kaynaklar

1. [Cited 2008 July 30]. <http://www.meb.uni-bonn.de/>
2. Cancer Research Website. American Association for Cancer Research [Cited 2008 July 30]. <http://www.aacr.org/>
3. 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; s1-2.
4. [Cited 2008 July 28]. <http://www.metrohealth.org/>
5. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. Am J Med 1977; 63:125-130.
6. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132:1497.
7. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie KB. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. Blood 1987; 69:1280-1288.
8. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. NEJM 1999; 341(3): 164-172.
9. Koca E, Haznedaroglu İC. Imatinib mesylate and the management of chronic myeloid leukemia (CML). Turk J Haematol 2005; 22(4):161-172.
10. Dinçkol G. Klinik Hemotoloji Kitabı. Nobel Tıp Kitapevleri 2003;199-214.
11. Kawakami K, Miyanishi S, Nishii K, Usui E, Murata T, Shinsato I, et al. A case of acute myeloid leukemia with t(7;11)(p15;p15) mimicking myeloid crisis of chronic myelogenous leukemia. Int J Hematol 2002; 76(1): 80-83.
12. Barbouti A, Höglund M, Johansson B, Lassen C, Nilsson PG, Hagemeijer A, et al. A novel gene, MSI2, encoding a putative RNA-binding protein is recurrently rearranged at disease progression of chronic myeloid leukemia and forms a fusion gene with HOXA9 as a

- result of the cryptic t(7;17)(p15;q23). *Cancer Res* 2003; 63(6):1202-1206.
13. Leibundgut EO, Jotterand M, Rigamonti V, Parlier V, Mühlematter D, Tobler A, et al. A novel BCR-ABL transcript e2a2 in a chronic myelogenous leukaemia patient with a duplicated Ph-chromosome and monosomy 7. *Br J Haematol* 1999; 106(4):1041-1044.
 14. Ikuta K, Torimoto Y, Jimbo J, Inamura J, Hosoki T, Shindo M, et al. A novel five-way chromosomal translocation observed in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 183(1): 69-71.
 15. Murati A, Arnoulet C, Lafage-Pochitaloff M, Adélaide J, Derré M, Slama B, et al. Dual lympho-myeloproliferative disorder in a patient with t(8;22) with BCR-FGFR1 gene fusion. *Int J Oncol* 2005; 26(6):1485-1492.
 16. Lee J, Kern WF, Cain JB, Mulvihill JJ, Li S. A variant t(8;10;21) in a patient with pathological features mimicking atypical chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 159(1):79-83.
 17. Yin CC, Medeiros LJ, Glassman AB, Lin P. t(8;21)(q22;q22) in blast phase of chronic myelogenous leukemia. *Am J Clin Pathol* 2004; 121(6):836-842.
 18. Osman İlhan. Kronik Myelositer Lösemi. 2006. www.osmanilhan.com/
 19. Haznedaroğlu İC. Kronik myeloid lösemi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007; 3(2):56-61.
 20. Akdoğan E, Sönmez M, Yılmaz M, Durmuş A, Ovalı E, Omay SB. Malign fibröz histiositom tanısıyla izlenen hastalarda radyoterapi sonrası kronik myelositer lösemi gelişimi: Olgu Sunumu, *UHOD* 2008; 18(2): 116-120.
 21. Baran Y. Kronik myeloid lösemi genetiği. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007; 3(2):50-55.
 22. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105(7): 2640-2653.
 23. 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.
24. OMIM Website. Online Mendelian Inheritance in Man [Cited 2008 August 09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 25. 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.
 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. 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.
 28. NCBI MapViewer Website. National Center for Biotechnology Information [Cited 2008 August 09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
 29. Vervoort VS, Roselli S, Oshima RG, Pasquale EB. Splice variants and expression patterns of SHEP1, BCAR3 and NSP1, a gene family involved in integrin and receptor tyrosine kinase signaling. *Gene* 2007; 391(1-2): 161–170.
 30. Dorssers LCJ, van Agthoven T, Brinkman A, Veldscholte J, Smid M, Dechering KJ. Breast cancer oestrogen independence mediated by BCAR1 or BCAR3 genes is transmitted through mechanisms distinct from the oestrogen receptor signalling pathway or the epidermal growth factor receptor signalling pathway. *Breast Cancer Res* 2005; 7(1): 82-92.
 31. Schrecengost RS, Riggins RB, Thomas KS, Guerrero MS, Bouton AH. Breast Cancer Antiestrogen Resistance-3 Expression Regulates Breast Cancer Cell Migration through Promotion of p130Cas Membrane Localization and Membrane Ruffling. *Cancer Res* 2007; 67(13): 6174-6182.

32. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(2):104-107.
33. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1687-1693.
34. Köktürk N, Kırıçoğlu CE, Öztürk C. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum* v5, s3, 2003; 127-138.
35. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JHA, Kallemeijn WW, Schutte M. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase or RAS Pathway Mutations in Human Breast Cancer Cell Lines. *Mol Cancer Res* 2007;5(2):195–201.
36. Braun BS, Shannon K. Targeting Ras in myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2008; 14(8):2249-2252.
37. Boztosun A, Kumru S, Gödekmerdan A. Sağlıklı gebelikler ve rekürren spontan abortus (RSA) ile T lenfositler ve bunların salgıladıkları sitokinlerin ilişkilerinin araştırılması. *F.Ü. Sağlık Bil Dergisi* 2004;18(3): 147-155.
38. Ergül AA: B Hepatiti etiyolojisinde konağa ait genetik faktörler. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enst Ankara 2004; s.17-23.
39. Baştürk B, Evke E, Tunalı A, Karakuş S. Interleukin-10 and interferon-gamma cytokine gene polymorphisms may be risk factors for chronic myelogenous leukemia. *Turk J Hematol* 2005; 22(4): 191-196.
40. Güngör B: Lone atriyal fibrilasyonda interleukin-1 β ve interleukin-1 reseptör antagonisti gen polimorfizmi. Kardiyoloji Uzmanlık Tezi, Prof. Dr. Siyami Ersek Göğüs, Kalp ve Damar Cerrahisi Merkezi Kardiyoloji Kliniği, İstanbul 2007; 24-25.
41. Fernandez S, Rosenow AA, James IR, Roberts SG, Nolan RC, French MA, et al. Recovery of CD4+ T Cells in HIV patients with a stable virologic response to antiretroviral therapy is associated with polymorphisms of interleukin-6 and central major histocompatibility complex genes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41(1):1-5.
42. Miranda C, Roccato E, Raho G, Pagliardini S, Pierotti MA, Greco A. The TFG protein, involved in oncogenic rearrangements, interacts

- with TANK and NEMO, two proteins involved in the NF-kappaB pathway. *J Cell Physiol* 2006; 208(1):154-160.
43. Wee S, Wiederschain D, Maira SM, Loo A, Miller C, Debeaumont R, et al. PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 28:1-5.
 44. Yavuz S: Respiratuvar distres sendromlu prematüre bebeklerde sitokin kompleman düzeylerinin ve akut faz reaktanlarının RDS şiddeti, ventilatör ilişkili pnömoni ve mekanik ventilasyon yöntemi ile ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Pediatri ABD, Adana 2008; 32-35.
 45. Sameni S, Ghayumi MA, Mortazavi G, Faghih Z, Kashef MA, Ghaderi A. Lack of association between interleukin-13 gene polymorphisms (-1055 C/T and +2044 G/A) in Iranian patients with lung cancer. *Mol Biol Rep* 2008; 28: 1-11
 46. Deepak P, Kumar S, Acharya A. Gender dichotomy in antibody response in a T-cell lymphoma: involvement of IL-13 and gonadal hormones. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59(2):127-38.
 47. Iseman M.D. İmmünite ve Patogenez. Çeviri: Klinisyenler için Tüberküloz Kılavuzu Çeviri. Nobel Tıp Kitapevleri 2002; 63-96.
 48. Inoue T, Kira R, Nakao F, Ihara K, Bassuny WM, Kusuhara K, et al. Contribution of the interleukin 4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis. *Arch Neurol* 2002; 59: 822-827.
 49. Söylemezoğlu F. Astrositom progresyonunun moleküler genetik temelleri. *Türk Noroşirürji Dergisi* 2000;10: 169 -175.
 50. Ikeda J, Tada M, Ishii N, Saya H, Tsuchiya K, Okaichi K, et al. Restoration of endogenous wild-type p53 activity in a glioblastoma cell line with intrinsic temperature-sensitive p53 induces growth arrest but not apoptosis. *Int J Cancer* 200; 94(1): 35-43.
 51. Ekmekçi A, Konaç E, Onen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal* 2008; 21(3): 1-4.
 52. Aydın M: Hematolojide farmakogenetik. Moleküler Hematoloji, Klinik Hematoloji için Pratik Genetik Yaklaşım Kursu, Antalya 11 Kasım 2006; 22-25.

53. Chavanpatil MD, Khadair A, Gerard B, Bachmeier C, Miller DW, Shekhar MP, et al. Surfactant-polymer nanoparticles overcome P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Mol Pharm* 2007; 4(5):730-738.
54. Lee TB, Park JH, Min YD, Kim KJ, Choi CH. Epigenetic mechanisms involved in differential MDR1 mRNA expression between gastric and colon cancer cell lines and rationales for clinical chemotherapy. *BMC Gastroenterology* 2008, 8:33 1-34.
55. Genetics home reference. U.S. National Library of Medicine.[Cited 2008 August 09]. <http://ghr.nlm.nih.gov/>
56. Stachowiak MK, Maher PA, Stachowiak EK. Integrative nuclear signaling in cell development--a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol* 2007; 26(12):811-826.
57. Miles RJ, Price DK, Figg WD. Temporal-mediated FGFR1 independence: Implications for targeting candidate molecules in prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(8): 1-23.
58. Dong S, Kang S, Lonial S, Khoury HJ, Viallet J, Chen J. Targeting 14-3-3 sensitizes native and mutant BCR-ABL to inhibition with U0126, rapamycin and Bcl-2 inhibitor GX15-070. *Leukemia* 2008; 22(3): 572-577.
59. Öztürk M. Meme kanserinin genetiği ve risk faktörleri. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyum Dizisi 2006; 54: 15-26.
60. Basak S, Jacobs SB, Krieg AJ, Pathak N, Zeng Q, Kaldis P, et al. The metastasis-associated gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation. *Mol Cell* 2008; 30(3):303-314.
61. Fan W, Luo J. RecQ4 facilitates UV-induced DNA damage repair through interaction with nucleotide excision repair factor XPA. *J Biol Chem* 2008; 7: 1-16.
62. Akkaynak Ş: Servikal neoplazilerde histolojik tanı ile P16 ve Kİ67 boyanma oranları ve yoğunlukları arasındaki korelasyon. Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araş. Hast. Patoloji Bölümü İstanbul 2007; 19-21.
63. Özcan S, Abay E. Bipolar bozukluğun genetiği. *Anadolu Psikiyatri Dergisi* 2004; 5: 163-178.

64. Zenteno JC, Ruiz G, Pérez-Cano HJ, Camargo M. Familial Wolfram syndrome due to compound heterozygosity for two novel WFS1 mutations. *Mol Vis* 2008; 14:1353-1357.
65. GeneCards Website. Weizmann Institute of Science. [Cited 2008 August 09]. <http://www.genecards.org/>
66. Sengupta S, Michener CM, Escobar P, Belinson J, Ganapathi R. Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1 (OCIAD1), a key player in ovarian cancer cell adhesion. *Gynecol Oncol* 2008; 109(2): 226-233.
67. Naor Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): Studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol* 2008; 5: 1-20.
68. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Costa EM, Versiani B, Baptista MT, et al. Loss-of-Function Mutations In The Genes Encoding Prokineticin-2 or Prokineticin Receptor-2 Cause Autosomal Recessive Kallmann Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 5: 1-3.
69. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett* 2007; 114(1):1-8.
70. Ratner L. Adult T cell leukemia lymphoma. *Front Biosci* 2004; 9: 2852-2859.
71. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 2008; 299(11):1306-1314.
72. Vasen HF. Review article: The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26 (2): 113-126.
73. Rahner N, Höefler G, Högenauer C, Lackner C, Steinke V, Sengteller M, et al. Compound heterozygosity for two MSH6 mutations in a patient with early onset colorectal cancer, vitiligo and systemic lupus erythematosus. *Am J Med Genet A* 2008; 146A(10): 1314-1319.
74. Lebrun C, Olschwang S, Jeannin S, Vandenbos F, Sobol H, Frenay M. Turcot syndrome confirmed with molecular analysis. *Eur J Neurol* 2007; 14(4): 470-472.

75. Gazioğlu N. Hipofiz Adenomlarının Moleküler Genetik Özellikleri. Türk Nöroşirürji Dergisi Cilt: 2006; 61(1): 18-19.
76. Toth J, Egervari K, Klekner A, Bogнар L, Szanto J, Nemes Z, et al. Analysis of EGFR Gene Amplification, Protein Over-expression and Tyrosine Kinase Domain Mutation in Recurrent Glioblastoma. Pathol Oncol Res 2008; 1- 17.
77. Voelzke WR, Petty WJ, Lesser GJ. Targeting the epidermal growth factor receptor in high-grade astrocytomas. Curr Treat Options Oncol 2008; 9(1): 23-31.
78. Park S, Seo EJ, Yoo HW, Kim Y. Novel mutations in the human elastin gene (ELN) causing isolated supravalvular aortic stenosis. Int J Mol Med 2006; 18(2):329-332.
79. Watts CR, Awan SN, Marler JA. An investigation of voice quality in individuals with inherited elastin gene abnormalities. Clin Linguist Phon 2008; 22(3):199-213.
80. Limaye N, Revencu N, Van Regemorter N, Garzon M, Bonduelle M, Chung W, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: KRIT1. Disease: cerebral cavernous malformation. Hum Genet 2007; 122(5): 552.
81. Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. J Cell Biol 2007; 179(2):247-254.
82. Özgül RK, Öğüş A. Kalıtsal periferik retina dejenerasyonları. J Retina-Vitreous 2006; 14(2): 89-94.
83. Yurdakök M. Respiratuar distres sendromunun ve yenidoğanın geçici takipnesinin kalıtsal yönü. Turk J Pediatr 2006; 49(3): 229-246.
84. Carlton VEH, Harris BZ, Puffenberg EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, et al. Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. Nature Genet 2003; 34: 91-96.
85. Kaklamani VG, Pasche B. Role of TGF-beta in cancer and the potential for therapy and prevention. Expert Rev Anticancer Ther 2004; 4(4):649-661.

86. Ural S, Örmən B, Coşkun NA, Bozdağ H, Yavaş S, Karakurt S. Tuberoz skleroz kompleksi. Olgu sunumu İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi 2005; 43 (2): 111-114.
87. 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.
88. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16:1215.
89. Internet Search. Google TM. [Cited 2008 August 09]. <http://www.google.com/>
90. AppliedBiosystems Home Page. [Cited 2008 August 09]. <http://www.appliedbiosystems.com/>
91. 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.
92. Maxwell CA, Moreno V, Sole X, Gomez L, Hernandez P, Urruticoechea A, et al. Genetic interactions: the missing links for a beter understanding of cancer susceptibility, progression and treatment. Mol Cancer 2008; 7(4): 1176-1186.
93. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. Eur J Cancer 2008; 44(7): 946-953.
94. Matheson EC, Hall AG. Assessment of mismatch repair function in leukaemic cell lines and blasts from children with acute lymphoblastic leukaemia. Carcinogenesis 2003; 24(1): 31-38.
95. Hayward BE, De Vos M, Valleley EM, Charlton RS, Taylor GR, Sheridan E, et al. Extensive gene conversion at the PMS2 DNA mismatch repair locus. Hum Mutat 2007; 28(5): 424-30.
96. De Vos M, Hayward BE, Picton S, Sheridan E, Bonthron DT. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. Am J Hum Genet 2004; 74(5): 954-64.

97. Bremer S, Mandla R, Vethe NT, Rasmussen I, Rootwelt H, Line PD, et al. Expression of IMPDH1 and IMPDH2 after transplantation and initiation of immunosuppression. *Transplantation* 2008; 85(1): 55-61.
98. Roberts RL, Gearry RB, Barclay ML, Kennedy MA. IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *Pharmacogenomics J* 2007; 7(5): 312-317.
99. Ikuta K, Torimoto Y, Jimbo J, Inamura J, Hosoki T, Shindo M, et al. A novel five-way chromosomal translocation observed in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;183(1): 69-71.
100. Yamamoto K, Yakushijin K, Nishikawa S, Minagawa K, Katayama Y, Shimoyama M, et al. Imatinib resistance in a novel translocation der(17)t(1;17)(q25;p13) with loss of TP53 but without BCR-ABL kinase domain mutation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 183: 77-81.
101. Pidala J, Pinilla-Ibarz J, Cuaing HD. A case of acute basophilic leukemia arising from chronic myelogenous leukemia with development of t(7;8)(q32;q13). *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 182: 46-49.
102. Yin CC, Medeiros LJ, Glassman AB, Lin P. t(8;21)(q22;q22) in blast phase of chronic myelogenous leukemia. *Am J Clin Pathol* 2004; 121(6): 836-842.
103. Murati A, Arnoulet C, Lafage-Pochitaloff M, Adélaide J, Derré M, Slama B, et al. Dual lympho-myeloproliferative disorder in a patient with t(8;22) with BCR-FGFR1 gene fusion. *Int J Oncol* 2005; 26(6): 1485-1492.
104. Lee J, Kern WF, Cain JB, Mulvihill JJ, Li S. A variant t(8;10;21) in a patient with pathological features mimicking atypical chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;159(1):79-83.
105. Borker A, Yu L, Ode D. Blast crisis of chronic myeloid leukemia: diagnosis prompted by T(8;9). *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24(8): 670-671.

Özgeçmiş

İsim : Can
Soyisim : KILINÇARSLAN

Adres :
İsmet Paşa Cad. Çarşı içi Mah. No:35 Pk.67670
Gökçebey / Zonguldak / TÜRKİYE (Ev)
Telefon : +90 372 512 2413
Cep Telefonu : +90 505 706 0752
E-posta : can_kilincarslan@hotmail.com
Doğum Tarihi : 17.06.1982
Doğum Yeri : Devrek / Zonguldak /TÜRKİYE
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti (T.C.)
Medeni Hali : Bekar
Cinsiyet : Erkek
Sürücü Belgesi : Var (B sınıfı – ver tarh.2000)
Askerlik Durumu : Tecilli (2010)

Eğitim Durumu :

1987 - 1993 İlkokul; Gökçebey İlkokulu. Zonguldak/Türkiye
1993 - 2000 İlköğretim, Lise; Devrek Anadolu Lisesi. Zonguldak/Türkiye
2001 - 2006 Lisans; Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Örgün).
İzmir/Türkiye (Diploma Notu: **73/100**)
2006- 2008 Yüksek Lisans; Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyoloji ve Genetik ABD. Gaziantep/Türkiye (Diploma Notu: **94/100**)

Makaleler ;

1. **Kilincarslan C**, Pehlivan S. Sağlıklı Türk Populasyonunda Kolesterol Ester Transfer Protein Genindeki TaqIB Polimorfizm Sıklığının Arastırılması. Cukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005; cilt.30: 1-6.

(**Kilincarslan C**, Pehlivan S. The Frequency of TaqIB polymorphism in Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Gene in Western Anatolia. Cukurova Medical Journal. 2005; vol.30: 1-6)

Ulusal ve Uluslar arası Kongre Bildirileri:

1. Sağlıklı Türk Populasyonunda Kolesterol Ester Transfer Protein (CETP) Genindeki Taq1B polimorfizm Sıklığının Araştırılması. **Kilincarslan C.** Pehlivan S. Adnan Menderes University, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Kusadasi,Aydin; 2006.
2. Silver Russell Sendromlu Hastalarda 7. kromozom uniparental Disomisi Görülme Sıklığı. **Karaca E.**, Pehlivan S., Ozkinay F., **Kilincarslan C.** VII. Ulusal Prenatal Tani ve Tıbbi Genetik Kongresi, Kayseri; 17-20 Mayıs 2006,. (Oral Presentation)
3. Interleukin 1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism in Childhood Nephrotic Syndrome. A. Balat, T. Sever, **C. Kilincarslan**, M. Buyukcelik, N. Araz, S. Pehlivan. 14th Congress of the International Pediatric Nephrology Association 31 August- 4 September 2007, Budapest, Hungary; 385 (P) 1506.
4. Gaziantep ilinde Talassemi Mutasyonlarının Sıklığı. Sacide Pehlivan, Vahap Okan, Elif Güler, Mehmet Yılmaz, Tuğçe Sever, Ebru Dikensoy, **Can Kılınçarslan**, Özcan Balat, Mustafa Pehlivan.. Turkish Journal Of Hematology Vol.24 No:4 2007 XXXIII. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özel Kitabı Bildiri:120 Poster No:P0048 Sayfa:99.
5. Multipl Myelomalı Olgularda Tromboza Yatkınlıkta Rolü Olan G Polimorfizmlerinin Sıklığı. Mustafa Pehlivan, Vahap Okan, Mehmet Yılmaz, **Can Kılınçarslan**, Tuğçe Sever, Sacide Pehlivan. Bildiri:267 Poster No:P0195 Sayfa 156-157 Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özel Kitabı. Turkish Journal Of Hematology, 2007, Vol.24 No.4; 99 .
6. Nefrotik Sendromlu Çocuklarda İnterlökin 1 reseptör Antagonisti Gen Polimorfizminin Araştırılması. Balat A., Sever T., **Kilincarslan C.**, Büyükçelik M., Çöl A., Oguzkan Balci S., Pehlivan S.. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. Oct 2007 Vol.16 No:4, P;102.
7. Complete Androgen Insensitivity Syndrome Within a Large Turkish Family From Southeast of Anatolia G. Cankus, G. Ogur, E. Ozturk, **C. Kilincarslan**, O. Balat, S. Pehlivan. Poster. EJHG Supplement 2 May 2008, Volume 16 P01.262.
8. The Frequency of Cholesteryl Ester Transfer Protein Taq1B Polymorphism in the Western Anatolia **C. Kilincarslan**, S. Pehlivan. Poster. Supplement 2 May 2008, EJHG Volume 16 P07.025.
9. Molecular Basis Of B-Thalassemia Mutations in an Urban Area of Gaziantep Turkey. S.Pehlivan, V.Okan, E. Guler, M. Yilmaz, T. Sever, E. Dikensoy, **C. Kilincarslan**, O. Balat, M. Pehlivan. Haematologica The Hematology Journal 13th Congress of the European Hematology Association Copenhagen, Denmark, June 12-15,2008, ISSN 0390-6078 P.0849.
10. Kilincarslan C. Kronik Myelositer Lösemide Kromozom Düzensizliklerinin MLPA Yöntemi İle Araştırılması.Gaziantep Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi, Ocak, 2009.

Kurs ve Kongre Katılımları :

1. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi (18. National Biology Congress – **Kusadasi** (Oral Presentation) - **Turkey**
2. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi (VII. National Prenatal Diagnosis and Medical Genetics Congress) - **Turkey**
3. 1. Ege Genetik Kongresi (Aegean Genetics Congress) – Ege University Faculty Of Medicine **Izmir - Turkey**
4. II. Congress Of Molecular Medicine 2007 – **İstanbul - Turkey**
5. QF-PCR Workshop 2006 – Ege University Faculty Of Medicine Medical Genetics Dept. **Izmir - Turkey**
6. PGD Course 2007 in II. Congress Of Molecular Medicine 2007 – **İstanbul - Turkey**
7. Bertinoro Course in Molecular Cytogenetics and DNA microarrays, October, 14-16, 2007 – **Bertinoro - Italy**

Laboratuvar Deneyimi :

- 2004-2006** Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Genetik Laboratuvarı.
- 2004-2007** Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler ve Sitogenetik Laboratuvarları.
- 2006-2008** Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi. Moleküler Genetik Tanı Laboratuvarı.

Çeşitli İş ve Sosyal Kuruluşlarda Deneyim :

- 2003-2004** Brio Erkek Giyim, part-time satış elemanı olarak. Alsancak/İzmir
- 2004-2006** Reklam Ajansı, tanıtım elemanı olarak. Bornova/İzmir
- 2004-2006** EGESAT, Ege Üniversitesi Sosyal Topluluğu, yönetim kurulu üyesi olarak. Ege Üniversitesi, Bornova/İzmir.
- 2004-2005** Divers Delight Diving Club, PADI Dive Master olarak. Marmaris-Fethiye.
- 2006-2008** Gaziantep Araştırma ve Uygulama Hastanesi Moleküler Genetik Tanı Birimi, moleküler genetik uzmanı ve biyolog olarak. Gaziantep