

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

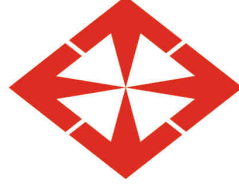
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**İLAÇ DİRENCİ GELİŞEN KRONİK MYELOİD LÖSEMİ
OLGULARINDA BCR-ABL1 T315I MUTASYONLARI VE *AH11*
GEN İFADELENME DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuğçe BULAKBAŞI BALCI

Ankara, 2009



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**İLAC DİRENCİ GELİŞEN KRONİK MYELOİD LÖSEMİ
OLGULARINDA BCR-ABL1 T315I MUTASYONLARI VE AHI1
GEN İFADELENME DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuğçe BULAKBAŞI BALCI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Feride İffet ŞAHİN

Ankara, 2009

Bu tez Başkent Üniversitesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: KA 09/47

ÖNSÖZ

Dört yıllık uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel gelişimime olan büyük katkıları, her konudaki desteği ve değerli önerileri için tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Feride İffet Şahin'e,

Tüm aşamalardaki emekleri, yardımları ve rehberliği için Sayın Doç. Dr. Zerrin Yılmaz'a,

Değerli tecrübelerinden faydalanmama olanak veren Sayın Doç. Dr. Belgin Ataç ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Erkan Yurtcu'ya,

Tez çalışmasında bize destek olan Ankara ve Adana'daki Hematoloji Bilim Dalı çalışanlarına,

Tez yazım aşamasındaki düzeltmeleri için Ece Başyigit'e ve istatistik çalışmasındaki büyük yardımları ve ayırdığı zamanı için Gözde Özer'e,

Beraber çalışmaktan hep gurur duyduğum, dört yıl boyunca iyi ve kötü zamanlarımda yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim ve hissedeceğim çalışma arkadaşlarım, dostlarım; Uzm. Dr. Özge Özalp Yüreğir, Uzm. Kim. Esra Başyigit, Bio. Elif Yücel, Kim. Derya Ertaş, Uzm. Bio. Sema Akgümüş, Tek. Şeyma Ateş, sekreterlerimiz Seval Koç, Nesrin Tellioğlu, Zeliha Kaçar'a ve özellikle tez aşamasında olmak üzere, tüm süreçteki önerileri, emeği ve yardımı için, her zaman olduğu gibi arkamda olduğunu bildiğim arkadaşım Arş. Gör. Dr. Özge Özer'e,

Eğitimim ve gelişimime verdikleri büyük önem sayesinde buraya kadar gelebildiğim, sınırsız sevgileri ile bana güç veren anne ve babama,

Ve her zaman desteğiyle doğru yolda, ayakta kalmamı sağlayan sevgili eşim Yener'e,

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tuğçe BULAKBAŞI BALCI

ÖZET

Kronik myeloid lösemi (KML) patogenezinden sorumlu t(9;22)(q34;q11) translokasyonunun ürünü olan *BCR-ABL1*'in moleküler olarak izlenebilmesi ve inhibitörü imatinibin kullanıma girmesiyle KML'de moleküler patogeneze yönelik tedavi uygulanmaya başlanmıştır. Uzun dönem sonuçlara göre bir grup hastada imatinib tedavisine direnç geliştiği gözlenmiş ve yeni tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir.

Çalışmamızda KML olgularında, imatinib direncinden sorumlu mekanizmalardan en sık görüleni olan kinaz bölgesi T315I mutasyonunun varlığı araştırılmıştır. Aynı örneklerde, KML patogenezinde *BCR-ABL1* aracılı lösemik transformasyonda JAK/STAT yolu üzerinden etkili olduğu ve tirozin kinaz inhibitörlerine yanıtta da yeri olduğu düşünülen *AHII* adlı yeni bir genin ifadenme analizi yapılmıştır.

Çalışılan 38 KML olgusunun tedavilerinin farklı aşamalarındaki toplam 83 örneğinden yapılan analizlerde, bir hastada (%2.63) T315I mutasyonu saptanmıştır. Tanı anındaki KML örneklerinde *AHII* ifadenme düzeyleri ile KML olmayan kontroller arasında anlamlı farklılık saptanmamakla beraber, imatinib tedavisi görmüş olguların düzeylerinin hem kontrol grubundan, hem de yeni tanı grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. İmatinib tedavisinin ilk 6 ayında düzeylerin arttığı, zamanla azaldığı gözlenmiştir. İmatinib tedavisine yanıt verenlerle vermeyenler arasında fark saptanmamıştır. Dasatinib kullanan olgularda ise *AHII* düzeylerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. *BCR-ABL1* transkript düzeyleri ile *AHII* düzeyleri arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır.

Bu sonuçlardan yola çıkılarak, *AHII* geninin KML tedavisindeki değişiminin, *BCR-ABL1*'den bağımsız mekanizmalarla da olabileceği düşünülmüştür. Daha fazla sayıda hastada *AHII* geninin ifadenmesinin değerlendirmesi ve *AHII*'in etkili olduğu düşünülen yollardan JAK/STAT ve Src ailesi kinazları yollarının üyelerinin de ifadenme açısından çalışılması yol gösterici olacaktır.

Anahtar sözcükler: Kronik myeloid lösemi, T315I mutasyonu, *AHII*.

ABSTRACT

Detecting BCR-ABL1 T315I Mutations and *AHII* Gene Expression Levels in Chronic Myeloid Leukemia Patients With Drug Resistance

The abnormality responsible for chronic myeloid leukemia (CML) is the t(9;22)(q34;q11) translocation and its product BCR-ABL1. With the availability of molecular monitoring of *BCR-ABL1* and the use of its inhibitor, imatinib; CML therapy now targets its molecular pathology. Long term follow up of this therapy revealed a group of patients with acquired imatinib resistance and alternative tyrosine kinase inhibitors have been developed.

In our study, the presence of the most common mechanism of imatinib resistance, kinase domain T315I mutation was investigated in CML patients. In the same samples, expression analysis of *AHII* was performed, a novel gene that has been thought to have a role in both BCR-ABL1 mediated leukemic transformation via the “JAK/STAT” pathway and response to tyrosine kinase inhibitors.

Analysis of 83 samples from 38 CML cases revealed that one patient (2.63%) harboured the T315I mutation. While no significant difference in *AHII* expression levels was observed between newly diagnosed CML samples and non-CML controls; CML samples under imatinib therapy had levels significantly higher than both newly diagnosed samples and controls. In the first 6 months of imatinib therapy, *AHII* expression levels were found to increase, then decrease gradually in time. There was no significant difference between imatinib responders and non-responders, while cases on dasatinib had significantly lower *AHII* levels. No significant correlation between BCR-ABL1 transcript levels and *AHII* expression levels could be demonstrated in the samples.

It is proposed that the change of *AHII* expression during CML therapy is probably under control of mechanisms independent from BCR-ABL1. By analyzing *AHII* expression levels in a greater number of patients and investigating expressions of the JAK/STAT and Src family kinases pathway members involved in *AHII* mediated signalling could be guiding.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, T315I mutation, *AHII*

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No:</u> |
|---|------------------|
| ÖNSÖZ..... | i |
| ÖZET | ii |
| İNGİLİZCE ÖZET | iii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ..... | iv |
| KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| TABLolar DİZİNİ..... | x |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.1 Hematopoetik Hücrelerin Gelişimi..... | 2 |
| 2.2 Kronik Myeloid Lösemi | 4 |
| 2.2.1 Tanım ve Tarihçe..... | 4 |
| 2.2.2 İnsidans | 4 |
| 2.2.3 Diğer Myeloproliferatif Hastalıklarla İlişkisi..... | 5 |
| 2.2.4 Etyoloji | 6 |
| 2.2.5 Klinik | 6 |
| 2.2.6 Progresyon..... | 7 |
| 2.3 KML’de Sitogenetik Değişiklikler | 7 |
| 2.4 KML’de Moleküler Patogenez | 10 |
| 2.4.1 BCR-ABL1 Aracılı Lösemik Transformasyonun Moleküler Mekanizması..... | 10 |
| 2.4.2 BCR-ABL1 Aracılı Lösemik Transformasyonun Moleküler Mekanizması..... | 14 |
| 2.5 KML Hastalığında Tanı..... | 18 |
| 2.5.1 Periferik Kan Bulguları | 18 |
| 2.5.2 Kemik İliği Bulguları | 19 |
| 2.5.3 Sitogenetik Analiz | 20 |
| 2.5.4 Moleküler Sitogenetik Analiz..... | 20 |
| 2.5.5 Moleküler Analiz | 21 |
| 2.6 KML Hastalığında Tedavi..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 2.6.1 Hidroksiüre | 22 |
| 2.6.2 Busulfan..... | 22 |
| 2.6.3 α -interferon | 23 |
| 2.6.4 Allojeneik Kök Hücre Nakli..... | 23 |
| 2.6.5 İmatinib..... | 23 |
| 2.6.6 İmatinib Direnci..... | 25 |
| 2.6.7 Diğer Tirozin Kinaz İnhibitörleri | 28 |
| 2.7 <i>AHI-1</i> (Abelson Helper Integration Site-1) | 30 |
| 2.7.1 <i>AHI-1</i> geninin yapısı ve fonksiyonu..... | 30 |
| 2.7.2 <i>AHI-1</i> geninin onkogenez ile ilişkisi | 32 |
| 2.7.3 <i>AHI-1</i> geninin hematopoez ve lösemi gelişimi ile ilişkisi..... | 32 |
| 2.7.4 <i>AHI-1</i> geninin KML ile ilişkisi..... | 33 |
| 2.8 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Gen İfadelenmesinin Analizi..... | 35 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 37 |
| 3.1 Olgular | 37 |
| 3.2 Yöntem | 37 |
| 3.2.1 Kullanılan cihazlar..... | 38 |
| 3.2.2 Kullanılan kimyasallar..... | 38 |
| 3.2.3 Kullanılan tampon ve çözeltiler..... | 39 |
| 3.2.4 Periferik kan ya da kemik iliğinden RNA eldesi..... | 40 |
| 3.2.5 RNA'dan cDNA eldesi..... | 40 |
| 3.2.6 T315I mutasyonu tespiti için PZR ve enzim kesimi | 41 |
| 3.2.7 Q-RT-PCR ile <i>AHII</i> ifadenme analizi..... | 43 |
| 3.2.8 İstatistiksel analiz | 46 |
| 4. BULGULAR | 47 |
| 4.1 T315I Mutasyonları | 49 |
| 4.2 <i>AHII</i> düzeyleri..... | 50 |
| 5. TARTIŞMA..... | 55 |
| 6. SONUÇLAR..... | 63 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 64 |
| 8. EKLER | 73 |

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---------------|--|
| α –IFN | : α -interferon |
| ABL1 | : <i>Abelson murine leukemia 1</i> |
| AF | : Akselere faz |
| AH11 | : Abelson Helper Integration Site 1 |
| ALL | : Akut lenfoblastik lösemi |
| AML | : Akut myeloid lösemi |
| A-MuLV | : Abelson Murine leukemia virusu |
| Ara-C | : Sitozin arabinozid |
| BCR | : <i>Breakpoint cluster region</i> |
| BF | : Blastik faz |
| cDNA | : Komplementer deoksiribonükleik asit |
| CFU | : Koloni oluşturan ünite (<i>colony forming unit</i>) |
| CFU-E | : Eritrosit – koloni oluşturan ünite |
| CFU-GM | : Granülosit-makrofaj – koloni oluşturan ünite |
| Cp | : Crossing point |
| Ct | : Threshold cycle |
| dHPLC | : Denatüran yüksek performanslı likit kromatografi |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| dNTP | : Deoksinükleotid trifosfat |
| DSÖ | : Dünya Sağlık Örgütü |
| dTTP | : Deoksitimidin trifosfat |
| dUTP | : Deoksiuridin trifosfat |
| EtBr | : Etidiyum Bromür |
| FAK | : Fokal adezyon kinaz |
| FISH | : Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon |
| GAP | : <i>GTPase activating protein domain</i> |
| GM-CSF | : Granülosit-makrofaj <i>colony stimulating factor</i> |
| GRB2 | : <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| IL-3 | : Interlökin-3 |
| IRIS | : International Randomized study of interferon vs imatinib |
| JAK | : Janus kinaz |
| JMML | : Jüvenil myelomonositik lösemi |
| kb | : kilobaz |
| kDa | : kiloDalton |

| | |
|-----------------|---|
| KF | : Kronik faz |
| KML | : Kronik myeloid lösemi |
| KMPH | : Kronik myeloproliferatif hastalıklar |
| MAPK | : <i>Mitogen activated protein kinase</i> |
| M-BCR | : Majör BCR |
| m-BCR | : Minör BCR |
| MDR1 | : <i>Multidrug Resistance</i> |
| MDS | : Myelodisplastik Sendrom |
| mm ³ | : milimetre küp |
| M-MuLV | : Moloney murine leukemia virusu |
| mRNA | : mesajcı ribonükleik asit |
| μ-BCR | : Mikro BCR |
| μM | : mikromolar |
| μl | : Mikrolitre |
| ng | : nanogram |
| PBS | : Fosfat tamponlu salin |
| Ph | : Philadelphia |
| PI3K | : <i>Phosphatidyl inositol 3 kinase</i> |
| PZR | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| Q-RT-PCR | : Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu |
| RasGAP | : GTPase activating protein |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| RT-PCR | : Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu |
| SAK | : Src ailesi kinazları |
| SH1, 2, 3 | : Src homoloji bölgeleri |
| Sos | : <i>Son of sevenless</i> |
| STAT | : <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> |
| TBE | : Tris Baz EDTA |
| Tyr177 | : 177. pozisyondaki tirozin |
| U | : Ünite |
| UNG | : Urasil-N-glikozilaz |
| WD40 | : Triptofan – aspartat 40 bölgesi |
| XPB | : <i>Xeroderma pigmentosum – B</i> |
| Y177 | : 177. pozisyondaki tirozin |
| °C | : Santigrad derece |

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

| | | |
|------------|---|----|
| Şekil 2.1 | Hematopoez basamaklarındaki hücrelerin görünümü | 3 |
| Şekil 2.2 | t(9;22) translokasyonunun kırık noktalarının, Ph kromozomunun ve BCR-ABL1 füzyon molekülünün şematik gösterimi | 8 |
| Şekil 2.3 | Bcr proteininin şematik gösterimi | 11 |
| Şekil 2.4 | <i>BCR</i> ve <i>ABL1</i> genlerindeki farklı kırık noktalarının ve oluşan mRNA'ların şematik gösterimi | 13 |
| Şekil 2.5 | <i>BCR</i> , <i>ABL1</i> ve <i>BCR-ABL1</i> genlerinin ve kodladıkları proteinlerin şematik gösterimi..... | 13 |
| Şekil 2.6 | Onkogenik <i>BCR-ABL</i> tirozin kinazının aktivasyonu ve etkilediği yollar | 14 |
| Şekil 2.7 | <i>BCR-ABL1</i> molekülünün hücre içi sinyal yollarıyla iletişiminin şematik gösterimi..... | 17 |
| Şekil 2.8 | 400x büyütmedeki periferik kan yaymasında lökositöz ve myeloid prekürsörlerle birlikte bazofili, eozinofili ve trombositöz görünümü | 19 |
| Şekil 2.9 | 18 no'lu olguya ait karyotip görüntüsü | 20 |
| Şekil 2.10 | 18 no'lu olguya ait interfaz nukleusuna uygulanmış <i>BCR/ABL1</i> Dual Color Dual Fusion Translokasyon (Vysis) probunun FISH görüntüsü | 21 |
| Şekil 2.11 | Moleküler analiz sonuçlarına göre tedaviye yanıtın belirlenmesi ve saptanan <i>BCR-ABL1</i> transkript düzeyinin hastadaki lösemi hücrelerinin sayısı ile olan ilişkisi | 22 |
| Şekil 2.12 | İmatinibe klinik direnç ile ilişkili <i>BCR-ABL1</i> kinaz bölgesi mutasyonları | 27 |
| Şekil 2.13 | KML tedavisinde kullanılan yeni moleküllerin <i>BCR-ABL1</i> yolağında etki yerlerinin gösterimi | 30 |
| Şekil 3.1 | 412 baz çiftlik <i>ABL1</i> cDNA PZR ürününün <i>Dde</i> I restriksiyon haritası | 43 |
| Şekil 3.2 | <i>GAPDH</i> geni için $10 - 10^{-4}$ dilüsyonlarla oluşturulan standartlar..... | 45 |
| Şekil 3.3 | <i>AHI-1</i> geni için $10 - 10^{-4}$ dilüsyonlarla oluşturulan standartlar | 46 |
| Şekil 4.1 | 14 örneğe ait T315I PZR sonrası enzim kesimlerinin %2'lik yüksek çözünürlüklü agaroz jel elektroforezi görüntüsü..... | 49 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Şekil 4.2 | Kontrol grubu ile yeni tanı ve tedavi altındaki KML hastalarının <i>AHII</i> düzeylerinin ortalamaları, bazı konum ölçüleri ve gruplardaki örnek sayıları | 50 |
| Şekil 4.3 | İmatinib tedavi sürelerine göre <i>AHII</i> ifadenme düzeylerinin ortalamaları, bazı konum ölçüleri ve gruplardaki örnek sayıları..... | 51 |
| Şekil 4.4 | İmatinib tedavi sürelerine göre tanıdan itibaren takipli hastaların AHI-1 ifadenme düzeylerinin ortalamaları ve bazı konum ölçüleri | 52 |
| Şekil 4.5 | Kullanılan ilaç ve tedavi yanıtına göre <i>AHII</i> ifadenme düzeylerinin ortalamaları, bazı konum ölçüleri ve gruplardaki örnek sayıları..... | 53 |
| Şekil 4.6 | Kullanılan ilaca göre <i>AHII</i> ifadenme düzeylerinin ortalamaları, bazı konum ölçüleri ve gruplardaki örnek sayıları..... | 54 |

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

| | | |
|-----------|---|----|
| Tablo 2.1 | DSÖ 2008 sınıflamasına göre kronik myeloproliferatif hastalıklar | 5 |
| Tablo 2.2 | KML’de tedavi yanıtını izlemede kullanılan kriterler..... | 24 |
| Tablo 2.3 | Erken kronik faz KML hastalarında imatinib 400 mg/gün tedavisine yanıt-sızlık, suboptimal yanıt kriterleri ve yanıt-sızlık uyarıları..... | 26 |
| Tablo 3.1 | Çalışılan genlerin primer dizileri ve ürün uzunlukları | 41 |
| Tablo 3.2 | Dde I enzimi ile kesim sonrası beklenen kesilmemiş, yabancı tip ve mutant tip ürünlerin ve olası ek bantların uzunlukları..... | 43 |
| Tablo 3.3 | Light Cycler cihazında <i>AHII</i> ve <i>GAPDH</i> genleri için Q-RT-PCR programı | 44 |
| Tablo 4.1 | Olguların demografik özellikleri, tanı anındaki klinik durumları, varsa karyotipleri, takip süreleri, en son takipte kullandıkları tedavi ve T315I mutasyonu durumları..... | 48 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML), kemik iliğinde myeloid seri elemanlarının artışıyla karakterize olan klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir. Tüm erişkin lösemilerin %20'sini oluşturan bu hastalık, bir kromozomal anomaliyle ilişkisi gösterilen ilk neoplazidir. Bu anomali, 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyon sonucu oluşan Philadelphia (Ph) kromozomudur. Ph kromozomu üzerinde oluşan *BCR-ABL1* füzyon geni, hücre içinde birçok yolağı aktive eden bir tirozin kinazı kodlar. KML onkogenezi açıklamada önemli role sahip olan bu yolakların üyelerini ve aralarındaki ilişkiyi tanımlama çalışmaları devam etmektedir.

BCR-ABL1 tirozin kinaz enzimini inhibe eden imatinib molekülünün bulunmasıyla KML, moleküler patogeneze yönelik tedavi geliştirilmiş ilk hastalıklardan biri olmuştur. İmatinib KML hastalarında etkili ve güvenli bir tedavi sağlayarak, kısa sürede tedavide ilk seçenek haline gelmiştir. Ancak, tedavinin uzun dönem sonuçlarının değerlendirilmesiyle, imatinibin KML'de kür sağlamadığı ve bir grup hastada imatinibe direnç geliştiği gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ağırlıklı olarak imatinib direncine yol açan moleküler mekanizmaları ortaya çıkarmaya yönelik olmuş ve bu sırada yeni tirozin kinaz inhibitörleri de kullanıma girmiştir.

KML patogenezinde hücre içi sinyal iletim sistemlerinden "JAK/STAT" yolağında etkili olduğu düşünülen *AHL-1* adı verilen yeni bir gen tanımlanmıştır. Bu genin, *BCR-ABL1* aracılı lösemik transformasyonunda etkili olmasının yanısıra tirozin kinaz inhibitörlerine yanıtta da yeri olduğu gösterilmiştir.

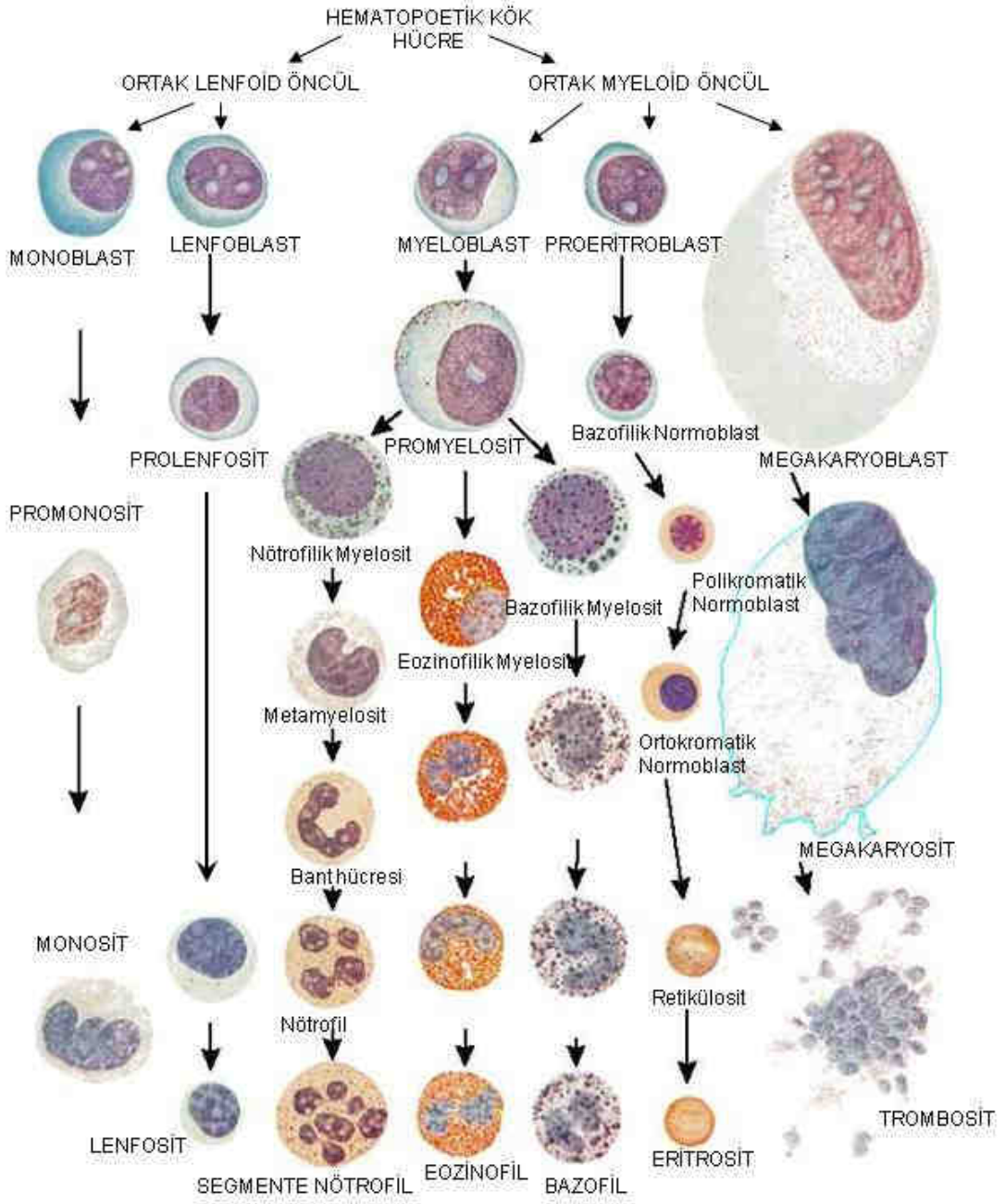
Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, KML tanısı almış hastalarda öncelikle imatinib direncinde sık rastlanan ve tüm tirozin kinaz inhibitörlerine dirençle karakterize kinaz bölgesi T315I mutasyonunun değerlendirilmesi, ardından tedavilerinin farklı zamanlarındaki örneklerinde *AHL-1* ifadenmesinin araştırılması ve zaman içinde ifadenme düzeylerinin değişiminin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoetik Hücrelerin Gelişimi

Dolaşımdaki tüm kan hücreleri erişkinde kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücreden gelişir. Hematopoetik kök hücrenin kendini yenileme özelliği vardır ve birçok farklı hücreye dönüşebilir (pluripotent). Bu kök hücreden gelişen öncül hücreler farklı serilerdeki kan hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşırlar. Hücreler morfolojik olarak farklılaşıp olgunlaştıkça, kendilerini yenileme özellikleri azalır. Öncelikle lenfoid-myeloid serilerin ayrımı olur ve ortak lenfoid öncül ile ortak myeloid öncül oluşur. Buradan sonra oluşan hücreler, kültüre konulduklarında oluşturacakları spesifik hücreye göre “koloni oluşturan ünite” (CFU-*colony forming unit*) adını alırlar. CFU-E eritrosit, CFU-GM granülosit ve monosit oluşturur (1).

Lökositlerin iki büyük grubu, lenfositik ve myelositik serilerden gelişir. Myelositik seri myeloblast ile başlar; bazofil, eozinofil ve nötrofil oluşturur. Myeloid seriden ayrıca eritrosit ve trombositler gelişir. Bu hiyerarşi içinde kök hücreden gelişen öncül hücreler, ara hücreler ve dolaşıma katılan son formları şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.1). Hematopoetik sistemin düzenlenmesi bazı büyüme faktörleri ile sağlanır. Aralarında kök hücre faktörü (*stem cell factor*) granülosit-makrofaj *colony stimulating factor* (GM-CSF), interlökin-3 (IL-3), eritropoetin ve trombopoetin gibi proteinlerin bulunduğu büyüme faktörleri, kontrollü salınımları ile kök hücrelerin kendini yenilemelerini, öncül hücrelerin farklılaşmasını ve dolaşımdaki hücrelere dönüşümlerini düzenler (1).



Şekil 2.1: Hematopoez basamaklarındaki hücrelerin görünümü (2)

2.2. Kronik Myeloid Lösemi

2.2.1. Tanım ve Tarihçe

Kronik myeloid lösemi (KML), klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir (3). Kemik iliğinde myeloid serinin tüm elemanlarında artışla karakterize olan bu hastalık, insanda sabit bir kromozomal anormallik ile ilgisi gösterilen ilk neoplazidir. Hastalığın ilk kez tanımlandığı 1845 yılından yaklaşık bir yüzyıl sonra, 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından Philadelphia kromozomunun (Ph) ilk kez gösterilmesi ile KML yepyeni bir boyut kazanmıştır (4). 1973 yılında Ph kromozomunun 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyondan kaynaklandığı gösterilmiş (5), 1984 yılında 22. kromozomun kırık noktasındaki *Breakpoint Cluster Region (BCR)* klonlanmış (6), 1985 yılında ise *BCR-ABL* füzyon geni, BCR-ABL kimerik proteini ve bu proteinin tirozin kinaz özelliği tanımlanmıştır (7). İlerleyen yıllarda, şimdiki adıyla “*BCR-ABL1*” füzyon geninin hayvan deneylerinde KML oluşturduğunun ve bu hastalığın nakledilebilir (*transplantable*) olduğunun gösterilmesi ile, bu genetik değişikliğin KML hastalığının patogenezindeki rolü kesinleştirilmiştir (8 – 10). 1998 yılında imatinib adı verilen bir molekülün BCR-ABL1 protein ürününü bloke ederek etkilerini tersine çevirdiğinin gösterilmesiyle de KML, moleküler mekanizması üzerinden etkili tedavi geliştirilen ilk hastalıklardan olmuştur (11).

2.2.2. İnsidans

Temelde erişkin yaşların hastalığı olan KML, Batı ülkelerinde yaklaşık 100 000’de 1 sıklıkta görülür. Yaşla birlikte görülme sıklığı da artar. Erkeklerde, kadınlara oranla daha fazla görülür (E/K: 3/2) (3). KML, tüm erişkin lösemilerinin %20’sini oluşturur (12). Çocuklarda KML nadiren görülür, tüm çocukluk çağı lösemilerinin %5’inden daha azından sorumludur. Daha önce juvenil KML olarak adlandırılan juvenil myelomonositik lösemi (JMML)’nin KML’den sitogenetik ve klinik olarak farklı bir hastalık olduğu anlaşılmıştır (3).

2.2.3. Diğer Myeloproliferatif Hastalıklarla İlişkisi

KML, kronik myeloproliferatif hastalıklar (KMPH) grubundan bir hastalıktır. KMPH, kemik iliğindeki pluripotent hematopoetik kök hücrelerinden kaynaklanan, farklı ama birbiriyle ilişkili klonal hastalıklardır (3). Tüm KMPH'lerin ortak özellikleri; multipotent bir hematopoetik öncül hücreden kaynaklanmaları, transforme olan klonun diğer klonlar üzerine baskınlaşması, tanımlanmış bir uyarıcı olmadığı halde bir ya da daha fazla grup kan elemanının aşırı üretimi, kemik iliğinde hipersellülarite, ekstramedüller hematopoez, akut lösemiye spontan dönüşüm ihtimali ve kemik iliği fibrozisi gelişimidir (13). Neoplastik kök hücre farklılaşma kapasitesini korur; böylece kemik iliğinde ve kanda olgunlaşmış ve olgunlaşmamış hücrelerde artış gözlenir. Bu farklılaşmış hücreler genellikle morfolojik ya da fonksiyonel anormallik göstermezler (3).

KMPH'ların sınıflandırılması, neoplastik kök hücreden hangi tip hücrenin çoğalmış olduğuna göre yapılır. 2008 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yenilenen KMPH sınıflamasında, KML tanısı için *BCR-ABL1* füzyonunun gösterilmesi şart koşulmuştur. Gösterilemiyorsa, atipik (*BCR-ABL1*-negatif) KML olarak adlandırılmış ve Myelodisplastik/ myeloproliferatif neoplaziler grubunda kronik myelomonositik lösemi ve JMML ile birlikte yer almıştır (Tablo 2.1) (14).

Tablo 2.1. DSÖ 2008 sınıflamasına göre kronik myeloproliferatif hastalıklar (14)

Myeloproliferatif Neoplaziler

Kronik myeloid lösemi (*BCR-ABL1* pozitif)

Kronik nötrofilik lösemi

Polisitemia vera

Primer Myelofibroz

Esansiyel trombositoz

Kronik eozinofilik lösemi

Mastositoz

Sınıflandırılmayan myeloproliferatif neoplaziler

Myelodisplastik/Myeloproliferatif neoplaziler

Kronik myelomonositik lösemi

Atipik kronik myeloid lösemi (*BCR-ABL1* negatif)

Jüvenil myelomonositik lösemi

Sınıflandırılmayan myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler

2.2.4. Etyoloji

KML etyolojisinde rol oynayan faktörler net olarak bilinmemekle birlikte, hastalığın gelişiminde radyasyonun rolü olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Radyasyon ile *in vitro* ortamda *BCR-ABL1* hibrid geni oluşumu gösterilmiştir (15, 16). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, obezitenin risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür (17). Ayrıca akut myeloblastik lösemi (AML) ve myelodisplastik sendromda olduğu gibi KML’de de diğer maligniteler için kullanılan tedavi ile ilişkili sekonder lösemi gelişme olasılığı araştırılmış, ancak kesin bir sonuca ulaşılamamıştır (18).

2.2.5. Klinik

KML tipik olarak 3 fazdan oluşur: kronik faz (KF), akselere faz (AF) ve blastik faz (BF).

Kronik Faz

Tedavisiz bırakılan hastalarda KF yaklaşık 3 – 6 yıl sürer, ardından AF’ya progrese olur ve en son BF’ye girer. Hastaların büyük bir kısmı (%80) KF’de tanı alırken, %10 kadarı AF’de, %10 kadarı da BF’de tanı alır (3). Yorgunluk, ateş, kemik ağrıları, kilo kaybı, karında şişkinlik gibi belirtilerle seyredebileceği gibi bu dönem asemptomatik olarak da geçirilebilir. Bu fazda lökosit sayısı yükselmiştir (100 000/ μ l’ye kadar ulaşabilir) ve kemik iliğinde blast oranı %10’dan azdır. Splenomegali, sternumda hassasiyet, lenfadenopatiler mevcut olabilir. Trombosit disfonksiyonu nedeniyle hafif kanamaya yatkınlık şikayetleri görülebileceği gibi, 1 000 000/ μ l’yi geçebilen artmış trombosit sayıları nedeniyle trombozlar da görülebilir (12).

Akselere faz

Akselere fazda splenomegali, lökositozda artış, blast sayısının %10’dan %30’a yükselmesi, bazofillerde %20 ya da daha fazla artış, trombositopeni ve klonal evrim (Ph kromozomuna ek sitogenetik anomaliler) gibi belirtilerden bir ya da birden fazlası bulunur (3, 12).

Blastik faz

Bu fazda hastalık, akut lösemiye andırır ve ortalama hayatta kalım süresi 2 – 4 aydır. Blastik fazda bir hastada Ph(+)'liğı saptandığında, Ph(+) akut lenfoblastik lösemi (ALL) ile de ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Hastalık bu fazda kendini myeloid blast krizi olarak da gösterebilir, bu durumda da *de novo* AML ile ayırımı yapılmalıdır. Bu fazda periferik kanda %30 ya da daha üzerinde blast görülür ve myeloid öncüller lenf nodlarında, deride ya da kemikte tümörler oluşturabilir. Bazı hastalarda akselere faz görülmeden aniden blastik faz ortaya çıkabilir (3, 12).

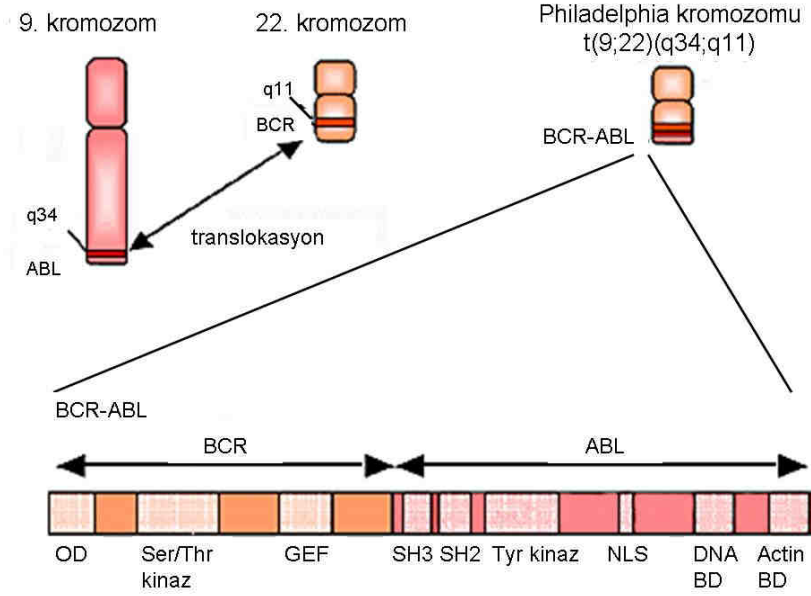
2.2.6. Progresyon

Ağır klinik belirtilerin genellikle görülmediğı kronik fazda hastaların performans durumu ve yaşam kalitesi çok fazla etkilenmez. Ancak, hastalık kaçınılmaz olarak blast krizine ilerler ve bu aşamadan sonra uzun süreli sağkalım çok nadirdir. Ölüm nedeni blast krizi olmayan KML hastalarında genellikle kemik iliğinde fibrozis nedeniyle kemik iliğı yetmezliğı gelişir (3).

Hastaların risk durumlarının belirlenmesinde Sokal ve Hasford risk skorlamaları kullanılabilir (19, 20). Sokal prognostik sınıflama sistemine göre, blastik faza geçiş süresini ya da tüm sağkalımı etkileyen faktörler arasında dalak büyüklüğü, dolaşımdaki blast yüzdesi ve yaş öne çıkmaktadır (19). Hasford risk skorlamasında ise yaş, dalak büyüklüğü, trombosit sayısı, myeloblast, eozinofil ve bazofil yüzdeleri dikkate alınır (3, 20).

2.3. KML'de Sitogenetik Değişiklikler

KML hastalarında saptanan sitogenetik anomali 9. ve 22. kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyondur (3). 9q34 bölgesinde ve 22q11 bölgesinde birer kırık oluşur ve kopan parçaların karşılıklı yer değişimi sonucu t(9;22)(q34;q11) translokasyonu oluşur (Şekil 2.2). Bu translokasyon spesifik olarak KML hastalığı ile ilişkilendirilmekle beraber, bazı ALL tiplerinde ve nadiren *de novo* AML olgularında görülür (12).



Şekil 2.2: t(9;22) translokasyonunun kırık noktalarının, Ph kromozomunun ve BCR-ABL1 füzyon molekülünün şematik gösterimi.

OD: Oligomerizasyon bölgesi, Ser/Thr kinaz: Serin-Treonin kinaz bölgesi, GEF: *Guanin exchange factor*, SH3: Src Homology 3, SH2: Src Homology 2, NLS: Nükleer lokalizasyon sinyalleri bölgesi, DNA BD: DNA bağlanma bölgesi, Actin BD: Aktin bağlanma bölgesi (21).

Oluşan 22. kromozom Philadelphia (Ph) kromozomu olarak adlandırılır ve normal homologundan daha küçük olduğundan sitogenetik incelemede kolaylıkla farkedilir. Hastalıktan sorumlu *BCR-ABL1* füzyon onkogeni bu kromozom üzerinde bulunur (Şekil 2.2). Bu klasik translokasyon tüm KML hastalarında saptanır ve hastalığın tüm evrelerinde mevcuttur (12).

KML'deki t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyonunun oluşum mekanizması hakkında birkaç teori vardır. Bir görüşe göre, kromozomlardaki bu kırık ve birleşme tamamen tesadüfi gerçekleşmekte, ancak oluşan onkogenik ürünün hücreye selektif büyüme avantajı sağlaması nedeniyle translokasyonu taşıyan hücreler hayatta kalmaktadır (22). Ph kromozomunun B ve T-lenfositler dahil tüm kan hücrelerinde gösterilmiş olması, neoplastik klonun ilkel bir pluripotent kök hücreden kaynaklandığına dair önemli bir kanıttır (3, 22). Translokasyonun tesadüfi olmadığını öne süren görüşün ise bu yönde bazı kanıtları bulunmaktadır. Öncelikle, epidemiyolojik araştırmalarda KML hastalığında iyonize edici radyasyonun bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Translokasyon, radyasyon etkisiyle oluşan kromozom kırıkları için "hot-spot" kabul edilen yerlerde gerçekleşmektedir (16). Ayrıca, interfaz sırasında 9. ve 22. kromozomların topografik

yerleşimlerinin birbirine yakın olduğu, bu nedenle spesifik olarak bu bölgelerin yanlış birleşmeye yatkın olabilecekleri öne sürülmüştür (22, 23).

Ph kromozomu oluşumunun patogeneze tek başına sorumlu lezyon mu, ikincil bir olay mı olduğu konusu da henüz tamamen açıklığa kavuşmamıştır. Bazı olgularda KML tanısı konulduğu halde Ph kromozomu gösterilememektedir (22). Ayrıca, tamamen sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda, duyarlı yöntemlerle %30'a varan oranlarda *BCR-ABL1* füzyon ürünü saptanmıştır (24, 25). Bu kanıtlar, *BCR-ABL1* hibrid geninin tek bir onkogen olarak malign dönüşüm için yeterli olamayabileceğini göstermektedir. Füzyon gen yapısının lösemi oluşturabilmesi için fonksiyonel bir proteinin oluşumuna yol açması ve bu olayı hematopoetik hiyerarşide görece erken (ilkel) ve kendini yenileme özelliğine sahip bir prekürsörde gerçekleştirmesi gerektiği öne sürülmüştür (25). Ayrıca KML hastalığı geliştirmiş bireylerin yapısal ya da edinilmiş olarak, henüz tanımlanamamış predispozan bir moleküler değişikliğe sahip olmaları da mümkündür (23).

KML hastalığında Ph kromozomuna ek olarak başka sitogenetik anomaliler de görülebilir. Klasik translokasyonun saptandığı olguların yaklaşık %15'inde derivatif 9. kromozom üzerinde interstisyel delesyonlar saptanmıştır. Bu delesyonun varlığı, ilk zamanlarda kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. İmatinib sonrası yapılan çalışmalarda ise imatinib kullanan hastalarda delesyonun varlığının genel sağkalım üzerine olumsuz etkisi gösterilememiştir. Ancak bu hastalarda progresyonun daha hızlı olduğu öne sürülmüştür (26).

Olguların %5-10'unda t(9;22)(q34;q11) dışında üçüncü bir kromozomun katıldığı varyant translokasyon görülebilir. Üçlü translokasyona en sık katılan kromozom bölgeleri arasında 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12 ve 22q13 bulunur (27). Bu translokasyonlarda çoğunlukla *BCR-ABL1* füzyonu 22. kromozom üzerinde gösterilebilir. Yapılan bazı çalışmalarda varyant translokasyonların fenotipik ya da prognostik etkisi gösterilemezken (27), bazı çalışmalarda kötü prognoz ile ilişkili olabileceği önerilmiştir. Bu durum, derivatif 9. kromozomdaki delesyonun varyant translokasyonlarda klasik Ph translokasyonunda olduğundan daha sık görülmesi ile açıklanmıştır (28).

Sitogenetik analizde Ph kromozomuna ek olarak başka anomaliler de saptanabilir; Bu anomaliler arasında tesadüfi olmayan ve sıklıkla saptananlar "klonal evrim" olarak adlandırılır. Bunların arasında +8, çift Ph (+Ph), i(17)(q), +19, +21 ve -Y en sık gözlenen anomalilerdir. Klonal evrim tanıda var olabileceği gibi, hastalık progresyonu sırasında da ortaya çıkabilir; böyle durumlarda kötü prognostik özellikleri olduğu düşünülmektedir (27,

29, 30). Sitogenetik klonal evrim genellikle KML'nin çok basamaklı progresyon sürecinin bir belirteci olarak değerlendirilmiştir. Klonal evrim ilk olarak blastik faz KML olgularında gözlenmiş, daha sonra akselere ve hatta kronik faz olgularında da tanımlanmıştır. Geniş kapsamlı çalışmalarda tanı anında var olan klonal evrimin uzun dönem sağkalıma kötü etkisinin olmadığı gösterilmiştir (31).

Klonal evrim dışındaki kompleks yeniden düzenlenmelerin hastalık patogenezindeki rolü ve prognoza etkisi ise tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak oluşumlarının genom instabilitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (32). Moleküler hedefe yönelik tedavinin uzun dönem sonuçları yorumlandıkça, KML'deki primitif kök hücre grubunun fragil yapısından dolayı birden fazla anomaliyi içeren hücre populasyonlarının gelişimine öncülük edebileceği; hem Ph içeren klonu, hem de başka kromozom anomalilerini içeren klonu oluşturabileceği öne sürülmüştür (33).

2.4. KML'de Moleküler Patogenez

2.4.1. BCR ve ABL Proteinlerinin Yapısı ve Fonksiyonu

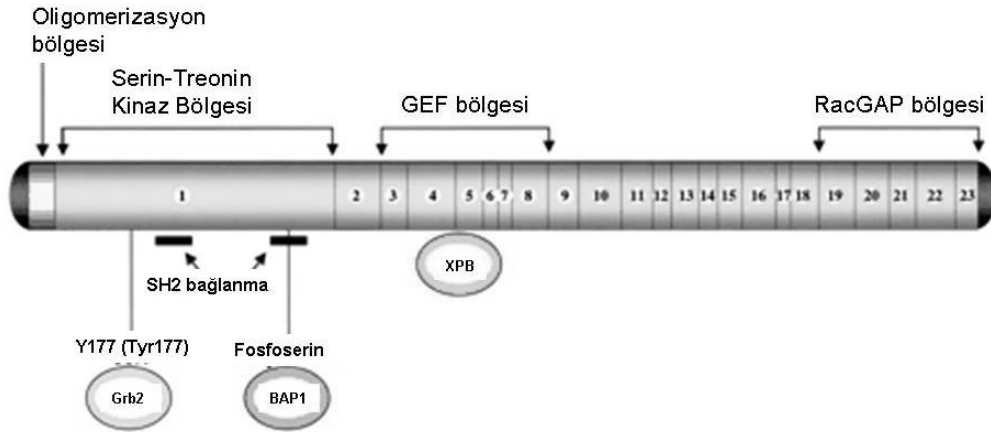
BCR

BCR geni, 22. kromozomda bulunan 130 kb uzunluğunda, 23 ekzonlu ve sürekli ifade edilen bir gendir (Şekil 2.3). İnsanda en çok beyin dokusunda ve hematopoetik hücrelerde ifade lenmektedir. Hematopoetik hücrelerde özellikle myeloid farklılaşmanın erken evrelerinde etkin olduğu, hücre olgunlaştıkça ifade lenmesinin azaldığı gösterilmiştir. Normal BCR proteini, 160 kd ağırlığında sitoplazmik bir proteindir. Bir Serin/Treonin kinaz olarak görev yapar. *BCR* geninin ayrıca 130 kD ağırlığında ikinci bir protein ürettiği de bilinmektedir (34).

BCR proteininin birçok fonksiyonel bölgesi bulunmaktadır. İlk ekzonun kodladığı bölge bir serin/treonin kinaz bölgesi, birçok Src Homology 2 (SH2) bağlayıcı bölgeleri ve bir oligomerizasyon bölgesi içerir. Oligomerizasyon bölgesi, ABL kinazının aktivasyonunda görev alan önemli bir bölgedir. Ayrıca, BCR veya BCR-ABL1 proteininin sitoplazmik lokalizasyonunda da rol alır (34). SH2 bölgeleri, reseptörler ya da hücre içi sinyal proteinleri üzerinde belirli peptid dizilerindeki fosforillenmiş tirozinlere bağlanan yüksek oranda korunmuş bölgelerdir (35). BCR üzerindeki SH2 bölgeleri de sinyal iletim moleküllerini bağlamaları ve hücre içinde önemli yolları aktive etmeleri açısından önem

taşımaktadır. Ayrıca ABL proteini de SH2 bölgeleri üzerinden bağlanarak aktive olur. BCR proteini serin ve treonin kalıntıları üzerinden otofosforilasyon yapabilmektedir. 177. pozisyondaki tirozinin (Tyr177 ya da Y177) otofosforillenmesi ile, bir adaptör protein olan GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) ile majör bir bağlanma bölgesi oluşur. BCR, GRB2 üzerinden Ras yolağı ile bağlantı sağlar (Şekil 2.3) (22, 36).

BCR proteininin santral ve karboksi terminal bölgeleri özellikle G-proteinleri ile olan çok yönlü ilişkileri nedeniyle önem taşımaktadır. G-proteinleri hücre içi iletim sistemlerinde, hücre büyümesinde ve hücre iskeleti organizasyonunda görev alırlar. BCR proteinin karboksil ucunda G-proteinlerini aktive eden *GTPase activating protein domain* (GAP) bulunmaktadır. Yeni çalışmalarda, BCR proteininin santral bölgesinin deoksiribonükleik asit (DNA) tamir mekanizmasında görevli *Xeroderma pigmentosum – B* (XPB) proteinini fosforillediği ve fonksiyonunu engellediği gösterilmiştir. Böylece, *BCR-ABL1* onkogeninin DNA onarım mekanizmaları üzerinden genomik instabiliteye katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (34).



Şekil 2.3: BCR proteininin şematik gösterimi

XPB: *Xeroderma pigmentosum – B* (34)

ABL1

ABL1 geni farede tanımlanan ve *Abelson murine leukemia* virusunun onkogeni olan *v-abl* geninin insandaki homologudur. 9. kromozomda bulunur ve 145 kd ağırlığında bir non-reseptör tirozin kinazı kodlar. İlk ekzonunun iki alternatifi vardır (1a ve 1b). *ABL1* geni

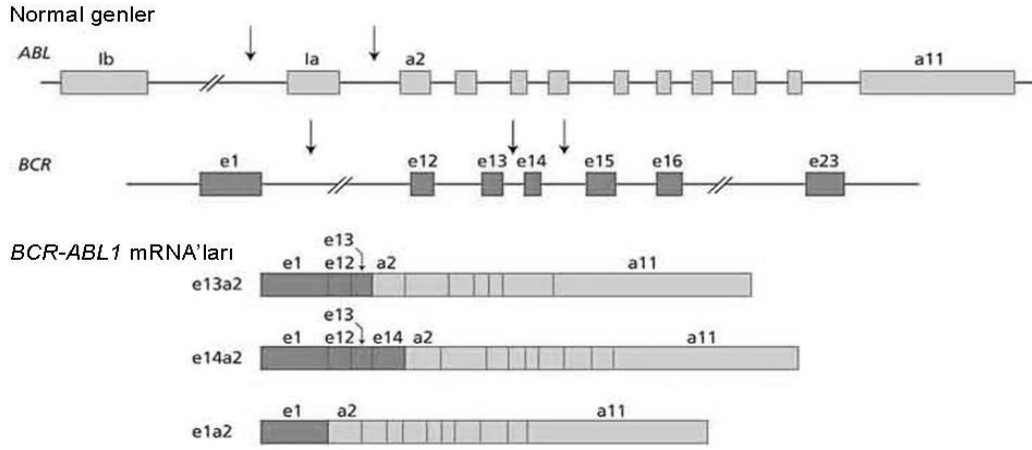
sürekli ifadelenen ve stres cevabı, hücre farklılaşması, bölünmesi ve adezyonunda görevleri olan bir proto-onkogendir. Aslen hücre çekirdeğinde ifadelenir ama sitoplazma ve çekirdek arasında gidip gelebilir. N terminalinde 3 adet Src homoloji (SH) bölgesi bulunur; diğer proline zengin sekanslara sahip proteinlerle bağlanmasını sağlayan SH3 bölgesi, fosfotirozinlerle bağlanan SH2 bölgesi ve tirozin kinaz görevini yerine getiren SH1 bölgesi (tirozin kinaz bölgesi) (22). C terminalinde nükleer lokalizasyon sinyalleri bölgesi, 3 adet DNA bağlayıcı bölgesi ve aktin bağlayıcı bölgesi bulunur (36). ABL1 proteininin ilk ekzonun alternatif splicing'i ile oluşan iki izoformu bulunur (22). Sitoplazmik ABL1 proteininin aktivitesi SH2 ve SH3 bölgeleri üzerinden kısıtlanır ve normal şartlarda transforme edici etkileri yoktur. Bu bölgelerin delesyonu ya da mutasyonları sonucu ABL1 aktifleşebilir (36).

BCR-ABL1 Füzyon Proteini

ABL1 geninde kırk 5' ucunda 300 kb'lık bir bölgede herhangi bir yerde oluşabilir. Genellikle alternatif 1. ekzonlar arasındaki intronda oluşur. Ancak *BCR-ABL1* mesajcı ribonükleik asit (mRNA) transkriptinde ilk ekzon yoktur ve hep a2 ekzonu ile başlar (22, 34).

BCR geninde kırk 3 farklı noktada olabilir (Şekil 2.4).

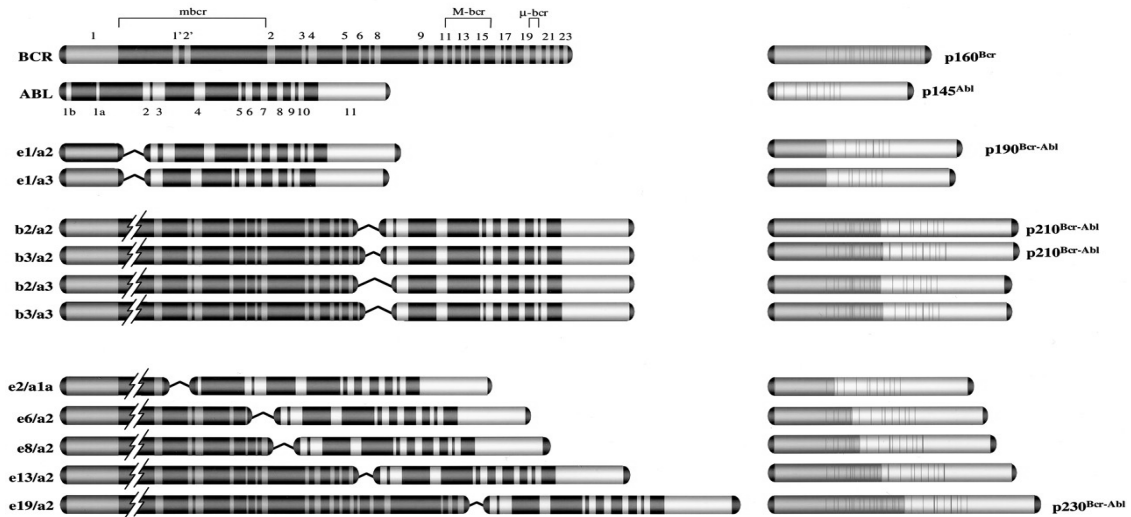
1. KML hastalarının %95'inde ve Ph+ ALL hastalarının yaklaşık 3'te 1'inde kırk Majör BCR (M-BCR) denilen bölgede oluşur ve sıklıkla ya 13. ekzondan (e13-b2) ya da 14. ekzondan (e14-b3) sonraki introndadır. Sonuç olarak oluşan hibrid transkript e13a2 (b2a2) ya da e14a2 (b3a2) birleşimi içerir. Her iki durumda da 210 kd ağırlığında bir füzyon proteini oluşur ve p210^{BCR-ABL} olarak adlandırılır (22, 34).
2. Ph+ ALL hastalarının 3'te 2'sinde, KML ve AML hastalarının çok az bir kısmında görülen diğer BCR kırk noktası minör BCR (m-BCR) denilen bölgede 1. ekzondan hemen sonra oluşur. Sonuç olarak oluşan hibrid transkript e1a2 birleşimini içerir ve 190 kd ağırlığında bir protein kodlar (p190^{BCR-ABL}) (22, 34).
3. KML olgularının çok az bir kısmında ve kronik myeloproliferatif hastalıklar sınıfından kronik nötrofilik lösemi (nötrofilik KML) hastalarında görülen üçüncü kırk noktası mikro BCR (μ -BCR) olarak adlandırılır ve 19. ekzondan (c3) sonra oluşur. Hibrid transkript e19a2 birleşiminden oluşur ve 230 kd ağırlığındaki p230^{BCR-ABL} proteinini kodlar (22, 34).



Şekil 2.4: *BCR* ve *ABL1* genlerindeki farklı kırık noktalarının ve oluşan mRNA'ların şematik gösterimi

Üstte, normal genlerin üzerindeki oklar olası kırık yerlerini göstermektedir. Altta, sırasıyla KML'de sık görülen M-BCR (e13a2 ve e14a2) ve ALL'de sık görülen m-BCR kırıkları ile oluşan mRNA'lar görülmektedir (37)

Bazı ALL ve KML hastalarında bu 3 tipin dışında farklı ve nadir kırık noktaları da bildirilmiştir (Şekil 2.5) (22, 34).



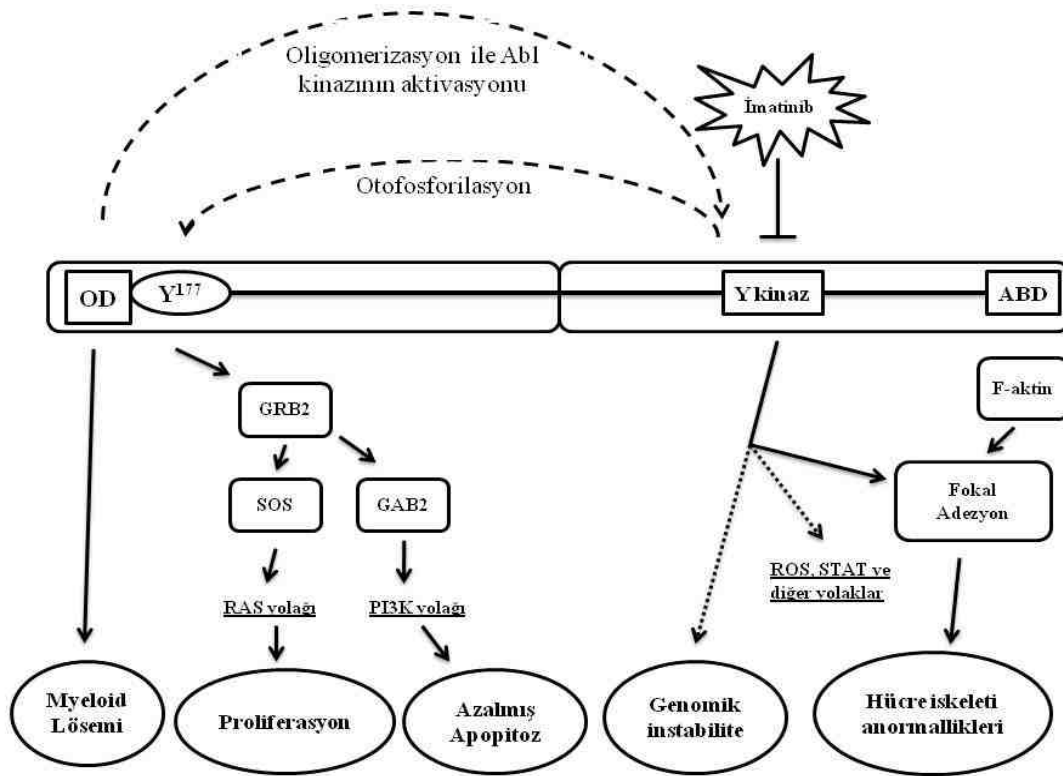
Şekil 2.5: *BCR*, *ABL1* ve *BCR-ABL1* genlerinin ve kodladıkları proteinlerin şematik gösterimi

Farklı kırık noktalarına göre olası füzyon genler sol tarafta, bu genlerin oluşturacakları protein ürünleri sağ tarafta gösterilmiştir (34).

2.4.2. BCR-ABL1 Aracılı Lösemik Transformasyonun Moleküler Mekanizması

Füzyon ve Aktifleşme

BCR ve ABL1 proteinlerin birleşmesi ile BCR üzerindeki oligomerizasyon bölgesinin yardımıyla füzyon molekülü, dimerizasyona ya da tetramerizasyona uğrar. Dimerizasyon önce BCR üzerindeki Tyr177'nin otofosforilasyonunu, sonra da ABL1 üzerindeki tirozinlerin transfosforilasyonunu tetikler; böylece ABL1 kinazı aktifleşmiş olur (Şekil 2.6) (23). Fosforile tirozinler de diğer proteinlerin SH2 bölgeleri ile birleşme bölgeleri yaratır. Böylece BCR-ABL1 hücre içinde farklı görevleri olan sinyal iletim molekülleri ile ilişkiye geçmiş olur (36). Bu moleküller üzerinden lökomojenik proliferatif sinyalin nasıl oluşturulduğu tam olarak tanımlanamamış olmakla birlikte şimdiye kadar KML'de aktifleştiği bilinen yollar aşağıda özetlenmiştir (22, 23, 36).



Şekil 2.6: Onkojenik BCR-ABL tirozin kinazının aktivasyonu ve etkilediği yollar

OD: Oligomerizasyon bölgesi, Y177: 177. Pozisyondaki tirozin, ABD: ATP binding domain, GRB2: Growth factor receptor bound protein 2, SOS: Son of sevenless, GAB2: GRB2 associated binding protein, PI3K: Phosphotidyl inositol 3 kinase ROS: Reaktif oksijen türleri, STAT: Signal transducers and activators of transcription (36).

Sinyal Yolaklarının Aktivasyonu

BCR-ABL1 aktivasyonu ile hücre içinde birçok sinyal yolağı aktive olur. Bu yolaklardan çoğu normalde IL-3, GM-CSF ve trombopoetin gibi hematopoetik büyüme faktörleri ile aktivasyonları düzenlenen yolaklardır. Çoğu modelde BCR-ABL1 aktivasyonunun öncül hematopoetik hücrelerde bu büyüme faktörlerine gereksinimi azaltarak ya da yok ederek etki ettiği gösterilmiştir (36). Bu yolaklardan en iyi tanımlanmış birkaçı aşağıda özetlenmiştir.

a) *Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Yolağı*

Normal fizyolojide bazı sitokinlerin (örneğin hematopoetik büyüme faktörlerinin) hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmasını takiben Janus kinaz (JAK) adı verilen kinazlar dimerize olarak aktive olmaktadır. Dimerize JAK'lar, *Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)* adı verilen molekülleri aktive eder. STAT'lar ise özellikle büyüme faktörleri üzerinden hücre büyümesini ve hücre sağkalımına etki eden genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir. STAT ifadenmesinin artması, insan kanserlerinde sıklıkla gösterilmiştir. Artmış STAT aktivitesinin, onkogenik transformasyonda rolü olduğu düşünülmektedir (38). KML hastalarından elde edilen hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda JAK/STAT yolağının aktif olduğu gösterilmiştir (22, 36). Yolaktaki moleküller arasında en öne çıkan STAT5 olmuştur. Aktive STAT5 molekülünün, BCR-ABL1'in büyüme faktöründen bağımsız büyümeyi sağlamasına yardım ettiği ve anti-apoptotik Bcl-X_L geninin transkripsiyonunu artırarak apoptozu inhibe ettiği, dolayısıyla malign transformasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir (22, 34). Ayrıca, BCR-ABL1 molekülünün JAK basamağını atlayarak STAT'lar ile direk ilişkiye geçebildiği ya da Src ailesi kinazları üzerinden de aktive edebildiği gösterilmiştir (34). STAT5'in *BCR-ABL1* ifade eden myeloid hücrelerde Src ailesinden "Hck" tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (22) (Bkz Şekil 2.6, Şekil 2.7).

BCR-ABL1'in erken öncül hücrelerde IL-3 ve G-CSF gibi büyüme faktörlerinin otokrin salgılanmasını sağladığı gösterilmiştir. BCR-ABL1'in STAT yolağı üzerinden malign transformasyonda etki gösteriyor olması, BCR-ABL1 (+) hücrelerin büyüme faktörüne bu şekilde bağımlılığını azalttığını düşündürmektedir (39).

b) Ras Yolağı

Hematopoetik hücrelerde proliferasyonu indükleyen ve apoptozu engelleyen büyüme faktörleri ve sitokinlerin aktive ettiği Ras yolağı, lösemide önemi gösterilmiş bir sinyal iletim sistemidir (38). BCR-ABL1 aracılı malign transformasyonda Ras yolağının aktivasyonuna yolaçan birden fazla aracı molekül olabileceğine dair kanıtlar mevcuttur. Bunlar arasında GRB2, Ras aktivatörü *Son of sevenless* (Sos), *GTPase activating protein* (RasGAP), Crkl (SH2/SH3 adaptörü) ve p62^{Dok} bulunmaktadır (34). Bu aracı moleküller sayesinde aktive olan Ras, hücre zarında bir serin/treonin kinaz olan Ref molekülünü aktive eder. Bu aktivasyon da MAP/ERK kinazlar (MEK1/MEK2) ve *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) enzimlerini aktive ederek gen transkripsiyonunu artırır (Bkz Şekil 2.7). Ras yolağı aktivasyonu sonucu transformasyon için tek başına yeterli olmayan, ancak hastalık için gerekli bir antiapoptotik etki oluştuğu gösterilmiştir (36).

c) Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) yolağı

BCR-ABL1 pozitif hücre dizilerinin transformasyonu ve proliferasyonunda PI3K molekülünün aktivitesinin önemli olduğu gösterilmiştir. Hücre içinde ikincil haberci sistemini uyarabilen PI3K yolağı; sağkalım ve büyümede görevli Akt ile, motilite ile ilişkili RAC ile, protein sentezi indükleyicisi S6kinaz ile ve Ras yolağı ile etkileşerek bu mekanizmaya katkıda bulunmaktadır (Bkz Şekil 2.7) (22, 36).

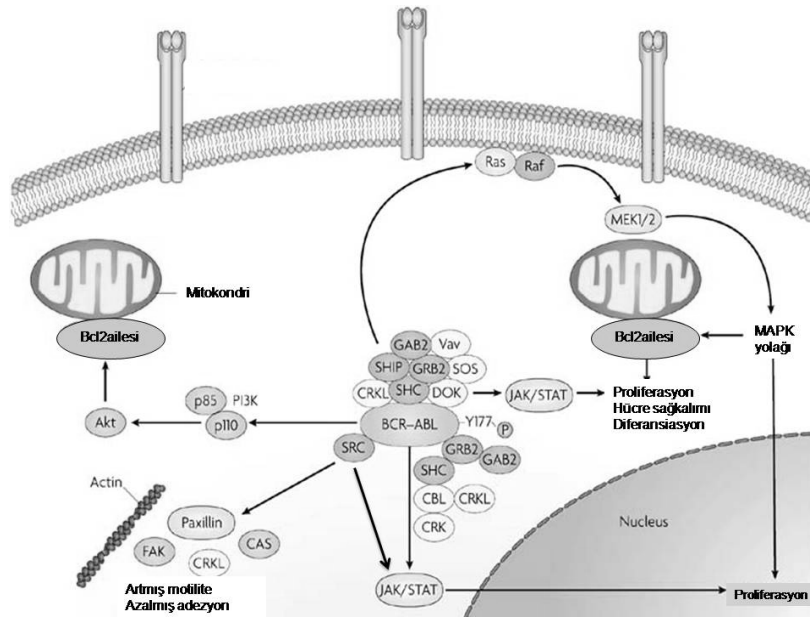
d) Src Ailesi Kinazları

BCR-ABL1 aktivasyonunun *downstream*'inde görev alan Src ailesi kinazları (SAK) BCR-ABL1'den bağımsız olarak diğer molekülleri aktive edebilmeleri açısından önem taşır. Bu moleküller hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalımı ile ilgili yollarda yer alan nonreseptör tirozin kinazlardır (Bkz Şekil 2.7). Bilinen 8 SAK üyesi Src, Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn ve Yes, her biri kendine özgü bölge içeren, ancak SH bölgeleri benzer olan moleküllerdir. SAK'lar ile myeloid ve lenfoid lösemiler arasında ilişki bulunduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Başta Hck olmak üzere, bazı SAK'ların aktivasyonunun BCR-ABL1 ile ilişkili transformasyonda gerekli olduğu gösterilmiştir.

SAK'lar KML onkogenezinde BCR-ABL1 ile işbirliği yaparlar. Ayrıca, blast krizine progresyonda Hck, Lyn ve Fgr'nin rolleri olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. İmatinib tedavisine direnç gelişiminde rol aldığı düşünülen SAK'ların patogenezdaki yeri anlaşıldıkça tedavide hedef olarak kullanılmaları gündeme gelmiştir (40).

e) Diğer Yolaklar

BCR-ABL1 molekülünün lösemik transformasyon sürecinde etkileştiği gözlenen diğer yolaklar arasında tek başına transforme edici etkisi bilinen reaktif oksijen türleri, Myc proto-onkogeni ve PI3K yolağının inhibitörlerinden SHIP1 ve SHIP2 proteinleri bulunmaktadır (22, 34, 36). Ayrıca, Ph pozitif öncül hücrelerin stromaya adezyonunda azalma gözlenmiştir. BCR-ABL1 molekülünün Crkl, Paxillin ve fokal adezyon kinaz (FAK) molekülleri üzerinden adezyonu etkilediği düşünülmektedir (Bkz Şekil 2.6, Şekil 2.7). Bu durum, Ph (+) hücrelerin normal öncül hücrelere göre düzenleyici sinyallere duyarlılıklarının azalmasına neden olabilmektedir (22). Yakın zamanda ise, DNA onarım genlerinden XPB ile olan etkileşimi ile BCR-ABL1'in bulunduğu hücrenin genomik instabilitesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmanın klonal evrim ve blast krizine progresyonda etkili olabileceği öne sürülmüştür (34).



Şekil 2.7: BCR-ABL1 molekülünün hücre içi sinyal yollarıyla iletişiminin şematik gösterimi (41)

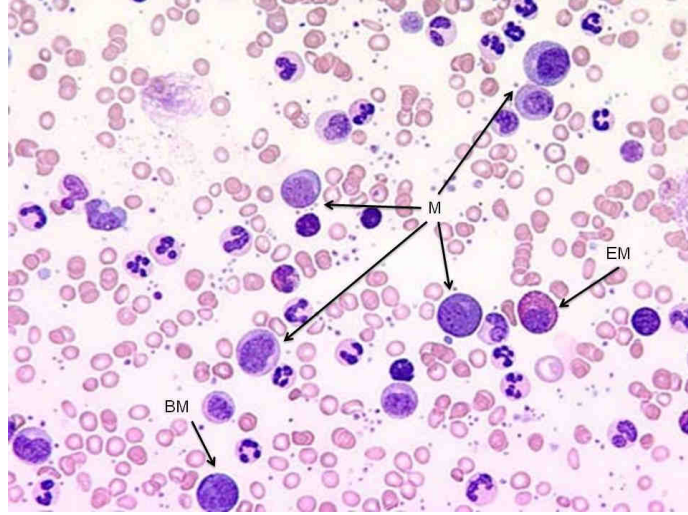
Tüm bu yolaklar sayesinde BCR-ABL1 molekülü bulunduğu hücrelerde sürekli mitojenik sinyalleme, eksternal büyüme faktörlerine bağımlılıkta azalma, hücre adezyon özelliklerinde değişim, apoptotik potansiyelde azalma ve DNA onarım mekanizmasında bozulma gibi etkilerle transforme edici etkisini gösterebilmektedir. Bu yolakların tanımlanması ile KML tedavisinde sürekli yeni moleküler hedefler ortaya çıkmaktadır (36).

2.5. KML Hastalığında Tanı

KML hastalığı genellikle kronik fazda insidental kan sayımları sırasında farkedilir. Tanı, öncelikle periferik kan yaymasına ya da kemik iliği incelemesine dayanır (3). Tanının kesinleştirilmesi için mutlaka sitogenetik ya da moleküler sitogenetik olarak Ph kromozomunun gösterilmesi ya da moleküler düzeyde *BCR-ABL1* füzyonunun gösterilmesi gerekir (12).

2.5.1. Periferik Kan Bulguları

Periferik kandaki en önemli histolojik bulgu, nötrofilik lökositöz ve bazofilidir. Lökosit sayısı 20 000-500 000/mm³ arasında olabilir. Lökosit alkalin fosfataz skoru azalmıştır. Periferik yaymada lökositözün nötrofilik olduğu ve myeloblasttan segmente nötrofile kadar nötrofil matürasyonunun tüm ögelerini içerdiği gözlemlenir. En fazla myelosit ve segmente nötrofil saptanır. Gözlenen bu hücreler çoğunlukla morfolojik olarak normaldir. Bazofili neredeyse her zaman saptanır ve kritik öneme sahiptir. Monositler tipik olarak artmıştır ancak rölatif monositopeni saptanır. Lenfosit sayısı değişken olmakla beraber, sıklıkla lenfositöz gözlenir. Trombositler hastaların yarısında artmıştır ve 1 000 000/ mm³'ün üzerinde seyrederek görünüşleri değişkendir (Şekil 2.8). Hastaların 4'te 1'inde megakaryositler gözlenir. Çoğu hastada tanıda normokrom normositer anemi saptanır. Aneminin derecesi lökositözle ilişkilidir (3).



Şekil 2.8. 400x büyütmedeki periferik kan yaymasında lökositoz ve myeloid prekürsörlerle birlikte bazofili, eozinofili ve trombositoz görünümü

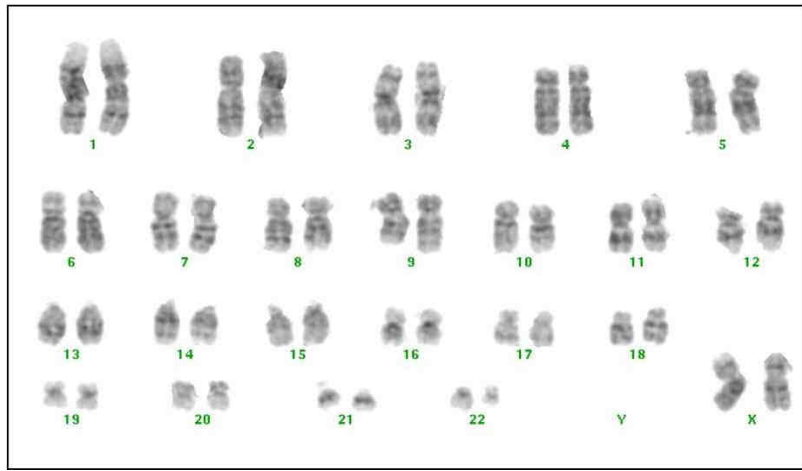
BM: Bazofilik myelosit, EM: Eozinofilik myelosit, M: Myelosit (42)

2.5.2. Kemik İliği Bulguları

Kemik iliği incelemesi özellikle hastalığı diğer myeloproliferatif hastalıklardan ayırmada önem taşır. Kemik iliği belirgin hipersellüler olarak gözlenir ve bu sellülarite çoğunlukla nötrofilik prekürsörlerden oluşur. Matürasyon süreci ve morfolojisi, her evrede normal olarak gözükür; ancak periferik kanda olduğu gibi myelositlerde belirgin artış göze çarpar. Myeloblastlar genellikle %5'in altındadır. Normal ilikte olduğu gibi; myeloid öncüller periosteal bölgelerde yerleşiktir. Bazofil, eozinofil ve hibrid hücreler ile bunların öncülleri de artmış olarak gözlenir. Megakaryositler tipik olarak artmıştır ve kümelenmiş halde görülür, ancak bu kümelenme esansiyel trombositozdaki gibi belirgin değildir. KML megakaryositleri normallerinden biraz küçüktür ve mikromegakaryositler saptanabilir. Hastaların üçte birinde pseudo-Gaucher hücresi adı verilen kaba granüler, periyodik-asit-Schiff-pozitif sitoplazmalı makrofajlar gözlenir. Myeloid/eritroid oranı her zaman artmış olarak saptanmakla birlikte, eritroid prekürsör sayısı artmış, azalmış ya da normal olabilir. Bazı olgularda bağ dokusu depolanması görülebilir (3).

2.5.3. Sitogenetik Analiz

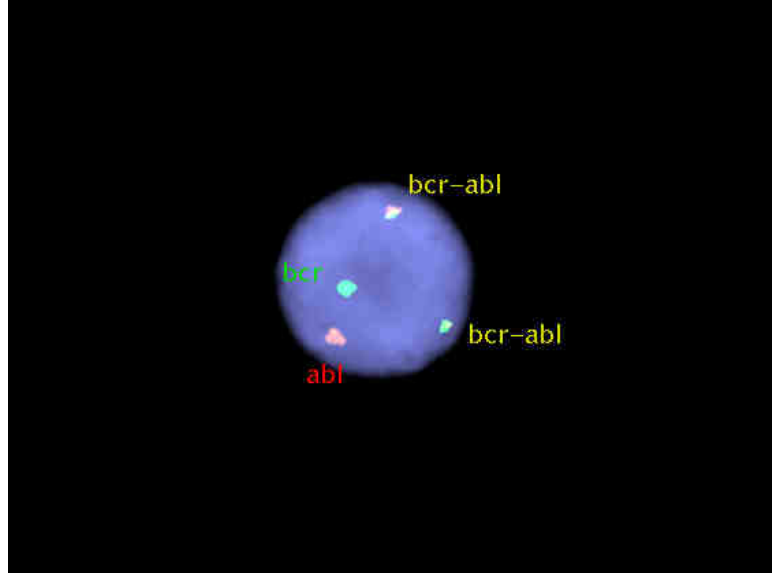
KML'de sitogenetik analiz tercihen kemik iliğinden yapılır, ancak periferik kandan da yapılabilir. 9. ve 22. kromozomlar arasındaki klasik t(9;22)(q34;q11) translokasyonunun ya da üçüncü bir kromozomun katıldığı varyant Ph translokasyonunun gösterilmesi ile tanı kesinleştirilir (Şekil 2.9) (12). Konvansiyonel sitogenetik inceleme hem tanıda hem de takipte, özellikle KML'nin çok basamaklı progresyonunun göstergesi kabul edilen Ph kromozomuna ek anomalileri ve klonal evrimi gösterebilecek tek yöntem olması nedeniyle önem taşır (30).



Şekil 2.9 18 no'lu olguya ait karyotip görüntüsü: 46,XX,t(9;22)(q34;q11)

2.5.4. Moleküler Sitogenetik Analiz

Sitogenetik incelemenin mümkün olmadığı durumlarda; örneğin metafaz elde edilemediğinde, interfaz hücrelerine floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi ile bu translokasyona özel olarak üretilmiş ticari problemler kullanılarak translokasyon gösterilebilir (Şekil 2.10) (43).



Şekil 2.10: 18 no'lu olguya ait interfaz nükleusuna uygulanmış BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion Translokasyon (Vysis) probunun FISH görüntüsü

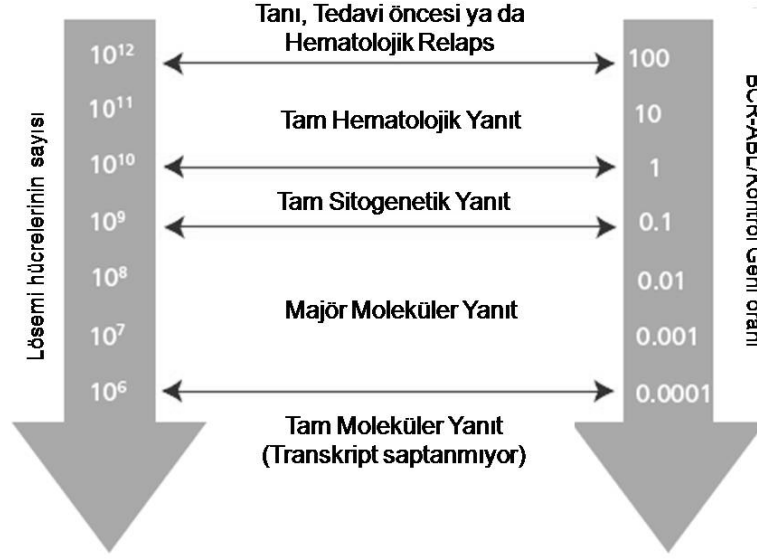
Bu yöntemle ayrıca derivatif 9. kromozomdaki delesyon gösterilebilir (28). Yine metafazlara uygulanabilecek FISH yöntemi ile varyant Ph translokasyonları da tanımlanabilir. Moleküler yöntemler varyant Ph translokasyonlarını ya da ek anomalileri gösterememektedir (26). Kompleks yeniden düzenlenmelerin gösterilebilmesi için karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, *multicolor* FISH gibi ek yöntemler gerekebilir (32).

2.5.5. Moleküler Analiz

KML'de moleküler tanı, *BCR-ABL1* füzyon gen ürününün varlığının moleküler yöntemlerle araştırılmasına dayanır. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*; Q-RT-PCR) yöntemi ile *BCR-ABL1* mRNA'sı ters transkripsiyonla komplementer DNA (cDNA) haline getirildikten sonra hassas bir reaksiyon ile çoğaltılır. Ürün saptandığında pozitif sonuç tanı koydurur. Moleküler analiz tanıda kullanılabileceği gibi, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de yüksek duyarlılığı nedeniyle tercih edilen yöntem olmuştur (44).

Moleküler yöntemlerle ölçülen *BCR-ABL1* füzyon gen ürünü seviyeleri ile hastalardaki rezidüel lösemik hücre sayılarının korele olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.11) (45). Q-RT-

PCR, 10^5 ile 10^6 normal hücre arasında tek bir BCR-ABL1 (+) hücreyi saptayabilecek kadar hassas bir yöntemdir (45).



Şekil 2.11: Moleküler analiz sonuçlarına göre tedaviye yanıtın belirlenmesi ve saptanan BCR-ABL1 transkript düzeyinin hastadaki lösemi hücrelerinin sayısı ile olan ilişkisi (45)

2.6. KML Hastalığında Tedavi

2.6.1. Hidroksiüre

Kronik faz KML tanısı almış olgularda ilk basamak tedavi, lökosit sayısını azaltmaya ve lökositözla ilişkili semptomların düzeltilmesine dayalıdır. Bu amaçla etkisinin hızlı, yan etkisinin az olması nedeniyle en sık kullanılan ilaçlardan biri hidroksiüre'dir. Hidroksiüre kullanımı ile hastaların çoğunda lökosit sayısı kontrol altına alınır, ancak Ph kromozomu kaybolmaz. Tedavi sırasında haftalık lökosit sayımları gerekir (3).

2.6.2. Busulfan

İlk kez 1959'da tedavide kullanılan bu ilaç (46), hidroksiüreden farklı olarak daha yavaş ama daha kontrollü bir şekilde lökosit sayısını düşürür. Ancak yan etkileri daha fazladır (3).

2.6.3. α -interferon

İmatinib kullanımından önce allojeneik kök hücre nakil şansı olmayan hastalarda seçilen tedavi α -interferon (α -IFN) idi. Etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, antiproliferatif, immünmodülatör ve anti-anjiogenik etkileri ile stromal hücrelerle hematopoetik hücreler arasındaki sitoadezyonu modüle etmesi nedeniyle tercih edilmekteydi. α -IFN özellikle erken kronik fazda etkilidir. Hastaların %50'sinde klinik cevaba ek olarak Ph kromozomu kaybolur. Bu grup hastaların 5 yıllık sağkalımları %80 civarındadır. Hangi hastaların α -IFN tedavisinden yarar göreceğini öngörebilmek için bazı klinik değişkenler kullanılabilir. Erken yan etkileri nedeniyle düşük dozlarda başlanır, giderek artırılır. Hastaların %25'ten fazlasında yüksek doza intolerans gelişir. Bazı çalışmalarda α -IFN tedavisine sitozin arabinozid (Ara-C) 'in eklenmesi ile sitogenetik yanıtta artma gözlenmiştir. Allojeneik kök hücre nakli ile α -IFN tedavisini karşılaştırmak için yapılan randomize çalışmalarda nakil hastalarında uzun dönem sağkalımda hafif bir artış gözlenmiş, bu artışın da genç yaşla ilişkili olabileceği ortaya koyulmuştur (3).

2.6.4. Allojeneik Kök Hücre Nakli

1970'lerden beri KML'de kullanılan allojeneik kök hücre nakli, hastalığın halen tek küratif tedavisidir (46). İşlemin getirdiği yüksek mortalite ve morbidite oranları nedeniyle son yıllarda çok tercih edilmese de, 50 yaş altı hastalarda kronik fazda uygulandığında en az %50 oranında kür sağlanmıştır. Akselere ve blastik fazlarda ise sonuçlar yüz güldürücü değildir (sırasıyla %25-35 ve <%10) (3), ancak seçilmiş hastalarda halen önerilen seçenektir (46). Transplantasyonun başarısını etkileyen bazı faktörler tanımlanmıştır; bu faktörler göz önüne alındığında iyi gruptaki hastalarda %70'lere varan oranlarda kür sağlanmıştır. Bu faktörler arasında yaş, verici cinsiyet uyumu, verici akrabalık derecesi, kök hücre kaynağı, tanıdan itibaren geçen süre, hastalık evresi ve busulfan maruziyeti bulunmaktadır (47). En önemli komplikasyon graft-versus-host hastalığıdır. Hastaların yaklaşık %15-20'sinde ise relaps gözlenir (3).

2.6.5. İmatinib

STI571 (4 - [(4 - methyl - 1 - piperazinyl)methyl] - N - [4 - methyl - 3 - [[4 - (3 - pyridinyl) - 2 - pyrimidinyl]amino]phenyl]benzamide methanesulfonate; Glivec, Novartis,

Basel, İsviçre) molekülü *in vitro* tirozin kinaz inhibitörleri taraması sırasında keşfedilmiş ve spesifik kinazlar için aktivitesi optimize edilmiştir. Molekül, tirozin kinaz enziminin ATP-bağlayıcı bölgesine kompetitif inhibisyonla bağlanarak etki eder. Bağlanma sonucu BCR-ABL1 sinyal iletiminde görevli proteinlerin tirozin fosforilasyonu inhibe olur. BCR-ABL1 kinazının yanı sıra trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve c-kit tirozin kinazlar için yüksek spesifite gösterir. *BCR-ABL1* ifade eden hematopoetik hücrelerde büyümenin durmasına ve apoptoza neden olur, ancak normal hücreleri etkilemez (11).

İlacın Faz I çalışmaları α -IFN tedavisinin başarısız olduğu KML hastalarında yapılmış ve oral yoldan alındığında iyi tolere edilerek anlamlı anti-lösemik aktivitesi olduğu gösterilmiştir (11). Bu gelişmelerin ardından, uluslararası bir grup kurularak α -IFN ile Ara-C alan hastalarla imatinib alan hastaların randomize karşılaştırılması amaçlanmıştır. *International Randomized study of IFN- α plus cytarabine versus STI571 (IRIS)* adı verilen bu grubun 1106 yeni tanı KML hastası ile yaptığı randomize çalışmada günlük oral 400 mg imatinib ile tam ve majör sitogenetik yanıt, hastalık progresyonu ve transformasyonunda anlamlı iyileşmeler gözlenmiştir (48). Erken sonuçlar o kadar anlamlı farklı çıkmıştır ki, α -IFN ile Ara-C alan hastaların %89'u çalışmanın ortanca 8. ayında imatinibe geçiş yapmıştır. Etik olarak haklı gerekçeleri olan bu durum çalışmanın uzun dönem sonuçlarını etkilemiştir. Aynı şekilde bundan sonra yapılması planlanan randomizasyonlarda da imatinib içermeyen rejimlerin kullanılması mümkün olmadığından, karşılaştırmalar ancak kayıtlara dayalı yapılabilmektedir (48).

Moleküler yöntemlerin gelişmesi ile imatinib tedavisine yanıtı değerlendirebilmek için yeni terimler ortaya çıkmıştır. Kullanılan terimler ve yanıt kriterleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. KML'de tedavi yanıtını izlemede kullanılan kriterler (45, 47)

| HEMATOLOJİK TAM YANIT (CHR) | SİTOGENETİK YANIT (CyR) | MOLEKÜLER YANIT (MR) BCR-ABL1/kontrol geni oranına göre |
|-------------------------------------|--------------------------------|--|
| Lökosit < 10 000/mm ³ | Tam sitogenetik yanıt (CCyR) | Tam Moleküler Yanıt (CMR) |
| Trombosit < 450 000/mm ³ | %0 Ph+ | BCR-ABL1 = 0 |
| Bazofil < %5 | Kısmi Sitogenetik yanıt (PCyR) | Majör Moleküler Yanıt (MMR) |
| Blast/promyelosit (-) | %1-35 Ph+ | BCR-ABL1 oranında standart bazal değer ≥3 log azalma |
| Ekstramedüller tutulum (-) | Minör Sitogenetik Yanıt | YA DA |
| Splenomegali (-) | %36-65 Ph+ | BCR-ABL1 oranı < %0.1 |
| Akselere/blastik faz bulgusu (-) | Minimal Sitogenetik Yanıt | |
| | %66-95 Ph+ | |
| | Yanıtız | |
| | >%95 Ph+ | |

IRIS çalışmasının devamında 2 yıllık sağkalım oranlarında da artış gözlenmiştir (49). Beş yıllık takipte ise özellikle tam sitogenetik yanıt sağlayan ve *BCR-ABL1* gen ürünü miktarlarında standart bazal değerden en az 3 log'luk azalma gösteren hastaların, göstermeyenlere oranla hastalık progresyonu açısından daha düşük riskte olduğu; ayrıca yan etkilerde artış olmadığı ve başlangıç tedavisi olarak imatinib'in hastaların çoğunda kalıcı yanıt sağladığı gösterilmiştir (50).

Ancak imatinib tedavisinin uzun dönem sonuçları takip edildikçe %20 – 30 gibi yüksek sayılabilecek bir grubun kalıcı yanıtı ulaşamadığı gösterilmiştir (46, 50). Bu grup hastaların ilaca direnç gösterme nedenleri araştırılmış ve *BCR-ABL1* kinaz bölgesinde mutasyonlar ve *ABL* amplifikasyonu gibi mekanizmaların *BCR-ABL1* reaktivasyonu ile dirence yol açtığı bulunmuştur (51).

2.6.6. Imatinib Direnci

Primer imatinib direnci tedaviye yanıtızsızlık olarak tanımlanır. Tedavinin başında değişken sürelerle yanıt gösterip, yanıtta azalma gösteren hastalarda ise sekonder imatinib direnci bulunmaktadır. Imatinib direnci hematolojik (periferik kan sayımlarının anormalleşmesi), sitogenetik (Ph kromozomunun gösterilmesi) ve moleküler (Q-RT-PCR ile *BCR-ABL1* transkriptinin varlığı) olarak da sınıflandırılabilir. Moleküler yanıtın kaybıyla sekonder direncin nasıl tanımlanması gerektiği konusunda görüş birliği henüz oluşmamıştır. Bunun nedenleri arasında *BCR-ABL1* transkript seviyelerini gözlemek için kullanılan Q-RT-PCR tekniklerinin henüz standardize olamamış olması ve *BCR-ABL1* transkript seviyelerinin zaman içinde varyasyonlar göstermesi bulunmaktadır (52).

Imatinib direncinin kriterleri Tablo 2.3'te özetlenmiştir, bu kriterlere göre yanıtızsız olan hastalarda imatinib tedavisi değiştirilmelidir. Suboptimal yanıt olan hastalarda tedaviye aynen devam edilirse uzun dönem yanıt optimal olmayacaktır. Uyarı yaratacak durumlar mevcut ise hasta daha yakından takip edilmeli ve alternatif tedavi seçenekleri değerlendirilmelidir (52, 53).

Tablo 2.3. Erken kronik faz KML hastalarında imatinib 400 mg/gün tedavisine yanıtızsızlık, suboptimal yanıt kriterleri ve yanıtızsızlık uyarıları (52, 53)

| Tamdan geçen zaman (ay) | Yanıtızsız | Suboptimal Yanıt | Yanıtızsızlık Uyarıları |
|-------------------------|---|---|--|
| 0 | - | - | Yüksek risk*, del der(9), Ph+ hücrelerde ek SA |
| 3 | HR yok (stabil hastalık ya da progresyon) | < CHR | - |
| 6 | < CHR, CyR yok | < PCyR | - |
| 12 | PCyR yok | < CCyR | < MMR |
| 18 | CCyR yok | < MMR | - |
| Herhangi bir zamanda | CHR ya da CCyR kaybı, mutasyon | Ph+ hücrelerde ek SA, MMR kaybı, mutasyon | Transkript seviyelerinde artış, Ph- hücrelerde ek SA |

Yüksek risk*: Sokal ya da Hasford skorlamasına göre yüksek risk, del der(9): Derivatif 9. Kromozomda Delesyon, SA: Sitogenetik Anomali, HR: Hematolojik Yanıt, CHR: Tam Hematolojik Yanıt, CyR: Sitogenetik Yanıt, PCyR: Parsiyel Sitogenetik Yanıt, CCyR: Tam Sitogenetik Yanıt, MMR: Majör Moleküler Yanıt.

- **Imatinibe direnç mekanizmaları**

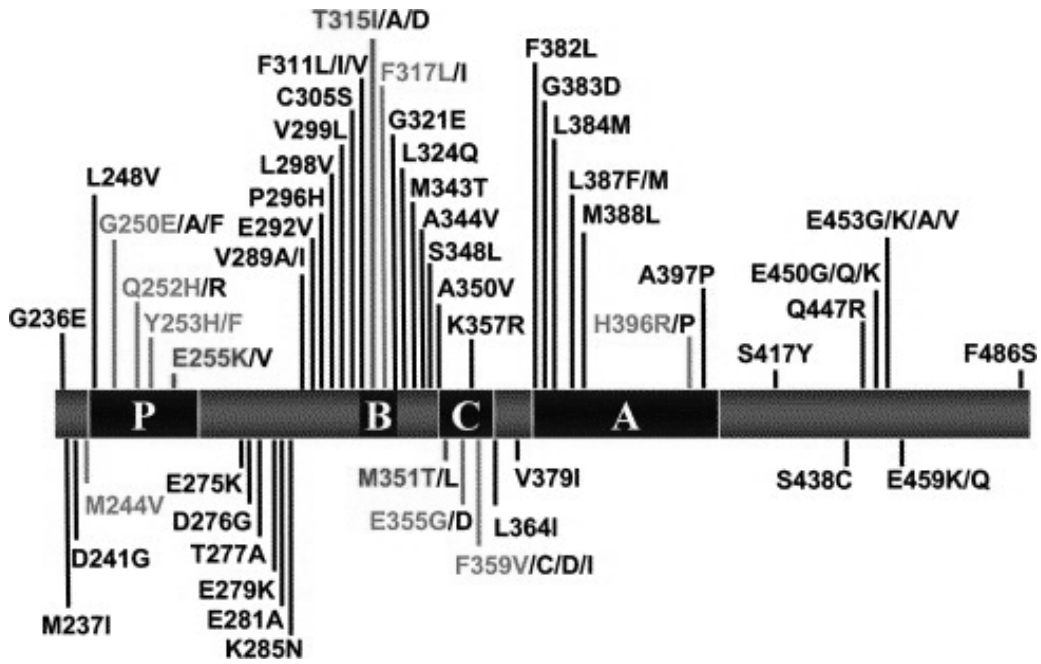
Imatinib tedavisine direnç mekanizmaları BCR-ABL1 yolağına bağımlı ve bu yolaktan bağımsız olarak iki grupta incelenebilir.

BCR-ABL1 yolağına bağımlı mekanizmalar

Yolak ilişkili direnç mekanizmaları arasında *BCR-ABL1* amplifikasyonu ve buna bağılı aşırı ifadenmesi ve BCR-ABL1 kinaz bölgesindeki nokta mutasyonları vardır. İmatinibe dirençte rolü olduğı bilinen en sık mekanizma nokta mutasyonlarıdır, dirençli hastaların %40-90'ında mutasyon gösterilebilir (52).

Bugüne kadar 100'den fazla nokta mutasyonu tanımlanmıştır (Şekil 2.12) (52). Mutasyonlar kinaz bölgesinin farklı yerlerinde olabilirler ve genellikle imatinibin bağlanmasını engelleyerek etki gösterirler. (54). Bu mutasyonlar tanı anında yani tedavi öncesi de bulunabilirler, tedavi sırasında da ortaya çıkabilirler. En sık gözlenen mutasyon bir sitozin-timin baz dönüşümü sonucu proteinde 315. pozisyondaki treoninin izolösine dönüştüğü T315I mutasyonudur (55). Dirençli hastaların yaklaşık %15'inde T315I

mutasyonu gözlenir (56). 315. pozisyonadaki treonin imatinibin bağlanmasında önemli bir basamakta görev alır, mutasyon durumunda bu bağlanma etkilenir ve imatinibe ek olarak diğer tirozin kinaz inhibitörlerinin de tümüne tam bir duyarsızlık gelişir. Diğer sık gözlenen mutasyonlar arasında Gly250, Tyr253, Glu255, Thr315, Met351 ve Phe359 amino asitlerini ilgilendiren mutasyonlar bulunmaktadır (sırasıyla G250E, G250V, Y253H, E255K, E255V, M351T, F359V). Bazı hastalarda birden fazla mutasyon gözlenebilir (52).



Şekil 2.12: İmatinibe klinik direnç ile ilişkili BCR-ABL1 kinaz bölgesi mutasyonları

A: aktivasyon loop; B: imatinib bağlanma bölgesi; C: katalitik bölge; P: P(fosfat)-loop (57)

Mutasyonları saptamak için birden fazla yöntem bulunmaktadır; bunlar arasında dizi analizi, subklonlama sonrası dizi analizi, denatüran yüksek performanslı likit kromatografi, *pyrosequencing*, *double-gradient* denatüran elektroforez ve allel spesifik oligonükleotid PZR sayılabilir (58). En sık kullanılan yöntem olan dizi analizi ile yaklaşık %20 duyarlılıkla sonuç verilebilmektedir (52). Bu yöntemle özellikle mutant klonun tüm hücrelerdeki oranı %20-30'dan az olduğunda mutasyonlar atlanabilmektedir (55).

Hali hazırda hastaların kinaz bölgesi mutasyonlarının ne zaman ve hangi yöntemle taranması gerektiği konusunda görüş birliği bulunmamaktadır (58). Mutasyonlar sıklıkla hastalığın ilerlemiş evrelerinde, tanıda yüksek riskli olan ya da ileri yaştaki hastalarda,

klonal evrimle birlikte, önceki α -IFN tedavisiyle ilişkili olarak saptandığından, mutasyon analizinin tedaviye yanıtı ya da suboptimal yanıt gösteren hastalarda ve *BCR-ABL1* seviyelerinde artma gözlemlendiğinde bakılması önerilmiştir (44, 46). Saptanan mutasyonlar arasında kuşkusuz tedaviyi en çok etkileyen, halihazırda kullanılan tüm tirozin kinaz inhibitörlerine dirençle ilişkisi gösterilen T315I mutasyonudur (44). T315I mutasyonu saptanan hastalarda en uygun mevcut tedavi seçeneği allojeneik kök hücre transplantasyonudur (59).

BCR-ABL1 yolağından bağımsız mekanizmalar

BCR-ABL1 yolağından bağımsız olarak imatinibe direnç geliştirme nedenleri arasında farmakokinetik nedenler, imatinibin hücre içine girmesini engelleyen ya da dışına çıkmasını kolaylaştıran moleküller (Multidrug Resistance; MDR1), KML kök hücreleri adı verilen sessiz ve imatinibe cevapsız hücrelerin varlığı, sitogenetik klonal evrim ve SAK aşırı ifadenmesi bulunmaktadır (52).

SAK'lerden Lyn, Hck ve Fgr moleküllerinin *BCR-ABL1* pozitif hücrelerde aktive olduğu ve Hck aktive olduğunda STAT5 üzerinden hücre siklusu genlerinin transkripsiyonunu arttırdığı bilinmektedir (52). Lyn molekülünün ise BCR-ABL1 mutasyonu olmadığı halde imatinib direnci olan hücrelerde hem aşırı ifadelendiği hem de aktive olduğu gösterilmiştir (57).

Imatinibe direnç gelişiminin mekanizmaları tanımlandıkça yeni tirozin kinaz inhibitörlerine ihtiyaç doğmuştur.

2.6.7. Diğer Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825) hem BCR-ABL1 hem de SAK'ları inhibe edebilen potent bir moleküldür (59). Imatinib'den farklı olarak BCR-ABL1'in hem aktif hem de inaktif formlarına bağlanabilir (Bkz Şekil 2.13) (60). En önemli özelliği BCR-ABL1 yolağından bağımsız olarak Src ailesinin üyelerinin de aktivasyonunu önleyebilmesidir. Imatinib direnci ya da intoleransı olan KML hastalarında tüm fazlarda kullanılabilir. Dasatinib'in

etkinliği *Src/Abl1 Tyrosine Kinase Inhibition Activity: Research Trials of Dasatinib* (START) alışması ile gösterilmiştir. Bu çalışmada imatinib direncinde dasatinib kullanımı, yüksek doz imatinib'den daha iyi yanıt sağlamıştır (59).

In vitro çalışmalar, dasatinib'in T315I dışındaki tüm mutasyonlarda BCR-ABL1'e bağlanabildiğini göstermiştir. Klinik olarak ise V299, T315, and F317 mutasyonlarında dasatinib direnci gösterilmiştir (59).

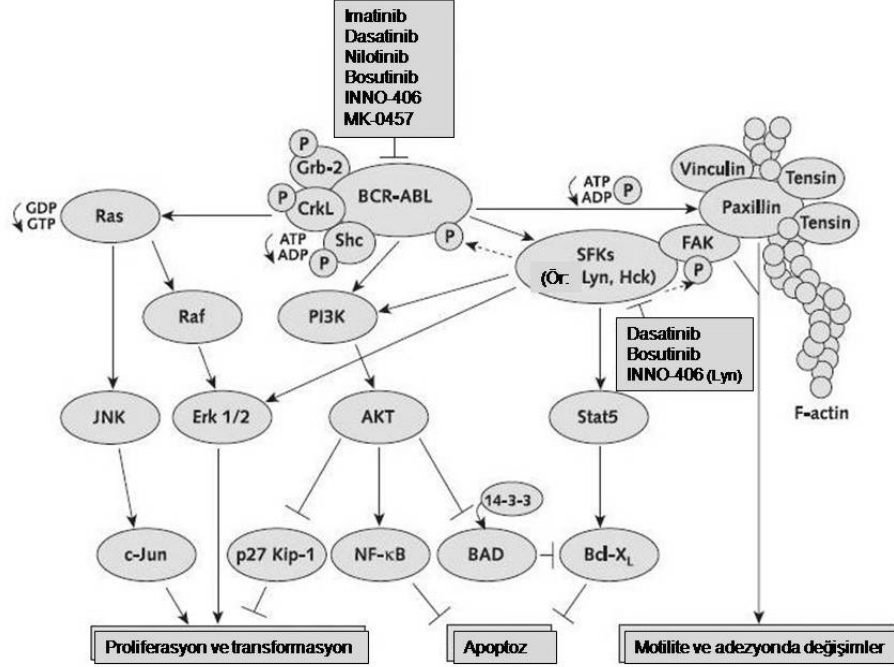
Nilotinib

Nilotinib (AMN107) imatinibin kimyasal yapısının değiştirilmesiyle elde edilmiş yeni bir aminopirimidin türevi tirozin kinaz inhibitörüdür. Imatinib'e benzer şekilde BCR-ABL1'in ATP-bağlayıcı bölgesine kompetitif inhibisyonla bağlanarak etki eder, ancak bağlanma affinitesi ve Abl kinaz seçiciliği imatinib'den üstündür (şekil 2.13). Imatinib dirençli hücre serilerinde de yüksek oranda etkinliği gösterilmiştir (61). Faz II alışmaları sonucu bu ilaç da imatinib direnci ya da intoleransı olan KML hastalarında tüm fazlarda kullanılmaya başlanmıştır. Hem imatinib hem de dasatinib tedavisinin başarısız olduğu durumlarda endikedir. *In vitro* alışmalarda T315I dışındaki mutantların tümüne etkisi gösterilmiş, ancak klinik çalışmalarda Y253, E255, T315 ya da F359 taşıyan hastalarda nilotinib direnci ortaya çıkmıştır (59).

Diğer moleküller

KML'de birçok yeni tirozin kinaz inhibitörü deneme aşamasındadır. Bunlar arasında ne çıkan potent inaktif/ara form/inaktif BCR-ABL1 inhibitörü bosutinib (SKI-606) ve dual Abl/Lyn kinaz inhibitörü INNO-406 (NS-187) molekülleri, diğer birçok mutasyona etkili oldukları halde T315I mutasyonunu taşıyan BCR-ABL1 molekülünü inhibe edememektedir. T315I inhibisyonuna yönelik çalışmalarda ON012380, MK-0457, SGX393 ve XL228 molekülleri denenmektedir (şekil 2.13) (57, 59).

Tirozin kinaz inhibitörleri dışında deneme aşamasında olan diğer ilaçlar arasında homoharingtonin (protein sentez inhibitörü), tipifarnib ve lorafarnib (farnezil transferaz inhibitörleri) ve desitabin (DNA metilasyon inhibitörü) bulunmaktadır (57, 59).



Şekil 2.13: KML tedavisinde kullanılan yeni moleküllerin BCR-ABL1 yolağında etki yerlerinin gösterimi (12’den değiştirilerek)

Halihazırdaki tüm tedavilere direnç gösterebilen varyantların bulunduğu KML hastalığında alternatif tedavi önerilerine her geçen gün ihtiyaç artmaktadır. Imatinibe direnç sürecinde BCR-ABL1 yolağından bağımsız mekanizmalar arasında Src ailesi kinazlarının aktivasyonunun özellikle JAK2/STAT5 hücre içi sinyal yolağı üzerinden hücre büyümesi ve sağkalımına destek olduğundan bahsedilmiştir. *AHI-1* adı verilen yeni tanımlanmış bir gen ve proteininin bu yolakta önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

2.7. *AHI-1* (Abelson Helper Integration Site-1)

2.7.1. *AHI-1* geninin yapısı ve fonksiyonu

Ahi-1 geni ilk olarak “Abelson Murine leukemia” virusu (A-MuLV) ile ilişkili olarak tanımlanmıştır. Farelerde oligoklonal B-hücreli lenfoma oluşturabilen A-MuLV defektif

bir virustur, yani hedef hücrede tek başına replike olma yeteneği yoktur. Ancak defektif olmayan başka bir virusun yardımıyla hücre içinde replike olabilir. A-MuLV için bu yardımcı virus “Moloney murine leukemia” virusudur (M-MuLV). A-MuLV’nin onkogeni olan *v-abl*’nin hedef hücredeki tek başına ifadelenmesi de tümör formasyonu için yeterli değildir, başka genetik olaylar da eklenmelidir. M-MuLV’nin “insersiyonel mutajen” olarak rolü, A-MuLV ile oluşturulan B-hücreli lenfomalarda bu virusun kullandığı *Ahi-1* (Abelson helper integration site-1) denilen ortak yardımcı provirus birleşme bölgesinin (helper provirus integration site) bulunmasıyla gösterilmiştir. Bu integrasyonun *v-abl* varlığında oluşacak malign transformasyon için gerekli bir genetik olay olduğu öne sürülmüştür (62).

Ahi-1 lokusu farede 10. kromozoma, *c-myc* protoonkogenine oldukça yakın bir noktaya haritalanmıştır. 2002 yılında Jiang ve arkadaşları, bu lokusta disregülasyonu tümör gelişimine yol açan yeni bir hedef gen olduğunu öne sürmüşler ve bu gene *Ahi-1* adını vermişlerdir. Bu genin diğer provirus integrasyon bölgelerinin de hedef bölgesi olduğunu ve SH3 motifi ve bir WD40 (WD: Triptofan-Aspartat) tekrar bölgesi olan bir protein kodladığını göstermişlerdir. Proteinin ayrıca biri SH3 bölgesinde olmak üzere iki potansiyel tirozin fosforilasyon bölgesi içerdiği bulunmuştur. SH3 bölgelerinin Grb2/Sem5, Sos ve Ras gibi proteinlerin birbirleri arasındaki etkileşimlerinde, WD40 tekrarlarının ise hücre döngüsü düzenlenmesi, “RNA processing”, programlı hücre ölümü ve gen regülasyonunda önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Tirozin fosforilasyon motiflerinin de diğer proteinlerin SH2 alanlarına bağlanmayı sağladığı bilindiğinden, *Ahi-1* proteininin de hücre içi sinyal iletiminde ve döngü kontrolündeki multiprotein komplekslerinin bir üyesi olduğu düşünülmüştür. Halen SH3 motifi ve WD40 tekrarı birlikte içeren başka bir protein gösterilmemiştir (62).

Bu genin diğer türlerde homologları araştırılmıştır. Fare, rat, hamster, kedi ve inekte gösterilmiş, ancak *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans* türlerinde hem SH3 motifi hem de WD40 tekrarı olan bir proteini kodlayan herhangi bir gen bulunamamıştır. Böylece bu genin memelilerde önemli fonksiyonları olan ve evrimsel olarak korunmuş bir gen olduğu öne sürülmüştür. Ardından genin insandaki homologu araştırılmış ve yüksek homoloji gösteren, 3 farklı cDNA dizisine ulaşılmıştır (AL136797, AK024085 ve AK000076). AL136797 kodlayan dizinin tamamını içerirken, AK024085 ve AK000076 klonlarının daha kısa izoformlar olduğu gösterilmiştir. Bu klonların kodladığı

proteinler de gösterilmiş ve AL136797 ile AK024085 izoformlarının kodladığı proteinlerin fare homologunda gösterildiği gibi SH3 ve WD40 bölgelerini içerdiği gösterilmiştir. İnsanda, fareden farklı olarak proteinin N-terminalinde bir “coiled-coil domain” olduğu gösterilmiştir (62).

İnsanda 6q23.3 bölgesinde bulunan *AHI-1* geni 33 ekzondan oluşmakta ve 213.7 kb’lik bir bölgeyi kapsamaktadır. Protein kodlayan dizi 4. ekzondan başlar (62). En çok beyinde, özellikle de kortikospinal traktus ve superior serebellar pedinküllerdeki nöronları oluşturan öncüllerde ifadelenmektedir. Otozomal resesif Joubert Sendromu görülen 3 ailede yapılan genom-boyu taramada 6q23 bölgesi belirlenmiş ve bölgedeki aday genlerin taraması sonucu *AHI-1* geninde 3 farklı mutasyon bulunmuştur. Böylece *AHI-1* geni Joubert Sendromu ile ilişkisi gösterilen ilk gen olmuştur (63). Takip eden çalışmalarda hastalığa yol açan farklı mutasyonlar bulunmuş ve beyinde kodladığı proteine Jouberin ismi verilmiştir (64).

2.7.2. *AHI-1* geninin onkogenez ile ilişkisi

Ahi-1 lokusu önce *v-abl* aracılı pre-B lenfomalarda, daha sonra *c-myc* aracılı T lenfomalarda ortak bir “provirus integration site” olarak tanımlandığından bu iki onkogen ile ilişkisi olduğu düşünülmüştür (62). Başka gruplar tarafından da timomalarda ve *Nfl* heterozigot farelerde AML oluşumunda “provirus integration” bölgelerinin yeniden düzenlendiği gösterilmiştir (65). Bu bölgelerdeki mutasyonların tesadüfi olmaması ve birçok tümörde gösterilmiş olması, bu genlerin onkojenik gelişimde rolü olduğunu göstermektedir (62).

2.7.3. *AHI-1* geninin hematopoez ve lösemi gelişimi ile ilişkisi

ABL, *MYC* ve *NFI* gibi insanda lösemilerde etkisi bilinen genlerle ilişkisi gösterildiğinden *AHI-1* geninin hematopoezde ve lösemi gelişimindeki rolü araştırılmıştır. *AHI-1* transkripti en ilkel hematopoetik hücrelerde en yüksek seviyelerde bulunmuş ve olgunlaşmanın erken dönemlerinde ifadelenmesinin giderek azalarak kaybolduğu gösterilmiştir. Bu durumdan

AHI-1 down-regülasyonunun normal hematopoetik hücre gelişiminde önemli olduğu sonucu çıkarılmıştır (66).

İnsan lösemik hücre dizilerinde *AHI-1* ifadelenmesi araştırılmış ve en yüksek seviyeler bir AML hücre dizisi olan THP-1’de, KML blast krizi hücre dizisi olan K-562’de ve 3 ayrı insan T-hücreli lösemi virusu (HTLV-1) ilişkili erişkin T-hücreli lösemi/lenfoma (ATLL) hücre dizisinde gösterilmiştir (66).

2.7.4. *AHI-1* geninin KML ile ilişkisi

AHI-1 geninin K-562 hücre dizisinde yüksek seviyelerde ifadelendiğinin görülmesi ile Ph(+) lösemilerde araştırılmış ve hem KML hücrelerinde hem de Ph(+) ALL hücrelerinde belirgin deregülasyonu saptanmıştır. Ph(-) ALL’de ise normal olarak bulunmuştur. Ayrıca, KML hastalığının her üç evresindeki hastalardan alınan hücrelerde ifadelenmenin artmış olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar *BCR-ABL1* ekspresyonu ile *AHI-1* deregülasyonu arasında olası güçlü bir ilişkiyi göstermektedir (66).

AHI-1 aşırı-ifadelenmesinin KML’deki biyolojik sonuçlarını açıklamak amacıyla ileri çalışmalar yapılmıştır. *AHI-1* aşırı ifadelenmesinin fare ve insanda hematopoetik hücrelerde *in vitro* olarak büyüme avantajı sağladığı ve *in vivo* olarak *BCR-ABL1*’in etkilerini artırarak lösemiye indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, KML kök hücrelerinde ve lin-CD34+ insan kordon kanı hücrelerinde RNA interferans aracılı *AHI-1* baskılanması ile *in vitro* olarak büyüme otonomisinin azaldığı saptanmıştır. KML hastalarından alınan hücrelerle deneyler tekrarlanmış ve özellikle *AHI-1* seviyeleri yüksek olan imatinibe dirençli ya da blast krizindeki hastalardan alınan hücrelerde bu etkinin anlamlı olduğu gösterilmiştir (67).

Aynı çalışmada *AHI-1* aşırı ifadelenmesinin BCR-ABL1 aktivasyonunu takip eden sinyal yollarından hangisi üzerinden etki ettiğini bulmak amaçlı deneyler yapılmış ve *AHI-1* ifadesi yüksek hücrelerde JAK2, STAT5, NF-κB (Nükleer faktör Kappa B) p65 ve Src proteinlerinin fosforilasyonunun artmış olduğu gösterilmiştir. Dikkat çekici olarak, hücreler *in vitro* ortamda BCR-ABL1 proteini seviyelerinin azalmasına neden olan doksisisikline maruz bırakıldığında bu proteinlerin artan fosforilasyonu azalmış, ancak IL-3 ilavesi ile JAK2, STAT5 ve daha az olarak Src proteinlerinin fosforilasyonunun yeniden

arttığı gözlenmiştir. *AHI-1* aşırı ifadelenmesi JAK2 ve STAT5 proteinlerinin yalnızca fosforilasyonunu değil, genlerinin ifadelenmesini de artırdığı gösterilmiştir. *AHI-1* baskılandığında ifadelenmeler azalmış, *AHI-1* tekrar hücreye verildiğinde tekrar artmıştır. BCR-ABL1 sinyal yolağının IL-3 ve GM-CSF ile sağlanan sitokin reseptör sinyal yolağı ile benzerliği bilinmektedir. Bu sonuçlarla *AHI-1*'in, BCR-ABL1'in KML hücrelerine büyüme faktöründen bağımsız büyüme avantajı sağlamasına IL-3 sinyal yolağı üzerinden JAK2 ve STAT5'in aktivasyonunu arttırarak yardımcı olduğu öne sürülmüştür (67).

Bu şekilde, ifade düzeyleri yüksek hücrelerde tanımlanan *AHI-1*-BCR/ABL-JAK2 etkileşim kompleksinin tedaviye yanıtta rol alıp almadığı incelenmiştir. *AHI-1*'in yüksek oranda ifadelenildiği hücrelere değişen dozlarda imatinib uygulandığında beklenen gerileme gözlenmemiştir. Bu hücrelerin IL-3 varlığında imatinibe daha da dirençli oldukları gözlenmiştir. Dolayısıyla, IL-3 varlığında *AHI-1* seviyeleri yüksek olan hücrelerin imatinib nedeniyle oluşan büyüme baskılanmasını daha kolay aştıkları sonucu çıkarılmıştır (67).

Ardından diğer tirozin kinaz inhibitörlerine yanıtta *AHI-1*'in rolü araştırılmış ve imatinib direnci olan ya da blast krizindeki KML hastalarından alınan hücrelerde *AHI-1*'in baskılanması ile dasatinib, imatinib ve nilotinib'e verilen yanıtta artma gözlenmiştir. Bunların arasında *AHI-1* baskılı hücrelerin en çok dasatinibe duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlarla da *AHI-1*'in tirozin kinaz inhibitörlerine yanıtta da rol alıyor olabileceği düşünülmüştür (67).

Tüm bu sonuçlar, yeni tanımlanmış bir protein olan *AHI-1*'in regülasyonunun KML'deki önemini göstermektedir. *AHI-1*'in etkilerini IL-3 bağımlı JAK2-STAT5 yolağı üzerinden ve muhtemelen başka modülatör proteinlerin de yardımıyla gösterdiği düşünülmektedir. BCR-ABL1 ilişkili malign transformasyona büyüme avantajı ve tirozin kinaz inhibitörlerine direnç sağlayarak katkıda bulunduğu düşünülen bu genin kendisinin ya da bulunduğu JAK2-STAT5 sinyal yolağının yeni bir tedavi hedefi olabileceği öne sürülmüştür (67).

2.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Gen İfadelenmesinin Analizi

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) özellikle gen ifadenme çalışmalarında kullanımı yerleşmiş bir yöntemdir (68). RT-PCR, döngüler sırasında reaksiyonlardan floresan sinyal toplayarak sürekli analize olanak verir. İfadelenmenin yanı sıra amplifikasyonlar, delesyonlar ve nokta mutasyonlarının da çalışılmasına olanak sağlayan bu yöntemin üstünlüğü hızında ve ürünlerin birikiminin gerçek zamanlı izlenebilmesinde yatmaktadır (69). Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (Q-RT-PCR) ise her reaksiyondan gelen floresan sinyaller her örnek için sayısal bir değere dönüştürülür. Q-RT-PCR yöntemi, genomik DNA kopya sayısını, tek nükleotid polimorfizmlerini, DNA metilasyon durumunu ve viral yükü belirlemekte kullanılabilir. En popüler kullanım alanı ise mRNA düzeylerinin belirlenmesi üzerinden gen ifadenmesi analizleridir (69).

İfadelenme analizinde başlangıç molekülü mRNA'dır. Örnekten elde edilen mRNA ters transkriptaz reaksiyonu ile cDNA'ya dönüştürülür. Floresan kaynağı olarak primerlere bağlı ya da onlardan bağımsız floresan işaretleyiciler kullanılır. En sık kullanılanlar arasında hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri, TaqMan® problemleri, Molecular Beacon® problemleri ve SYBR® Green I boyası bulunmaktadır. SYBR® Green I boyası reaksiyonda çoğalan her türlü çift zincirli DNA'ya nonspesifik olarak bağlanır ve çift zincirli DNA'nın artışıyla orantılı olarak floresan sinyal verir (69). Her deneyde hedeflenen ampikonun çoğalıp çoğalmadığını, kantifikasyona primer dimerlerinin ve nonspesifik ürünlerin karışmadığını gösterebilmek için, reaksiyon sonrası ürünler jelde görüntülenebilir ya da reaksiyondan sonra erime eğrisi ("melting curve") analizi basamağı eklenebilir (70).

Q-RT-PCR çalışmalarında kimi zaman PZR ürünlerinin taşınma kontaminasyonunu önlemek için urasil-N-glikozilaz (UNG) uygulaması kullanılabilir. UNG uygulamasını kullanabilmek için reaksiyona eklenen deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) karışımında deoksitimidin trifosfat (dTTP) yerine deoksiuridin trifosfat (dUTP) olmalıdır. UNG enzimi reaksiyona eklendiğinde, dUTP nükleotidini içeren her türlü olası PZR ürününü sindirir (71).

Q-RT-PCR analizlerinde genel olarak iki kantifikasyon stratejisi izlenebilir; mutlak (*absolute*) kantifikasyon ya da görel (*relative*) kantifikasyon. Mutlak kantifikasyonda elde

edilen sinyaller önceden hazırlanmış bir kalibrasyon eğrisine göre kopya sayısı olarak hesaplanarak sonuç verir. Görelî kantifikasyon ise belli bir RNA'nın ifadenme seviyelerindeki değişimin bir başka RNA'nın ifadenme seviyesine göre oranının ölçülmesine dayanır. Görelî kantifikasyonda kesin konsantrasyonları bilinen standartlara ya da kalibrasyon eğrisine ihtiyaç yoktur, dizisi bilindiği sürece her türlü transkript referans olarak kullanılabilir. En sık kullanılan referanslar sabit ifadelendiği bilinen genler (*house-keeping* genler) ve evrensel ya da yapay kontrol RNA / DNA molekülleridir. Görelî kantifikasyonda bir basamak daha eklenerek bu görelî sonuçlar bir kontrol hastasına, tedavisiz bir örneğe ya da olgunun sıfır anındaki örneğine oranlanabilir. Bu basamağa normalizasyon adı verilir (72).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Klinik Araştırmalar ve Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır (Proje No: KA09/47, Onay tarihi: 5 Mart 2009).

Çalışmaya KML tanısı almış 38 hasta dahil edildi. Tanı sırasındaki yaşları 17-74 arasında değişen (ortanca: 46) hastaların erkek/kadın oranı 1.9 (25 erkek, 13 kadın) idi. Hastaların tanıdan itibaren ortalama 24.5 (0 – 63) ay süren takiplerinde rutin olarak bakılan Q-RT-PCR yöntemi ile *BCR-ABL1* transkript düzeyleri geriye dönük olarak kaydedildi ve bu sonuçlara göre hastalar üç gruba ayrıldı. İlk grup (n=11), yeni tanı almış ve/veya tanıdan bu yana en fazla 18 ay geçmiş olan KML olgularından oluşturuldu. İkinci grup (n=10), 18 aydan uzun süredir takipte olup, imatinib tedavisi altında *BCR-ABL1* seviyeleri negatif seyreden, “cevap veren” hastalardan oluşturuldu. Üçüncü grup (n=17) ise, 18 aydan uzun süredir takipte olup, imatinib tedavisi altında iken *BCR-ABL1* seviyeleri pozitifleşen ve bu nedenle tedavisi yüksek doz imatinib, dasatinib ya da nilotinib ile değiştirilen “cevapsız” hastalardan oluşturuldu.

KML hastalarındaki *AHI-1* düzeylerini normal durumla karşılaştırabilmek için KML olmadığı bilinen bireylerden kontrol grubu oluşturuldu. Bu grupta lökosit sayısı normal olan ve *BCR-ABL1* transkript düzeyinin negatif olduğu kabul edilen 11 KML olmayan sağlıklı bireyden alınan periferik kan örnekleri kullanıldı.

3.2. Yöntem

Çalışmada hastaların Q-RT-PCR yöntemi ile *BCR-ABL1* füzyon gen ürünü düzeyleri belirlenmesi için Aralık 2007 – Eylül 2009 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilmiş olan periferik kan ya da kemik iliği örneklerinden elde edilen cDNA örnekleri kullanıldı.

Tüm hastalara ve kontrol grubundaki bireylere bilgilendirme ve onam formu okutularak imzalatıldı (Bkz. EK 1). Geriye dönük olarak saklanmış materyalinden çalışılacak olan hastaların söz konusu örnekleri verdikleri sırada moleküler tetkikler için bilgilendirme ve rıza formunu imzalamış ve daha sonraki ek çalışmalar ve bilimsel nitelikli araştırmalarda gerektiğinde kullanılmak üzere artan çalışma materyalinin saklanmasına izin verdiğine dair kutucuğu işaretlemiş olduğu kesinleştirildi.

3.2.1. Kullanılan cihazlar

1. Distile su cihazı (Millipore, Fransa)
2. Masa Üstü Santrifüj Cihazı (Beckman-Coulter, ABD)
3. Minisantrifüj (Labnet, Kore)
4. Çalkalayıcı (Nüve, Türkiye)
5. Spektrofotometre (Eppendorf, Almanya)
6. Manyetik karıştırıcı (SBS, Güney Afrika Cumhuriyeti)
7. Ph metre (Consort P500, Belçika)
8. Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
9. Derin dondurucu (Arçelik, Türkiye)
10. Termal Cycler (Applied Biosystems 2720, ABD)
11. Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
12. Yatay elektroforez sistemi (Cleaver Scientific, İngiltere)
13. Jel görüntüleme sistemi (Syngene, İngiltere)
14. Güç kaynağı (Consort, Belçika)
15. Light Cycler 2.0 (Roche, İsviçre)

3.2.2. Kullanılan Kimyasallar

1. RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics, Almanya)
2. RNaz spreyi (RNase free, Mercury, CLP, Pretech Instruments, İsveç)
3. Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche Diagnostics, Almanya)
4. Steril Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma, ABD)
5. cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics, Almanya)

6. Primer sentezleri (Alpha DNA, Kanada)
7. Tbr DNA polimeraz (DyNAzyme™ II, Finnzymes, Finlandiya)
8. PZR tamponu (Finnzymes, Finlandiya)
9. dNTP (10x) Herbir deoksiribonükleotidden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM (Jena Bioscience, Almanya)
10. DdeI Restriksiyon Enzimi (New England Biolabs, ABD)
11. Agaroz (Sigma, ABD)
12. Yüksek çözünürlüklü agaroz (Sigma, ABD)
13. Trizma Baz (Sigma, ABD)
14. Borik Asit (Sigma, ABD)
15. EDTA disodium disulfate (Sigma, ABD)
16. Etidyum Bromür (Sigma, ABD)
17. 50 baz çifti moleküler ağırlık belirteci (Fermentas, İngiltere)
18. 100 baz çifti moleküler ağırlık belirteci (Fermentas, İngiltere)
19. Etanol (Merck, Almanya)
20. DyNAmo™ Capillary SYBR Green Q-RT-PCR kiti (Finnzymes, Finlandiya)

3.2.3. Kullanılan tampon ve çözeltiler

- Agaroz (%2)
0,5 gr agaroz, 100 ml 0.5xTris baz EDTA (TBE) içinde mikrodalga fırında kaynatılarak eritildi.
- Yüksek çözünürlüklü agaroz (%2)
0,5 gr yüksek çözünürlüklü agaroz 100 ml 0.5xTBE içinde mikrodalga fırında kaynatılarak eritildi.
- 10xTBE
108 gr Tris baz, 55 gr Borik asit, 9.3 gr EDTA toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü.
- 0,5xTBE
50 ml 10x TBE tamponuna distile su eklenerek 1000 ml toplam hacime tamamlandı.
- Etidium bromür
Distile suda çözülerek 10 mg/ml konsantrasyona ulaşıldı.

3.2.4. Periferik kan ya da kemik iliğinden RNA eldesi

Hastalara ait periferik kan ya da kemik iliği örnekleri laboratuvara ulaştıkları gün içinde RNA eldesine alındılar. Bu işlem için High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Almanya) kullanıldı. İzolasyon yapılacak olan tezgah ve kullanılacak santrifüjün içi çamaşır suyu ile temizlendi, RNaz spreyi ile temizlik tamamlandı. Hastanın lökosit sayısına bağlı olarak arttırılıp azaltılmak üzere yaklaşık 500 µl tam kan ya da kemik iliği steril bir tüpe alındıktan sonra üstüne 1 ml “Red blood cell lysis buffer” eklendi. Tüp çalkalayıcıda 10 dakika oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 5 dakika 500xg’de santrifüj edildi. Oluşan kırmızı süpernatant dökülerek beyaz pellete 1 ml “red blood cell lysis buffer” eklenerek 3 dakika 500xg’de santrifüj edildi. Kalan pellete 200 µl steril PBS eklendi ve karıştırıldı. Üzerine 400 µl “lysis/binding buffer” eklendi. Her örnek için filtre tüpü ve toplama tüpü hazırlanarak örnekler buraya aktarıldı. 15 saniye 8000xg’de santrifüj edildikten sonra süzüntü döküldü ve filtre tüpü üzerine 90 µl “DNase incubation buffer” ile 10 µl “DNase I” karıştırılarak eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra üzerine 500 µl “wash buffer 1” eklenerek tekrar 15 saniye 8000xg’de santrifüj edildi. Üzerine sırasıyla 500 µl “wash buffer 2” ve 200 µl “wash buffer 2” eklenerek yıkamalar tekrarlandı ve 2 dakika 14000-15000xg’de santrifüj edilerek solüsyonlar uzaklaştırıldı. Filtre tüpü yeni bir steril reaksiyon tüpüne alındı, üzerine 50-100 µl “elution buffer” eklenerek 1 dakika 8000xg’de santrifüj edildi. Elde edilen 50-100 µl RNA örneği bekletilmeden cDNA eldesine alındı.

3.2.5. RNA’dan cDNA eldesi

“Transcriptor reverse transcriptase” cDNA eldesi kiti ile işlem yapmadan önce RNA denatürasyonu yapıldı. Tüp içeriği her örnek için aşağıdaki şekilde hazırlandı.

| İçerik | µl |
|---------------------|--------------|
| Distile su | 2 |
| Random hexamer | 1 |
| RNA | 10 |
| Toplam hacim | 13 µl |

Hazırlanmış örnek kitin öngördüğü şekilde 65⁰C’de 10 dakika denatürasyona tabi tutuldu. Ardından aşağıdaki şekilde hazırlanmış karışımlar tüplere eklendi.

| Tüp no (içerik) | µl |
|----------------------------------|-----------|
| 2 (RT buffer) | 4.0 |
| 4 (dNTP mix) | 2.0 |
| 1 (reverse transkriptase) | 0.5 |
| 5 (RNase inhibitor) | 0.5 |
| Toplam hacim | 7 µl |

Termal cycler cihazında kitin önerdiği programda (25⁰C’de 10 dakika, 50⁰C’de 60 dakika, 85⁰C’de 5 dakika) ters transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.6. T315I mutasyonu tespiti için PZR ve enzim kesimi

Olguların takipleri sırasında en az iki noktadaki örnekleri ABL kinaz bölgesindeki T315I mutasyonu açısından araştırma için seçildi. İlk gruptaki olgulardan tanı anındaki örnekleri de çalışıldı. İkinci ve üçüncü gruptaki hastalardan ise tedavilerinin erken ve geç dönemlerinde iki ayrı noktada bakılmasına dikkat edildi.

T315I mutasyon durumunu değerlendirebilmek için 412 baz çiftlik (bç) ABL bölgesi PZR ile çoğaltılarak *DdeI* enzimi ile spesifik kesim noktalarının kaybı araştırıldı. Kullanılan ABL primerlerinin dizisi Tablo 3.1’de gösterilmiştir (55).

Tablo 3.1. Çalışılan genlerin primer dizileri ve ürün uzunlukları (*ABL* – 55, *AHI-1* ve *GAPDH* primerleri – 67).

| Genler | Primer dizileri | Ürün uzunluğu |
|---------------|----------------------------------|----------------------|
| <i>ABL</i> | F GAG GGC GTG TGG AAG AAA TA | 412 bç |
| | R GCT GTG TAG GTG TCC CCT GT | |
| <i>AHI-1</i> | F GCC GAG ATA GCC CGG TTT ATC | 76 bç |
| | R TCA GTT CGG TGA ATG TAA ACT CC | |
| <i>GAPDH</i> | F CCC ATC ACC ATC TTC CAG GAG | 105 bç |
| | R CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC | |

F: Forward, R: Reverse, bç: baz çifti

Olguların cDNA örneklerinin konsantrasyonları spektrofotometre cihazında ölçülerek reaksiyona yaklaşık 250 ng olacak şekilde sulandırılarak eklendi. Reaksiyonda DNA polimeraz olarak DyNAzyme™ II Hot Start DNA Polimeraz (Finnzymes, Finlandiya) kullanıldı. Enzimle birlikte edinilen PZR tamponunda, 1x konsantrasyonda 2,5 mM molaritede olacak şekilde magnezyum klorür (MgCl₂) bulunmaktaydı. PZR karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- PZR tamponu: 2.5 µl (1×)
- Primer F: 0.2 µl (1 µM)
- Primer R: 0.2 µl (1 µM)
- dNTP: 1 µl (0.5mM)
- Hot Start Tbr Polimeraz: 0.2 µl (0,4 U)
- Sulandırılmış cDNA örneği: 5 µl (250 ng)

Son hacim steril distile su ile 20 µl'ye tamamlandı. Aşağıda verilen koşullarda PZR cihazına koyuldu.

PZR koşulları:

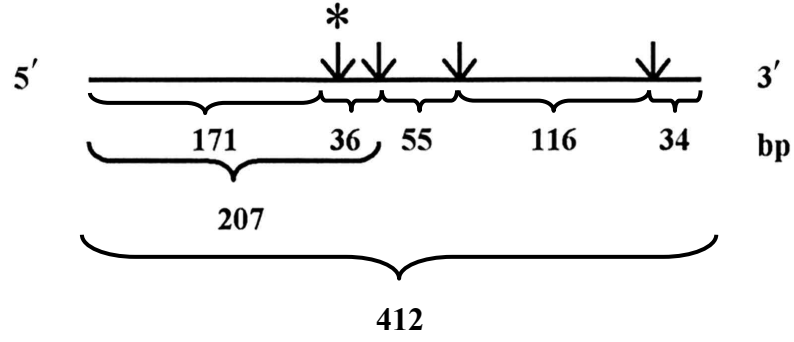
94⁰C 12 dakika

94⁰C 30 saniye
57⁰C 30 saniye
72⁰C 30 saniye

} 35 siklus

72⁰C 5 dakika

Elde edilen PZR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezinde (90 voltta 50 dakika) yürütülerek kontrol edildi. Enzim kesimi için alınacak PZR ürünü miktarı, ürünün jeldeki parlaklığı değerlendirilerek belirlendi (5-20 µl). PZR ürünleri 5 U Dde I restriksiyon enzimi ile 37⁰C'de 8-16 saat kesildi. Dde I restriksiyon enziminin ABL cDNA ürünüdeki kesim noktaları şekilde gösterilmiştir (Şekil 3.1) (55).



Şekil 3.1: 412 baz çiftlik ABL1 cDNA PZR ürününün *Dde* I restriksiyon haritası

Oklar kesim noktalarını, yıldız (*) kriptik *Dde* I bölgesini göstermektedir. Altta kesim tamamlandığında oluşacak parçaların uzunlukları gösterilmiştir. bp: baz çifti (55).

Enzim kesimi sonrasında ürünler %2'lik yüksek çözünürlüklü agaroz jel elektroforezinde (90 voltta 2 saat) yürütülerek kontrol edildi. Beklenen ürünlerin uzunlukları Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. *Dde* I enzimi ile kesim sonrası beklenen kesilmemiş, yabancı tip ve mutant tip ürünlerin ve olası ek bantların uzunlukları

| Sonuç | Ürün boyları (bç) |
|--------------------|-------------------|
| Kesilmemiş (uncut) | 412 |
| Yabancı tip | 171 + 36 |
| Mutant | 207 + 171 + 36 |
| Ek bantlar | 116, 55 |

3.2.7. Q-RT-PCR ile *AHI-1* ifadenme analizi

Olguların takipleri sırasında T315I mutasyonları bakılan cDNA örnekleri *AHI-1* ifadenme analizine alındı. Bu örnekler her hasta için tedavileri sırasında en az iki farklı noktadan seçilmişti. İlk gruptaki olgulardan tanı anındaki örnekleri de çalışıldı. İkinci ve üçüncü gruptaki hastalardan ise tedavilerinin erken ve geç dönemlerinde alınmış iki ayrı örnekte bakılmasına dikkat edildi. Olguların cDNA örnekleri, her örnekten reaksiyona 100 ve 250 ng cDNA gelecek şekilde iki farklı dilüsyonla, duplike olarak çalışıldı.

AHI-1 geninin ifadenin analizinde görel kantifikasyon yapabilmek için referans gen olarak gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) geni seçildi (67). Her iki genin primer dizileri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Q-RT-PCR için DyNAmo™ Capillary SYBR Green Q-RT-PCR kiti (Finnzymes, Finlandiya) kullanıldı. Kitte hazır olarak bulunan “2x Master Mix” içerisinde Tbr DNA polimeraz, SYBR Green I, optimize PZR tamponu, 6 mM MgCl₂ ve dUTP içeren dNTP karışımı bulunmaktaydı. *AHI-1* ve *GAPDH* genleri için Q-RT-PCR karışımları kitin önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- 2x Master Mix: 10 µl (1x)
- Primer F: 0.06 µl (0.3 µM)
- Primer R: 0.06 µl (0.3 µM)
- Sulandırılmış cDNA örneği: 5 µl (100 ng / 250 ng)

Son hacim steril distile su ile 20 µl’ye tamamlandı. Light Cycler cihazında kullanılan program Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

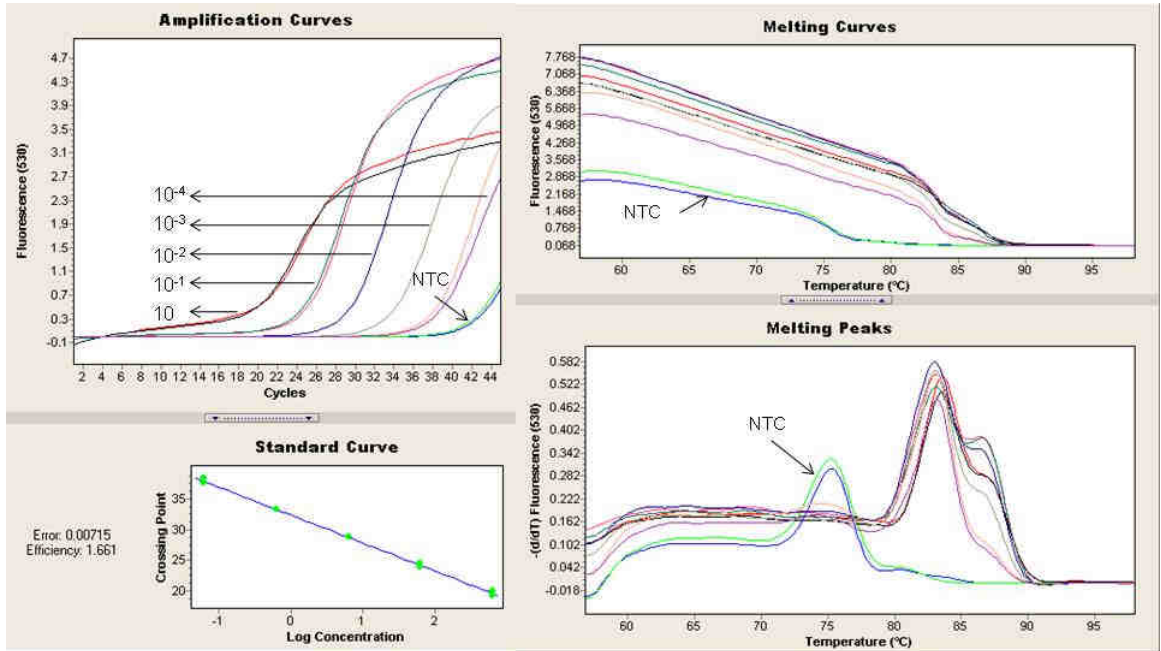
Tablo 3.3. Light Cycler cihazında *AHI-1* ve *GAPDH* genleri için Q-RT-PCR programı

| Basamak | İşlem | Sıcaklık | Süre | Artış (°C/s) | Veri alımı |
|---------------------------------|------------------|----------|------|--------------|------------|
| 1. İlk denatürasyon | UNG inkübasyonu | 50°C | 2’ | 20 | - |
| | İlk denatürasyon | 95°C | 10’ | 20 | - |
| 2. Amplifikasyon (45 siklus) | Denatürasyon | 95°C | 10’’ | 20 | - |
| | Bağlanma | 62°C | 20’’ | 20 | - |
| | Uzama | 72°C | 20’’ | 20 | Tek |
| 3. Erime eğrisi | Denatürasyon | 95°C | 0 | 20 | - |
| | “Reannealing” | 57°C | 15’’ | 20 | - |
| | Denatürasyon | 98°C | 0 | 0.1 | Sürekli |
| 4. Soğuma | Soğuma | 40°C | 10’’ | 20 | - |

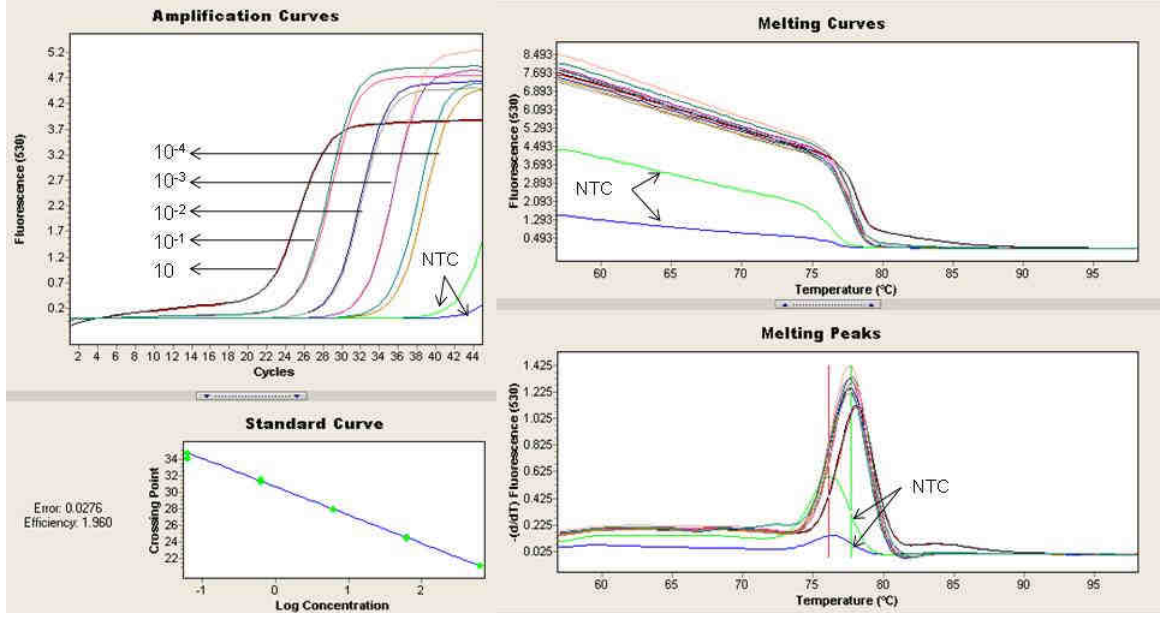
UNG: Urasil N-glikozilaz

Görelî kantifikasyon için *AHI-1* ve *GAPDH* genleri için standart oluşturma amacıyla normal bir kontrolden elde edilen cDNA örneği seri olarak sulandırılarak, her iki gen için 5 farklı dilüsyonda duplike olarak Q-RT-PCR reaksiyonuna alındı. Her iki gen için oluşturulan standart eğrileri ve erime eğrileri Şekil 3.2 ve 3.3'te gösterilmiştir.

Standartlar oluşturulduktan sonra örnekler, her reaksiyonda normal bir kontrolden elde edilen cDNA örneği olan kalibratör ile beraber çalışıldı. Böylece, reaksiyon sonunda her örnek için, Light Cycler yazılımı tarafından öncelikle hedef gen / referans gen "konsantrasyon oranı" hesaplandı; sonrasında ise bu oran kalibratörün konsantrasyon oranı sonucuna bölünerek normalizasyon yapıldı ve "normalize oran" hesaplandı. Olguların *AHI-1* ifadenleme düzeyi sonuçları olarak normalize oran kullanıldı.



Şekil 3.2. *GAPDH* geni için 10 – 10⁻⁴ dilüsyonlarla oluşturulan standartlar Sol üstte amplifikasyon eğrileri, sol altta standart eğrisi, sağ üstte erime eğrileri ve sağ altta erime eğrisi analizine göre oluşan erime pikleri görölmektedir. NTC: *No template control*.



Şekil 3.3. *AHI* geni için 10^{-4} – 10^{-1} dilüsyonlarla oluşturulan standartlar
Sol üstte amplifikasyon eğrileri, sol altta standart eğrisi, sağ üstte erime eğrileri ve sağ altta erime eğrisi analizine göre oluşan erime pikleri görülmektedir. NTC: *No template control*.

3.2.8. İstatistiksel analiz

Verilerin SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programı analizi ile yapıldı (73). Gruplar arasında fark olup olmadığını kontrol etmek için “One way ANOVA” testi kullanılarak %95 güven düzeyinde sonuçlar yorumlandı.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 38 olgunun cinsiyetleri, tanı anındaki yaşları, tanı anındaki hastalık durumları, takip süreleri, varsa karyotipleri, en son takiplerinde kullanılan tedavi seçenekleri ve T315I mutasyon durumları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Karyotipler ISCN 2005’e göre düzenlenmiştir (74).

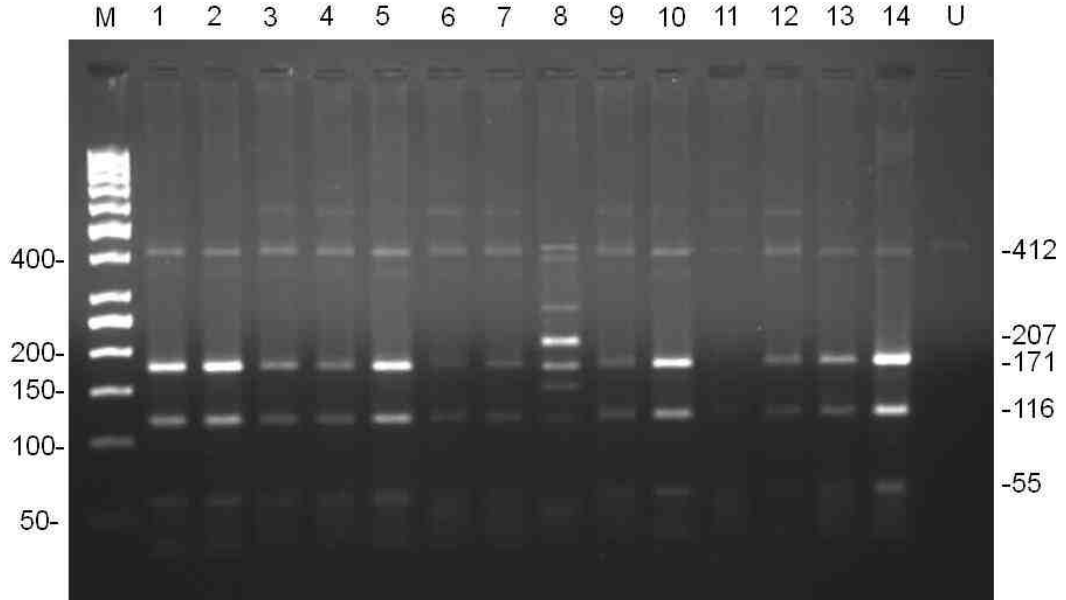
Tablo 4.1. Olguların demografik özellikleri, tanı anındaki klinik durumları, varsa karyotipleri, takip süreleri, en son takipte kullandıkları tedavi ve T315I mutasyonu durumları

| Olgu No | Cinsiyet | Tam Yaşı | Tamda Klinik | Takip Süresi (ay) | Tamda karyotipi | Kullanılan Tedavi | T315I Mutasyonu |
|---------|----------|----------|--------------|-------------------|---|-------------------|-----------------|
| 1 | K | 74 | KF | 61 | 46,XX,t(9;22)(q34;q11) | IM-YD | Negatif |
| 2 | E | 31 | KF | 63 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/46,XY[10] | Dasatinib | Negatif |
| 3 | K | 36 | KF | 63 | 46,XX,t(9;22)(q34;q11) | Nilotinib | Negatif |
| 4 | E | 60 | KF | 59 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | Dasatinib | Negatif |
| 5 | E | 36 | KF | 60 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 6 | K | 55 | KF | 54 | Yok | Dasatinib | Negatif |
| 7 | K | 45 | KF | 56 | 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[19]/46,XX[1] | Nilotinib | Negatif |
| 8 | E | 54 | KF | 40 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[18]/46,XY[2] | Dasatinib | Negatif |
| 9 | E | 43 | KF | 45 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | Nilotinib | Negatif |
| 10 | E | 40 | KF | 14 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[1]/46,XY[4] | Dasatinib | Negatif |
| 11 | E | 52 | AF | 38 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 12 | E | 66 | KF | 31 | Yok | IM-YD | Negatif |
| 13 | K | 40 | KF | 13 | 46,XX,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 14 | E | 34 | KF | 23 | Yok | IM | Negatif |
| 15 | E | 41 | KF | 26 | Yok | IM | Negatif |
| 16 | K | 69 | KF | 21 | Yok | Dasatinib | Negatif |
| 17 | E | 70 | KF | 23 | 46,XY,der(3),der(5),der(8),t(9;22)(q34;q11),der(16) | Nilotinib | Negatif |
| 18 | K | 47 | KF | 21 | 46,XX,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 19 | E | 25 | KF | 17 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 20 | E | 18 | KF | 15 | Yok | IM | Negatif |
| 21 | E | 61 | KF | 29 | Yok | IM | Negatif |
| 22 | K | 25 | KF | 30 | 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[12]/46,XX[6] | IM | Negatif |
| 23 | E | 74 | KF | 16 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[18]/46,XY[2] | IM | Negatif |
| 24 | E | 70 | KF | 53 | Yok | IM | Negatif |
| 25 | K | 59 | KF | 52 | Yok | IM | Negatif |
| 26 | K | 43 | KF | 17 | Yok | IM | Negatif |
| 27 | E | 62 | KF | 40 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 28 | E | 48 | KF | 12 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 29 | K | 50 | KF | 22 | 46,XX,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 30 | K | 71 | KF | 43 | Yok | Dasatinib | Negatif |
| 31 | E | 59 | KF | 57 | Yok | IM | Negatif |
| 32 | E | 44 | KF | 17 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 33 | E | 18 | KF | 15 | 46,XY,t(9;22;13)(q34;q11;q10) | IM | Negatif |
| 34 | E | 57 | BF | 9 | Yok | IM-YD | Pozitif |
| 35 | E | 45 | KF | 7 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 36 | E | 22 | KF | 8 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 37 | K | 34 | KF | 0 | 46,XX,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |
| 38 | E | 17 | KF | 0 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11) | IM | Negatif |

K: Kadın, E: Erkek, KF: Kronik faz, AF: Akselere faz, BF: Blastik faz, IM: imatinib, IM-YD: Yüksek doz imatinib

4.1. T315I Mutasyonları

T315I mutasyonunun tedavinin öncesinde varolabileceği gibi ilerleyen zamanlarda da ortaya çıkabileceği bilindiğinden (55) dirençli olgular ve yeni tanı olguların yanı sıra *BCR-ABL1* seviyeleri negatif seyreden olguların da tedavilerinin farklı zamanlardaki örnekleri çalışmaya alınmıştı. Çalışmaya dahil edilen 38 olgunun yalnızca 1'inde (Olgu No 34) T315I mutasyonu saptandı (%2.63). Bu olgunun blastik fazda başvurduğu ve AML tedavisi aldıktan sonra yüksek doz imatinib ile tedaviye devam edildiği öğrenildi. Enzim kesimlerinden elde edilen örnek jel fotoğrafı Şekil 4.1'de görülmektedir.

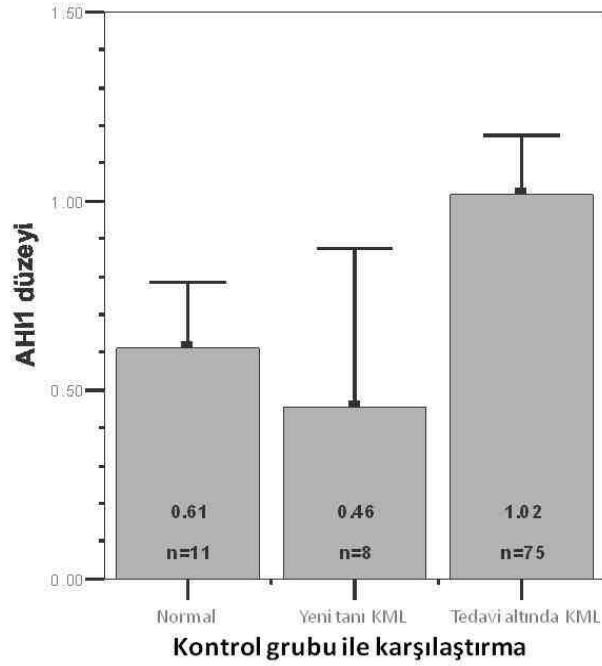


Şekil 4.1: 14 örneğe ait T315I PZR sonrası enzim kesimlerinin %2'lik yüksek çözünürlüklü agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: 50 bp DNA ağırlık belirteci, 1-7 ve 9-14: T315I mutasyonu saptanmayan örnekler, 8: T315I mutasyonu saptanan 34 no'lu olguya ait örnek.

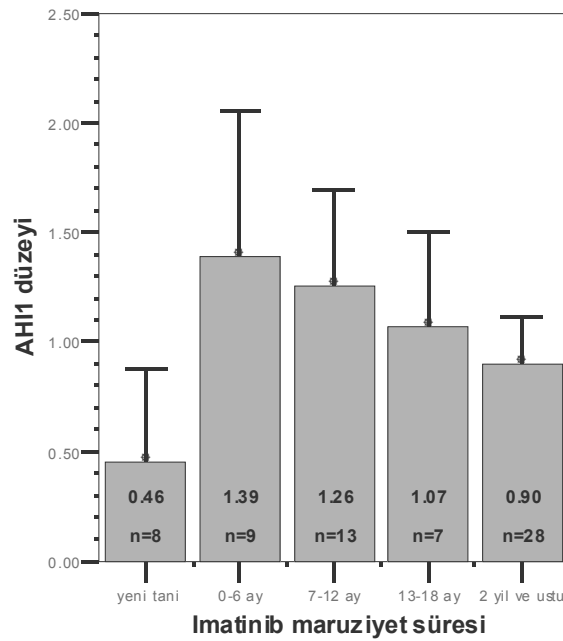
4.2. *AHI-1* düzeyleri

AHI-1 düzeylerinin tedavisiz ve tedavi altındaki KML olgularında değişip değişmediğini anlamak için yeni tanı alan olgulara ait örnekler (n=8) ve tedavi altındaki örnekler (n=75) KML olmayan kontrol grubu (n=11) ile karşılaştırıldı. Buna göre; tedavi almamış yeni tanı KML olgularının örneklerindeki *AHI-1* düzeyleri, KML olmayan olgulardan düşük olmakla beraber, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.599). Ancak, tedavi görmüş olguların *AHI-1* düzeyleri hem KML olmayan kontrol grubundan hem de yeni tanı grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla p=0.047, 0.018) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kontrol grubu ile yeni tanı ve tedavi altındaki KML hastalarının *AHI-1* düzeylerinin ortalamaları, bazı konum ölçüleri ve gruplardaki örnek sayıları

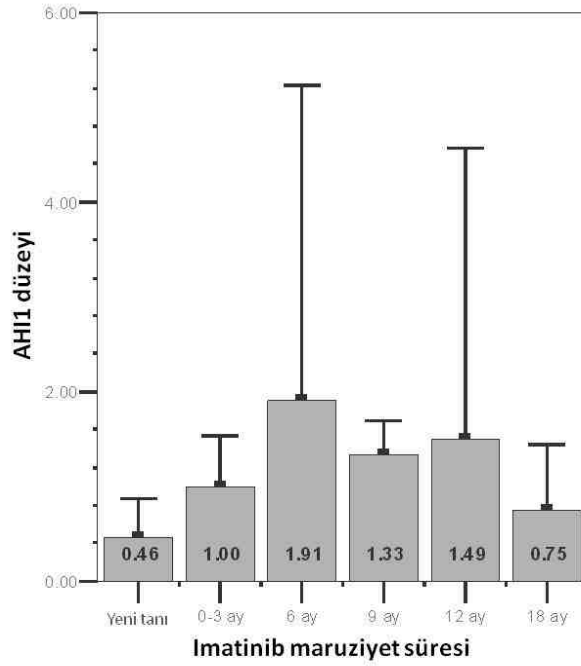
KML olgularının farklı zamanlarındaki örneklerinden yapılan *AHI-1* ifadenme analizi sonuçları farklı gruplar arasında incelendi. İmatinib tedavisinin *AHI-1* ifadenme seviyelerine olan etkisini görebilmek amacıyla öncelikle yalnızca imatinib tedavisi altındaki örnekler (n=65), imatinib maruziyeti sürelerine göre sınıflandırıldı. Buna göre olgular yeni tanı (n=8), imatinib tedavisi altında 0-6 ay (n=9), 7-12 ay (n=13), 13-18 ay (n=7) ve 2 yıl ve sonrası (n=28) olarak gruplandırıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İmatinib tedavi sürelerine göre *AHI-1* ifadenme düzeylerinin ortalamaları, bazı konum ölçüleri ve gruplardaki örnek sayıları

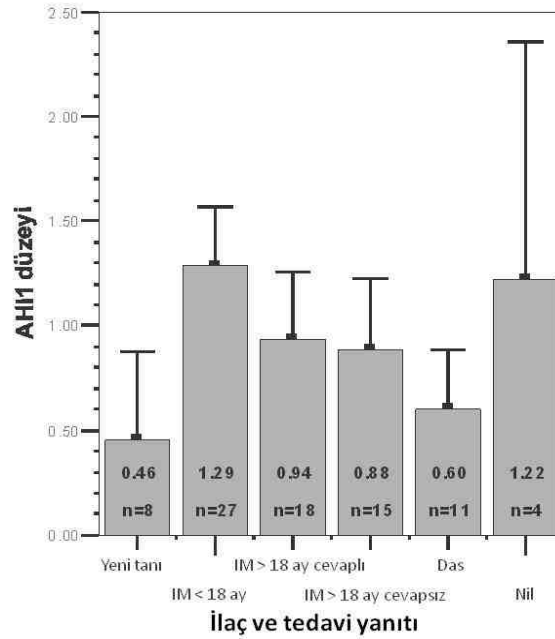
Farklı olan grupları belirlemek amacıyla yapılan analizlerde; 0-6 ay ve 7-12 ay gruplarının her ikisinin de, yeni tanı grubunun düzeylerinden anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (sırasıyla $p=0.004$, 0.006). Ayrıca 0-6 ay grubunun düzeyleri 2 yıl ve sonrası grubunun düzeylerinden de anlamlı derecede yüksekti ($p=0.047$). Bu şekilde, tedavi almadan önce görece düşük seyreden düzeylerin imatinib tedavisi altında ilk 6 ay içinde arttığı, sonra giderek azaldığı grafikte gözlenmektedir (Şekil 4.3).

Tanıdan itibaren takipli olguların *AHI-1* düzeylerinin zamansal değişimini görebilmek amacıyla tanı anındaki ve takip eden en fazla 18 ayda örnekleri seri olarak çalışılmış olguların örneklerinden ayrı bir grup oluşturuldu (n=25). Buna göre, yeni tanı ile 6. ay ve 12. ay grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0.006 ve 0.041). Şekil 4.4'te de görülebileceği gibi olgu bazında da imatinib tedavisi ile ilk 6 ayda *AHI-1* düzeylerinde artış gözlenmekte, zaman içinde düzeyler azalmaktaydı.



Şekil 4.4. İmatinib tedavi sürelerine göre tanıdan itibaren takipli hastaların *AHI-1* ifadenme düzeylerinin ortalamaları ve bazı konum ölçüleri

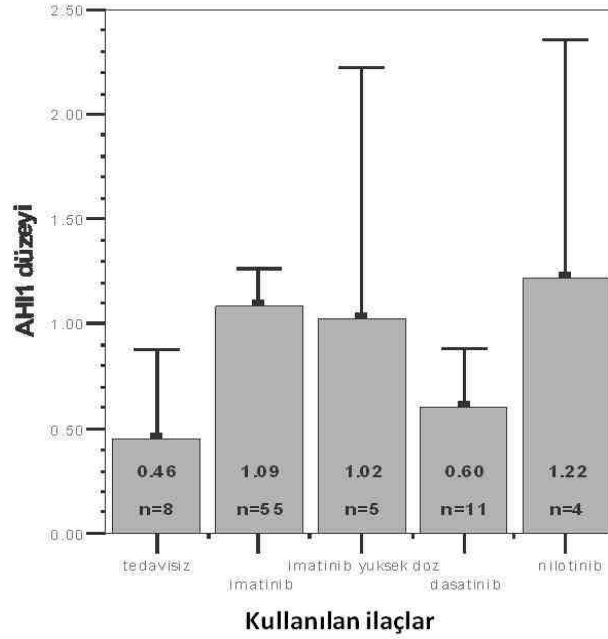
AHI-1 seviyelerinin *BCR-ABL1*'in tedavi ile negatifleşmesi ile değişip değişmediğinin anlaşılabilmesi için, örnekler başka bir sınıflandırma ile tedaviye verilen cevap yönünden değerlendirildi. Buna göre; yeni tanı / tedavisiz (n=8), 18 aydan kısa süredir imatinib kullananlar (IM<18ay, n=27), 18 aydan uzun süredir imatinib kullayıp, *BCR-ABL1* seviyeleri negatif olanlar (IM>18ay cevap veren, n=18), 18 aydan uzun süredir imatinib kullayıp, *BCR-ABL1* seviyeleri pozitif olanlar (IM>18 ay cevapsız, n=15), dasatinib kullananlar (Das, n=11) ve nilotinib kullananlar (Nil, n=4) grupları oluşturuldu. En düşük düzeyler yine yeni tanı grubunda, en yüksek düzeyler ise nilotinib grubunda gözlemlendi. Bu analize göre imatinib tedavisine cevap verenlerle vermeyenler arasında *AHI-1* düzeyleri açısından fark yoktu (p=0.814). “IM<18ay” grubunun *AHI-1* düzeyleri yeni tanı grubundan ve Dasatinib grubundan anlamlı derecede daha yüksek olarak gözlemlendi (p=0.002 ve 0.003) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kullanılan ilaç ve tedavi yanıtına göre *AHI-1* ifadenme düzeylerinin ortalamaları, bazı konum ölçüleri ve gruplardaki örnek sayıları

IM: imatinib, Das: dasatinib, Nil: nilotinib

Zamandan bağımsız olarak kullanılan ilaçların *AHI-1* düzeylerine etkilerini anlamak amacıyla, tedavisiz, imatinib, yüksek doz imatinib, dasatinib ve nilotinib grupları oluşturuldu. Buna göre, yine standart doz imatinib tedavisi almış grubun *AHI-1* düzeyleri, tedavi almamış yeni tanı grubundan anlamlı derecede fazlaydı ($p=0.012$). Dasatinib grubunun ise düzeyleri yine standart doz imatinib grubundan düşüktü ($p=0.026$). Yüksek doz imatinib ya da nilotinib alan grubun ise değerleri farklı değildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kullanılan ilaca göre *AHI-1* ifadelenme düzeylerinin ortalamaları, bazı konum ölçüleri ve gruplardaki örnek sayıları

IM: imatinib, Das: dasatinib, Nil: nilotinib

BCR-ABL1 düzeyleri ile *AHI-1* ifadelenme düzeyleri arasında ilişki olup olmadığını görebilmek amacıyla tüm örneklerdeki *BCR-ABL1* ile *AHI-1* düzeyleri arasındaki korelasyona bakıldı. Tüm örnekler gruplandırılmadan incelendiğinde, *BCR-ABL1* ile *AHI-1* düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı ($p=0.080$). Tanıdan itibaren takipli hastalardan oluşturulan grupta da *BCR-ABL1* ile *AHI-1* düzeyleri arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p=0.761$).

5. TARTIŞMA

BCR-ABL1 füzyon geninin keşfi, lösemilerin moleküler genetiğinin anlaşılmasında yeni bir çağ başlatmış ve bu sayede KML, moleküler patogeneze yönelik tedavi geliştirilen ilk hastalıklardan olmuştur. Ancak halen KML'nin gelişiminde *BCR-ABL1*'in başlatıcı lezyon olup olmadığı kesin olarak bilinmemekte, KML hücrelerinin tedavi sürecinde dirençle ilişkili olabilecek yeni genetik olayları oluşturacak genomik instabilitesi hakkında kesin yargılara varılamamaktadır. Bazı olgularda direnç gelişimi tek bir mutant klonun gelişimine dayandırılabilirken, bazılarında direncin nedeni belli değildir. Bu olaylarda etkili olduğu düşünülen yolaklar ve bu yolaklardaki moleküller, ifadenme düzeyleri ve etkileştikleri proteinler açısından sıklıkla çalışılmaktadır. Moleküler hedefe yönelik yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkmasıyla tedavi yanıtı ve/veya direnci ile ilgili yeni moleküller ön plana çıkmaktadır (23).

Çalışmamızda periferik kan ya da kemik iliği örneğinde; yapılan sitogenetik, moleküler sitogenetik ya da moleküler yöntemlerle $t(9;22)(q34;q11)$ translokasyonu, Ph kromozomu ya da *BCR-ABL1* füzyon transkripti gösterilerek KML tanısı almış 38 olgu değerlendirildi. Olgulardan 30'unun tanısı sitogenetik ve/veya moleküler sitogenetik yöntemlerle konulurken, diğer 8 olgunun tanı anında moleküler incelemesi de mevcuttu. Olguların 36'sının kronik fazda (%94.74), birinin (Olgu No 11) akselere fazda (%2.63), birinin (Olgu No 34) ise blastik fazda (%2.63) tanı aldığı öğrenildi (Bkz Tablo 4.1). Literatüre göre KML hastalarının yaklaşık %80 kadarı kronik fazda tanı almaktadır (12). Bizim olgularımızda bu oranın daha yüksek çıkması, akselere ya da blastik fazda tanı almış olguların büyük bir kısmının tedavinin erken dönemlerinde kaybedilmesi, bu nedenle uzun süreli takip yapılamadığı için çalışma dışı bırakılmış olması ile ilişkilendirildi.

Tüm olgular arasından tanı anında kromozom analizi bulunan 25 olgunun sonuçları incelendiğinde bir olguda (Olgu No 33) varyant Ph translokasyonu (%4), bir olguda (Olgu No 17) ise kompleks karyotip (%4) gözlemlendi. 33 no'lu olguda gözlenen varyant Ph

kromozomuna 13. kromozom katılmıştı ve karyotipi 46,XY,t(9;22;13)(q34;q11;q10) olarak belirlenmişti. Kompleks karyotip gözlenen 17 no'lu olguda ise 3, 5, 8 ve 16. kromozomları içeren çoklu yapısal anomaliler gözlenmişti. Diğer 23 olguda klasik t(9;22)(q34;q11) translokasyonu gözlendi (Bkz Tablo 4.1). Varyant translokasyonların KML'de kötü prognostik etkisi bazı gruplar tarafından bildirilmemekle beraber (27), derivatif 9. kromozomda delesyon olması durumunda prognozun kötü etkilenebileceği söylenmektedir (28). Bizim olgularımızda saptadığımız varyant translokasyon oranı (%4) literatürde bildirilen %2-10 sıklığına uymaktadır (27). Kompleks karyotip ise çok daha nadir görülmektedir ve KML'deki olumsuz etkisi, tüm lösemilerde olduğu gibi, özellikle genomik instabiliteyi işaret etmesi açısından bilinmektedir (32). Bizim kompleks karyotipe sahip olan 17 no'lu olgumuz da, beklendiği gibi imatinib tedavisine rağmen *BCR-ABL1* pozitifliğini korumuş ve bu nedenle bu olguda 18. aydan sonra nilotinib tedavisine geçiş yapılmıştır.

Klonal evrim, KML hastalarında takip edilmesi gereken sitogenetik olaylardan bir diğeridir (27, 30). Ortanca 24.5 ay takibi olan hasta grubumuz arasında klonal evrim gözlenmemiştir. Bu durum, çoğu hastada konvansiyonel sitogenetik analizin sadece tanı anında değerlendirilmiş olması ile açıklanabilir. Klonal evrim özellikle hastalık progresyonu sırasında ortaya çıktığında kötü prognozla ilişkili olduğundan, literatürde önerildiği gibi tam sitogenetik yanıtı ulaşına dek 6., 12. ve 18. aylarda ve tedavi direncinden şüphelenildiğinde sitogenetik inceleme yapılmasının önemi vurgulanmalıdır (44, 46).

BCR genindeki farklı kırık noktaları farklı transkriptler ve bununla birlikte farklı füzyon proteinleri oluşturur (34). KML'de en sık görülen e13a2, e14a2 ve daha az sıklıkta görülen e1a2 füzyon transkriptleri, çalışmamızda Q-RT-PCR analizi sonuçlarını kullandığımız t(9;22) Quantification Kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile gösterilebilmektedir. Yöntemimiz nadir füzyon transkriptleri açısından ayırım yapmakta yetersiz kalmaktadır. Ancak, olgularımız arasında kliniği KML ile uyumlu olduğu halde, *BCR-ABL1* transkriptini saptayamadığımız olgu olmaması, yöntemimizin bu sınırlılığını ortadan kaldırmaktadır. Aynı zamanda tüm olgularımızın bu en sık görülen 3 füzyon tipinden birine sahip olması literatürle yakın sonuçlarımız olduğunu göstermektedir.

KML olgularında moleküler olarak *BCR-ABL1* transkript düzeyinin takibi tedaviye yanıtın en önemli göstergesidir. Tanıdaki düzeyi temel olarak kullanılarak, tam sitogenetik yanıtı ulaştıktan sonra 3 ayda bir değerlendirilmesi önerilmektedir (44, 46, 59). Moleküler yanıtı ulaşıp ulaşılmadığı bu düzeyler üzerinden belirlenmektedir. Tanıdaki düzeyinden 3 log azalması (45) ya da tam sitogenetik yanıtı ulaştığındaki düzeyinin 1 log altına düşmesi majör moleküler yanıt olarak değerlendirilmektedir (44). IRIS çalışmasına göre, 12. aylarında majör moleküler yanıtı ulaşan hastaların, imatinib tedavisiyle 5 yıl progresyonsuz sağkalıma ulaşma olasılıkları %100'dür (50). Olgularımızın moleküler olarak *BCR-ABL1* transkript seviyelerinin takibi laboratuvarımızda Q-RT-PCR analizinin rutin kullanıma girmesiyle başlamıştır. Dolayısıyla, çoğu olgumuzun (30 olgu, %78.94) tanı anındaki *BCR-ABL1* transkript düzeyi bilinmemektedir. Bunun yanısıra, bazı olgularımızın moleküler takipleri hastalıklarının ileri dönemlerinde başlamıştır. Sonuçlara göre farklı tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi sözkonusu olduğundan *BCR-ABL1* düzeylerinin moleküler yöntemlerle takibi büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız KML hasta grubunda hem tedavisiz, hem imatinib tedavisi altında tedaviye yanıt gösteren, hem de direnç geliştiği düşünülerek yüksek doz imatinib/dasatinib/nilotinib tedavisine geçilmiş hastalar mevcuttu. Bu nedenle, halihazırda kullanımda olan üç tirozin kinaz inhibitörüne de dirençle ilişkili olduğu bilinen ve direnç mekanizmaları arasında en sık rastlanan durum olan kinaz bölgesi T315I mutasyonu tarama için seçildi (56). PZR – enzim kesimi yöntemi T315I mutasyonu saptanması için özgüllüğünün yüksek olduğu gösterilmiş; kolay uygulanabilir, ancak mutant hücre oranı %10'un altına düştüğünde mutasyonu saptayamadığı gösterilen bir yöntemdir (75). Halihazırdaki mutasyon tarama yöntemlerinin hemen bir çoğu halen araştırılmakta, uygulanabilirlik ve özgüllük açısından karşılaştırılmaktadır. Bildirilen mutasyon sıklıkları arasındaki belirgin farklılığın mutasyon tarama yöntemlerinin duyarlılıklarının farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (52). Son çalışmalarda ise sık görülen mutasyonların yanında nadir ya da bilinmeyen değişikliklerin gösterilebilmesini sağlamak için dizi analizi önerilmektedir. Bu yöntemle de duyarlılık

%10 - %20 arasındadır, yani mutant klon belli bir oranın üzerinde varolduğunda saptanabilmektedir (46, 52, 58).

Mutasyon taramasının ne zaman yapılması gerektiği konusunda ise, 2008 yılında yayımlanmış bir derlemedeki görüşlere göre, *BCR-ABL1* transkript seviyelerinde artış görülür görülmez muayene, tam kan sayımı, kemik iliği incelemesi ve karyotiplemeyi takiben kinaz bölgesi mutasyonlarının taranması önerilmektedir (46). Mutasyonların tedavi sürecinde akselere ve blastik fazlarda daha sık olmak üzere, kronik fazda ortaya çıkabileceği gibi, tanı anında da bulunabileceği bilinmektedir (55). Çalışmamızda 38 olguya ait, tedavilerinin farklı zamanlarında alınan 83 cDNA örneği halihazırda bulunduğundan, direnç gelişen olguların yanısıra direnç geliştirmemiş ve henüz tedavisinin erken dönemlerinde olan olguların da en az iki örneği T315I mutasyonu açısından çalışıldı. Böylece, mutasyon saptanan bir olguda mutasyonun ortaya çıkış zamanına dair bilgi edinilmesi amaçlandı. Buna göre, tanıdan itibaren takipli olguların tanı anındaki örnekleri de dahil olmak üzere iki örneği çalışıldı. *BCR-ABL1* seviyesi negatif olduğu için tedaviye cevap veriyor olduğu düşünülen olguların da tedavinin erken ve geç dönemlerinde olmak üzere iki örneği çalışıldı. Tedaviye cevap vermeyen olguların ise özellikle *BCR-ABL1* seviyeleri arttığı andaki ya da farklı ilaca geçildiği andaki örnekleri çalışıldı. Ancak T315I mutasyonu sadece, bir olguda (Olgu No 34) saptandı (%2.68) (Bkz Şekil 4.1). Kullanımdaki her üç tirozin kinaz inhibitörüne de dirençle ilişkisi gösterilen bu mutasyonun saptanması, olgunun küratif tek tedavi seçeneği olan allojeneik kök hücre transplantasyonu için uygun bir aday olabileceğini göstermektedir.

Hasta grubumuzda T315I mutasyonu tespit oranımızın (%2.68), literatürden düşük (%15) olması, kullanılan PZR – enzim kesimi yönteminin düşük oranda mevcut mutant klonları tespit duyarlılığının düşük olması ile açıklanabilir (56). Olguların daha uzun süreli takipleri yapıldığında şüphesiz ki T315I mutasyonu saptanan hasta sayısı artacaktır. Bunun yanısıra, kinaz bölgesinde karşılaşılabilecek 100 kadar farklı mutasyonun da değerlendirilmesi gerekliliği öne çıkmaktadır. Bu durumda dizi analizi gibi farklı mutasyon tarama yöntemlerinin kullanılması tanı olasılığını artıracaktır. Ayrıca, yukarıda belirtildiği gibi, tedavi direnci uyarıları gösteren hastalarda, kinaz bölgesi mutasyon taramasının yanısıra, konvansiyonel sitogenetik inceleme ile klonal evrimin ya da olası

kompleks yeniden düzenlenmelerin araştırılması; moleküler sitogenetik yöntemlerle de *BCR-ABL1* amplifikasyonunun ve/veya derivatif 9. kromozomun delesyonunun araştırılması da önerilmektedir (44, 54). Mutasyon saptayamadığımız dirençli olgularımızda bu mekanizmalardan biri dirençten sorumlu olabileceği gibi, ilaç farmakokinetiği de etkili olabilir. Bir diğer mekanizma ise, moleküler patogeneizde de etkisi bilinen SAK yolağı üyelerinin aşırı ifadenmesi ve aktive olmasıdır (40, 52, 57).

KML'de imatinib tedavisine direnç geliştiğinde seçilebilecek tedavi alternatifleri arasında, imatinib dozunun yükseltilmesi, dasatinib ya da nilotinib tedavisine geçilmesi, allojeneik kök hücre transplantasyonu değerlendirmesi ve hastanın yeni ajanlarla yapılacak klinik çalışmalara yönlendirilmesi bulunmaktadır. Tedavi değişikliği yalnızca bariz direnç durumunda değil, suboptimal yanıtta da değerlendirilebilir (59). Alternatif tedavi seçiminde kuşkusuz direnç mekanizmasının tipi önem kazanmaktadır. Olgularımızda uzun süreli tedavi takibinde *BCR-ABL1* transkript düzeyleri yükselen hastalardan üçünde imatinib dozu arttırılmıştı (Olgu No 1, 10, 12). Bu hastalardan birinde daha sonra dasatinibe geçiş yapıldı (Olgu No 10). Dasatinibe geçiş yapan hasta sayısı 7 idi (Olgu No 2, 4, 6, 8, 10, 16, 30). Dört hastada ise nilotinibe geçiş yapıldı (Olgu No 3, 7, 9, 17) (Bkz Tablo 4.1). Grubumuzda allojeneik kök hücre transplantasyonu planlanan hasta olmamakla beraber, T315I mutasyonu saptadığımız 34 no'lu olgu bu açıdan değerlendirilmektedir.

Moleküler patogenezinin, tedavisinin ortaya çıkması ve geliştirilmesinde tarihsel önemi olduğu KML hastalığında hücre içinde *BCR-ABL1* aktivasyonu ile başlayan ve onunla birlikte ya da ondan bağımsız olarak lökomogenezi tetikleyen sinyal iletim sistemleri ve bu yolların üyeleri olan moleküller, özellikle yeni tedavi hedefleri açısından önemli araştırma odakları haline gelmiştir. KML'de şu anki hedef, tedaviye cevap vermeyecek olguların erken dönemde tespit edilmesi ve hasta bazında daha etkili alternatif tedavilerin uygulamaya koyulmasıdır (59). Bu doğrultuda çalışmamızda, KML hastalarına ait örneklerde yaptığımız ifadenme analizi ile yeni bulunan bir gen olan *AHI-1* geninin, KML hastalarında tedaviyle ya da tedaviye dirençle ilişkisi gösterilmeye çalışılmıştır.

Hematopoetik sistemin öncül hücrelerinde yüksek oranlarda, olgun hücrelerde ise daha düşük düzeylerde ifadelendiği gösterilen *AHI-1* gen ifadenmesinin yakın zamanda KML hücre dizilerinde belirgin deregülasyonu saptanmıştır (66). Aynı grubun takip eden çalışmalarında aşırı ifadenme, baskılanma ve uyarılabilir model sistemleri kullanılmış ve *AHI-1* geninin biyolojik ve moleküler fonksiyonları tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda ilkel hematopoetik hücrelerde *AHI-1* aşırı ifadenmesinin *in vitro* olarak çoğalma avantajı sağladığı, *in vivo* olarak lösemiye indüklediği, bu etkilerinin BCR-ABL1 ile arttığı bildirilmiştir. Tedaviye cevap veren ve direnç gösteren KML hastalarından saflaştırılan hücrelerde yapılan çalışmalarda *AHI-1*'in BCR-ABL1 ilişkili malign transformasyona büyüme avantajı ve tirozin kinaz inhibitörlerine direnç sağlayarak katkıda bulunduğu düşünülmüş ve bu etkisini JAK2-STAT5 sinyal yoluğu üzerinden gösterdiği öne sürülmüştür (67).

Çalışmamızda, 38 KML olgusuna ait tedavilerinin farklı zamanlarındaki periferik kan ya da kemik iliği örneklerinden izole edilen total mRNA'dan sentezlenen cDNA örnekleri kullanıldı. Bu şekli ile çalışmamız, *AHI-1* geninin KML olgularının ayrılmamış örneklerinden elde edilen total mRNA içinde ifadenmesinin incelendiği ve sonuçların aynı yöntemle elde edilen kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığı ilk çalışmadır.

Tanı anında, hiç tedavi almamış olgulara ait örneklerde (n=8) *AHI-1* düzeyi ortalaması ile KML olmayan kontroller (n=11) arasında anlamlı fark gösterilemedi (Bkz Şekil 4.2). Bu sonucun tersine, daha önce yapılan çalışmada, *AHI-1* ifadenme düzeyinin KML'nin tüm fazlarında belirgin deregülasyonu gösterilmişti (66). Bu farklı sonucun bir nedeninin, hücrelerin saflaştırılmamış olması veya kontrollerdeki matür hücrelerin yüksek endojen *AHI-1* seviyeleri olabileceği düşünüldü. Ayrıca, *in vitro* çalışmalarda hücre düzeyinde gösterilen bulguların hasta örneklerinden elde edilen bulgularla farklı çıkması beklenen bir durumdu. Bir başka olası açıklama ise, toplumumuzdaki normal *AHI-1* ifadenme düzeyleri bilinmiyor olduğundan, KML olmayan gruptaki düzeylerin ne kadar normali yansıttığının kesin olarak söylenememesi idi.

İlginç olarak, imatinib tedavisine başlandıktan 6-12 ay sonra *AHI-1* ifadenme seviyelerinde belirgin artış gözlemlendi. Bu bulgunun, imatinib tedavisinin *AHI-1*

ifadelenmesinin upregülasyonuna neden olduğunu gösteriyor olması açısından anlamlı olabileceği düşünöldü. *AHI-1* ifadelenme düzeyini KML hücrelerinde ilk kez çalışan grupta (Jiang ve arkadaşları) yaptığımız kişisel iletişimden alınan yayınlanmamış bilgilerden, imatinib dirençli hastalardan elde edilen hücre dizilerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda da imatinib tedavisi ardından *AHI-1* upregülasyonu gözleendiği öğrenildi. *AHI-1* gen ifadelenmesini KML hastalarının örneklerinde, imatinib tedavi öncesi ve sonrası değerlendiren ilk çalışma olması açısından çalışmamızın bu bulgularının yol gösterici olacağı düşünölmektedir.

Aynı olgularda, tirozin kinaz inhibitörü tedavilerine verilen farklı yanıtlarda *AHI-1* düzeylerinde fark olup olmadığı araştırıldı. 18 aydan uzun süredir imatinib kullanmakta olup tedaviye yanıt veren (n=18) ve vermeyen (n=15) olguların cDNA örnekleri arasında *AHI-1* ifadelenme düzeyleri açısından fark gözlenmedi. Yukarıda bahsedilen gruptan Zhou ve arkadaşlarının sonuçlarına göre ise, imatinibe yanıt veren (n=6) olguların ayrıştırılmış KML öncül hücrelerindeki *AHI-1* transkript seviyeleri, yanıt vermeyen (n=10) olgularınkine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştu (67). Örnek sayımız diğer gruptan fazla olmakla birlikte, hücre ayrıştırması yapmamış olmamız nedeniyle aradaki farkı gösterememiş olabileceğimiz düşünöldü. Öte yandan, sonuçlarımız ayrıılmamış KML hasta örneklerindeki saptanabilir seviyeleri gösterdiği için, tüm hücreler açısından daha genel bir sonuca varılmasına yardımcı olabileceği düşünöldü.

Farklı tedavi seçenekleri açısından örnekler karşılaştırıldığında, dasatinib kullanılan hastaların örneklerinde (n=11) *AHI-1* düzeylerinin anlamlı derecede düşük olması dikkati çekti. Olgu sayımız az olmakla birlikte, bu sonucun dasatinibin *AHI-1* ifadelenmesini azalttığı yönünde yorumlanabileceğini düşündük. Yukarıda bahsedilen grubun yaptığı *in vitro* deneylerde de, *AHI-1* baskılı hücrelerin en çok dasatinibe duyarlı olduğu bulgusunun (67) bu yorumumuzu desteklediğini düşündük.

KML olgularındaki *AHI-1* ifadelenme seviyelerindeki artış ile örneklerdeki *BCR-ABL1* transkript seviyelerindeki artış ve/veya azalış arasında anlamlı bir korelasyon gösterilememiş olması, *AHI-1* upregülasyonunu etkileyen mekanizmanın *BCR-ABL1*'den bağımsız olabileceğini düşündürdü. Bu mekanizmanın, *BCR-ABL1* ilişkili lösemik transformasyonda etkili olduğu bilinen yollardan SAK yolağı olduğu

düşünülebilir. Bunun bir nedeni, SAK yolağının KML'nin lösemik transformasyonunda bağımsız bir rolü olduğunun bilinmesidir (40). Ayrıca, SAK yolağı üzerinde etkili bir tirozin kinaz inhibitörü olan dasatinib kullanan olgularda bulduğumuz düşük *AHI-1* seviyeleri, SAK yolağı inhibe edildiğinde *AHI-1*'in etkilendiğini gösteriyor olabilir. Şüphesiz ki, tüm bu bulguları doğrulamak ve geçerliliğini sağlamak için daha çok sayıda olguyla yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

SAK yolağının hastalık progresyonunun yanısıra imatinib direncinde de rolü olduğu düşünülmektedir (12). İlaça dirençli BCR-ABL1 hücrelerinde SAK yolağı üyelerinden Lyn molekülünün ifadenmesinin baskılanması ile hücrelerin sağkalımının ve proliferasyonunun azaldığı gözlenmiştir (76). Ayrıca, yukarıda bahsedilen gruptan Kennah ve arkadaşlarının yakın zamanda yayınlanmış başka bir çalışmada, kutanöz T-hücreli lenfoma hücrelerinde AHI-1 aracılı transformasyonda rol alan olası genleri belirleme çalışması yapılmış ve yine SAK yolağı üyelerinden HCK ve bir tümör süpresör gen olan BIN1 aday kooperatif genler olarak öne çıkmıştır. Bu çalışmada da *AHI-1*'in baskılandığı ya da ekspresyonunun artırıldığı hücrelerde HCK fosforilasyonunda ve inhibitörü olan dasatinib molekülüne verdiği cevapta değişimler gözlenmiştir (77). Farklı bir malignitede gösterilmiş olmakla birlikte, bu bulgular da, *AHI-1*'in KML onkogenezinde ve ilaç direncindeki etkilerini açıklayabilmek için *AHI-1* ile birlikte SAK yolağının üyelerinin KML olgularında çalışılması gerekliliğini desteklemektedir.

KML hastalarında farklı mekanizmalarla ortaya çıkabilecek imatinib direnci nedeniyle, günümüzde olguya ve direncin mekanizmasına spesifik olarak da seçilebilecek değişik tedavi seçenekleri geliştirilmektedir. Çalışmamızın sonuçlarından yola çıkarak, bundan sonraki deneylerde değişik tedaviler altındaki çok sayıda hasta örneğinde *AHI-1* ekspresyonu çalışılırken, aynı örneklerde AHI-1 proteinin etkili olduğu bilinen yollar arasında JAK/STAT yolağı ve özellikle SAK yolağı üyelerinin ifadenme düzeylerine bakılabilir. Böylece, KML'de lösemik transformasyon ve tedavi direncindeki yeri daha iyi anlaşılacak olan *AHI-1* genine ve bulunduğu yollara yönelik tedavi geliştirilmesi olanakları tartışılabilir. Çalışmamız, KML hastalarının tedavi öncesi ve sonrası değişik zamanlardaki *AHI-1* ifadenme düzeyleri hakkında anlamlı bilgiler vermesi açısından bu yöndeki gelecek çalışmalara da rehber olacaktır.

6. SONUÇLAR

- ✓ Çalışmamızda KML olgularında *AHI-1* ifadenme düzeylerinde imatinib tedavisiyle belirgin artış gözlenmiştir.
- ✓ Dasatinib tedavisi altındaki olguların *AHI-1* ifadenme düzeylerinin, diğer tedavi gruplarından daha düşük olduğu gözlenmiştir.
- ✓ Olguların *BCR-ABL1* transkript düzeylerindeki değişim ile *AHI-1* ifadenme düzeylerindeki değişim arasında anlamlı ilişki gösterilememiş ve *AHI-1* seviyelerinde tedaviyle birlikte görülen artışın *BCR-ABL1*'den bağımsız mekanizmalarla olabileceği düşünülmüştür.
- ✓ Çalışmamızda olgu sayısının azlığı kısıtlılık kabul edilerek, farklı tedaviler altındaki daha fazla sayıda hastada *AHI-1* geninin ifadenme düzeylerinin değerlendirmesi önerilmektedir.
- ✓ Bunlara ek olarak, *AHI-1* geninin etkili olduğu bilinen yollardan JAK/STAT yolağı ve SAK yolağı üyelerinin de ifadenme açısından çalışılması da önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Guyton AC, Hall JE. Blood Cells, Immunity and Blood Clotting. Textbook of Medical Physiology. (Guyton AC, Hall JE, ed) Tenth edition. ABD, W.B. Saunders Company. 382-401, 2000.
2. Development of Blood Cells. Medical Integrated Publishing. Erişim: (http://www.tpub.com/content/medical/14295/css/14295_284.htm). Erişim Tarihi: 13.09.2009
3. Rabinowitz I, Larson RS. Chronic Myeloid Leukemia. Wintrobe's Clinical Hematology (Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, ed) Eleventh Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. Vol. 2. 2235-2258, 2004.
4. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 132:1497, 1960.
5. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 243:290-293, 1973.
6. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell 36(1):93-99, 1984.
7. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. Nature 315(6020):550-554, 1985.
8. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science 247(4944): 824-828, 1990.
9. Elefanty AG, Hariharan IK, Cory S. bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. EMBO J. 9(4):1069-1078, 1990.

10. Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(17): 6649-6653, 1990.
11. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344(14): 1031-1037, 2001.
12. Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med.* 145(12): 913-23, 2006.
13. Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, Marchetti M. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 200-224, 2003.
14. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114(5): 937-951, 2009.
15. Corso A, Lazzarino M, Morra E, Merante S, Astori C, Bernasconi P, Boni M, Bernasconi C. Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol* 70(2):79-82, 1995.
16. Ballarini F, Ottolenghi A. A model of chromosome aberration induction and chronic myeloid leukaemia incidence at low doses. *Radiat Environ Biophys* 43(3):165-171, 2004.
17. Strom SS, Yamamura Y, Kantarjian HM, Cortes-Franco JE. Obesity, weight gain, and risk of chronic myeloid leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(5):1501-1506, 2009.
18. Aguiar RC. Therapy-related chronic myeloid leukemia: an epidemiological, clinical and pathogenetic appraisal. *Leuk Lymphoma* 29(1-2):17-26, 1998.

19. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 63(4):789-799, 1984.
20. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 90(11):850-858, 1998.
21. CML information. Erişim: (<http://www.hai-bin.net/CMLinfomation.htm>.) Erişim tarihi: 25.09.2009
22. Melo J, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia – signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin N Am* 18:545-568, 2004.
23. Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia--how does it work? *Acta Haematol.* 119(4):212-217, 2008.
24. Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 86(8): 3118-3122, 1995.
25. Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 92(9): 3362-3367, 1998.
26. Campbell LJ. Deletion of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Myeloid Leukemia, Methods and Protocols.* (Iland H, Hertzberg M, Marlton P, ed) *Methods in Molecular Medicine* 125, New Jersey, Humana Press. 107-114, 2006.
27. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 107(2): 76-94, 2002.

28. Gorusu M, Benn P, Li Z, Fang M. On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 173: 97-106, 2007.
29. Deininger MW. Cytogenetic studies in patients on Imatinib. *Semin Hematol* 40(Suppl 2): 50-55, 2003.
30. Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Rios MB, Shan J, Garcia-Manero G, Faderl S, Thomas DA, Wierda W, Ferrajoli A, Jeha S, Kantarjian HM. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 101(10): 3794-3800, 2003.
31. Cortes JE, Talpaz M, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Verstovsek S, Rios MB, Shan J, Kantarjian HM. Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* 106(6):1306-1315, 2006.
32. Babicka L, Zemanova Z, Pavlistova L, Brezinova J, Ransdorfova S, Houskova L, Moravcova J, Klamova H, Michalova K. Complex chromosomal rearrangements in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 168(1):22-29, 2006.
33. Loriaux M, Deininger M. Clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome negative cells in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leuk Lymphoma* 45(11):2197-2203, 2004.
34. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res* 61(6): 2343-2355, 2001.
35. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition. ABD. New York Academic Press. S 2002.
36. Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol* 40(2 Suppl 2):4-10, 2003.
37. Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: why does it evolve from chronic phase to blast transformation? *Front Biosci* 11:198-208, 2006.

38. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Bäsecke J, Libra M, Stivala F, Milella M, Tafuri A, Lunghi P, Bonati A, Martelli AM, McCubrey JA. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* 22(4): 686-707, 2008.
39. Jiang X, Lopez A, Holyoake T, Eaves A, and Eaves C. Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 96: 12804-12809, 1999.
40. Li S. Src-family kinases in the development and therapy of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 49(1): 19-26, 2008.
41. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7(5): 345-356, 2007.
42. Woermann U, Division of Instructional Media, Institute for Medical Education, University of Bern, Switzerland. (<http://emedicine.medscape.com/article/199425-overview>) Erişim Tarihi: 05.09.2009.
43. Campbell LJ. Cytogenetic and FISH techniques in myeloid malignancies. *Myeloid Leukemia, Methods and Protocols*. (Iland H, Hertzberg M, Marlton P, ed) *Methods in Molecular Medicine* 125, New Jersey, Humana Press. 13-26, 2006.
44. Branford S. Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 376-383, 2007.,
45. Hellenbrecht A, EUTOS for CML. European LeukemiaNet. Erişim: (http://www.eutos.org/content/molecular_monitoring/information/) Erişim Tarihi: 14.09.2009
46. Deininger MW. Milestones and monitoring in patients with CML treated with imatinib. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 419-426, 2008.
47. Soysal T. Kronik Myeloid Lösemi'de Çifte Çetrefil: Transplantasyon'a Karşı İmatinib. *Türk Hematoloji Derneği 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu kitapçığı*, 2006.

48. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Rios MB, Shan J, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Verstovsek S, Wierda W, Keating M, Talpaz M. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. *Cancer* 98(12):2636-2642, 2003.
49. Anstrom KJ, Reed SD, Allen AS, Glendenning GA, Schulman KA. Long-term survival estimates for imatinib versus interferon-alpha plus low-dose cytarabine for patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Cancer* 101(11):2584-2592, 2004.
50. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355(23): 2408-2417, 2006.
51. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, Richard H, Lynch KP, Hughes TP. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 99: 3472-3475, 2002.
52. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* 16(2): 122-131, 2009.
53. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R; European LeukemiaNet. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108(6):1809-1820, 2006.

54. Branford S, Hughes T. Detection of *BCR-ABL* mutations and resistance to Imatinib mesylate. *Myeloid Leukemia, Methods and Protocols.* (Iland H, Hertzberg M, Marlton P, ed) *Methods in Molecular Medicine* 125, New Jersey, Humana Press. 93-106, 2006.
55. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 100(3):1014-1018, 2002.
56. Cortes J, Jabbour E, Kantarjian H, Yin CC, Shan J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Giles F, Breeden M, Reeves N, Wierda WG, Jones D. Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 110(12): 4005-4011, 2007.
57. Melo JV, Chuah C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett* 249(2):121-132, 2007.
58. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NC, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman JM. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 108(1):28-37, 2006.
59. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Suboptimal response to or failure of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia: what is the optimal strategy? *Mayo Clin Proc* 84(2):161-169, 2009.
60. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP, Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 354(24):2531-2541, 2006.

61. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 354(24):2542-2551, 2006.
62. Jiang X, Hanna Z, Kaouass M, Girard L, Jolicoeur P. Ahi-1, a novel gene encoding a modular protein with WD40-repeat and SH3 domains, is targeted by the Ahi-1 and Mis-2 provirus integrations. *J Virol* 76(18):9046-9059, 2002.
63. Ferland RJ, Eyaid W, Collura RV, Tully LD, Hill RS, Al-Nouri D, Al-Rumayyan A, Topcu M, Gascon G, Bodell A, Shugart YY, Ruvolo M, Walsh CA. Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in AHI1 in Joubert syndrome. *Nat Genet* 36(9):1008-1013, 2004.
64. Dixon-Salazar T, Silhavy JL, Marsh SE, Louie CM, Scott LC, Gururaj A, Al-Gazali L, Al-Tawari AA, Kayserili H, Sztriha L, Gleeson JG. Mutations in the AHI1 gene, encoding joubertin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria. *Am J Hum Genet* 75(6):979-987, 2004.
65. Blaydes SM, Kogan SC, Truong BT, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Largaespada DA, Brannan CI. Retroviral integration at the Epi1 locus cooperates with Nfl gene loss in the progression to acute myeloid leukemia. *J Virol* 75(19):9427-9434, 2001.
66. Jiang X, Zhao Y, Chan WY, Vercauteren S, Pang E, Kennedy S, Nicolini F, Eaves A, Eaves C. Deregulated expression in Ph⁺ human leukemias of AHI-1, a gene activated by insertional mutagenesis in mouse models of leukemia. *Blood* 103(10):3897-3904, 2004.
67. Zhou LL, Zhao Y, Ringrose A, DeGeer D, Kennah E, Lin AE, Sheng G, Li XJ, Turhan A, Jiang X. AHI-1 interacts with BCR-ABL and modulates BCR-ABL transforming activity and imatinib response of CML stem/progenitor cells. *J Exp Med* 205(11):2657-2671, 2008.
68. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol* 34:597-601, 2005.

69. Shipley GL. An introduction to real-time PCR. Real Time PCR (Dorak MT, ed) New York, Taylor & Francis Group. 1-38, 2006.
70. Ponchel F. Real-time PCR using SYBR[®] Green. Real Time PCR (Dorak MT, ed) New York, Taylor & Francis Group. 139-154, 2006.
71. Adams PS. Data analysis and reporting. Real Time PCR (Dorak MT, ed) New York, Taylor & Francis Group. 39-62, 2006.
72. Pfaffl MW. Relative quantification. Real Time PCR (Dorak MT, ed) New York, Taylor & Francis Group. 39-62, 2006.
73. Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, United States.
74. ISCN 2005: An International System of Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Tommerup N. Karger. Almany, 2005.
75. Liu WH, Makrigiorgos GM. Sensitive and quantitative detection of mutations associated with clinical resistance to STI-571. Leuk Res 27(11):979-982, 2003.
76. Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, Emerson SG, Gewirtz AM. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. Nat Med 10(11):1187-1189, 2004.
77. Kennah E, Ringrose A, Zhou LL, Esmailzadeh S, Qian H, Su MW, Zhou Y, Jiang X. Identification of tyrosine kinase, HCK, and tumor suppressor, BIN1, as potential mediators of AHI-1 oncogene in primary and transformed CTCL cells. Blood 113(19):4646-55, 2009.

8. EKLER

EK 1. Gönüllü Denek Bilgilendirme Formu Örnekleri

Kronik myeloid lösemi tanısı almış bireyler için bilgilendirme ve onay formu

Kronik myeloid lösemi hastalığı olan ve tedavi sırasında BCR-ABL füzyon ürünü negatif seyreden bireyler için bilgilendirme ve onay formu

Kronik myeloid lösemi hastalığı olan ve tedavi sırasında BCR-ABL füzyon ürünü pozitif seyreden bireyler için bilgilendirme ve onay formu

Lökosit sayısı normal, kronik myeloid lösemi hastalığı olmadığı bilinen bireyler için bilgilendirme ve onay formu

GÖNÜLLÜ DENEK BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU

| | | |
|---|---|--|
| Araştırmanın konusu | : | Kronik myeloid lösemi olgularında tedaviye gelişen direnç ile ilgili AHI1 gen ifadenmesi ve T315I mutasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması |
| Araştırmanın amacı | : | Saptanacak bulguların hastalığın takip ve tedavisini yönlendirecek biçimde kullanılması |
| Araştırmaya katılma süresi | : | Hastalık nedeniyle takip sırasında bir kez |
| Araştırmaya katılacak yaklaşık gönüllü sayısı | : | 10 Kronik myeloid lösemi tanısı almış birey |

Hematoloji bölümünde yapılan muayene ve tetkikler sonrasında kronik myeloid lösemi hastası olduğunuz ve bu hastalık sebebiyle takip edilmeniz gerektiği belirlenmiştir. Tedavinizi takip amacıyla sizden rutin olarak belli aralıklarla kan ya da kemik iliği örnekleri alınacaktır. Bu çalışmada sizden takip amaçlı alınan örneklerin sonuçları kullanılacaktır. Ayrıca şu andaki durumunuzu değerlendirmek için sizden 4 ml kan alınıp cDNA eldesi yapılarak ilaç direnci ile ilişkili bir genetik değişikliğin sizde olup olmadığı araştırılacaktır. Aynı cDNA örneğinden ilaç direncine etkisi olduğu düşünülen bir genin ifadenmesine bakılacaktır. Bu işlemler için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecek ve rutin takiplerinizi etkilenmeyecektir.

Bu bilgiler ışığında,

- Biyolojik materyallerimin bu çalışma için kullanılmasına izin veriyorum.
- Biyolojik materyallerimin bu çalışma ve bundan sonraki çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Biyolojik materyallerimin bu çalışma dışındaki başka çalışmalar için kullanılmasına izin vermiyorum.

Yukarıdaki, araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bana, tanık huzurunda, aşağıda konusu belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı ve katılmama hakkımın olduğunu, araştırma başladıktan sonra devam etmeyi istememe hakkına sahip olduğum gibi, kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızam ile katılmayı kabul ediyorum.

| | |
|--|-----------------|
| GÖNÜLLÜ | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| Bilgi verebilecek kişi: | <i>İmza</i> |
| VELİ , VASİ VEYA VEKİL | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| Yakınlığı: | <i>İmza</i> |
| ARAŞTIRMACI | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| GEREKTİĞİNDE GÖNÜLLÜ VEYA YAKINININ BİLGİ İÇİN BAŞVURABİLECEĞİ KİŞİ | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| TANIK | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Görevi: | Faks : (0) |
| Adresi: | <i>İmza</i> |
| TANIK | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Görevi: | Faks : (0) |
| Adresi: | <i>İmza</i> |

Not. Bu belge dört örnek halinde hazırlanacak birer örnek araştırmacı, gönüllü, tanık ve kurum tarafından saklanacaktır.

GÖNÜLLÜ DENEK BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU

| | | |
|---|---|--|
| Araştırmanın konusu | : | Kronik myeloid lösemi olgularında tedaviye gelişen direnç ile ilgili AHI1 gen ifadenmesi ve T315I mutasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması |
| Araştırmanın amacı | : | Saptanacak bulguların hastalığın takip ve tedavisini yönlendirecek biçimde kullanılması |
| Araştırmaya katılma süresi | : | Hastalık nedeniyle takip sırasında bir kez |
| Araştırmaya katılacak yaklaşık gönüllü sayısı | : | 10 Kronik myeloid lösemi hastalığı olan ve tedavi sırasında BCR-ABL füzyon ürünü negatif seyreden birey |

Hematoloji bölümünde kronik myeloid lösemi hastası olarak takip edilmektesiniz. Tedavinizi takip amacıyla sizden belli aralıklarla kan ya da kemik iliği örnekleri alınmaktadır. Önceki tetkikler sonucu elde edilen bilgilerinize göre tedaviye cevabı gösteren değerleriniz negatif seyretmektedir. Bu çalışmada sizden takip amaçlı alınan örneklerin önceki sonuçları kullanılacaktır. Ayrıca şu andaki durumunuzu değerlendirmek için sizden 4 ml kan alınıp cDNA eldesi yapılarak ilaç direnci ile ilişkili bir genetik değişikliğin sizde olup olmadığı araştırılacaktır. Aynı cDNA örneğinden ilaç direncine etkisi olduğu düşünülen bir genin ifadenmesine de bakılacaktır. Bu işlemler için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecek ve rutin takiplerinizi etkilenmeyecektir.

Bu bilgiler ışığında,

Biyolojik materyallerimin bu çalışma için kullanılmasına izin veriyorum.

Biyolojik materyallerimin bu çalışma ve bundan sonraki çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

Biyolojik materyallerimin bu çalışma dışındaki başka çalışmalar için kullanılmasına izin vermiyorum.

Yukarıdaki, araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bana, tanık huzurunda, aşağıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı ve katılmama hakkımın olduğunu, araştırma başladıktan sonra devam etmeyi istememe hakkına sahip olduğum gibi, kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızam ile katılmayı kabul ediyorum.

| | |
|--|----------------|
| GÖNÜLLÜ | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| Bilgi verebilecek kişi: | <i>İmza</i> |
| VELİ , VASI VEYA VEKİL | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| Yakınlığı: | <i>İmza</i> |
| ARAŞTIRMACI | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| GEREKTİĞİNDE GÖNÜLLÜ VEYA YAKINININ BİLGİ İÇİN BAŞVURABİLECEĞİ KİŞİ | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| TANIK | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Görevi: | Faks : (0) |
| Adresi: | <i>İmza</i> |
| TANIK | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Görevi: | Faks : (0) |
| Adresi: | <i>İmza</i> |

Not. Bu belge dört örnek halinde hazırlanacak birer örnek araştırmacı, gönüllü, tanık ve kurum tarafından saklanacaktır.

GÖNÜLLÜ DENEK BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU

| | |
|---|--|
| Araştırmanın konusu | : Kronik myeloid lösemi olgularında tedaviye gelişen direnç ile ilgili AHI1 gen ifadenmesi ve T315I mutasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması |
| Araştırmanın amacı | : Saptanacak bulguların hastalığın takip ve tedavisini yönlendirecek biçimde kullanılması |
| Araştırmaya katılma süresi | : Hastalık nedeniyle takip sırasında bir kez |
| Araştırmaya katılacak yaklaşık gönüllü sayısı | : 20 Kronik myeloid lösemi hastalığı olan ve tedavi sırasında BCR-ABL füzyon ürünü pozitif seyreden birey |

Hematoloji bölümünde kronik myeloid lösemi hastası olarak takip edilmektesiniz. Tedaviyi takip amacıyla sizden belli aralıklarla kan ya da kemik iliği örnekleri alınmaktadır. Önceki tetkikler sonucu elde edilen bilgilerinize göre tedaviye yanıtınız direnç kazanmıştır. Bu çalışmada sizden takip amaçlı alınan örneklerin önceki sonuçları kullanılacaktır. Ayrıca şu andaki durumunuzu değerlendirmek için sizden 4 ml kan alınıp cDNA eldesi yapılarak ilaç direnci ile ilişkili bir genetik değişikliğin sizde olup olmadığı araştırılacaktır. Aynı cDNA örneğinden ilaç direncine etkisi olduğu düşünülen bir genin ifadenmesine bakılacaktır. Bu işlemler için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecek ve rutin takiplerinizi etkilenmeyecektir.

Bu bilgiler ışığında,

- Biyolojik materyallerimin bu çalışma için kullanılmasına izin veriyorum.
 Biyolojik materyallerimin bu çalışma ve bundan sonraki çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
 Biyolojik materyallerimin bu çalışma dışındaki başka çalışmalar için kullanılmasına izin vermiyorum.

Yukarıdaki, araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bana, tanık huzurunda, aşağıda konusu belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı ve katılmama hakkımın olduğunu, araştırma başladıktan sonra devam etmeyi istememe hakkına sahip olduğum gibi, kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızam ile katılmayı kabul ediyorum.

| | |
|--|----------------|
| GÖNÜLLÜ | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| Bilgi verebilecek kişi: | <i>İmza</i> |
| VELİ , VASİ VEYA VEKİL | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| Yakınlığı: | <i>İmza</i> |
| ARAŞTIRMACI | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| GEREKTİĞİNDE GÖNÜLLÜ VEYA YAKINININ BİLGİ İÇİN BAŞVURABİLECEĞİ KİŞİ | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| TANIK | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Görevi: | Faks : (0) |
| Adresi: | <i>İmza</i> |
| TANIK | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Görevi: | Faks : (0) |
| Adresi: | <i>İmza</i> |

Not. Bu belge dört örnek halinde hazırlanacak birer örnek araştırmacı, gönüllü, tanık ve kurum tarafından saklanacaktır.

GÖNÜLLÜ DENEK BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU

| | |
|---|--|
| Araştırmanın konusu | : Kronik myeloid lösemi olgularında tedaviye gelişen direnç ile ilgili AHI1 gen ifadenmesi ve T315I mutasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması |
| Araştırmanın amacı | : Saptanacak bulguların hastalığın takip ve tedavisini yönlendirecek biçimde kullanılması |
| Araştırmaya katılma süresi | : Hastalık nedeniyle takip sırasında bir kez |
| Araştırmaya katılacak yaklaşık gönüllü sayısı | : 10 lökosit sayısı normal, kronik myeloid lösemi olmayan birey |

Kronik myeloid lösemi olgularında tedavide kullanılan ilaçlara direnç gelişiminden sorumlu mekanizmalardan biri hakkında yaptığımız araştırmaya lökosit sayısı normal ve KML olmadığı bilinen kontrol grubu olarak katılmaktasınız. Sizden 4 ml kan alınıp cDNA eldesi yapılarak kronik myeloid lösemi hastalarında ilaç direncine etkisi olduğu düşünülen bir genin ifadenmesine bakılacaktır. Bu işlemler için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecek ve rutin takiplerinizi etkilenmeyecektir.

Bu bilgiler ışığında,

- Biyolojik materyallerimin bu çalışma için kullanılmasına izin veriyorum.
 Biyolojik materyallerimin bu çalışma ve bundan sonraki çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
 Biyolojik materyallerimin bu çalışma dışındaki başka çalışmalar için kullanılmasına izin vermiyorum.

Yukarıdaki, araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bana, tanık huzurunda, aşağıda konusu belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı ve katılmama hakkımın olduğunu, araştırma başladıktan sonra devam etmeyi istememe hakkına sahip olduğum gibi, kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızam ile katılmayı kabul ediyorum.

| | |
|--|----------------|
| GÖNÜLLÜ | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| Bilgi verebilecek kişi: | <i>İmza</i> |
| VELİ , VASI VEYA VEKİL | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| Yakınlığı: | <i>İmza</i> |
| ARAŞTIRMACI | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| GEREKTİĞİNDE GÖNÜLLÜ VEYA YAKINININ BİLGİ İÇİN BAŞVURABİLECEĞİ KİŞİ | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Adresi: | Faks : (0) |
| TANIK | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Görevi: | Faks : (0) |
| Adresi: | <i>İmza</i> |
| TANIK | |
| Adı Soyadı: | Telefon : (0) |
| Görevi: | Faks : (0) |
| Adresi: | <i>İmza</i> |

Not. Bu belge dört örnek halinde hazırlanacak birer örnek araştırmacı, gönüllü, tanık ve kurum tarafından saklanacaktır.