

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

(YÜKSEK LİSANS DOKTORA TEZİ)

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT MYELOİD LÖSEMİ
HASTALARINDA KROMOZOMAL DEĞİŞİKLİKLER VE
FLT3 GENİ MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

ENDER M. COŞKUNPINAR

**DANIŞMAN
PROF. DR. UĞUR ÖZBEK**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

15 / 07 / 2008

Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN

Prof. Dr. Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genetik Programı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Genetik Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Ender M. Coşkunpınar
Tez Başlığı : Çocukluk Çağı Akut Myeloid Lösemi Hastalarında Kromozomal Değişiklikler ve FLT3 Geni Mutasyonlarının Araştırılması
Sınav Yeri : Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü
Sınav Tarihi : 08 / 07 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Uğur Özbek (Tez danışmanı), İstanbul Üniversitesi, DETAE Genetik AD
2. Prof. Dr. Şükrü Palandüz, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Tıbbi Genetik Bilim Dalı
3. Prof. Dr. Sema Anak, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Hematoloji/Onkoloji Bilim Dalı
4. Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD
5. Doç. Dr. Kıvanç Çefle, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Tıbbi Genetik Bilim Dalı

BEYAN

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

Ender M. Coşkunpınar

İTHAF

Babama ve Anneme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasını yapmam için gerekli imkanı sağlayan, öneri ve yönlendirmeleriyle çalışmamın her noktasında yardımını hissettiğim ve bana bir hocadan ziyade her hususta bir ağabey gibi davranan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Uğur Özbek' e teşekkür ederim.

Çalışmamı gerçekleştirebilmek için gerekli fiziksel şartların oluşturulmasında büyük pay sahibi olan ve bitmez tükenmez bir enerji ve disiplin anlayışıyla örnek aldığım İ.Ü.Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Mehmet Kaya'ya, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nihan Ünaltuna' ya, laboratuvarımızda uyguladığımız moleküler genetik tekniklerle ilgili yardımlarından dolayı Dr. Neslihan Abacı, Dr. Müge Sayitoğlu, Dr. Sema Sırma ve Yard. Doç. Dr. Naci Çine'ye, her konuda ne zaman kapılarını çalsam hep açık bulduğum sevgili dostlarım Yard. Doç. Dr. Fahri Akbaş, Msc. Tıbbi Biyolog Çağrı Güleç, Msc. Tıbbi Biyolog Özden Hatırnaz ve Yard. Doç. Dr. Duran Üstek'e, çalışmamın başlangıcındaki katkısından dolayı Dr Fatma Atalar'a, ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma, özellikle tezimin yazımı esnasında büyük bir anlayışla, beni meşgul etmeyerek ve hatta yüreklendirerek ivme kazandıran sevgili çocuklarım Elif ve Fatih'e teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın oluşmasında bilim adına çaba gösteren ve Türkiye'nin birçok ilinde görev yapmakta olan Hematolog ve Onkolog doktor arkadaşlarıma ve çalışmaya katılmayı kabul etmiş olan tüm lösemi hastaları ve ailelerine de teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1850

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hematopoez.....	3
2.2. Lösemilerin sınıflandırılması	4
2.3. Akut lösemiler	5
2.3.1. Akut Myeloid Lösemi (AML)	5
2.3.2. AML etiyolojisi.....	5
2.3.3. AML sınıflandırması.....	7
AML’de WHO Sınıflandırması:	12
2.3.4. AML’de klinik	18
2.3.5. Prognoz.....	19
2.3.6. Tedavi.....	21
2.4. AML’de moleküler genetik değişiklikler.....	23
2.4.1. Core Binding Factor (CBF) translokasyonları.....	24
2.4.2. Retinoik Asit Reseptör Alfa (RAR α).....	24
2.4.3. Homeobox (HOX) gen ailesi üyeleri	25
2.4.4. AML’de sık görülen mutasyonlar.....	25
2.4.4.1. FLT3 geni mutasyonları	25
2.4.4.2. RAS gen ailesi mutasyonları.....	28
2.4.4.3. CEBP α , GATA1, AML1 mutasyonları	28

2.4.4.4. NPM1 mutasyonları	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Hasta örneklerinin toplanması	29
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	31
3.1.3. Kullanılan kitler	31
3.1.4. Kullanılan restriksiyon enzimleri.....	32
3.1.5. Kullanılan markırlar	32
3.1.6. Kullanılan cihazlar	32
3.1.7. Kullanılan tampon solüsyonları, çözeltiler.....	33
3.2. Yöntemler.....	36
3.2.1. DNA izolasyonu	36
3.2.2. RNA izolasyonu.....	37
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi.....	39
3.2.4. FLT3 geni ITD mutasyon bölgesinin PZR ile çoğaltılması	41
3.2.5. FLT3 geni D835 mutasyon bölgesinin PZR ile çoğaltılması	42
3.2.6. FLT3 geni PZR ürünlerinin pürifikasyonu.....	44
3.2.7. Restriksiyon enzim kesimi ile mutasyon taraması.....	44
3.2.8. İstatistik Analiz.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. AML hastalarında kromozomal değişiklikler	49
4.2. FLT3 geninde tespit edilen değişiklikler	57
5. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR	65
FORMLAR	72
ETİK KURUL KARARI.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	77

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.3-1: AML'ye yatkınlık oluşturan faktörler (21)	6
Tablo 2.3-2: AML'de FAB sınıflandırması (13,16,17,22).....	7
Tablo 2.3-3: AML'de izlenen immünofenotipik markırlar ve sınıflandırma (3)	11
Tablo 2.3-4: AML'de WHO sınıflandırması (3)	12
Tablo 2.3-5: AML'de iyi prognostik belirteçler (21).....	19
Tablo 2.3-6: AML'de kötü prognostik belirteçler (21).....	20
Tablo 2.3-7: AML'de translokasyon sonucu oluşan füzyon genler ve ATRA tedavisine yanıt (3).....	22
Tablo 2.4-1: AML'de transkripsiyon faktörlerinin kromozomal translokasyonları (19) 23	
Tablo 3.1-1: Örneklerin geliş yerleri ve oranı	29
Tablo 3.2-1: cDNA sentezi PZR içeriği	38
Tablo 3.2-2: Beta globin geni kontrol PZR içeriği	39
Tablo 3.2-3: FLT3 geni ITD mutasyon bölgesi PZR içeriği	41
Tablo 3.2-4: FLT3 geni D835 nokta mutasyonu PZR içeriği.....	42
Tablo 3.2-5: FLT3 geni PZR koşulları	43
Tablo 3.2-6: FLT3 geni D835 enzim kesimi içeriği.....	45
Tablo 3.2-7: t(15;17) PZR içeriği.....	46
Tablo 3.2-8: t(15;17) PZR koşulları.....	46
Tablo 3.2-9: t(8;21) PZR içeriği	47
Tablo 3.2-10: t(8;21) PZR koşulları.....	47
Tablo 3.2-11: İnv(16) PZR içeriği	48
Tablo 3.2-12: İnv(16) PZR koşulları.....	48
Tablo 4.1-1: Yeni tanı AML hastalarındaki klinik özellikler	50
Tablo 4.1-2: t(15;17) translokasyonu ile FAB-M3 alttipi arasındaki ilişki.....	52
Tablo 4.1-3: t(8;21) translokasyonu ile FAB-M2 alttipi arasındaki ilişki.....	53
Tablo 4.1-4: inv(16) ile FAB alttipleri arasındaki ilişki.....	53
Tablo 4.1-5: FAB sınıflaması ile cinsiyet ilişkisi P=0.122.....	53
Tablo 4.1-6: FAB sınıflaması ile yaş ilişkisi P=0.128.....	53
Tablo 4.1-7: t(15;17) ile cinsiyet ilişkisi P=0.655.....	54
Tablo 4.1-8: t(15;17) ile yaş ilişkisi P=0.630	54

Tablo 4.1-9: t(8;21) ile cinsiyet ilişkisi P=0.561	54
Tablo 4.1-10: t(8;21) ile yaş ilişkisi P=0.129	54
Tablo 4.1-11: inv(16) ile yaş ilişkisi P=0.243.....	54
Tablo 4.1-12: t(15;17) ile lökosit ilişkisi P=0.222	55
Tablo 4.1-13: t(8;21) ile lökosit ilişkisi P=0.138	55
Tablo 4.1-14: inv(16) ile lökosit ilişkisi P=0.201	55
Tablo 4.1-15: t(15;17) ile kemik iliği blast oranı arasındaki ilişki P=0.063	55
Tablo 4.1-16: t(8;21) ile kemik iliği blast oranı arasındaki ilişki *P=0.049	56
Tablo 4.1-17: inv(16) ile kemik iliği blast oranı arasındaki ilişki P=0.652.....	56
Tablo 4.1-18: t(15;17) ile FAB sınıflaması arasındaki ilişki *P=0.009	56
Tablo 4.1-19: t(8;21) ile FAB sınıflaması arasındaki ilişki *P=0.005	56
Tablo 4.1-20: inv(16) ile FAB sınıflaması arasındaki ilişki *P=0.043	57
Tablo 4.2-1: FLT3-ITD ile cinsiyet arasındaki ilişki P=0.351	58
Tablo 4.2-2: FLT3-ITD ile yaş arasındaki ilişki P=0.307	59
Tablo 4.2-3: FLT3-D835 nokta mutasyonu ile cinsiyet arasındaki ilişki P=0.213.....	59
Tablo 4.2-4: FLT3-D835 nokta mutasyonu ile yaş arasındaki ilişki P=0.518.....	59
Tablo 4.2-5: FLT3-ITD ile lökosit sayısı arasındaki ilişki P=0.781	59
Tablo 4.2-6: FLT3-D835 nokta mutasyonu ile lökosit sayısı arasındaki ilişki P=0.970:	59
Tablo 4.2-7: FLT3-ITD ile hemoglobin düzeyi arasındaki ilişki *P=0.013.....	60
Tablo 4.2-8: FLT3-D835 nokta mutasyonu ile hemoglobin düzeyi arasındaki ilişki P=0.679.....	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hematopoez (Kendini yenileyebilen kök hücrelerden gelişen 8 farklı hematopoetik hücre hattı)	4
Şekil 2-2: t(8;21) translokasyonu sonucu meydana gelen AML1-ETO füzyon geninin şematik görünümü	14
Şekil 2-3: İnv(16) (p13;q22) sonucu meydana gelen CFBF-MYH11 füzyon geninin şematik görünümü	14
Şekil 2-4: t(15;17) (q22;q21) translokasyonu sonucu meydana gelen PML-RARA füzyon geninin şematik görünümü	15
Şekil 2-5: FLT3 Reseptör Yapısı	26
Şekil 2-6: FLT3 geninin genomik yapısı	26
Şekil 2-7: FLT3-ITD Mutasyonlarının Aktivasyonu	27
Şekil 3-1: Total RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü	38
Şekil 3-2: Beta globin kontrol PZR'ı jel elektroforezi görüntüsü: M: Markır (puc 8), 1,2,3,4,5,6 : Örnekler. 7: Negatif	40
Şekil 3-3: FLT3 geni ITD PZR jel elektroforezi görüntüsü: M: Markır (Puc 8). 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10: Örnekler.	42
Şekil 3-4: FLT3 geni D835 PZR jel elektroforezi görüntüsü. M: Markır (Puc 8). 1,2,3,4,5,6: Örnekler. 7: Negatif	43
Şekil 3-5: FLT3 D835 enzim kesimi. (A)- M: Markır, 1: Heterozigot, 2: Normal Tip, 3: Kesilmemiş örnek. (B) - M: Markır. 1,6: Normal Tip, 7: Heterozigot, 8: Kesilmemiş örnek.....	45
Şekil 4-1: t(15;17) RT PZR Sonuçları.....	51
Şekil 4-2: t(8;21) RT PZR Sonuçları.....	51
Şekil 4-3: İnv(16) RT PZR Sonuçları.....	52
Şekil 4-4: A- t(15;17) standart curve B- t(8;21) standart curve ...	52
Şekil 4-5: EcoRV ile enzim kesimi sonrası Şekil 4-6: PZR sonrası FLT3.....	57
Şekil 4-7: Dizileme sonucu FLT3 geni 20. intronda bulunan A>G değişikliği.....	58
Şekil 4-8: FLT3-ITD mutasyonu düşünülen olgunun PZR ürününün dizileme sonucu .	58

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AAMT	: Edinsel amegakaryositik trombositopeni
AML	: Akut myeloid lösemi
AML1	: Akut myeloid lösemi 1
AMKL	: Akut megakaryositik lösemi
ANLL	: Akut nonlenfoblastik lösemi
APL	: Akut promyelositik lösemi
CAMT	: Konjenital amegakaryositik trombositopeni
CBF	: Core binding factor
CBP	: c-AMP cevaplı elemente bağlayıcı proteine bağlanan protein
C/EBPA	: CCAAT/Enhancer Bağlayıcı protein
DIC	: Dissemine Intravasküler Coagulation
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikası
Eo-KYH	: Eozinofil-Koloni Yapıcı Hücre
ETO	: Eight twenty one
EV11	: Ektopik viral integrasyon 1
FBS	: Fetal bovine serum
FISH	: Floresan In-situ Hibridizasyon
FLT3	: FMS benzeri tirozin kinaz 3
FLT3-ITD	: FMS benzeri tirozin kinaz 3'in internal tandem duplikasyonu
5FU	: 5 Fluorourasil
G-KYH	: Granülosit-Koloni Yapıcı Hücre
G-CSF	: Granülosit-monosit koloni stimule edici faktör
G-CSFR	: Granülosit CSF reseptörü
GLÖ	: Genel Lenfoid Öncü

GMÖ	: Genel Myeloid Öncü
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
GM-CSFR α	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptör alfa
GM-KYH	: Granülosit Makrofaj Koloni Yapıcı Hücre
HLA DR	: İnsan lökosit antijeni DR
KML	: Kronik myeloid lösemi
KOB	: Kan Oluşturucu Birim
KYB	: Kan Yapıcı Birim
LAP	: Lenfadenopati
M-CSF	: Makrofaj koloni stimüle edici faktör
M-CSFR	: Makrofaj CSF reseptör
M-KYH	: Makrofaj-Koloni Yapıcı Hücre
Mast-KYH	: Mast-Koloni Yapıcı Hücre
MDS	: Myelodisplastik Sendrom
MDS1	: Myelodisplastik sendrom 1
Meg-KYH	: Megakaryosit-Koloni Yapıcı Hücre
MPH	: Myeloproliferatif hastalık
MPO	: Myeloperoksidaz
MPÖH	: Multipotent öncü hücre
MRD	: Minimal Rezidüel hastalık
NSE	: Nöron spesifik enolaz
Ost-KYH	: Osteoblast-Koloni Yapıcı Hücre
PAS	: Periyodik asid schiff
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAR α	: Retinoik Asit Reseptör alfa

RAEB	: Blast sayısı çok yüksek refrakter anemi	:
RT-PZR	: Ters transkriptaz-PZR	
SB	: Sudan siyahı	
TCR- β	: T-hücre reseptör beta	
WT1	: Willms Tümör 1	

ÖZET

Coşkunpınar, E. (2008). Çocukluk çağı Akut Myeloid Lösemi Hastalarında Kromozomal Değişiklikler ve FLT3 Geni Mutasyonlarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Akut lösemiler çocukluk çağı kanserleri içinde ölümcül etkisi bilinen en yaygın hastalıklardır. AML çocukluk çağındaki akut lösemilerin %15-20'sini oluşturmaktadır. AML ile ilgili translokasyonlar genellikle CBF, RAR α ve ETS ailesine ait transkripsiyon faktörlerini ve HOX gen ailesini etkiler. CBF ile ilgili lösemiler AML'lerin %25'ini oluşturur. Bu genin dahil olduğu genetik değişiklikler arasında: t(8;21) translokasyonu sonucu oluşan AML1-ETO füzyon geni ve inv(16) (p13;q22) sonucu oluşan CBF β -MYH11 füzyon geni yer almaktadır. t(8;21) (q22;q22) AML1-ETO tüm AML'lerin %10-14'ünde, inv(16) (p13;q22) CBF β -MYH11 tüm AML'lerin %5-7'sinde, t(15;17) PML-RAR α tüm AML'lerin %8-10'unda görülür. AML hastalarında saptanan diğer bir genetik değişiklik ise FLT3 genindeki aktive edici mutasyonlardır. Bu çalışmada yeni tanı almış 50 çocukluk çağı AML hastasına ait kan veya kemik iliği örneğinde RT-PZR yöntemi ile t(15;17), t(8;21), inv(16) kromozomal translokasyonları ve PZR yöntemi ile FLT3 geni ITD tipi mutasyonlar ve D835 nokta mutasyonları varlığı araştırıldı. Olguların 4'ünde t(15;17) (%8.16), 12'sinde t(8;21) (%24), 3'ünde inv(16) (%6.38) kromozomal düzensizliği, 2 olguda FLT3-ITD mutasyonu (%4.44), 1 olguda FLT3-D835 nokta mutasyonu (%2.22) olduğu tespit edildi. t(15;17) pozitif AML M3'lü bir olguda hem FLT3-ITD hem de FLT3-D835 mutasyonları bakımından heterozigotluk tespit edildi. Aynı olgudaki hem iyi prognostik belirteç olan t(15;17) ve hem de kötü prognostik belirteç olan FLT3 geni mutasyonlarının bir arada bulunması ile birlikte hastanın yaklaşık 1 yıldır sağ ve remisyonda olması AML hastalarında prognostik belirteçler arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Yapılacak klinik korelasyon ve tedavi izlemi sonrasında translokasyon ve mutasyonların pozitiflik gösterdiği olgularda prognostik yeni ilişkilendirmelerin bulunmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma ile görülme sıklığı açısından nadir bir hastalık olan çocukluk çağı AML grubunda FLT3 mutasyon sıklığı %4.44 oranında bulunmuştur. Bu oran çocukluk çağı AML hasta grubu için ülkemizdeki ilk sonuçları oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler : Çocukluk çağı akut myeloid lösemi, FLT3 gen mutasyonları, Internal tandem duplikasyon, D835 mutasyonları, kromozomal translokasyonlar

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1850

ABSTRACT

Coşkunpınar, E. (2008). Analysis of Chromosomal Aberrations and FLT3 Gene Mutations in Childhood Acute Myelogenous Leukemia Patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department, Master Thesis. Istanbul.

Acute leukemias are the most common malignancy disease with mortal effects among childhood cancers. AML comprises 15-20% of childhood acute leukemia. Translocations related to AML generally affect CBF, RAR α , ETS family transcription factors and HOX gene family. Leukemia related to CBF comprises 25% of AML. AML1-ETO fusion gene due to t(8;21) translocation, inv(16) (p13;q22) and CBFb-MYH11 fusion gene are among genetic alterations due to this gene. t(8;21) (q22;q22) AML1-ETO is found in 10-14% of all AMLs, inv(16) (p13;q22) CBFb-MYH11 is found in 5-7% of all AMLs and t(15;17) PML-RAR α is found in 8-10% of all AMLs. Activating mutations in FLT3 gene are another genetic alterations observed in AML patients. In the present study, blood or bone marrow samples of newly diagnosed 50 childhood AML patients are analysed to determine t(15;17), t(8;21), inv(16) chromosomal translocations by using real-time PCR and FLT3 gene ITD, D835 mutations are also detected by PCR method. t(15;17) (%8.16), t(8;21) (%24.0), inv(16) (%6.38) chromosomal aberrations, and FLT3-ITD mutations (%4.44), FLT3-D835 point mutation heterozygosity (%2.22) are observed in 4, 12, 3, 2, 1 patients, out of 50 patients respectively. In one case with t(15;17) positive AML M3, both FLT3-ITD and heterozygous FLT3-D835 mutations are observed. The same patient who has both good prognostic marker t(15;17) and bad prognostic marker FLT3 gene mutations together is still in remission approximately for 1 year after diagnosis. This conditions may show a possible relationship in the prognostic markers of AML patients. In the cases with positive translocation and mutations together, it is thought to be possible to find out prognostic new associations after clinical correlations. In this study we determined the FLT3 gene mutation frequency as 4.44%. This is the the first figure of FLT3 mutation frequency for the Turkish pediatric AML patients group.

Key Words: Childhood acute myeloid leukemia, FLT3 gene mutations, internal tandem duplications, D835 mutations, chromosomal translocations.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 1850

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut Myeloid Lösemi, onkogenik füzyon proteinlerinin oluşumuna bağlı ve kromozom translokasyonları ve inversiyonlarıyla birliktelik gösteren myeloid kök hücre malinitesidir. AML’de birçok farklı translokasyon tanımlanmaktadır. En yaygın olanları t(8;21), t(15;17), inv(16) olarak belirtilmektedir. AML sınıflandırmasında bu tekrarlayan translokasyonlar temel alınmaktadır. AML, transkripsiyon faktörlerini kodlayan proteinlerdeki hata sonucu myeloid hücre farklılaşmasının normal sürecinde gerçekleşmemesi ve, gelişimin erken bir evresinde hematopoetik öncül hücrelerin neoplastik dönüşümü sonucu gelişen kemik iliğinin malign bir hastalığıdır (1,2,3).

AML hastalarında en sık mutasyona uğrayan gen Fms benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3) genidir. FLT3 geni reseptör tirozin kinaz 3 (RTK3) alt ailesinin yeni bir üyesidir. Hematopoetik kök/öncü hücrelerde eksprese olur. AML hastalarında sıklıkla iki tip FLT3 aktive edici mutasyonunun varlığı bildirilmektedir. Her iki mutasyonda FLT3 geni aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (4). Olguların yaklaşık %20-30’unda FLT3 geninin “*jukstamembran*” bölgesinin duplikasyonu (ITD) genin aktive olmasına neden olmaktadır. FLT3 geninde görülen bu mutasyonla birlikte genin otoinhibitör bölgesinin hasara uğradığı ve tirozin kinaz aktivitesinin ortaya çıktığı bildirilmektedir. Olguların yaklaşık %5-10’unda ise FLT3 geninin aktive edici loop bölgesi D835. pozisyonunda meydana gelen nokta mutasyonunda tirozin kinaz aktivitesine sebep olmaktadır. FLT3 geni mutasyonları AML hastalarında kötü prognozla birliktelik göstermektedir ve AML’ye eşlik eden kromozomal translokasyonlar ve inversiyonlarla birliktelik gösterebilmektedir (5,6).

FLT3 gen mutasyonuna sahip hastalar daha yüksek tekrarlama riski ve daha düşük sağ kalım oranına sahiptirler. Ayrıca mutant/normal FLT3 gen oranlarının sağ kalımla ilişkili olarak bir takip kriteri olarak kullanılabileceği de son zamanlarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (5,6,7,8).

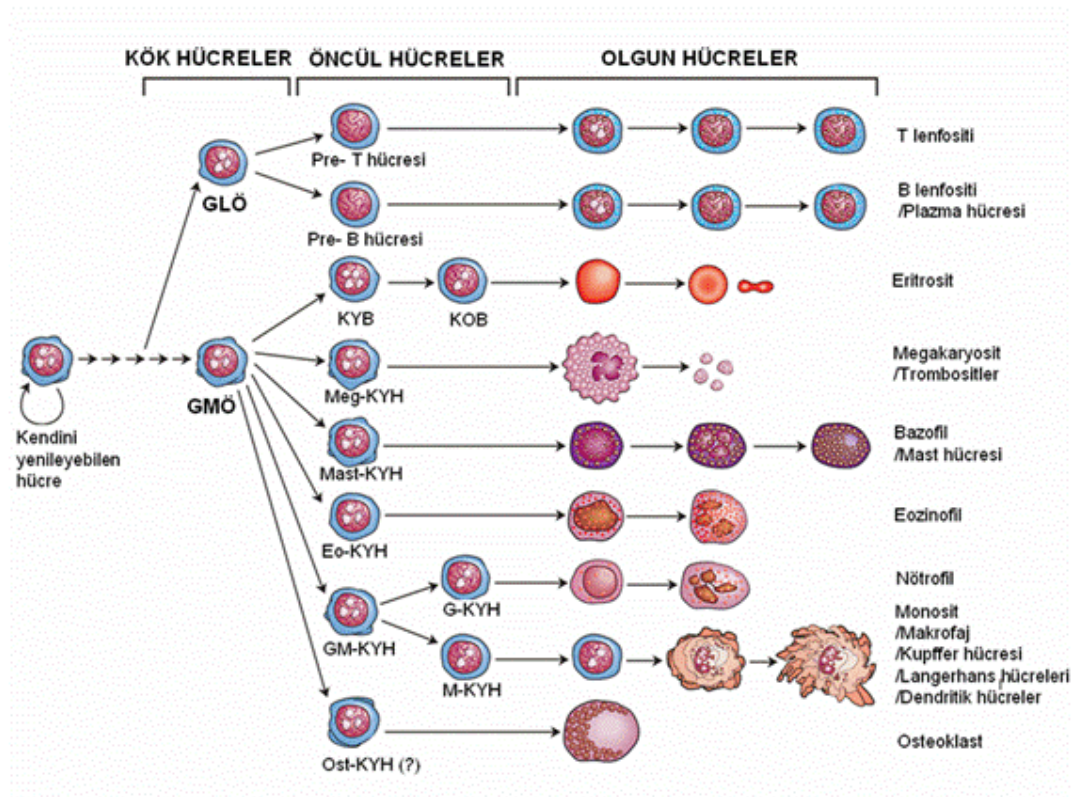
Çalışmamızda yeni tanı almış çocukluk çağı AML olgularında eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile t(15;17), t(8;21) ve inv(16) kromozomal değişiklikleri ve FLT3 geni ITD ve D835 mutasyonları araştırıldı. Sonuçlar olguların klinik verileri ile ilişkilendirilerek, genetik değişikliklerin klinik ve prognostik önemlerinin saptanması amaçlandı.

Literatürde, özellikle çocukluk çağı AML hastalarına ait t(8;21), t(15;17), inv(16) ve FLT3 gen mutasyonlarının varlığı bildirilmekle birlikte, kromozomal translokasyonlarla FLT3 geni mutasyonlarının birarada bulunmalarının birbirleri üzerindeki etkileri, AML sınıflandırılması ve takip kriterleri ile ilgili olarak nasıl kullanılacaklarına dair yeterli veri yoktur. Bu çalışma, Türkiye’de bugüne kadar çocukluk çağı AML hastaları ile yapılmış bilinen en kapsamlı çalışmadır. AML’de tekrarlayan kromozomal değişiklikler ve FLT3 geni mutasyonlarının belirlenmesinin ve birbirleri ile etkileşimlerinin ortaya çıkarılmasının, hastalığın takibi ve tedavisinde büyük öneminin olabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

Hematopoez, kan hücrelerinin üretim, farklılaşma ve gelişimi süreci olarak tanımlanabilir. Hematopoetik sistem, kemik iliği, karaciğer, dalak, lenf nodları ve timusları içerir. Hücrelerin farklılaşma ve gelişim yönünü belirleyen mekanizma özel büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin veya büyüme faktörü reseptörlerinin değişmiş ekspresyonu ya da bunların her ikisinin birlikte etkisi ile oluşur (9). Hematopoetik hücre jenerasyonunu ve bunların oluşumunu sağlayan adımların ilki uzun ömürlü “*pluripotent*” hücrelerin oluşumudur. Tüm kan hücrelerinin progenitörü “multipotent hematopoetik kök hücreler” olarak bilinen hücrelerdir. Hematopoetik kök hücreler (HKH), uzun süreli-HKH ve kısa süreli-HKH olmak üzere iki gruba ayrılır. Uzun süreli-HKH’ler hayat boyunca kendini yenileme potansiyeline sahip olmasına rağmen kısa süreli-HKH’ler için bu süre yaklaşık 8 haftadır ve daha sonra ‘*multipotent*’ öncü hücreleri (MPÖH) oluşturur. MPÖH’ler de daha sınırlı farklılaşma kapasitesine sahip öncüleri “*oligo-lineage restricted progenitorler*” oluşturur ve giderek fonksiyonel olarak geriye dönüşümsüz olgun hücrelere farklılaşırlar. Lenfoid kök hücreler T ve B lenfositleri olarak bilinen hücrelerin öncülleridir. Hematopoetik hücreler üç fazda ayrışabilirler. İlk grupta kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özelliklerine sahip en ilkel multipotent hücreler ikinci grupta öncül hücrelerden gelişen hücre hatları ve en gelişmiş grupta ise özel fonksiyonlarına en olgunlaşmış hücreler bulunur. Bu multipotent kök hücreler lenfositik ve nonlenfositik hücreler olarak adlandırılan iki büyük hücre grubunun öncülleridir. Kemik iliği multipotent kök hücrelerden olgunlaşmış kan hücrelerinin bu gelişimi ve teşekkülü büyüme faktörleri, inhibitörler ve mikroçevre tarafından kontrol edilir (9,10,11).



Şekil 2-1: Hematopoez (Kendini yenileyebilen kök hücrelerden gelişen 8 farklı hematopoetik hücre hattı)

2.2. Lösemilerin sınıflandırılması

Lösemiler kabaca hematopoetik sistemden kaynağını alan, klonal, neoplazik kan hastalıkları olarak tanımlanabilir. Başka bir deyişle lösemiler normal kan hücrelerinin gelişim, olgunlaşma, ve/veya homeostasis sürecinde rol oynayan genlerin yapısal veya fonksiyonel olarak hatalı çalışmaları sonucu oluşur. Hücre olgunlaşma derecesine bağlı olarak lösemi tipleri öncelikle 4 temel grupta toplanabilir (12).

- 1-Akut / Kronik myeloid lösemi
- 2-Akut / Kronik monositik lösemi
- 3-Akut / Kronik myelomonositik lösemi
- 4-Akut / Kronik lenfoid lösemi

2.3. Akut lösemiler

Akut lösemiler, hematopoetik öncül hücrelerin neoplastik dönüşümü sonucunda gelişen, malign ve çocukluk çağı kanserleri içinde ölümcül etkisi bilinen en yaygın hastalıktır (13). Akut lösemiler, genç ve olgunlaşmamış hücrelerin lösemik formlarının periferik kan ve kemik iliğinde çoğalmaları ve istila etmeleri ile karakterizedir. Akut myeloid lösemi çocukluk çağıında akut lösemilerin %15-20'sini oluşturmaktadır (14,15). Yetişkin hastaların yaklaşık %70'inde özellikle enfeksiyon sebebi mortalite görülmektedir. Tedavi edilmeyen bir akut myeloid lösemi hastası için ortalama yaşam süresi yaklaşık üç aydır. Çocukların %90'ı ve yetişkinlerin %70'inde tedavi ile hastalığın gerilemesi ve iyileşme görülebilmektedir. Modern tedavi metodları ile özellikle çocukluk çağı hastalarında büyük oranda iyileşme görülebilmektedir. Akut myeloid lösemi hastalığında en uzun iyileşme ve olası tam iyileşmenin sağlanması için gereken, hastalığın ilk tanı döneminde mümkün olduğunca çok hücrenin öldürülmesidir. Çünkü çeşitli tedavi protokolleri löseminin akut tiplerinin kesin tanısında hayati öneme sahiptir. Akut lösemiler akut myeloid lösemiler (AML) ve akut lenfoblastik lösemiler (ALL) olmak üzere iki büyük gruba ayrılabilir (13).

2.3.1. Akut Myeloid Lösemi (AML)

AML myeloid, monosit, eritroid ve megakaryositik hematopoetik prekürsörlerde olgunlaşmanın erken dönemde duraksadığı malign bir hastalıktır. AML çocukluk çağı lösemilerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. Tüm dünyada görülme sıklığı yılda 5-7/1.000.000 'dur. Özellikle yenidoğan ve adolesan dönemde daha sık görülmektedir. Görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Erkeklerde ve beyaz ırkta diğerlerine oranla daha fazladır (3,16).

2.3.2. AML etiyolojisi

AML etiyolojisinde birçok faktör yer almakla beraber, hastalarda tanımlanmış belli bir risk faktörü bulunmamaktadır (de novo AML). En önemli risk faktörlerinden biri myelodisplastik sendrom (MDS) ve artmış blast sayısı ile karakterize refrakter anemidir (REAB-II) (3,17). Bunların yanında AML olgularının çoğunda tekrarlayıcı kromozom düzensizlikleri görülmektedir (18). AML ile ilgili translokasyonlar genellikle CBF (core binding factor), retinoik asid reseptör alfa (RAR α) ve ETS ailesine ait transkripsiyon faktörlerini ve Homeobox gen ailesini etkiler (19). Kromozomal translokasyonlar dışında AML hastalarında saptanan diğer bir genetik

değişiklik FLT3 genindeki aktive edici mutasyonlardır. En sık görülen internal tandem duplikasyon tipi mutasyon %23 sıklıkla görülürken, nokta mutasyonları da (D835) görülebilmektedir (18,19,20). Ayrıca iyonize radyasyon, kimyasal maddeler, kemoterapötik ilaçlar ve retrovirüsler de AML etiyojisinde rol oynamaktadır. (Tablo-2.3-1)

Tablo 2.3-1: AML'ye yatkınlık oluşturan faktörler (21)

Cevresel Faktörler:

- İyonize radyasyon
- Kimyasallar
- Prenatal dönemde alkole maruziyet
- Prenatal dönemde sigara dumanına maruziyet

Kalıtsal Faktörler:

- Ailede AML öyküsü
- Ailevi trombosit hastalığı (FDP)
- Ataksi Talenjektazi
- Bloom Sendromu
- Diskeratozis konjenita
- Down Sendromu
- Dubowitz Sendromu
- Fankoni anemisi
- Klinefelter Sendromu
- Konjenital amegakaryositik trombositopeni (CAMT)
- Kostman sendromu
- Li Fraumeni Sendromu
- Nörofibromatozis Tip I
- Noonan Sendromu
- Poland Sendromu
- Schwachman – Diamond sendromu
- Seckel sendromu
- Willms Tümörü
- Wolf Hirschhorn sendromu

Edinsel Faktörler:

- Aplastik anemi
 - Edinsel amegakaryositik trombositopeni (AAMT)
 - Klonal sitopeniler
 - Myelodisplastik Sendrom (MDS)
 - Myeloma
 - Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri
 - Polysitemia vera
-

2.3.3. AML sınıflandırması

İlk defa 1976 yılında Fransız, Amerikalı ve İngiliz bir grup bilimadamı tarafından oluşturulan French-American-British (FAB) sınıflaması 1985 yılında tekrar gözden geçirilerek revize edilmiş ve halen kullanılmaktadır. (Tablo:2.3-2) Öte yandan FAB sınıflama sistemine göre sadece morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre sınıflandırılan akut lösemiler, sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerin gelişmesi ve bunlardan elde edilen değerlendirmelerle prognostik önemi olan markırların gösterilebilir hale gelmesiyle yeni bir sınıflandırma sistemi olarak 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından yeni bir sınıflandırma yapılmıştır (16,17,18,22,23,24).

Tablo 2.3-2: AML'de FAB sınıflandırması (13,16,17,22)

M0	-Diferansiye edilemeyen AML
M1	-Minimal diferansiye AML (M0'dan farkı immünohistokimya veya akım sitometrisi ile MPO ekspresyonu gösterilir)
M2	-Diferansiyasyon ile birlikte görülen AML
M3	-Akut promyelositik lösemi (hastaların ~ %90'ında t(15;17) mevcuttur).
M4	-Akut myelomonositik lösemi
M4eo	-Eozinofili ile birlikte görülen akut myelomonositik lösemi
M5	-Akut monositik lösemi
M5a	-Monoblastik (diferansiye olmaksızın akut monositik) lösemi
M5b	-Diferansiyasyon ile birlikte görülen akut monositik lösemi
M6	-Eritrolösemi (Akut eritroid lösemi)
M7	-Akut megakaryositik lösemi

M0 (Farklılaşmamış Myeloblastik Lösemi):

AML'nin bu tipinde farklılaşmamış myeloid hücreler morfolojik olarak ışık mikroskobu ile görüntülenebilmektedir. Bu tipteki AML hastalarında kemik iliği yapılamaması, trombositopeni ve nötropeni gözlemlenmektedir. Kemik iliğindeki blast hücrelerinin oranı %30'un üzerinde ve histokimyasal boyamaların genellikle tamamı negatif sonuç vermektedir. AML'nin bu tipi kötü prognostik grupta yer alır ve ortalama yaşam süresi yaklaşık 10 aydır. ALL'den CD13 ve CD33 immünofenotipik markırlarının (+) olması ile ayrılır. Vakaların çoğunda CD34 ve HLA DR pozitifdir (21,24,25,26).

M1 (Minimal Farklılaşma Gösteren Myeloblastik Lösemi):

Kemik iliğinde yüksek oranda (yaklaşık %90) blast hücrelerinin varlığıyla karakterize olan löseminin bu tipinde blastların yaklaşık %10'unu olgun nötrofiller oluşturur ve tüm blast hücrelerinin yaklaşık %3'ü MPO ve Sudan Siyahı (SB) pozitifdir. İmmünofenotiplemede CD13, 33, 34 ve HLA-DR pozitifdir. Myeloblastlar azurofilik granüllere ve auer cisimlerine (auer rods) sahiptir. Löseminin bu tipi hayatın ilk birkaç ayında görülen en yaygın lösemi tipidir. Kız-erkek görülme oranı eşittir (13,21,24,25).

M2 (Minimal Farklılaşma Gösteren Myeloblastik Lösemi):

Kan veya kemik iliğindeki myeloblastların yaklaşık %20'sini blast hücrelerinin oluşturmasıyla karakterize olan löseminin bu tipinde blastlar tüm hücrelerin %30-90'ı arasındadır. İmmünofenotiplemede CD13, CD33, CD34 ve HLA-DR pozitifdir. FAB M2 tipi lösemi tüm yaş gruplarında görülmekle beraber hastaların yaklaşık %20'si 25 yaşından küçük ve %40'ı 60 yaş ve üzeridir. Hastalarda çoğunlukla anemi, trombositopeni ve nötropeni görülür. Myeloblastlar auer cisimlerine sahiptir. Arasına azurofilik granüller gözenir. Nötrofillerde anormal nükleer segmentasyon görülür. Karyotip anomalisi olan vakaların yaklaşık %33'ü t(8;21)(q22;q22) varlığıyla ilişkilidir. AML1/ETO füzyon protein yapımı ile sonuçlanan löseminin bu tipinde t(8;21) varlığı iyi prognostik değere sahiptir. Bazı nadir vakalarda t(6;9)(q23;q34) varlığı rapor edilmiştir ve kötü prognostik değere sahiptir (13,21,24,25).

M3 (Akut Promyelositik Lösemi):

Hastaların %90'ından fazlasında t(15;17) (q22;q22) mevcuttur. AML vakalarının yaklaşık %8-10'unu oluştururlar. PML/RARA füzyon proteini oluşur. Kadın-erkek görülme oranı yaklaşık 1:2' dir. Genellikle orta yaş grubunda görülür ve

ortalama yaşam süresi yaklaşık 16 aydır. Varyant M3 tipi (M3v) çoğunlukla granül içermez ve M4 ile karıştırılabilir. Normalin çok üzerinde promyelosit varlığı ile karakterize olan löseminin bu tipinde blast hücreleri %5'in üzerindedir ama %30 ve üzeri olma zorunluluğu yoktur. MPO ve SB (Sudan Siyahı) pozitifdir ve auer cisimleri oldukça sık görülür. İmmünohistokimide CD13, CD15 ve CD33 pozitifdir, HLA-DR ve CD34 negatiftir. Total lökosit sayısında lökopeniden lökositoya kadar görülebilen bir dağılım mevcuttur. Promyelositler hipergranüler, mikrogranüler veya hipogranüler varyantlarda olabilir. Dissemine İntravasküler Koagülasyon (DİK) insidansı artmıştır. Olguların %90'ından fazlasında t(5;17) varlığı söz konusudur ve bu iyi prognostik göstergedir. Retinoik asit tedavisine olumlu yanıt verir (13,21,24,25).

M4 (Akut Myelomonositik Lösemi-AMML):

Öncü monosit ve nötrofillerin proliferasyonu ile karakterizedir. FAB M4 tipi lösemi çocuklarda ve genç yetişkinlerde nadir olarak görülür. Genellikle 50 yaş ve üzeri yetişkinlerde görülen löseminin bu tipinde erkek-kadın görülme oranı 1.4:1'dir. Bu tip löseminin tüm formları akut formdur ve ortalama yaşam süresi yaklaşık 8 aydır. Kemik iliği blast oranı %20'nin üzerindedir. Periferik kanda monosit oranı yaklaşık $5 \times 10^9 / L$ ve üzerindedir. MPO ve Sudan Siyahı (SB) negatiftir ve auer cisimleri az görülür. İmmünohistokimide CD13, CD33, HLA-DR ve CD14 pozitifdir. Ekstramedüller tutulum görülebilir. Vakaların çoğunda 16. kromozom anomalisi ve özellikle inv(16) görülür ve bu iyi prognostik değere sahiptir. İmmünohistokimide monositik farklılaşma belirteçleri olan CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64 ve CD36 açıklayıcı değere sahiptir. AMML vakalarının çoğu nonspesifik sitogenetik anomaliler sergiler. Ayrıca kromozom 16 anomalisi gösteren vakaların çoğunda kemik iliğinde anormal derecede artmış eozinofil sayısı da izlenmektedir (13,21,24,25).

M5 (Akut Monositik Lösemi):

Kemik iliği blast oranı %30'un üzerindedir. FAB M5a ve FAB M5b olmak üzere iki formu vardır. Özellikle FAB M5a formu genç yetişkinlerde daha yaygındır. FAB-M5 özellikle <2 yaşta daha sıktır. M5a için ise ortalama yaş 16'dır. Akut monoblastik ve akut monositik lösemi hücrelerini oluşturan hücreler tüm AML'ler içerisinde bir monositik seri lösemik hücrelerin %80 veya daha fazlasıdır. Bu hücreler monoblastlar, promonositler ve monositleri içerir. M5a ve M5b göreceli olarak monoblastların ve promonositlerin oranlanmasıyla birbirinden ayrılmaktadır. Akut

monoblastik lösemide monoblastların çoğunu ($\geq$ %80) monositik hücreler oluşturmaktadır. Akut monositik lösemide monositik hücrelerin çoğu promonositlerdir. Akut monoblastik lösemi tüm AML vakalarının %5-8' ini oluşturur. M5a formu için erkek-kadın görülme oranı yaklaşık 0.7:1, M5b formu için ise yaklaşık 1.8:1'dir. M5b formu tedaviye oldukça dirençlidir. Yaşam süresi bu tip için oldukça kısadır (7-8 ay arası). Yaygın klinik özellikleri arasında her iki tip M5 tipi lösemide de kanama bozuklukları, ekstramedüller tutulum ve merkezi sinir sistemi tutulumu sayılabilir. Nadiren auer cisimleri görülür. Tipik olarak NSE pozitif, MPO negatif ve Lizozim pozitifdir. Histokimyasal ve immünofenotipik olarak M4 ile benzer özellikleri gösteren M5a tipi lösemide 11q23 anomalisi en sık görülen anomali olup kötü prognostik değere sahiptir (13,21,24,25).

M6 (Akut Eritroid Lösemi):

Hücrelerin yarısından çoğu eritroid hücrelerdir. Önemli bir myeloid içeriğe sahip olan eritrolöseminin FAB M6a ve FAB M6b olmak üzere iki alt tipi vardır. Daha sık erişkinlerde görülür ve tüm AML'ler içinde görülme oranı yaklaşık %5-6 arasındadır. Kemik iliğindeki noneritroid hücrelerin %20'den fazlası blasttır. Histokimyasal boyamalarda SB negatif, MPO ve Periyodik Asit Shift (PAS) pozitifdir. İmmünofenotiplemede CD13, CD33, CD117 ve glikoforin pozitifdir. Bu tip lösemide 5. ve 7. kromozomda delesyon sık görülür ve kötü prognostik değere sahiptir (13,21,24,25).

M7 (Akut Megakaryositik Lösemi):

Megakaryoblastlar %30'un üzerindedir. Sudan siyahı ve MPO negatif, PAS ,asit fosfataz ve nonspesifik esteraz pozitifdir. İmmünofenotiplemede myeloid belirteçler olan CD13 ve CD33 pozitif olabilir. CD36 genellikle pozitifdir. Yetişkinlerde akut megakaryoblastik lösemi ile ilişkili bilinen translokasyon yoktur. Çocukluk döneminde kısmen infant dönemde ve t(1;22)(p13;q13) ile ilişkili olarak görülebilir ve bu akut löseminin bu tipi için kötü prognoz göstergesidir. FAB M7 sıklıkla trizomi 21'li çocuklarda görülmektedir (13,21,24,25).

Tablo 2.3-3: AML'de izlenen immünofenotipik markırlar ve sınıflandırma (3)

<u>Markır</u>	<u>Hücre hattı</u>
CD13	Myeloid
CD33	Myeloid
CD34	Erken dönem
HLA-DR	AML'lerin çoğunda (+)'tir, APL'de (-)'tir
CD11b	Olgun monositler
CD14	Monositler
CD41	Trombosit glikoprotein IIb/IIIa kompleksi
CD42a	Trombosit glikoprotein IX
CD42b	Trombosit glikoprotein Ib
CD61	Trombosit glikoprotein IIIa
Glykoforin A	Eritroid
TdT	Genellikle ALL'de belirteçtir
CD11c	Myeloid
CD117(C-kit)	Myeloid / kök hücre
CD56	NK hücresi/ kök hücre

AML'de WHO Sınıflandırması:

Yeni tekniklerin geliştirilmesi ve bu teknikler sayesinde saptanabilen, moleküler genetik ve sitogenetik anomalilerin ve bunların prognostik değerlerinin anlaşılması sonucunda akut lösemilerin sınıflandırılması için 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından WHO sınıflandırması adı verilen yeni bir sınıflama yapılmıştır. (Tablo: 2.3-4) WHO sınıflandırma sisteminde FAB sistemine göre birkaç önemli değişiklik bulunmaktadır. FAB sınıflaması hücre morfolojisi ve farklılaşma derecesine göre, biyokimyasal reaksiyonlara ve hücre yüzey belirteçlerine bağlı olarak yapılmakta iken WHO sınıflamasında morfolojik özellikler, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler dikkate alınmıştır. WHO ve FAB sınıflandırma sistemleri arasındaki en önemli farklılık kan veya kemik iliğindeki blast hücre oranının %30'dan %20'ye indirilmiş olmasıdır. FAB sınıflamasına göre bu oranın %30 ve üzeri olması myelodisplastik sendrom sınıfında yer alan ve blast oranı %20-29 arasında olan aşırı blast transformasyonu ile karakterize Refraktör Anemi ("refractory anemia with excessblasts in transformation" RAEB-t) sınıfı ortadan kaldırılmaktadır (3,18,21,23,24,27,28).

Tablo 2.3-4: AML'de WHO sınıflandırması (3)

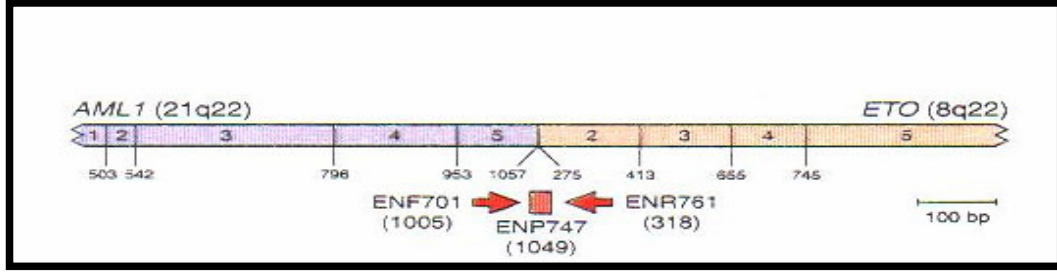
-
1. Tekrarlayan genetik anomalilerle seyreden AML
 - *t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO) ile AML
 - *inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) ile seyreden AML
 - *APL t(15;17)(q22;q22), (PML/RARA)
 - *11q23 (MLL) ile seyreden AML
 2. Çoğul seri displazisi ile seyreden AML
 - *Önceden Myelodisplastik Sendromlu (MDS'li) tip
 - *Önceden MDS'li olmayan tip
 3. Tedaviye ikincil AML ve MDS
 - *Alkilleyici ajanlarla ilişkili tip
 - *Topoizomeraz II ile ilişkili tip
-

4. Tanımlanan gruplara girmeyen AML

- *Minimal farklılaşma gösteren AML
- *Olgunlaşma göstermeyen AML
- *Akut miyelofibrozis ile panmiyelozis lösemi
- *Granülositik olgunlaşma gösteren AML
- *RARA rearrajmanı göstermeyen APL
- *Akut Myelomonositer Lösemi
- *Akut Monoblastik ve Monositer Lösemi
- *Akut Eritrolösemi
- *Akut Megakaryoblastik Lösemi
- *Akut Bazofilik Lösemi
- *Myeloid Sarkom

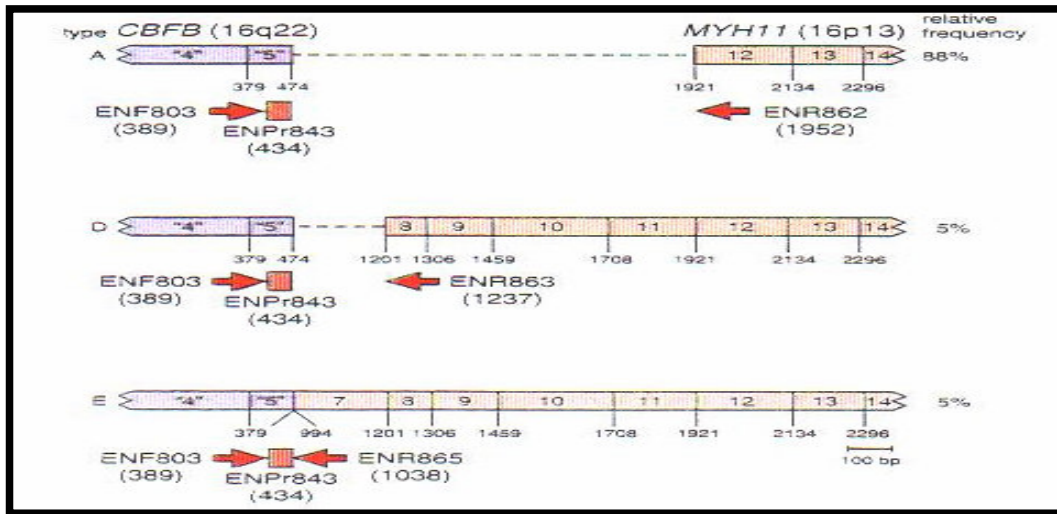
t(8;21) (q22;q22) ile birlikte seyreden AML (AML1/ETO):

Tüm AML'ler içinde %5-12 oranında görülmektedir. t(8;21) (q22;q22) AML'deki en yaygın kromozomal düzensizliklerden biridir (29). FAB M2 grubunda sık görülür. AML1 gen ürünü DNA bağlama özelliğindedir. AML1-CBF β transkripsiyon faktörü kompleksinin bir parçasıdır (5). ETO geni ise bir "zinc finger" protein kodlamaktadır. Translokasyon neticesinde 21. kromozomdaki AML1 geni ve 8. kromozomdaki ETO geninden oluşan bir füzyon proteini ortaya çıkar. Oluşan bu AML1/ETO füzyon geni AML1'in DNA bağlayan kısmını ve ETO geninin tamamını içerir. Genellikle kemoterapiye yanıt iyidir ve konsolidasyon fazında "cytarabine" ile tedavi edildiğinde uzun süreli sağkalım ve tam remisyon oranı yüksektir. Olgun nötrofillerde auer cisimleri görülebilir. Anormal nüklear segmentasyonu ve histokimyasal boyamalarda anormallikler görülebilir. Nadiren kemik iliği blast oranı %20'nin altına inebilir. Bunların dışında cinsiyet kromozomu kaybı ve del(9)(q22) gibi genetik anomaliler sık görülmektedir. CD56 ekspresyonu artışı ek prognostik faktör olarak sayılabilir (18,29).



Şekil 2-2: t(8;21) translokasyonu sonucu meydana gelen AML1-ETO füzyon geninin şematik görünümü

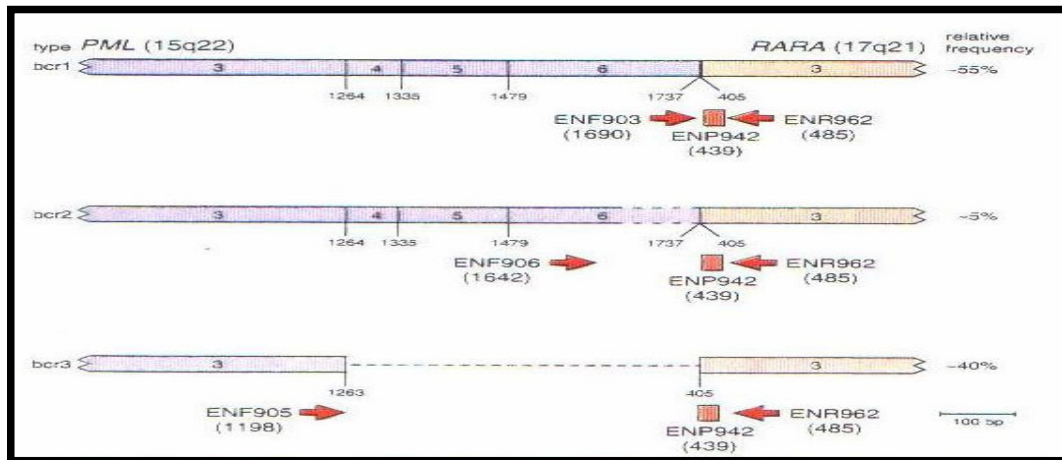
İnv(16)(p13;q22)veya t(16;16)(p13;q22),(CBFβ/MYH11) ile seyreden AML:Tüm AML'ler içinde yaklaşık %10-12 oranında görülmektedir. Genç hastalarda daha sık görülür (18,30). Morfolojik olarak Akut Myelomonositik Lösemiye (FAB M4) benzemektedir. Yeni tanıda veya relapsta myeloid sarkomlar görülebilir. Hem inv(16)(p13;q22) ve hem de t(16;16)(p13;q22) translokasyonları sonucunda 16q22 bölgesinde bulunan Core Binding Factor β geni (CBFβ) ile 16p22 bölgesinde bulunan Muscle Myosin Heavy chain 11 geni (MYH11) füzyona uğrayarak CBFβ-MYH11 füzyon geni oluşur. Bu genetik değişiklik geleneksel sitogenetik bantlama teknikleriyle gösterilemediği için Fluorescence İn Situ Hybridization (FISH) ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemlerinin kullanılması gereklidir. Bu hastalar konsolidasyon fazında yüksek doz “cytarabine” ile tedavi edildiklerinde remisyon oranı yüksektir (18,31,32).



Şekil 2-3: İnv(16) (p13;q22) sonucu meydana gelen CBFβ-MYH11 füzyon geninin şematik görünümü

t(15;17)(q22;q21), (PML/RAR α) ile seyreden AML (APL):

Tüm AML'ler içinde yaklaşık %5-8 oranında görülmektedir. Akut Promyelositer Lösemi (APL) hipergranüler (ya da tipik) APL ve hipogranüler (ya da mikrogranüler) APL olmak üzere iki gruba ayrılır. Mikrogranüler APL hipergranüler APL'den lökosit sayısının fazlalığıyla ayrılmaktadır. Her iki tip APL'de de “*Dissemine Intravascular Koagulation*” (DIC) görülmektedir. Daha çok orta yaş ve üzerindeki yetişkinlerde görülür. APL'de t(15;17)(q22;q12) translokasyonu sonucunda 17q12 bölgesinde bulunan Retinoik Asit Reseptör Alfa (RAR α) geni ile 15q22 bölgesinde bulunan Promyelositik Lösemi (PML) geni füzyona uğrayarak PML/RAR α füzyon geni oluşur. Bu tip AML'de olguların %90'ından çoğunda bu translokasyon görülmektedir. APL'de lökosit sayısı çok hızlı bir şekilde ikiye katlanır. Bütün lösemik promyelositlerde MPO kuvvetli pozitif sonuç verir. Bazı durumlarda bu translokasyon maskelenerek sitogenetik olarak gösterilemeyebilir. Fakat bu olgularda da varyant translokasyon ve insersiyonlar PML/RAR α füzyon geni oluşumu görülebilmektedir. FISH ve RT-PZR yöntemleri ile maskelenmiş olan bu genetik yeniden düzenlenmeler gösterilebilmektedir. APL hastaları bir farklılaşma ajanı olarak görev yapan “*All-Trans Retinoic Acid*” (ATRA) ile tedavi edildiklerinde yüksek oranda remisyon sağlarlar. APL vakalarının yaklaşık %1'i RAR α geniyle ilişkili olan t(11;17)(q23;q21), t(5;17)(q32;q12) ve t(11;17)(q13;q21) gibi translokasyon varyantlarını içermektedir (18, 33).



Şekil 2-4: t(15;17) (q22;q21) translokasyonu sonucu meydana gelen PML-RAR α füzyon geninin şematik görünümü

11q23 (MLL) ile seyreden AML:

Tüm AML'ler içinde yaklaşık %5-6 oranında görülmektedir. Tipik olarak monositik özellikler gösterirler. Özellikle çocuklarda sık görülür. İnfant AML ve tedaviye bağlı AML olmak üzere iki alt grubu vardır. Tedaviyle ilişkili AML genellikle Topoizomeraz II kullanımından sonra oluşur. Hastalarda DIC, ekstremiteler monositik sarkomalar ve/veya doku infiltrasyonu görülebilir. 11q23 anomalileri özellikle akut myelomonositik, monoblastik ve monositik lösemilerde (FAB M4, M5a ve M5b) ve nadir olarak da olgunlaşma göstermeyen ve minimal düzeye olgunlaşmış AML'lerde (FAB M2 ve FAB M1) görülür. 11q23 bölgesinde yerleşmiş olan MLL geni gelişim sırasında düzenleyici rol oynamaktadır ve yaklaşık 22 farklı translokasyonu bildirilmiştir. FISH ile bu farklı genetik anomaliler gösterilebilmektedir (18).

FLT3 mutasyonu saptanan AML'ler:

Aktive edici FMS benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3) mutasyonları yeni tanı AML vakalarının yaklaşık %20-30' unda saptanmaktadır (18,34). Bu mutasyonlar AML'de prognozu en belirleyici moleküler anomalidir. Bu mutasyonların en yaygın olanı reseptörün jukstamembran bölgesinde yerleşik olan ve yaklaşık %23 sıklıkla görülen internal tandem duplikasyon (FLT3/ITD) mutasyonlarıdır. Bundan başka, daha az sıklıkla görülen (yaklaşık %7) nokta mutasyonları da vardır. FLT3/ITD mutasyonu bulunan AML'lerin klinik özellikleri arasında, normal sitogenetik, lökositoz ve monositik farklılaşma sayılabilir. FLT3/ITD mutasyonları artmış relaps oranı ve genel sağkalım süresinde kısalma ile ilişkilidir (18).

Çoğul Seri Displazisi ile Birlikte Seyreden AML:

Bu tip AML'ler MDS'da görülen sitogenetik anomalilerle karakterizedir. Kan veya kemik iliği blast oranı $\geq 20\%$ dir ve 2 ya da daha fazla hücre tipi ve bu serileri oluşturan hücrelerin en az %50' sinde displazi görülür. Bu hücreler genellikle megakaryositlerdir. Daha çok yaşlılarda görülür. Olguların %85' inden fazlasını 70 yaş ve üzerindeki hastalar oluşturur (23,35). Bu tip AML ya de novo olarak ya da MDS'u takiben ortaya çıkar. Hastalarda çoğunlukla ciddi pansitopeni mevcuttur. Çoğul seri displazisi ile birlikte seyreden AML'lerin (FAB sınıflandırma sistemine göre) M6a ve M6b olmak üzere iki morfolojik tipi vardır. Bazı hastalarda bu iki morfolojik tip birlikte bulunabilmektedir. Bu tip lösemide başta kromozom 5 ve kromozom 7'de olmak üzere

belli kromozomlarda büyük parçaların kaybı ya da duplikasyonu şeklinde kromozom anomalileri görülebilmektedir (18).

Tedaviye İkincil AML ve MDS:

Bu sınıfta yer alan AML sitotoksik kemoterapi ve / veya radyasyon tedavisi sonucu gelişir. Alkilleyici ajanlarla ve Topoizomeraz II ile ilişkili olmak üzere 2 formu vardır. Alkilleyici ajanlarla ilişkili olan tip genellikle alkilleyici ajanlara ya da radyasyona maruziyetten 5-6 yıl yada daha sonra gelişir. Genellikle önce MDS tablosu gelişir. Bu evre çoklu seri displazisi ile seyreden AML ile benzerlik gösterir. Olgular olgunlaşma gösteren akut myeloblastik lösemi (FAB-M2), akut monositik lösemi (FAB-M5b), AMML (FAB-M4), eritrolösemi (FAB-M6a) veya akut megakaryoblastik lösemi (FAB-M7) morfolojisi göstermektedir. Vakaların %90' ından fazlasında sitogenetik anomaliler ve kromozom 5 ve 7'yi içeren yada çoklu kromozom anomalileri gözlenmektedir. Ortalama yaşam süresi tanıdan sonra yaklaşık 7-8 aydır.

Topoizomeraz II ile ilişkili olan tip ise Topoizomeraz II inhibitörleri ile tedavi gören hastalarda oluşur. Bu ajanlar epipodofilotoksinler, teniposid, antrasiklinleri (doksorubisin ve 4-epi-doksorubisin) kapsar (36). Çoğul seri displazisi ile birlikte seyreden AML'ye göre daha erken dönemde (2 yıl sonra) ortaya çıkar (37). Vakaların çoğu akut monoblastik veya myelomonositik lösemi özellikleri ile karakterizedir. Bildirilen diğer morfolojiler promyelositik lösemi, MDS ve akut megakaryoblastik sendrom ile uyumludur (18).

Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML'ler:

Yukarıda sayılan grupların hiçbirine girmeyen AML'ler FAB sınıflamasına göre belli tiplerdeki AML'lerin modifiye edilmesiyle gruplandırılmışlardır. Bunların yaklaşık yarısını M0, M1 ve M2 alt grupları oluşturmaktadır. M3 %10, M5a ve M5b %10, M6 %5, M7 %3-5 oranlarında görülür. RAR α rearrajmanı göstermeyen APL tipik M3 bulguları ile karakterizedir. ATRA tedavisine cevap vermez (18,23).

Varyant: Down Sendromunda Görülen AML/Myeloproliferatif Hastalık:

Down Sendrom'lu (trizomi 21) hastalarda akut lösemilerin özellikle myeloid tipine yatkınlık artmıştır. Başta akut megakaryoblastik lösemide bu açıkça görülmektedir. Down Sendromlu yenidoğanların yaklaşık %10'unda lösemiye ait klinik özellikler; lökositoz, kanda %30' dan %50' ye uzanan blast yüzdesi ve ekstramedüller

tutulmuş görülmektedir. Bu hücrelerin büyük bölümünü promegakaryositler oluşturur. Diseritropoezis diğer bir morfolojik özelliktir. Blast hücrelerinin sitokimyasal boyamalarında MPO ve SB negatiftir (18).

Akut Bazofilik Lösemi:

Bazofillerde farklılaşmanın görülmesiyle karakterize başlıca akut myeloid lösemi tipidir. Sıklığı %1'den azdır. Klinik özellikleri arasında kemik iliğinde hasar, halkasal blastlar ve organomegali sayılabilir. Hepatosplenomegali diğer AML tiplerine oranla daha sıktır. İmmünohistokimya ile myeloid yüzey antijenlerinin pozitifliğinin yanı sıra CD9 ve CD25 pozitifliği görülür. Olgun bazofillerin sayısı oldukça azdır. Asit fosfataz sıklıkla pozitiftir. MPO ve SB negatiftir. Akut bazofilik lösemi için herhangi bir kromozom anomalisi tanımlanmamıştır.

Akut Panmyeloz veya Myelofibrozis:

Kemik iliğinin kısa sürede ilerleyen fibrozisi ile karakterize olan löseminin bu tipi oldukça nadirdir ve tüm yaş gruplarında görülebilir. De novo veya alkileyici ajanlarla kemoterapi veya radyasyona maruziyeti takiben görülebilir. Ağır pansitopeni tablosuyla birlikte anizositozis ve myeloid hücrelerde displastik değişiklikler görülür. Kanda blast oranı %5'in altındadır. Akut panmyeloz veya myelofibrozis ile ilişkili tanımlanmış bir kromozomal anomali yoktur.

Myeloid Sarkom:

Myeloid sarkom, ekstrasmedüller myeloid tümör, granülositik sarkom ve kloroma olarak adlandırılır ve tüm AML hastalarının yaklaşık %2-8'inde gelişir. MPO ve ASD pozitiftir. Myeloid sarkomla ilişkili olarak bildirilen kromozomal anomali bulunmamaktadır (18).

2.3.4. AML'de klinik

AML hastalarında kemik iliği hasarıyla sonuçlanan semptomlar gözlenmektedir. En yaygın semptom şiddetli anemidir. Diğer semptomlar arasında halsizlik, kilo kaybı, pansitopeniye bağlı kanamalar, ekimoz, peteşi, sık görülen enfeksiyonlar sayılabilir. Aslında yaşlı bir AML hastasında myokard enfarktüsü başlıca semptomdur. Hastalarda çoğunlukla lökosit sayısında artma görülürken nötrofil seviyesinde bir düşüş söz konusudur. Hepatomegali, splenomegali merkezi sinir sistemi tutulumu ve lenfadenopati pek sık izlenmemekle beraber FAB-M4 ve FAB-M5 AML'lerde organ

tutulumu daha sık görülmektedir. Bu belirtiler yanında özellikle APL’de ve FAB-M4 ve M5 tipi AML’lerde DIK’a eğilim ,merkezi sinir sistemi tutulumu bulguları ve dişeti hipertrofisi görülebilmektedir. Ayrıca hastaların çoğunda oral antibiyotik tedavisine rağmen uzun sürebilen solunum yolu enfeksiyonlarında görülmektedir. Sıklıkla tutulan organlar, dalak, karaciğer ve dişeti olarak bildirilmiştir (3,21).

2.3.5. Prognoz

AML’de erken dönemde uygulanan agresif tedavi ile remisyon sağlanması olasılığı yüksektir. Özellikle 60 yaşın altındaki erişkin hastaların %15-20’ si bu tedavi sonrası ortalama 3 yıllık bir yaşam süresine sahip olabilmektedir. Yaşın ilerlemesiyle birlikte (>65 yaş) remisyon oranında hayatta kalım süreside düşer. Bununla birlikte sınıflandırma tipine göre çeşitli kromozomal translokasyonlar, inv(16) varlığı, remisyonda iken indüksiyon terapisinde blast sayısının düşmesi ve blastların kaybolması, normal metafazların varlığı ve bunun gibi daha birçok faktör iyi prognostik belirteç olarak (Tablo:2.3-5), FLT3 geni mutasyonlarının varlığı, enfeksiyonlar, lökosit sayısının aşırı artmış olması, merkezi sinir sistemi tutulumu gibi etkenler kötü prognostik belirteç olarak bilinmektedir (Tablo:2.3-6) (3,21).

Tablo 2.3-5: AML'de iyi prognostik belirteçler (21)

-
- t(15;17) varlığı (Özellikle FAB-M3 vakalarında)
 - t(8;21) varlığı (Özellikle FAB-M2 vakalarında)
 - İnv(16) varlığı
 - İndüksiyon terapisi esnasında blast sayısının düşmesi ve blastların kaybolması
 - TdT ekspresyonunun düşük olması (<%5 olması)
 - CD11b ekspresyonunun yüksek olması
 - Kaspaz-3 seviyesindeki artış
 - Telomeraz aktivitesinin yüksekliği
-

Tablo 2.3-6: AML'de kötü prognostik belirteçler (21)

-
- >65 yaş
 - 5. ve 7. kromozomların delesyonları
 - 8. ve 10. kromozomların trizomisi
 - Lökosit sayısının >50.000/ μ l, blast hücrelerinin sayısının 15.000/ μ l olması
 - Trombosit sayısının <50.000/ μ l olması
 - Yüksek LDH düzeyi
 - Obezite, diyabet, böbrek yetmezliği
 - İndüksiyon tedavisi sırasında entübe olma veya ventilasyon desteği almış olmak
 - Yüksek Bcl-2 ekspresyonu
 - Düşük Retinoblastoma ekspresyonu
 - Yüksek CD33 ve CD34 ekspresyonu
 - GATA1 ve CD56 ekspresyonunun artmış olması
 - Ekstramedüller tutulum
 - FLT3 mutasyonlarının varlığı,
 - Yüksek EVI1 ve NPM1 ekspresyonu
 - Yüksek İnterlökin 1 β ekspresyonu
 - P15 metilasyon
 - Mikrosatellit instabilitesi
 - Yüksek serum albümin düzeyi
 - 11q23 varlığı
-

2.3.6. Tedavi

AML’de başarılı bir tedavi, eğer varsa öncelikle, sistemik ya da merkezi sinir sistemi hastalığının özel tedavisi ve kemik iliği kontrolüne bağlı olarak yapılabilir. Bu stratejinin olmazsa olmazı sistemik olarak uygulanan kombinasyon kemoterapisidir. Çünkü merkezi sinir sistemi hastalığı gelişmiş AML hastalarının sadece %5’inde profilaktik tedavi endike değildir (18,38,39).

Tedavi iki faza ayrılmaktadır:

1-İndüksiyon tedavisi

2-Remisyon sonrası tedavi

İndüksiyon tedavisi remisyonun sağlanması için uygulanır ve bu tedavi yönteminde kabul edilebilir çeşitli ajanlar kullanılmaktadır. Hem lösemi hem de uygulanan lösemi tedavileri myeloid hücrelerin baskılanmasına neden olmaktadır. Bu sebeple hastalar, enfeksiyöz komplikasyonlara karşı uygulanan tedavilerdeki gibi trombosit transfüzyonlarını içeren kan fraksiyonlarıyla hematolojik olarak desteklenmelidirler. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda koloni uyarıcı faktörler gibi granülosit koloni-uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör ile lösemi tedavisiyle ilişkili olan granülositopeni periyodunu kısaltmak için denenmektedir (18).

Remisyon sonrası tedavi ise remisyonun sürekliliğinin sağlanması için yapılmaktadır. AML’de remisyon, hastalık semptomlarının yok olması, periferik kan ya da kemik iliğinde blast oranının %5’in altına inmesi ve hücre sayılarının normal sınırlara gerilemesi olarak tanımlanabilir.

Akut promyelositik lösemi (APL) AML’nin özel bir alt grubudur. APL için indüksiyon tedavisinde ATRA kullanılmakta ve hastaların %70-90’ında tam remisyon sağlanabilmektedir. ATRA lösemili hücrelerin farklılaşmasını sağlamaktadır. Bu gruptaki hastalarda t(15;17) iyi prognostik göstergedir. APL hastalarının yaklaşık %95’inde t(15;17)(q21;q11) varlığı tespit edilmektedir. APL hastalarının çok az bir bölümünde ise diğer sitogenetik anomaliler [t(11;17)(q23;q11), t(11;17)(q13;q11), t(15;17)(q31;q11), t(17;17) görülebilmektedir. t(11;17)(q23;q11) translokasyonu olan hastalar ATRA tedavisine dirençlidir. (Tablo: 2.3-7) ATRA tedavisinin lökositöz ve solunum güçlüğüne sebep olduğuda bildirilmektedir (3).

2.4. AML’de moleküler genetik değişiklikler

Löseminin moleküler genetik temellerinin anlaşılmasına dair özellikle geçtiğimiz on yılda kayda değer ilerlemeler olmuştur. Lösemilerin en büyük sebebi hematopoetik öncü hücrelerdeki sonradan kazanılmış somatik mutasyonlardır. İki transkripsiyon faktörünün füzyonu dengeli resiprokal translokasyonlarla ilgili akut lösemilerde görülen yaygın bir durumdur. Bu transkripsiyon faktörleri evrim boyunca korunmuştur. Bu transkripsiyon faktörleri CBF, RAR α , HOX ve ETS ailesi üyeleridir (Tablo:2.4-1).

Bu kromozomal translokasyonlar tek başlarına lösemi fenotipini oluşturmak için yeterli değildir. AML patogeneğinde sıklıkla FLT3 gibi bir tirozin kinaz’ın sürekli aktivitesi ile transkripsiyon faktörlerini etkileyen kromozomal translokasyonlar birlikte etkili olmaktadır. Tirozin kinazların aktivasyonuna yol açan mutasyonlar hücre çoğalmasını uyararak veya apoptozisi engelleyerek kansere yol açarken, transkripsiyon faktörlerinde füzyon proteinlerinin oluşumu ile sonuçlanan mutasyonlar hücre farklılaşmasını bozarak kanser oluşumuna katılır (19).

Tablo 2.4-1: AML'de transkripsiyon faktörlerinin kromozomal translokasyonları (19)

<u>Transkripsiyon faktörü</u>	<u>Translokasyon</u>	<u>Oluşan füzyon gen</u>
CBF	t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO
	t(3;21)(q26;q22)	AML1-EVI1
	inv(16)(p11;q22)	CBF-MYH11
	t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1
RAR α	t(15;17)(q22;q11)	PML-RAR α
	t(5;17)(q31;q11)	NPM-RAR α
	t(11;17)(p13;q11)	PLZF-RAR α
HOX	t(7;11)(p15;p15)	NUP98-HOXA9
	t(2;11)(q31;p15)	NUP98-HOXD13
	t(12;13)(p13;q12)	TEL-CDX2
ETS	t(12;22)(p13;q11)	MN1-TEL
	t(16;21)(p11;q22)	TLS-ERG

2.4.1. Core Binding Factor (CBF) translokasyonları

CBF, CBF α (AML1 olarak da bilinir) ve CBF β alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. CBF normal hematopoetik farklılaşmada gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar. CBF α DNA'ya bağlanarak CBF β ise CBF α 'nın DNA'ya olan ilgisini arttırarak işlev görür. CBF'nin AML'de değişik mutasyonları görülür. Bu mutasyonlar normal hematopoetik hücre farklılaşmasını bozar. Örneğin t(8;21) translokasyonunda CBF'in alfa alt ünitesi etkilenir ve fonksiyon kaybına neden olur (40). Bu translokasyonla AML1-ETO füzyon geni oluşur. İn(16) sonucunda ise CBF β 'nin fonksiyonu değişmektedir. Burada oluşan füzyon gen CBF β -MYH11 genidir. CBF'nin regüle ettiği genlerden bazıları interlekin 3 (IL-3), GM-CSF, M-CSF, T-hücre reseptör beta (TCR β) enhanceri, immunoglobulin ağır zincir enhanceridir (E μ) (41). CBF füzyon proteinlerinin normal CBF'nin de fonksiyonunu bozarak baskın negatif (dominant negatif) etkili olduğu gösterilmiştir (42). AML'de CBF α geninde nokta mutasyonları veya delesyonlar da bulunmuştur. Bu mutasyonlar AML'ye yatkın olan nadir ailesel trombosit hastalığı (FPD/AML) ile birliktedir. Ayrıca farklılaşma göstermeyen AML'de (FAB M0) bu genin mutasyonları bulunur. CBF α aktive edici veya inhibe edici farklı mutasyonları vardır, fakat moleküler mekanizması bilinmemektedir (19).

2.4.2. Retinoik Asit Reseptör Alfa (RAR α)

APL'de 17. kromozomda bulunan RAR α geninin çeşitli genlerle translokasyonu görülmektedir. (Tablo: 2.4-1). t(15;17) sonucu oluşan PML-RAR α füzyon geni APL'nin %95'inde görülür. Geriye kalan APL olgularında RAR α geni, PLZF, NPM, NuMA ve STAT5 gibi genlerle füzyon oluşturur. Bu da genel moleküler mekanizmanın RAR α 19 yoluyla olduğunu düşündürmektedir. RAR α 'nın fonksiyonunun kaybı normal granülositik farklılaşma ile ilişkili hücre ölümünü inhibe eder, bu sebeple RAR α tümör baskılayıcı gendir. Genin translokasyonları ikinci vuruşu sağlayarak lösemi gelişimine neden olur (24). PML'nin fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır. Transgenik farelerde PML-RAR α anlatımı doğumdan birkaç ay sonra promyelositik lösemi gelişimine neden olur .Bu durum, lösemi gelişimi için ikinci bir mutasyon gerektiğini göstermektedir. Tedavide kullanılan ATRA'nın etkisi, ilacın PML-RAR α füzyon proteinine bağlanarak

hematopoetik farklılaşma sürecinde görülen blokajı kısmende olsa kaldırmasıyla olmaktadır (19).

2.4.3. Homeobox (HOX) gen ailesi üyeleri

Oldukça geniş olan Homeobox (HOX) ailesi üyesi transkripsiyon faktörleri hematopoetik gelişimde oldukça önemli rol oynamaktadır. HOX genleri 61 aminoasitlik korunmuş DNA bağlanma bölgesi içeren proteinlerdir. Kromatin yeniden modellenmesinde (“*chromatin remodelling*”) rol oynayan HOX genlerinin düzenleyicisi olan MLL genindeki mutasyonlarda lösemi gelişimine neden olmaktadır (19).

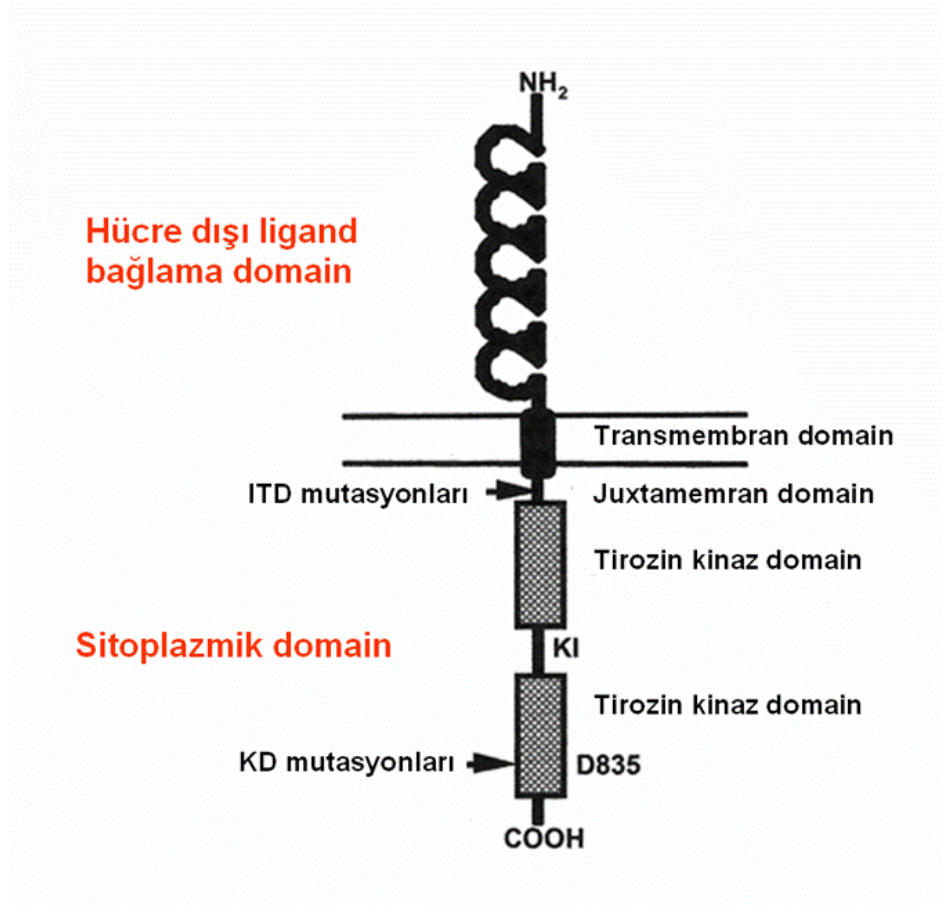
2.4.4. AML’de sık görülen mutasyonlar

2.4.4.1. FLT3 geni mutasyonları

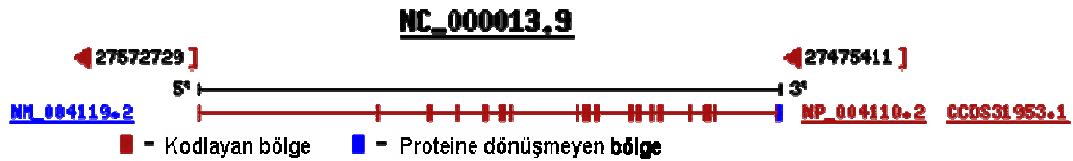
Fms benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3) geni reseptör tirozin kinaz sınıf 3 ailesi üyesidir. Reseptör, 5 Ig benzeri bölge içeren bir hücre dışı bölge, bir transmembran bölge ve bir kinaz bölgesiyle ikiye ayrılmış sitoplazmik bir kinaz bölgesinden oluşur. Reseptör, fms benzeri tirozin kinaz3 ligandının reseptörün hücre dışı bölgeye bağlanmasıyla aktive olur. Bu hücre dışı bölge plazma membranında homodimer oluşumunu uyarak reseptörün otofosforilasyonuna yol açar. Aktive olan reseptör kinaz birçok sitoplazmik efektör molekülü fosforilleyerek aktive eder. Bu efektörler kemik iliğindeki hematopoetik hücrelerin apoptozu, çoğalma ve farklılaşmasında gerekli olan yollarda görev alır. Hematopoezde merkezi bir rol oynayan FLT3, kromozom 13q12 bölgesinde 67 kilobaz büyüklüğünde 24 ekzonlu bir gendir. Ürünü 993 aminoasitlik bir protein olan FLT3 hematopoetik kök hücrelerde ve ayrıca insan lösemi veya lenfoma hücre hatlarında da eksprese edilmektedir. Bu reseptörün sürekli aktivasyonu sonuçlanan mutasyonlar AML ve ALL’ye neden olur. FLT3 mutasyonu gen üzerindeki ilk tirozin kinaz bölgesi içerisindeki jukstamembran bölgede meydana gelir (43,44). Bu duplike olmuş diziler çoğunlukla ekzon 11’ de ve bazen de intron 11’de bulunur (6,45,46,47,48,49,50).

AML olgularının büyük bir bölümünde FLT3 ve cKIT geninde aktive edici mutasyonların varlığı bilinmektedir. FLT3 geni mutasyonları AML’de en sık görülen mutasyonlardır (yaklaşık %25-30). Bu oran çocuklar arasında daha düşüktür (yaklaşık %5-22) (43). Olguların yaklaşık %20-25’ inde genin jukstamembran bölgesinin duplikasyonu (ITD) genin aktive olmasına neden olurken bu mutasyonla genin

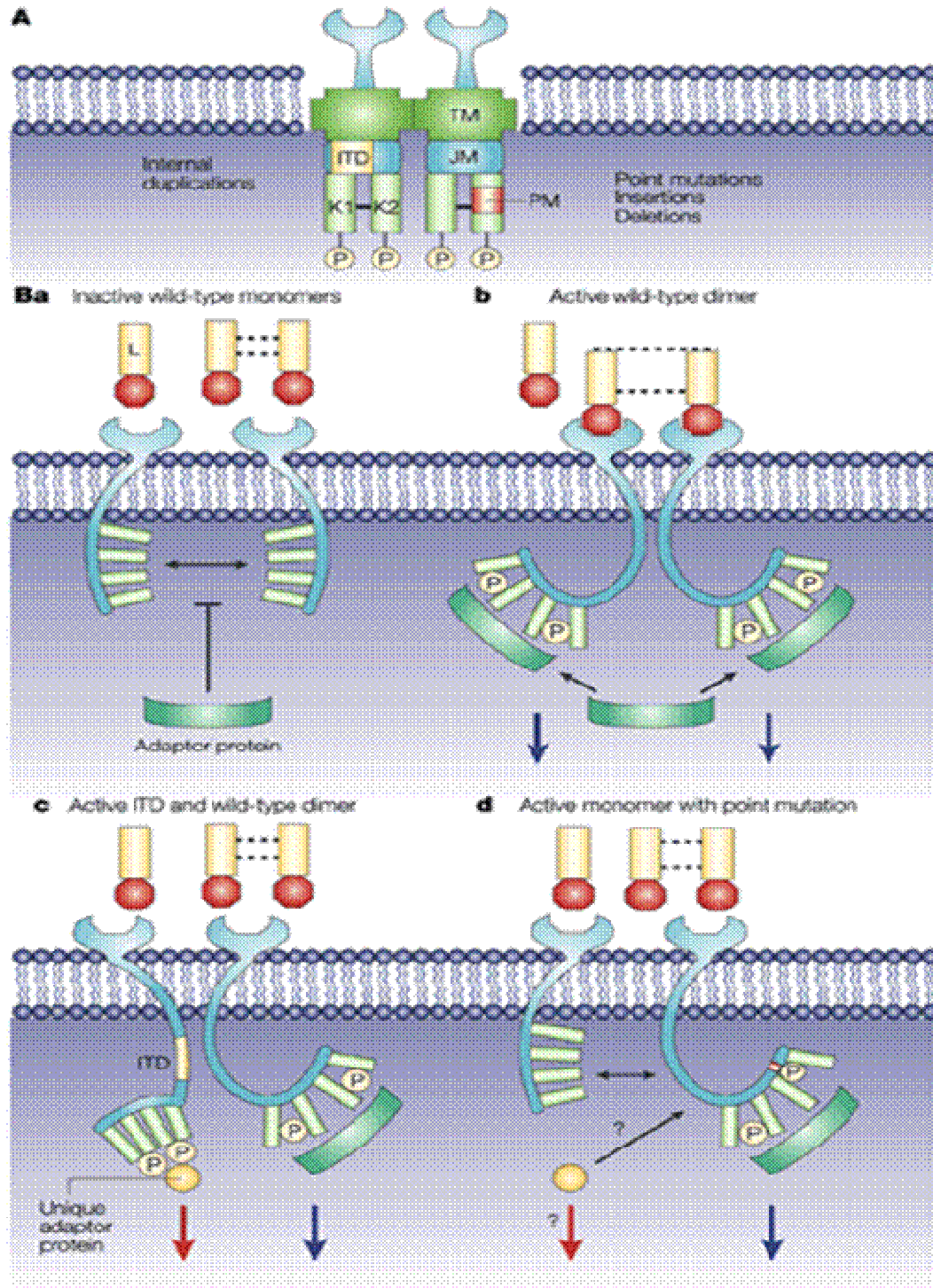
otoinhibitör bölgesinin hasara uğradığı ve kinaz aktivitesinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (5). AML vakalarının yaklaşık %5-10'unda genin D835. pozisyonunda “aktive edici loop” bölgesinde oluşan nokta mutasyonda tirozin aktivitesine neden olabilmektedir. FLT3 geni mutasyonları transkripsiyon faktörlerinin kromozomal translokasyonları ile birlikte de görülebilmektedir (45). FLT3 anomalisi olan hastalar daha yüksek nüks riski ve daha düşük sağ kalım oranına sahiptirler. Ayrıca mutant/normal FLT3 gen oranlarının sağ kalımla ilişkili bir takip kriteri olarak kullanılabileceği de son zamanlarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (43).



Şekil 2-5: FLT3 Reseptör Yapısı



Şekil 2-6: FLT3 geninin genomik yapısı



Şekil 2-7: FLT3-ITD Mutasyonlarının Aktivasyonu

2.4.4.2. RAS gen ailesi mutasyonları

AML ve MDS’de görülen mutasyonlardır. Genelde N ve K RAS genlerinin 12, 13 ya da 61. kodonlarında görülür. Aktive edici mutasyon varlığı kötü prognostik belirteç olarak bildirilmektedir.

2.4.4.3. CEBP α , GATA1, AML1 mutasyonları

CEBP α geni lösin zipper transkripsiyon faktörleri ailesinden, normal myeloid gelişim için gerekli, granülositik farklılaşmada önemli olan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu gene ait mutasyonlar daha çok FAB-M2 tipindeki AML olgularında bildirilmiştir (5,51).

AML’ de CEBP α ’nın monoallelik ve biallelik mutasyonları bulunmustur. Monoallelik mutasyonlar N terminal bölgesindedir ve proteinin daha sonraki ATG’den başlamasına sebep olur. Bu genin ekspresyonu hematopoetik hücrelerde farklılaşma süresince sabit kalır. Bu da baskın negatif etkisinin (dominant negatif etki) türe özel olduğunu gösterir. Mutant proteinin normal CEBP α ile heterodimerizasyonu henüz gösterilmemiştir. Son çalışmalar CEBP α geni mutasyonlarının iyi prognostik belirteç olduğu yönündedir (52).

GATA1 geni GATA transkripsiyon faktörleri ailesindendir ve GATA1 mutasyonları özellikle akut megakaryoblastik lösemiler (FAB-M7) ve trizomi21-Down Sendromu gelişen lösemilerde görülmektedir. DNA üzerinde (A/T)GATA(A/G) dizisine bağlandıkları için bu isim verilmiştir (53).

2.4.4.4. NPM1 mutasyonları

Nükleofosmin1 (NPM1) ekzon 12’de kromozom 5q35 bölgesinde lokalize, nüklear ve çok fonksiyonlu bir fosfoproteindir ve son zamanlarda yapılan çalışmalarla de novo AML olgularının yaklaşık %35’inde bu mutasyonun varlığı bildirilmektedir (54). NPM1, ribozomal proteinlerin nüklear membrandan transportunu sağlayan şaperon proteinler olarak işlev görür ve belirgin bir şekilde nukleolusta lokalizedir. NPM1 mutasyonları özellikle normal karyotipe sahip AML olgularında gözlenmektedir (54,55). Normal karyotipe sahip AML vakalarında yapılan moleküler analizler bilinen mutasyonların belirgin olarak heterojen bir altgruba ait olduğunu göstermektedir. Bunlar transkripsiyon faktörleri tarafından kodlanan etkilenmiş gen mutasyonlarını içerir (56,57).

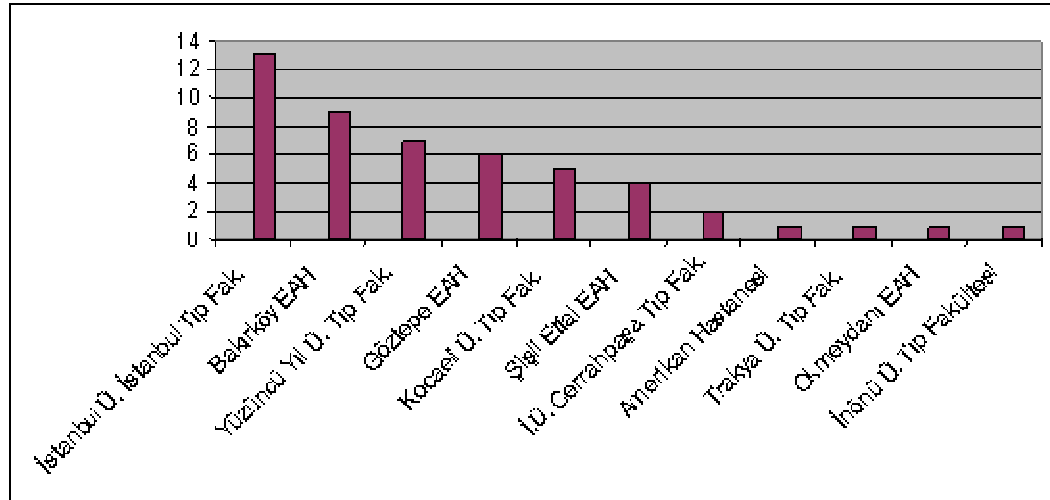
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta örneklerinin toplanması

Yeni tanı almış 50 çocukluk çağı akut myeloid lösemi hastasına ait kan/kemik iliği örneklerinde çalışma yapıldı. Örnek alımı sırasında hastalara ve / veya ebeveynlerine, yapılacak çalışmayla ilgili bilgilerin sunulduğu bilgilendirilmiş onay formu imzalatıldı. 11 ayrı merkezden İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'na gelen kan veya kemik iliği örneklerine ait beyaz hücre örnekleri izole edilerek denatürasyon solüsyonu (Solüsyon D guanidyum tiosiyonat ve beta merkaptotanol içeren denatüre edici solüsyon) içerisinde -80 derecede çalışma dönemine kadar saklandı.

Tablo 3.1-1: Örneklerin geliş yerleri ve oranı



Tablo 3.1-2: Olguların Klinik Özellikleri

Özellikler	Olgu Sayısı (n)	%
<u>Yaş (Yıl)</u>		
0-5	15	31.3
5-10	13	22.9
10-18	22	45.8
<u>Cinsiyet</u>		
Erkek	28	56.0
Kız	22	44.0
<u>Lökosit($\times 10^9/L$)</u>		
≤ 50	39	78.0
> 50	9	18.0
Bilinmiyor	2	4.0
<u>Hemoglobin (g/dl)</u>		
≤ 10	31	62.0
> 10	17	34.0
Bilinmiyor	2	4.0
<u>Trombosit ($\times 10^9/L$)</u>		
≤ 50	21	42.0
> 50	26	52.0
Bilinmiyor	3	6.0
<u>Blast oranı(%)</u>		
≤ 80	31	62.0
> 80	13	26.0
Bilinmiyor	6	12.0
<u>FAB Altıtipi</u>		
M0	3	6.0
M1	8	16.0
M2	14	28.0
M3	12	24.0
M4	3	6.0
M5	5	10.0
M7	1	2.0
Bilinmiyor	4	8.0

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

- Agaroz (Sigma, A-6013)
- Amonyum asetat (Sigma A-1542)
- Beta-merkapto-etanol (Sigma, M7522)
- Etil alkol (Merc)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma, 9884)
- Etidyum Bromid (Sigma, E1510)
- Hidroklorik asit (Sigma, H1758)
- Hidrojen peroksit (Sigma, 349887)
- İzopropanol (Sigma, 19516)
- Ksilen siyanol (Sigma, X4126)
- PBS (Fosfat tampon çözeltisi)
- Proteinaz K (Sigma, P2308)
- Sodyum Dedodesil Sülfat (Sigma, L4390)
- Sodyum Klorid (Sigma, S3014)
- Tripan mavisi (Gibco, 15250061)
- Tris Baz (BioChemika, 93362)

3.1.3. Kullanılan kitler

- QiaAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, GmbH, D-40724 Hilden, Almanya)
- IDPURE Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Id Labs inc., Biotechnology, Kanada)
- Light Cycler FastStart DNA Master Hyprobe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)
- Magna Pure Compact Nucleic acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)

- LightMix for the detection of AML1-ETO t(8;21), (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Almanya)
- LightMix for the detection of t(15;17), PML-RAR (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Almanya)
- LightMix for the detection of inv(16) (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Almanya)

3.1.4. Kullanılan restriksiyon enzimleri

- EcoRV (15U/μl) (TaKaRa, GmbH, Almanya)

3.1.5. Kullanılan markırlar

- Puc Mix Marker, 8 (Fermentas, GmbH, Litvanya)

3.1.6. Kullanılan cihazlar

- Buzdolabı ve Derin Dondurucu (+ 4 oC ve -20 oC , -80°C Forma Scientific)
- Çalkalayıcı (Belly dancer) (Stovall life science)
- Çeker Ocak (Kermanlar)
- Derin dondurucu -80 derece (Heraeus Sepatech)
- DNA ve RNA izolasyon cihazı (Magna Pure,Roche)
- Distile su cihazı (Millipore)
- Elektroforez sistemi (Thermo)
- Elektroforez sistemi (Fisher Biotech FB-SB710)
- Etüv (Heraeus) (Nüve)
- Güç kaynağı (Stratagene)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Hibridizasyon fırını (Techne)
- Isı bloğu (Fisher scientific model111004)
- Light Cycler RT- PZR cihazı (Roche)

- Masaüstü mini santrifüj (Eppendorf) (Hettich)
- Otomatik pipetler (Gilson) (Eppendorf)(Thermo)
- PZR cihazı (MJ Research PTC200, Eppendorf, Techne 512, BioRad)
- PH metre (Corning)
- Soğutmalı santrifüj (Heraus)
- Spektrofotometre (NanoDrop)
- CCD kamera - bilgisayar donanımı Bio Rad -Universal Hood II-SN
- Su banyoları (Fisher scientific)
- Laminar Flow kabin (Hepa filtreli) (Thermo, Scientific)
- Elektronik hücre sayıcı (Bechman Coulture)
- İnkübatörler (37°C %5-10 CO₂) (Forma scientific)
- Masaüstü mini Santrifüj (Hettich)

3.1.7. Kullanılan tampon solüsyonları, çözeltiler

- **Eritrosit Parçalama Çözeltisi (RBL):**

8.74 g NH₄CL

1 g KHCO₃

0.0372 g Na₂EDTA

1 litre distile suda çözüldü. pH 'sı 7.4 olarak ayarlandı. Ayarlamada HCL ve NaOH çözeltileri kullanıldı. Otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

- **Lökosit Parçalama Çözeltisi (WBL):**

8 ml 5 M NaCl

20 ml 0.5 M Na₂EDTA

Steril distile su ile 400 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

- **Amonyum Asetat (9M NH₄Ac) :**

732.26 g NH₄Ac

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp, sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirildi ve oda ısısında saklandı.

- **Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) %10 (pH 7.2)**

10 g SDS steril distile su ile 100 ml'de çözüldü. pH'ı HCl ile 7.2'ye ayarlandı. Sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirildi ve oda ısısında saklandı.

- **Gey's Solüsyonu:**

8.291 g NH₄Cl

1.001 g KHCO₃

Steril distile su ile 1000 ml'de çözüldü.

- **EDTA (0.5 M)**

86.1 g EDTA

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı. Oda ısısında saklandı.

- **Proteinaz K:**

0.02 g. Proteiaz K 1 ml steril distile su ile çözüldü ve -20 °C'de saklandı.

- **Tris EDTA (TE) pH: 8.0:**

10 ml 1 M Tris-HCL (pH 8.0)

20 ml 0.5 M EDTA

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

- **Tris-HCL pH 8.0:**

121.1 g Tris-HCL

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. pH'ı HCl ile 8.0'a ayarlandı. Otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

- **6X Agaroz Jel Yükleme Tamponu**

2.5 mg Bromfenol mavisi 10ml distile suda çözüldü. Oda ısısında saklandı.

- **50 X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA)**

242 g Tris baz

57,1 g Glasiyal asetik asit

100 ml EDTA (0.5M)

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

- **5 X TBE (Tris baz-Borik asit-EDTA)**

60,57 g Tris baz

30,90 g Borik asit

40 ml EDTA (0.5M)

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

- **Tripan mavisi (0.04%)**

0.4 gr tripan mavisi

0.81 gr NaCl

0.06 gr K₂HPO₄

PBS ile 1000 ml ye tamamlandı. Filtre ile sterilize edip, +4°C de saklandı.

- **%70'lik Etil Alkol:**

70 ml etil alkol

Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- **Denatüre Edici Solüsyon – SOL D :**

25 g Guanidium thiocyanate

1.25 ml Sodyum sitrat (ph=7.0)

%5'lik N-Lauryl sarcosyl

350 µl 0.1 M 2 Merkaptoetanol

Steril distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. DNA izolasyonu

- Gelen kan veya kemik iliği örneği falkon tüplere alındı ve üzerine 3 katı kadar eritrosit parçalama solüsyonu (RBL) eklendi.
- +4 °C’de 20 dakika bekletildi.
- +4 °C’de 1500 rpm hızla 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım döküldü ve pellet elle vurmak suretiyle homojenize edildi.
- Pellet üzerine baştaki hacmin 2 katı kadar RBL eklendi ve +4 °C’de 1500 rpm hızla 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım döküldü ve pellet homojenize edilerek çözüldü.
- Üzerine 10 ml Lökosit Parçalama Solüsyonu (WBL), 50 µl Proteinaz K, 500 µl %10 SDS eklenerek 56 °C’deki su banyosunda gece boyu bekletildi.
- Daha sonra üzerine 3.7 ml 9 M Amonyum Asetat (NH₄Ac) ilave edilerek hafifçe karıştırıldı.
- +4 °C’de 4500 rpm hızla 20-30 dakika santrifüj edildi.
- DNA içeren üst kısım temiz ependorf tüplere alındı çökelti atıldı.
- Temiz falkon tüpe alınan üst kısmın üzerine 2 katı hacimdeki %99’luk etil alkol eklendi. Alkolün eklenmesiyle birlikte DNA yüzeye çıkmaya başlar. Üstte toplanan DNA bir pipet ucuyla yakalandı ve 1,5 ml’lik ependorf tüpe alındı.
- DNA %70’lik etil alkolde yıkandı ve oda ısısında kurutuldu.
- Üzerine Tris EDTA (TE) tamponu eklendi. DNA çözündürüldü.
- DNA kalitesinin belirlenmesi için NanoDrop spektrofotometrede konsantrasyon ölçümleri yapıldı.
- DNA’lar -20°C’de saklandı.

DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

- DNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ışığı soğurma (OD) ölçümü yapıldı. 260nm'deki OD/280 nm'deki OD oranı hesaplanarak DNA'nın saflık derecesi bulundu.

Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit ile DNA izolasyonu:

- Gelen kan/kemik iliği örnekleri kit içerisinde çıkan kartuşlara konuldu.
- Kartuş üzerindeki barkod cihazın okuma penceresinden okutuldu.
- Kontroller ve gerekli solüsyonlar cihaza yerleştirildikten sonra cihazın prosedürüne uygun olarak DNA izolasyonları yapıldı.

3.2.2. RNA izolasyonu

- Gelen kan/kemik iliği örneklerinden QiaAmp RNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen, GmbH, D-40724 Hilden, Almanya) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Çalışma buz üzerinde yapıldı.
- 5×10^6 hücre alındı ve 500 µl denatürasyon solüsyonu (Sol D) içerisinde homojenize edildi.
- Homojenize olan örnekler eşit hacimde %70'lik etil alkol ile karıştırıldı ve filtreli tüpe aktarıldı.
- 14.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilerek, karışım filtreden geçirildi. RNA'nın filtreye bağlanması sağlandı ve dibe çöken sıvı atıldı.
- 700µl RW1 olarak adlandırılan solüsyon ilave edildi ve 14.000rpm'de 15 saniye santrifüj edilerek, çöken sıvı atıldı
- Filtrenin üzerine 500µl RPE olarak adlandırılan yıkama solüsyonu eklenerek 14.000rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.Çöken sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
- Filtrenin üzerine 50 µl RNaz olmayan steril su eklenerek, RNA çözüldü.
- Filtre temiz tüpe alındı. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek RNA'nın çökmesi sağlandı. Elde edilen RNA -80°C'de saklandı.

RNA Konsantrasyonunun Ölçümü:

- İzole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop kullanılarak ölçüldü.
- RNA Konsantrasyonu= 50(sulandırma oranı)X 40(sabit)XOD260=ng / μ l
- RNA örnekleri aynı zamanda %1 agaroz jelde yürütülerek, degrade olup olmadığı ve miktarı kontrol edildi. (Şekil: 3-1)



Şekil 3-1: Total RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü

cDNA Eldesi:

cDNA eldesi için total RNA örnekleri eşit konsantrasyona getirildi ve aşağıdaki karışım hazırlandı. (Tablo: 3.2-1)

Tablo 3.2-1: cDNA sentezi PZR içeriği

	<u>Miktar</u>
• dH ₂ O	11 μ l
• total RNA	10 μ l (1 μ g/1 μ l)
• Random primer (10 μ M)	1 μ l (0.3 μ g/1 μ l)
Toplam:	22 μ l
Bu karışım 5 dakika 70 °C’de bekletildi ve ikinci karışım ilave edilene kadar buzda bekletildi.	
• dH ₂ O	3.5 μ l
• 5 X RT Buffer	8 μ l
• dNTP mix (10 mM)	4 μ l
• RNase inhibitor (20 u/ μ l)	1 μ l
• Reverse transkriptaz (200 u/ μ l)	1.5 μ l
Toplam:	18 μ l

Hazırlanan bu karışım ilk karışıma eklendi. 10 dakika 25°C’de, 1 saat 42°C’de, 10 dakika 70°C’de bekletildi.

Kontrol geni olarak β -globin geni kullanılarak PZR yapıldı ve cDNA’lar kontrol edildi.
(Tablo: 3.2-2)

Tablo 3.2-2: Beta globin geni kontrol PZR içeriği

	<u>Miktar</u>
• dH ₂ O	33.7 μ l
• Buffer	5 μ l
• MgCl ₂	3 μ l
• dNTP (10mm)	4 μ l
• Primer (F) 10 pmol	1 μ l
• Primer (R) 10 pmol	1 μ l
• Taq polimeraz 2.5 U	0.3 μ l
• <u>cDNA</u>	<u>2 μl</u>
Toplam	50 μl

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

- Hazırlanacak jelin yoğunluğu yürütülecek DNA dizisinin uzunluğuna göre belirlendi.
- Uygun miktardaki toz agaroz 1X TAE solüsyonu içerisine eklenerek mikrodalga fırında ısıtıldı ve çözünmesi sağlandı.
- Çeker ocak altında, üzerine 2 μ l etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Jel kabına hava kabarcığı bırakmayacak şekilde döküldü ve örnek sayısına uygun taramalar yerleştirilerek katılaşması için beklendi.

- Katılaşan jel, içerisinde 1X TAE solüsyonu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Taraklar yavaşça çıkartılarak yüklemeler yapıldı.
- Örnekler yükleme boyası ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.
- Uygun markırda yüklendikten sonra 60-90 volt elektrik akımında yürütüldü
- Bu işlemin sonunda jelde ilerlemiş olan ürünler ultraviyole ışığı altında CCD kamera ile görüntülendi.

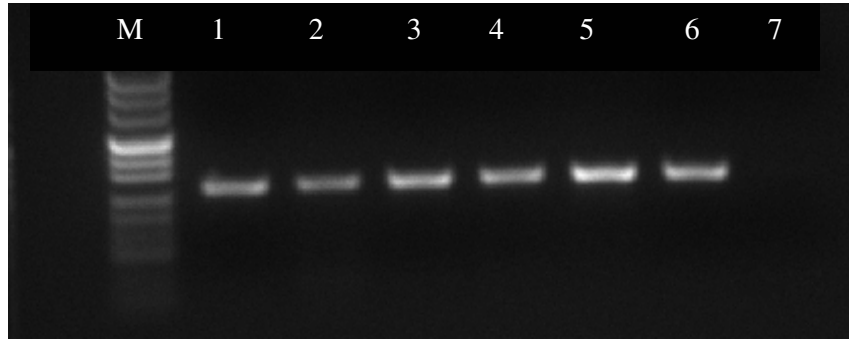
β-Globin Geni primerleri:

Forward : 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

Reverse : 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

PZR Ürün boyu : 345 bp

PZR sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde yürütüldü. (Şekil: 3-2)



Şekil 3-2: Beta globin kontrol PZR'ı jel elektroforezi görüntüsü: M: Markır (puc 8), 1,2,3,4,5,6 : Örnekler. 7: Negatif

3.2.4. FLT3 geni ITD mutasyon bölgesinin PZR ile çoğaltılması

FLT3 geni ITD bölgesi PZR'ı final volümde 50 µl olacak şekilde ve 1µl DNA, primerlerin herbiri 10 pmol, 10 mmol dNTP, 2.5 U Taq DNA polimeraz (fermentas), içinde 10 mmol/l Tris-HCL (pH:8.3) 50mmol/l KCL ve 1.5 mmol/l MgCl₂ olan buffer kullanılarak hazırlandı. (Tablo: 3.2-3)

Tablo 3.2-3: FLT3 geni ITD mutasyon bölgesi PZR içeriği

	<u>Miktar</u>
• dH ₂ O	33.9 µl
• Buffer	5 µl
• MgCl ₂	3 µl
• dNTP (10mm)	2 µl
• Primer (F) 10 pmol	2.5 µl
• Primer (R) 10 pmol	2.5 µl
• Taq polimeraz 2.5 U	0.1 µl
• <u>DNA</u>	<u>1 µl</u>
Toplam	50 µl

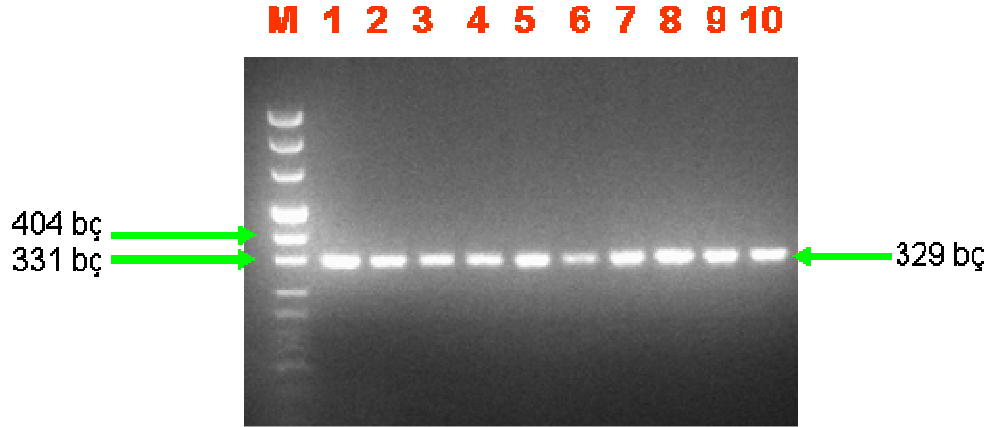
FLT3 Geni ITD Primerleri :

Forward : 5' GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC 3'

Reverse : 5' CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC 3'

PZR ürün boyu : 329 bp

PZR sonrası elde edilen ürünler %3'lük agaroz jelde yürütüldü. (Şekil : 3-3)



**Şekil 3-3: FLT3 geni ITD PZR jel elektroforezi görüntüsü: M: Markır (Puc 8).
1,2,3,4,5,6,7,8,9,10: Örnekler.**

3.2.5. FLT3 geni D835 mutasyon bölgesinin PZR ile çoğaltılması

FLT3 geni D835 bölgesi PZR'ı final volümde 50 µl olacak şekilde ve 1µl DNA, primerlerin herbiri 10 pmol, 10 mmol dNTP , 2.5 U Taq DNA polimeraz (fermentas) , içinde 10 mmol/l Tris-HCL(pH:8.3) 50mmol/l KCL ve 1.5 mmol/l MgCl₂ olan buffer kullanılarak hazırlandı. (Tablo :3.2-4)

Tablo 3.2-4: FLT3 geni D835 nokta mutasyonu PZR içeriği

	<u>Miktar</u>
• dH ₂ O	33.9 µl
• Buffer	5 µl
• MgCl ₂	3 µl
• dNTP (10mm)	2 µl
• Primer (F) 10 pmol	2.5 µl
• Primer (R) 10 pmol	2.5 µl
• Taq polimeraz 2.5 U	0.1 µl
• <u>DNA</u>	<u>1 µl</u>
Toplam	50 µl

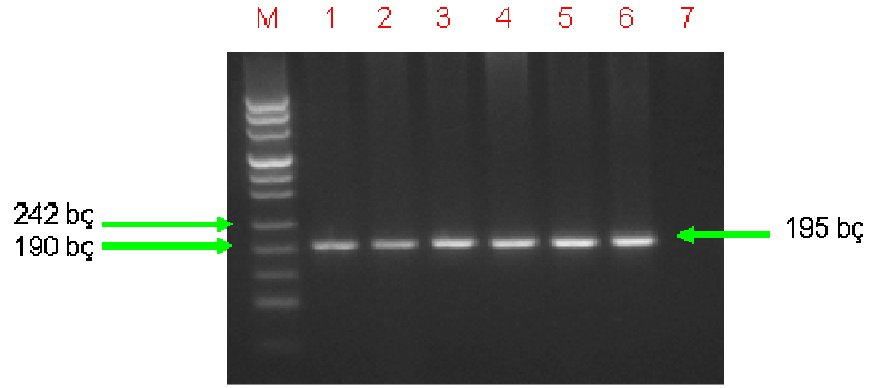
PZR sonrası elde edilen ürünler %3'lük agaroz jelde yürütüldü.

FLT3 Geni D835 Primerleri :

Forward : 5' CCA GGA ACG TGC TTG TCA 3'

Reverse : 5' TCA AAA ATG CAC CAC AGT GAG 3'

PZR ürün boyu : 195 bç



Şekil 3-4: FLT3 geni D835 PZR jel elektroforezi görüntüsü. M: Markır (Puc 8). 1,2,3,4,5,6: Örnekler. 7: Negatif

Tablo 3.2-5: FLT3 geni PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön denatürasyon	95°C	12 dakika
Denatürasyon	94°C	30 saniye
Primer bağlanması	59°C	1 dakika
Zincir uzaması	72°C	2 dakika
Son uzama	72°C	10 dakika

35 döngü

3.2.6. FLT3 geni PZR ürünlerinin pürifikasyonu

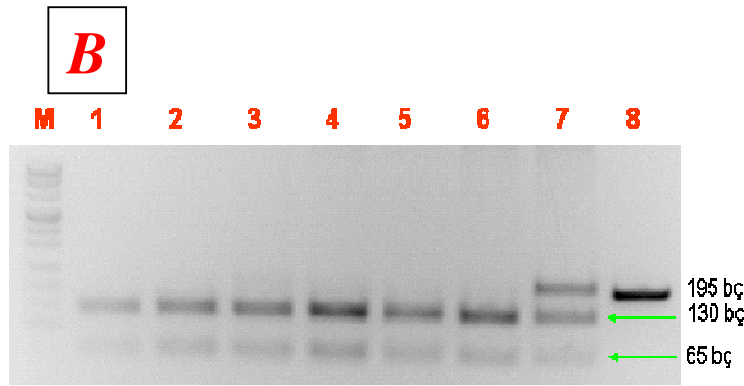
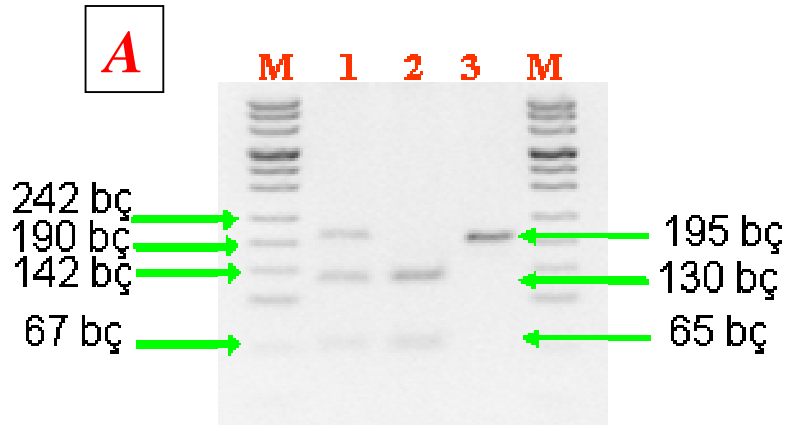
- PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra, aşağıda belirtildiği gibi jelden izole edildi:
- DNA bandı kesilerek, jelden çıkartıldı.
- Tartılarak, üzerine 3 katı hacimde Binding Buffer II çözeltisi konuldu ve 56°C'de, hafifçe sallanarak 10 dakika bekletildi.
- Karışım filtre (spin column) üzerine alınarak 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpü değiştirilerek filtre üzerine 500 µl Wash Solution adlı çözelti eklendi.
- 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpü değiştirilerek filtre üzerine 500 µl Wash Solution adlı çözelti eklendi.
- 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtre 1.5 ml'lik temiz bir ependorf tüpünün üzerine yerleştirildi.
- Üzerine 50 µl Elution Buffer adlı çözelti eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çözünerek, filtreden tüpe geçmesi sağlandı.

3.2.7. Restriksiyon enzim kesimi ile mutasyon taraması

PZR ürünleri 20 µl final hacimde ECo RV restriksiyon enzimi ile kesildi. Enzim kesimi için 2.5 ünite enzim kullanıldı. (Tablo: 3.2-6) 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Kesim sonrası ürünler uygun büyüklükteki DNA markır ile beraber %3'lük agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek görüntülendi.

Tablo 3.2-6: FLT3 geni D835 enzim kesimi içeriği

	<u>Miktar</u>	
dH ₂ O	5.5 µl	
10X Buffer	2 µl	(37°C' de 4 saat)
Eco RV restriksiyon enzimi	2.5 µl	
PZR ürünü	10 µl	
Toplam	20 µl	



Şekil 3-5:
FLT3 D835 enzim kesimi. (A)- M:
Markır, 1:
Heterozigot,
2: Normal Tip, 3:
Kesilmemiş örnek.
(B) - M: Markır.
1,6: Normal Tip,
7: Heterozigot, 8:
Kesilmemiş örnek

PZR sonrası jelde mutasyon görülen örnekler pürifikasyon kiti kullanılarak pürifiye edildi ve kontrol için dizilemeye gönderildi. Dizileme sonuçları *Chromas Version 2.33* programı kullanılarak analiz edildi.

t(15;17) translokasyonunun tespiti için Light Cycler FastStart DNA Master Hyprobe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kit ve LightMix for the detection of t(15;17), PML-RAR α (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Almanya) primer-prob seti kullanılarak aşağıdaki karışım hazırlandı. (Tablo: 3.2-7)

Tablo 3.2-7: t(15;17) PZR içeriği

	<u>Miktar</u>
dH ₂ O	6.6 ul
MgCl (25mM)	2.4 ul
Reaksiyon mix	4 ul
Fast start master mix	2 ul
cDNA	5 ul
<u>Toplam</u>	<u>20 ul</u>

Uygun koşullarda eş zamanlı PZR yapıldı. (Tablo: 3.2-8)

Tablo 3.2-8: t(15;17) PZR koşulları

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>
Ön Denatürasyon	95 °C	10 dk.
Denatürasyon	95 °C	5 saniye
Primer Bağlanması	59 °C	15 saniye
Zincir Uzaması	72 °C	10 saniye
Son Uzama	72 °C	10 dk

40 döngü

t(8;21) translokasyonunun tespiti için Light Cycler FastStart DNA Master Hyprobe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kit ve LightMix for the detection of t(8;21), AML1-ETO (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Almanya) primer-prob seti kullanılarak aşağıdaki karışım hazırlandı. (Tablo: 3.2-9)

Tablo 3.2-9: t(8;21) PZR içeriği

	<u>Miktar</u>
dH ₂ O	6.6 ul
MgCl (25mM)	2.4 ul
Reaksiyon mix	4 ul
Fast start master mix	2 ul
cDNA	5 ul
<u>Toplam</u>	<u>20 ul</u>

Uygun koşullarda eş zamanlı PZR yapıldı. (Tablo: 3.2-10)

Tablo 3.2-10: t(8;21) PZR koşulları

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>	
Ön Denatürasyon	95 °C	10 dk	
Denatürasyon	95 °C	5 saniye	40 döngü
Primer Bağlanması	59 °C	15 saniye	
Zincir Uzaması	72 °C	10 saniye	
Son Uzama	72 °C	10 dk	

İnv(16) tespiti için Light Cycler FastStart DNA Master Hyprobe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kit ve LightMix for the detection of İnv(16), CFBF-MYH11 (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Almanya) primer-prob seti kullanılarak aşağıdaki karışım hazırlandı. (Tablo: 3.2-11)

Tablo 3.2-11: İnv(16) PZR içeriği

	<u>Miktar</u>
dH ₂ O	6.6 ul
MgCl (25mM)	2.4 ul
Reaksiyon mix	4 ul
Fast start master mix	2 ul
cDNA	5 ul
<u>Toplam</u>	<u>20 ul</u>

Uygun koşullarda eş zamanlı PZR yapıldı. (Tablo: 3.2-12)

Tablo 3.2-12: İnv(16) PZR koşulları

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>
Ön Denatürasyon	95 °C	10 dk.
Denatürasyon	95 °C	5 saniye
Primer Bağlanması	59 °C	15 saniye
Zincir Uzaması	72 °C	10 saniye
Son Uzama	72 °C	10 dk

40 döngü

3.2.8. İstatistik Analiz

Hasta verileri (cinsiyet, yaş, lökosit, hemoglobin, trombosit, blast oranı) ile, t(15;17), t(8;21) ve inv(16) kromozomal değişimlerinin ve FLT3 genindeki mutasyonların varlığı arasındaki olası ilişkiler, *SPSS Version 12.0* programı kullanılarak istatistiksel olarak incelendi. İstatistik analizde *Pearson Chi-Square* ve *Fisher's exact* testleri kullanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

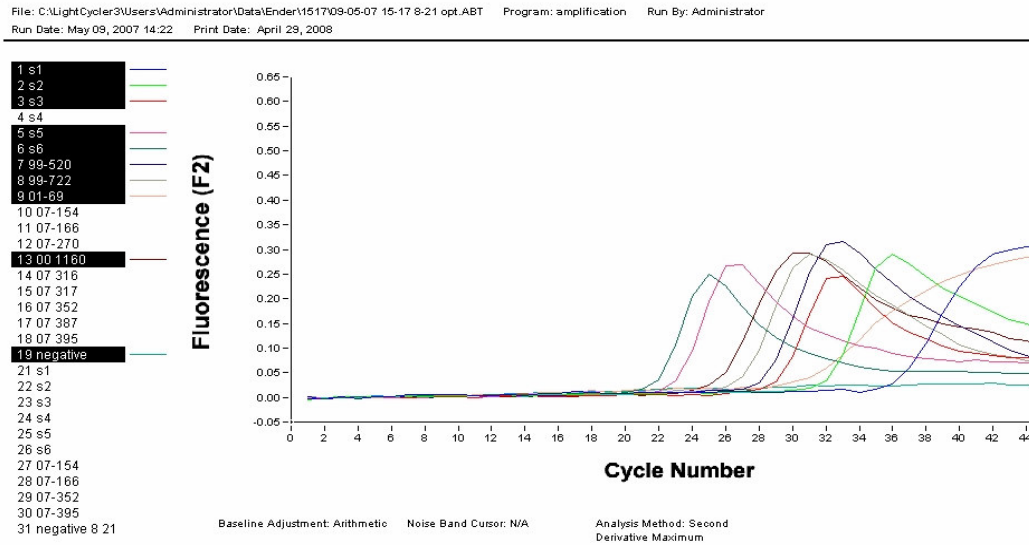
4. BULGULAR

4.1. AML hastalarında kromozomal değişiklikler

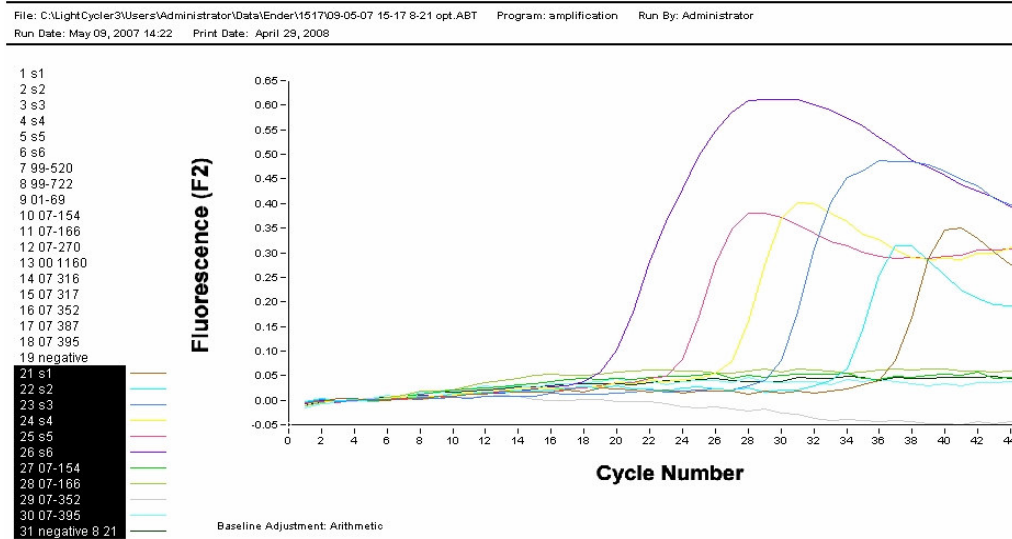
Bu çalışmada, yeni tanı almış, çocukluk çağı AML hastalarında oluşan kromozomal değişiklikler ve FLT3 geni mutasyonları ile bu değişikliklerin hastalığın takip ve tedavisinde etkisinin varlığının araştırılması amaçlandı. Çalışma grubu, 0-18 yaş (ort.:8.42±5.24) arası 28 erkek (%56) ve 22 kız (%44) olmak üzere toplam 50 hastadan oluştu. Hastaların lökosit sayısı 890-260000 /mm³ ort.: 30394.17 ±57255.86, trombosit sayısı 2X10⁹-291X10⁹/L ort.: 83851.06±76349.87, hemoglobin değeri 3.4-14.3 g/dl ort.: 3.4±2.67, kemik iliği blast oranı%12-100 ort.: %60.86±22.9 olarak bulundu. Olgulardan yeni tanı döneminde kemik iliği materyali alınarak RNA ve DNA izolasyonları yapıldıktan sonra cDNA ve DNA bankası oluşturuldu. Kontrol için β -globin geni referans olarak kullanılarak kontrol PZR'ı yapıldı ve RNA'ların varlığı ve kalitesi agaroz jelde görüntülendi. Çalışma grubunu oluşturan hastalar FAB sınıflamasına ve tanı dönemimindeki, cinsiyet, yaş, lökosit, hemoglobin, trombosit ve blast oranına göre değerlendirilerek gruplara ayrıldı (Tablo:4.1-1). Toplam 50 olgu analiz edildi. 4 olguda t(15;17) (Şekil:4.1), 12 olguda t(8;21), (Şekil:4.2), 3 olguda inv(16) (Şekil:4.3) kromozomal değişiklikleri tespit edildi. t(15;17) translokasyonu görülen 4 hastanın dördü de M3 alt grubuna dahildi. t(8;21) translokasyonu görülen 12 hastanın 9'u M2, ikisi M1, biri de M4 alt grubuna, inv(16) görülen 3 hastadan 1'i M0, 1'i M1, 1'ide M5 alt grubuna dahildi. M6 alt grubuna dahil hiç hasta yoktu. Bu sebeple FAB-M6 alt grubu istatistiksel değerlendirme kapsamına alınmadı. Hemoglobin değeri hastaların klinik özellikleri arasında anlamlı bulundu (***P=0.013**). FAB-M2 alt grubu ile t(8;21) translokasyonu arasında (***P<0.0001**), FAB-M3 alt grubu ile t(15;17) translokasyonu arasında (***P=0.007**) anlamlı ilişki bulundu. Ayrıca inv(16) ile FAB M0, FAB M1 ve FAB M5 grupları arasında anlamlı ilişki bulundu (***P= 0.001**, ***P=0.003**, ***P=0.002**). (Tablo:4.1-2, 4.1-3, 4.1-4).

Tablo 4.1-1: Yeni tanı AML hastalarındaki klinik özellikler

Özellikler	FLT3	Negatif	FLT3 Pozitif	P değeri
	n	(%)	n	(%)
Toplam Olgu sayısı	48		2	
<u>Yaş (Yıl)</u>				0.307
0-5	15	(31.3)		
5-10	11	(22.9)	2	(100)
10-18	22	(45.8)		
<u>Cinsiyet</u>				0.351
Erkek	26	(54.2)	2	(100)
Kız	22	(45.8)		
<u>Lökosit($\times 10^9/L$)</u>				0.781
≤ 50	38	(79.1)	1	(50)
> 50	8	(16.7)	1	(50)
Bilinmiyor	2	(4.2)		
<u>Hemogloblin (g/dl)</u>				*0.013
≤ 10	31	(64.6)		
> 10	16	(33.3)	1	(50)
Bilinmiyor	1	(2.1)	1	(50)
<u>Trombosit ($\times 10^9/L$)</u>				0.097
≤ 50	21	(43.8)		
> 50	25	(52.1)	1	(50)
Bilinmiyor	2	(4.2)	1	(50)
<u>Blast oranı(%)</u>				0.172
≤ 80	30	(62.5)	1	(50)
> 80	13	(27.1)		
Bilinmiyor	5	(10.4)	1	(50)
<u>FAB Altıtipi</u>				0.205
M0	3	(6.3)		
M1	8	(16.7)		
M2	14	(29.2)		
M3	11	(22.9)	1	(50)
M4	3	(6.3)		
M5	5	(10.4)		
M7	1	(2.1)		
Bilinmiyor	3	(6.3)	1	(50)

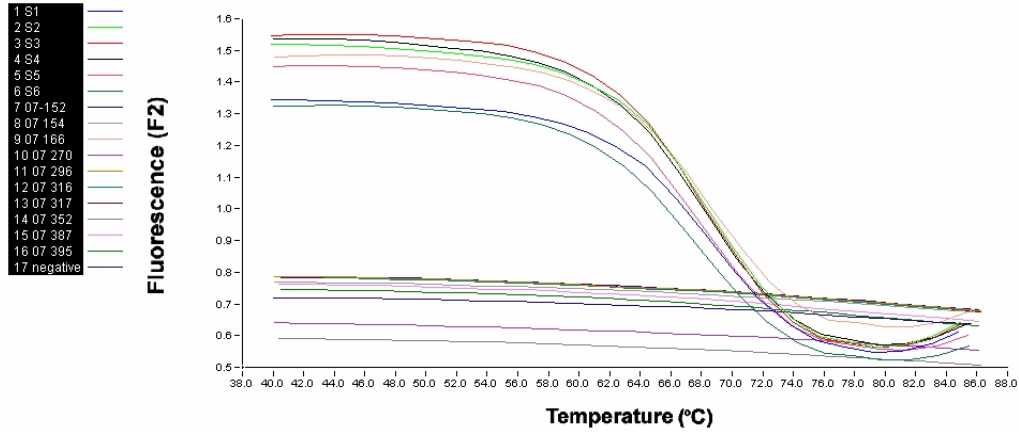


Şekil 4-1: t(15;17) RT PZR Sonuçları



Şekil 4-2: t(8;21) RT PZR Sonuçları

File: C:\LightCycler3\Users\Administrator\Data\Env\inv_16\10.05.2007\inv16.ABT Program: MELTING Run By: Administrator
Run Date: May 10, 2007 14:53 Print Date: April 29, 2008

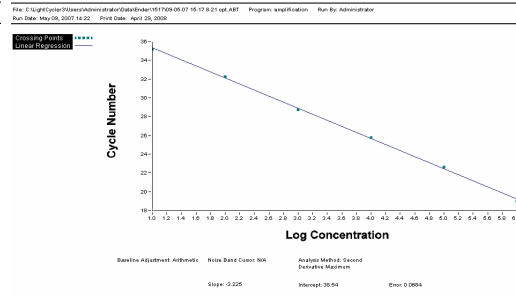
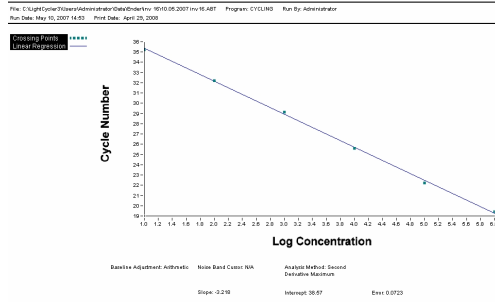


Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial

Şekil 4-3: Inv(16) RT PZR Sonuçları

A

B



Şekil 4-4: A- t(15;17) standart curve

B- t(8;21) standart curve

Tablo 4.1-2: t(15;17) translokasyonu ile FAB-M3 alttipi arasındaki ilişki

Özellikler	t(15;17)+		t(15;17)-		P değeri
	n	(%)	n	(%)	
<u>FAB Altıpti</u>					
M3	4	(33.3)	8	(66.7)	*0.007

Tablo 4.1-3: t(8;21) translokasyonu ile FAB-M2 alttipi arasındaki ilişki

Özellikler	t(8;21)+		t(8;21)-		P değeri
	n	(%)	n	(%)	
<u>FAB Alttipi</u>					
M2	12	(85.7)	2	(14.3)	*<0.001

Tablo 4.1-4: inv(16) ile FAB alttipleri arasındaki ilişki

Özellikler	inv(16)+		inv(16)-	
	n	(%)	n	(%)
<u>FAB Alttipi</u>				
M0	1	(33.3)	2	(66.7)
M1	1	(12.5)	7	(87.5)
M2	0	(0)	14	(100)
M3	0	(0)	12	(100)
M4	0	(0)	3	(100)
M5	1	(20)	4	(80)
M7	0	(0)	1	(100)
Bilinmiyor	0	(0)	4	(100)

Tablo 4.1-5: FAB sınıflaması ile cinsiyet ilişkisi P=0.122

	fab								Total
		0	1	2	3	4	5	7	
se>0	2	0	2	8	7	2	0	1	22
1	2	3	6	6	5	1	5	0	28
Total	4	3	8	14	12	3	5	1	50

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	11,396 ^a	7	,122
Likelihood Ratio	14,809	7	,039
N of Valid Cases	50		

Tablo 4.1-6: FAB sınıflaması ile yaş ilişkisi P=0.128

	fab								Total
		0	1	2	3	4	5	7	
age 0	2	2	1	3	2	0	4	1	15
1	0	0	3	5	5	0	0	0	13
2	2	1	4	6	5	3	1	0	22
Total	4	3	8	14	12	3	5	1	50

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	20,084 ^a	14	,128
Likelihood Ratio	22,926	14	,061
N of Valid Cases	50		

Tablo 4.1-7: t(15;17) ile cinsiyet ilişkisi P=0.655

		t1517			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1						
sex	0	0	20	2	22	Pearson Chi-Square	,848 ^a	2	,655
	1	1	25	2	28	Likelihood Ratio	1,221	2	,543
Total		1	45	4	50	N of Valid Cases	50		

Tablo 4.1-8: t(15;17) ile yaş ilişkisi P=0.630

		t1517			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1						
age	0	0	14	1	15	Pearson Chi-Square	2,583 ^a	4	,630
	1	0	11	2	13	Likelihood Ratio	2,825	4	,587
	2	1	20	1	22	N of Valid Cases	50		
Total		1	45	4	50				

Tablo 4.1-9: t(8;21) ile cinsiyet ilişkisi P=0.561

		t821		Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
		0	1							
sex	0	17	5	22	Pearson Chi-Square	,035 ^b	1	,852		
	1	21	7	28	Continuity Correction	,000	1	1,000		
Total		38	12	50	Likelihood Ratio	,035	1	,852		
					Fisher's Exact Test				1,000	,561
					N of Valid Cases	50				

Tablo 4.1-10: t(8;21) ile yaş ilişkisi P=0.129

		t821		Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1					
age	0	14	1	15	Pearson Chi-Square	4,091 ^a	2	,129
	1	8	5	13	Likelihood Ratio	4,655	2	,098
	2	16	6	22	N of Valid Cases	50		
Total		38	12	50				

Tablo 4.1-11: inv(16) ile yaş ilişkisi P=0.243

		inv16			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1						
age	0	2	11	2	15	Pearson Chi-Square	5,462 ^a	4	,243
	1	0	12	1	13	Likelihood Ratio	6,881	4	,142
	2	1	21	0	22	N of Valid Cases	50		
Total		3	44	3	50				

Tablo 4.1-12: t(15;17) ile lökosit ilişkisi P=0.222

	t1517			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1					
wbc		0	2	0	2			
0		0	35	4	39	Pearson Chi-Sq	5,708 ^a	,222
1		1	8	0	9	Likelihood Ratio	5,440	,245
Total		1	45	4	50	N of Valid Cases	50	

Tablo 4.1-13: t(8;21) ile lökosit ilişkisi P=0.138

	t821			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1					
wbc		1	1	2				
0		28	11	39	Pearson Chi-Sq	3,961 ^a	2	,138
1		9	0	9	Likelihood Ratio	5,935	2	,051
Total		38	12	50	N of Valid Cases	50		

Tablo 4.1-14: inv(16) ile lökosit ilişkisi P=0.201

	inv16			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1					
wbc		0	2	0	2			
0		1	36	2	39	Pearson Chi-Sq	5,976 ^a	,201
1		2	6	1	9	Likelihood Ratio	4,762	,313
Total		3	44	3	50	N of Valid Cases	50	

Tablo 4.1-15: t(15;17) ile kemik iliği blast oranı arasındaki ilişki P=0.063

	t1517			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1					
blast		1	5	0	6			
0		0	29	2	31	Pearson Chi-Sq	8,907 ^a	,063
1		0	11	2	13	Likelihood Ratio	6,112	,191
Total		1	45	4	50	N of Valid Cases	50	

Tablo 4.1-16: t(8;21) ile kemik iliği blast oranı arasındaki ilişki *P=0.049

	t821		Total
	0	1	
blast	6	0	6
0	20	11	31
1	12	1	13
Total	38	12	50

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Sq	6,032 ^a	2	,049
Likelihood Ratio	7,733	2	,021
N of Valid Case	50		

Tablo 4.1-17: inv(16) ile kemik iliği blast oranı arasındaki ilişki P=0.652

	inv16			Total
	0	1		
blast	0	6	0	6
0	3	26	2	31
1	0	12	1	13
Total	3	44	3	50

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Squ	2,457 ^a	4	,652
Likelihood Ratio	3,837	4	,428
N of Valid Cases	50		

Tablo 4.1-18: t(15;17) ile FAB sınıflaması arasındaki ilişki *P=0.009

	t1517			Total
	0	1		
fab	0	4	0	4
0	0	3	0	3
1	0	8	0	8
2	0	14	0	14
3	0	8	4	12
4	1	2	0	3
5	0	5	0	5
7	0	1	0	1
Total	1	45	4	50

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Sq	9,630 ^a	14	,009
Likelihood Ratio	8,417	14	,188
N of Valid Cases	50		

Tablo 4.1-19: t(8;21) ile FAB sınıflaması arasındaki ilişki *P=0.005

	t821		Total
	0	1	
fab	4	0	4
0	3	0	3
1	6	2	8
2	5	9	14
3	12	0	12
4	2	1	3
5	5	0	5
7	1	0	1
Total	38	12	50

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Sq	10,499 ^a	7	,005
Likelihood Ratio	14,042	7	,001
N of Valid Cases	50		

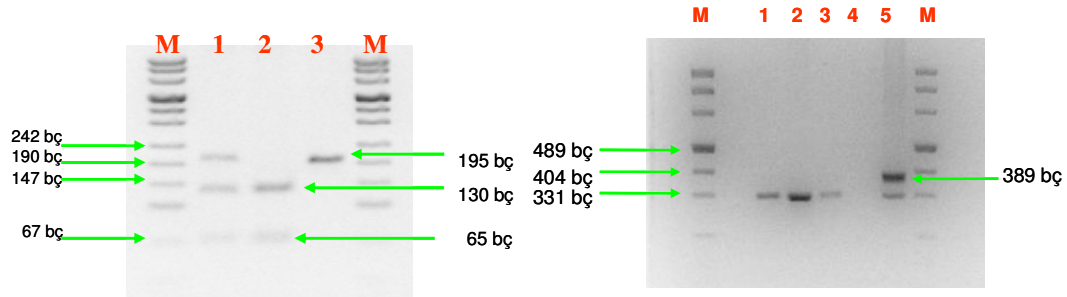
Tablo 4.1-20: inv(16) ile FAB sınıflaması arasındaki ilişki *P=0.043

	inv16			Total
	0	1	2	
fab	2	2	0	4
0	0	2	1	3
1	0	7	1	8
2	0	14	0	14
3	1	11	0	12
4	0	3	0	3
5	0	4	1	5
7	0	1	0	1
Total	3	44	3	50

	Value	df	symp. Si 2-sided)
Pearson Chi	4,189 ^a	14	,043
Likelihood R	7,730	14	,219
N of Valid C	50		

4.2. FLT3 geninde tespit edilen değişiklikler

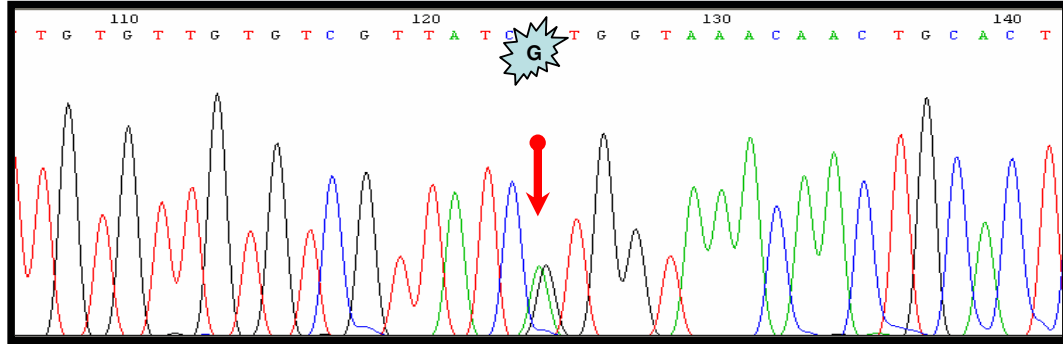
İncelenen 45 hastanın 2'sinde FLT3 geninde değişiklikler tespit edildi. Bu hastaların birinde FLT3-ITD (Şekil:4.6) bir diğer hastada ise FLT3-ITD mutasyonu yanında 20. intronik bölgenin 49. bazında A → G (g.IVS20 +49A>G) dönüşümü tespit edildi (Şekil:4.5 ve Şekil:4.7). Veritabanlarında bu değişikliğin daha önceden bilinen bir mutasyon (*Ensembl*rs/17086226) olduğu görüldü. Bu olgu M3 altgrubuna dahildi. Diğer hastalarda FLT3 genine ait mutasyon görülmedi. FLT3 geni ile hemoglobin düzeyi (Tablo: 4.2-7) dışındaki klinik özellikleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.



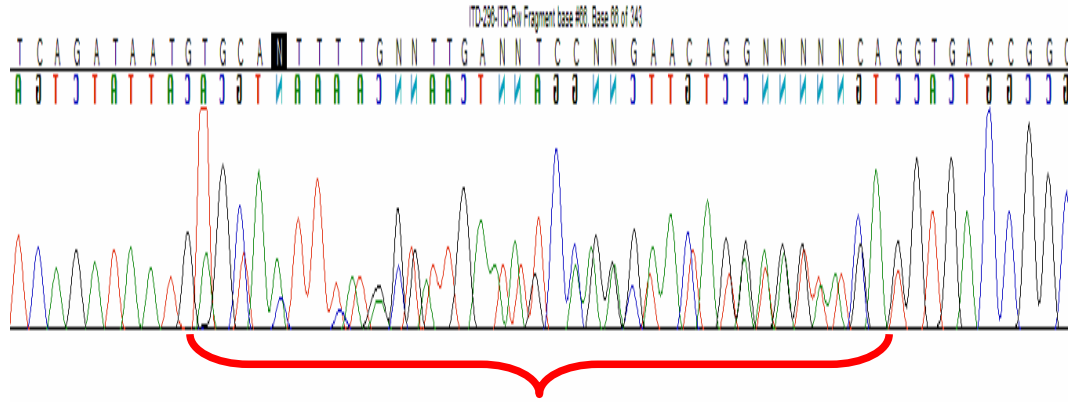
Şekil 4-5: EcoRV ile enzim kesimi sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü.

M: Markır puc8, 1: Hetrozigt örnek, 2: normal, 3: Kesilmemiş örnek

Şekil 4-6: PZR sonrası FLT3 genindeki ITD'un %3'lük agaroz jelde görüntüsü. M:Markır, 1,2,3:Normal örnekler, 4:Negatif 5: mutant olgu



Şekil 4-7: Dizileme sonucu FLT3 geni 20. intronda bulunan A>G değişikliği



Heterozigot olguda, allellerin dizi farklılığı gösteren bölgesi

Şekil 4-8: FLT3-ITD mutasyonu düşünülen olgunun PZR ürününün dizileme sonucu

Tablo 4.2-1: FLT3-ITD ile cinsiyet arasındaki ilişki P=0.351

		itd			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1	2					
sex	0	3	19	0	22	Pearson Chi-Square	2,092 ^a	2	,351
	1	2	24	2	28	Likelihood Ratio	2,835	2	,242
Total		5	43	2	50	N of Valid Cases	50		

Tablo 4.2-2: FLT3-ITD ile yaş arasındaki ilişki P=0.307

		itd			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1						
age	0	3	11	1	15	Pearson Chi-Sq	4,810 ^a	4	,307
	1	0	12	1	13	Likelihood Ratio	6,521	4	,163
	2	2	20	0	22	N of Valid Cases	50		
Total		5	43	2	50				

Tablo 4.2-3: FLT3-D835 nokta mutasyonu ile cinsiyet arasındaki ilişki P=0.213

		d835			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1						
sex	0	3	19	0	22	Pearson Chi-Squa	5,822 ^a	4	,213
	1	2	25	1	28	Likelihood Ratio	6,632	4	,157
Total		5	44	1	50	N of Valid Cases	50		

Tablo 4.2-4: FLT3-D835 nokta mutasyonu ile yaş arasındaki ilişki P=0.518

		d835			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1						
age	0	3	12	0	15	Pearson Chi-Squ	1,317 ^a	2	,518
	1	0	12	1	13	Likelihood Ratio	1,687	2	,430
	2	2	20	0	22	N of Valid Cases	50		
Total		5	44	1	50				

Tablo 4.2-5: FLT3-ITD ile lökosit sayısı arasındaki ilişki P=0.781

		itd			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1						
wbc	0	4	34	1	39	Pearson Chi-Squ	1,755 ^a	4	,781
	1	1	7	1	9	Likelihood Ratio	1,690	4	,793
Total		5	43	2	50	N of Valid Cases	50		

Tablo 4.2-6: FLT3-D835 nokta mutasyonu ile lökosit sayısı arasındaki ilişki P=0.970:

		d835			Total		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
		0	1						
wbc	0	4	34	1	39	Pearson Chi-Squa	,532 ^a	4	,970
	1	1	8	0	9	Likelihood Ratio	,945	4	,918
Total		5	44	1	50	N of Valid Cases	50		

Tablo 4.2-7: FLT3-ITD ile hemoglobin düzeyi arasındaki ilişki *P=0.013

	itd			Total
	0	1	1	
hb	0	1	1	2
0	3	28	0	31
1	2	14	1	17
Total	5	43	2	50

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	12,622 ^a	4	,013
Likelihood Ratio	6,724	4	,151
N of Valid Cases	50		

Tablo 4.2-8: FLT3-D835 nokta mutasyonu ile hemoglobin düzeyi arasındaki ilişki P=0.679

	d835			Total
	0	1	1	
hb	0	2	0	2
0	3	28	0	31
1	2	14	1	17
Total	5	44	1	50

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2,311 ^a	4	,679
Likelihood Ratio	2,724	4	,605
N of Valid Cases	50		

5. TARTIŞMA

AML tanısında günümüzdeki yaklaşım, standart klinik özellikler ve rutin laboratuvar tetkiklerinin yanı sıra, tanıyı destekleyici patoloji, immünofenotipleme, sitogenetik tetkikler ve moleküler tanı yöntemlerine de ihtiyaç duymaktadır. Kromozom anomalilerinin tanımlanması, uygulanacak olan tedavi ve buna bağlı olarak hastalığın prognozunu direkt olarak etkileyeceği için AML sınıflamasındaki kritik basamaklardan biridir (1,58). AML’de çok sayıda farklı translokasyonlar tanımlanmıştır. Bunlardan en sık görülenleri t(9;11), t(15;17), t(8;21) ve inv(16)’dır. Bu bozukluklar ve varyantları AML olgularının yaklaşık %30-40’ında görülmektedir (1,23,59,60). Bu translokasyonlar sonucu oluşan kimerik protein, füzyona katılmış olan genlerin yapısına bağlı olarak yeni bir fonksiyon kazanmaktadır (5, 61). t(15;17) translokasyonu varlığı AML FAB-M3 için, t(8;21) translokasyonu varlığı AML FAB-M2 ve M4 için ve inv(16) varlığı AML FAB-M4 (Eo) için iyi prognostik belirteçlerdir.

FLT3 geni, reseptör tirozin kinaz sınıf 3 ailesine dahil, hematopoezde önemli rol oynayan bir gendir. Kromozom 13q12 bölgesinde lokalizedir ve hematopoetik kök hücrelerde eksprese edilir. Ayrıca insan lösemi ve lenfoma hücre hatlarında da eksprese edilmektedir (44). FLT3 genine ait sık görülen iki mutasyon FLT3-ITD ve FLT3-D835 mutasyonlarıdır. AML hastalarında bu mutasyonların bulunması kötü prognoz göstergesidir.

Bu veriler doğrultusunda çalışmamızda 50 çocukluk çağı yeni tanı AML hastasında t(15;17), t(8;21), inv(16) kromozomal değişiklikleri ve FLT3 geni mutasyonları araştırıldı. Çalışmamızda t(15;17) translokasyonu ile FAB-M3 alt grubu, t(8;21) translokasyonu ile FAB-M2 alt grubu arasında bilinen anlamlı ilişki doğrulandı (***P=0,009**, ***P=0.005**). t(15;17) translokasyonu bulunan 4 olgunun tümü AML FAB-M3 alt grubuna dahildi. AML FAB-M2 alt grubuna dahil 14 hastadan 12’sinde t(8;21) translokasyonu bulundu. Kemik iliği blast oranı <%80 ve ≥%80 olmak üzere iki grup halinde gruplandı. t(8;21) translokasyonu ile kemik iliği blast oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu (***P=0.049**). t(8;21) translokasyonu bulunan hastalarda kemik iliği blast oranı daha yüksek bulundu. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından yayınlanan AML rehberi ve Ajeta Dash ve arkadaşları tarafından yapılan

yayınlardaki veriler (18,19) bu bulgumuzu destekler niteliktedir. AML FAB-M2’de blast hücrelerinin oranı tüm hücrelerin %30-90’ı arasındadır (13,21,24). t(8;21) translokasyonuna sahip FAB-M2 12 olgunun 11’inde (%91.6) kemik iliği blast oranının %80’in üzerinde olması özellikle FAB-M2 altgrubuna dahil pediatrik hastalarda kemik iliği blast oranının üst sınıra yakın olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada inv(16) ile FAB grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (***P=0.043**). inv(16) pozitif 3 olgunun biri M0, biri M1 ve biri de M5 alt grubuna dahildi. Literatüre göre inv(16) FAB-M4 altgrubunda diğerlerinden daha sık görülmektedir (62). Fakat M4 tipi lösemi daha sık ≥ 50 yaş yetişkinlerde görülür (13,21). inv(16) varlığı FAB-M4 altgrubu için iyi prognostik belirteçtir fakat diğer lösemi tipleri ile arasında nasıl bir ilişki olduğuna dair yayınlarda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Çalışma grubumuzda bulunan 3 M4 tipi hastada ise inv(16) saptanmadı.

Çalışma kapsamında incelenen 45 olgudan 2’sinde (%4.44) FLT3-ITD mutasyonu ve bu olgulardan birinde aynı zamanda FLT3-D835 nokta mutasyonu saptandı. Bu oran ITD mutasyonu sıklığı için verilen değerlere çok yakın olmamakla birlikte %20-25’lik oranın yetişkin AML hastalarında görüldüğünü belirtmek gerekir. Çocukluk çağı AML hastalarında yapılan çalışmalardan Der-Chern Liang ve arkadaşları bu oranı %11.3 olarak bulmuşlar ve (45) Kondo ve arkadaşları ile Iwai T. ve arkadaşları bu oranı %5.3-16.5 arasında vermişlerdir. Çalışmamızda bulduğumuz FLT3 mutasyon oranı (%4.44) literatürde bildirilen oranlardan daha düşüktür. Bulgularımız, ülkemizde ilk kez pediatrik hastalarla yapılan bu çalışmada FLT3 mutasyonu oranının diğer toplumlara göre daha düşük sıklıkta olduğunu göstermektedir. Türk toplumunda FLT3 mutasyon sıklığının daha düşük olduğunu ispatlamak için daha geniş hasta popülasyonlarında çalışmayı planlamaktayız.

FLT3 geni mutasyonu bulunan hastalarla, bulunmayan hastalar arasında, yaş, cinsiyet, lökosit sayısı, blast oranı ve FAB sınıflamasına göre yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark bulunmadı (P=0.307, P=0.351, P=0.781, P=0.172, P=0.205). Kondo ve arkadaşları ile Wang ve arkadaşlarının yayınları, FLT3-ITD ile yaş arasındaki ilişki açısından bizim bulgularımızı desteklemektedir (44,45). Fakat birçok yayında FLT3-ITD mutasyonlarının görülme oranının yaşla birlikte arttığı belirtilmektedir (63). FLT3-ITD mutasyonları ve lökosit sayısı arasındaki ilişki ile ilgili incelemelerimizde

anlamalı bir fark bulunmamakla birlikte hastalarımızın %95'inin lökosit sayısının $<50 \times 10^9/L$ olması Moreno ve arkadaşlarının yayınıyla uyumludur (34). AML hastalarında en sık görülen semptomlardan biri uzun süren ve şiddetli anemidir. Bu durum kemik iliğinin hasarıyla sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda FLT3-ITD ile düşük hemoglobin düzeyi arasında anlamalı bir ilişki bulundu (***P=0.013**). Fakat FLT3-D835 ile hemoglobin düzeyi arasında aynı bağlantı bulunamadı ($P=0.679$). Bunun hem FLT3-D835 nokta mutasyonuna sahip sadece bir hastamız olması hem de incelemiş olduğumuz toplam olgu sayısının yetersiz olması ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. AML M3'lü 7 yaşındaki bir olguda t(15;17) translokasyonunun yanısıra hem FLT3-ITD hem de FLT3-D835 nokta mutasyonunun bulunması prognostik açıdan dikkate değerdir. t(15;17) M3 alttipi için iyi prognoz, FLT3 mutasyonları ise kötü prognoz göstergesidir. Türk toplumunda bu özelliklerde bildirilmiş başka bir vaka bulunmamaktadır. Literatürde hem FLT3-ITD hem de FLT3-D835 nokta mutasyonunun ayrı ayrı bulunduğu birçok yayın (6,43,44,50) olmasına rağmen her iki mutasyonun birarada bildirildiği birkaç yayın bulunmaktadır. Hem FLT3-ITD hem de FLT3-D835 mutasyonlarını taşıyan M3 ve M5 FAB grubundan iki olgu 2005 yılında Wang ve arkadaşları tarafından (4) ve 4 olgu 2003 yılında Moreno ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Fakat Moreno ve arkadaşları her iki mutasyona da sahip 4 hastalarından birinin indüksiyon tedavisi sırasında diğer üç vakanın ise relapstan sonra 2., 4. ve 6. ayda kaybedildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalar FLT3 ITD ve D835 mutasyonunu birlikte taşıyan olguların kötü prognozlu olduğu yönündedir. Bizim çalışmamızdaki olgu ise her iki mutasyona sahip olmakla birlikte yaklaşık 1 yıldır remisyonadadır. Bu olgunun literatürde bildirilenin aksine iyi prognozlu seyretmesine rağmen daha uzun takip edilmesi gerekmektedir. FLT3 geninde her iki mutasyonun birlikte bulunmasının tirozin kinaz aktivitesini daha da etkili bir biçimde arttırıp arttırmadığı veya daha fazla hücre çoğalmasına neden olup olmadığı bilinmemektedir. Akut myeloid lösemi, myeloid hücrelerin aşırı çoğalması ve farklılaşmasının durması sonucu meydana gelmektedir. Bu olguda t(15;17) ile birlikte FLT3 geni mutasyonlarının bulunması, tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ile bozulmuş transkripsiyon faktörlerinin AML patogenezinde birlikte etkili olduğunu desteklemektedir. FLT3 mutasyonu sonucu sürekli tirozin kinaz aktivitesi hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olurken, t(15;17) translokasyonu ile RAR α transkripsiyon faktörünün fonksiyonun bozulması sonucu hücre farklılaşmasının durmasına neden olmaktadır. Bu durum FLT3 mutasyonları ve

t(15;17) translokasyonu çok basamaklı lösemi gelişiminin farklı basamaklarında ortaya çıkarak, birlikte AML gelişimine neden olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız bu çalışmada ülkemizde ilk kez pediatrik AML hastalarında saptanan kromozomal değişiklikler moleküler genetik yöntemlerle ayrıntılı olarak incelendi. Ayrıca bu olgularda ilk kez kombine olarak FLT3 geni mutasyonları saptandı. Olguların literatürle uyumlu olarak t(15;17) translokasyonunun FAB M3 grubuna özgü olduğu ve t(8;21) translokasyonunun FAB M2 grubuyla ve yüksek blast oranı ile ilişkili olduğu gösterildi. FLT3 mutasyonları ülkemizde pediatrik AML’de diğer ülkelere göre daha düşük oranda (% 4.44) bulundu. Ayrıca bir olgunun FLT3 geninin iki mutasyonunu (FLT3-ITD ve FLT3-D835) birden taşıdığı gösterildi.

KAYNAKLAR

1. Sanggyu Lee, Jianjun Chen, Guolin Zhou, Run Zhang Shi, Gerard G. Bouffard, Masha Kocherginsky, Xijin Ge, Miao Sun, Nimanthi Jayathilaka, Yeong Cheol Kim, Neelmini Emmanuel, Stefan K. Bohlander, Mark Minden, Justin Kline, Ozden Ozer, Richard A. Larson, Michelle M. LeBeau, Eric D. Green, Jeffery Trent, Theodore Karrison, Piu Paul Liu, San Ming Wang, and Janet D. Rowley. Gene expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations using SAGE. *PNAS* 2006;**103**;1030-1035; originally published online Jan 17, 2006.
2. Smith, M., Barnett, M., Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C. and Kern, W. (2004) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **50**,197-222
3. Seiter K. Acute myelogenous leukemia.
www.emedicine.com/med/topic34.htm.Last updated: January, 24, 2006.
4. Lihong Wang,Dong Lin,Xinwei Zhang, Sen Chen, Min Wang, Jianxang Wang. Analysis of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in Chinese acute leukemia patients. *Leukemia Research* **29** , 2005 ; 1393-8
5. Müge Aydın Sayitoğlu, Sema Sırma, Uğur Özbek. Molecular genetics of acute leukemias. *Türkiye klinikleri J İnt Med Sci* 2007, **3** (2)
6. D-C. Liang, L-Y Shih , I-J Hung, C-P Yang, S-H Chen, T-H Jaing, H-C Liu, L-Y Wang, W-H Chang. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* (2003)**17**(5), 883-6
7. Levis M, Allebach J, Tse KF, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD et al. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2002; **99**: 3885–91
8. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; **97**: 2434-2439
9. Rosmarin AG, Yang Z ve Resendes KK. Transcriptional regulation of myelopoiesis : Hematopoietic fate choice, myeloid differantion and leukemogenesis. *Exp Hematol* 2005, **33**(2):131-43.

10. Passegue E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics. *PNAS* 2003;**100**:11842-11849.
11. Blood Lines by Donald Metcalf. Alpha Med Press, 2007.
12. Turgeon M. L., 1999 Clinical Hematology , Theory and procedures, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, third edition, page:210-1
13. Turgeon M. L., 1999 Clinical Hematology , Theory and procedures, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, third edition, page: 213-4
14. Guidelines for the pediatric cancer center and role of such centers in diagnosis and treatment. American Academy of Pediatrics Section Statement Section on Hematology/Oncology. *Pediatrics*. 1997;**99**:139–141.
15. Downing J.R., Shannon K.M. Acute leukemia: a pediatric perspective. *Cancer Cell*. 2002;**2**:437–45.
16. Redner A. Leukemias .In: Lanzkowsky P, ed. Manual of pediatric hematology and oncology.4th edition.San Diego: Elseiver Academic pres; 2005 ; p: 415
17. Golub TR,Arceci RJ. Acute myelogenous leukemia .In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and practise of pediatric oncology .5th. edition.Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins ,2006 : p. 591-644
18. National Cancer Institute .Adult acute myeloid Leukemia. Mednews (internette) 2007. Erişim 07.17.2007, <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/>
19. Dash A, Gilland D.G. Molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Best pract Res Clin Heamatology*. 2001, p. 49-64
20. Levis M, Small D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* ,2003;**17**(9):1738–52.
21. Liesveld JL, Lichtman MA. içinde Litchman MA, Beutler E, Kaushansky K, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal J, editor. Williams Hematolog, 7th ed . USA: Mac Graw Hill;2006. pp.1183-1210.
22. Vardiman JW, Haris NL, Brunning RD, .”The World Health Organization (WHO) classifications of the myeloid neoplasms”. *Blood*, 2002; (10):2292-302

23. Rıdvan Ali. Classification and differential diagnosis of the acute leukemias. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007 , **3**(2)
24. Brunning RD,Matutes E, Haris NL, et al.:Acute myeloid leukemia:introductionIn: Jaffe ES, Haris NL;Stein H, et al.eds:Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues,Lyon ,France :IARC pres, 2001 ,World Health,Organization classificationof tumours ,**3**, pp 77-80
25. Sırma, S. Akut Myeloid Lösemi Etiyolojisinde MN1 Geninin Rolü.İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2007.
26. Venditti A.Del Poeta G, Stasi R, et al,1994: Minimally diferantiated Acute myeloid leukemia (AML-M0) : cytochemical , immunphenotypic and cytogenetik analysis of 19 cases . Br J. Haematol. **88** (4) : 784-93
27. Huh YO, Jilani I, Estey E. Et al. , 2002: More cell death in refraktory anemia with excess blasts in transformation than in acute myeloid leukemia. Leukemia **16**(11) : 2249-52.
28. Strupp C, Gattermann N,Giagonudis A,et al. , 2003: Refractory anemia with excess of blasts in transformation : analysis of reclassification according to do WHO proposals Leuk Res **27**(5) :397-404.
29. Caligiuri MA,Strout MP,Gilliland DG, 1997: Molecular Biyology of acute myeloid leukemia . Semin Oncol. **24**(1): 32-44
30. Brunning RD,Matutes E, Haris NL, et al.:Acute myeloid leukemia:introductionIn: Jaffe ES, Haris NL;Stein H, et al.eds:Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues,Lyon ,France :IARC pres, 2001 ,World Health,Organization classificationof tumours ,**3**, pp 81-7
31. Bloomfield C.D., Lawrence D,Byrd J.C,et al, 1998: Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification of acute myeloid leukemiaavaries by cytogenetic subtype. Canser Res.**58**(18) :4173-9
32. Byrd JC,Mrozek K,Dodge RK, et al, 2002: Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of indükction success,cumulative incidence of relapse , and overall survival in adult patients with de nova acute myeloid

- leukemia : results from cancer and leukemia group B(CALGB 8461). *Blood* **100** (13): 4325-36
33. Jansen JH,Löwenberg B: Acute promyelocytic leukemia with a PLZF-RAR α fusion protein.Semin Hematol.**38**(1) :37-41, 2001.
 34. Isabel Moreno, Guillermo Martin, Pascuar Bolufer, Eva Barragan, Eva Rueda, Jose Roman, Pascual Fernandez, Pilar Leon, Armanda Mena, Jose Cervera, Antonio Torres, Miguel a. Sanz. 2003. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica/Journal of hematology* vol.**88**(1): p: 19-24
 35. Head DR. Classification and differentiation of the acute leukemias. İçinde: Greer JP,Foerster J,Lukens JN,Rodgers GM,Paraskevas F, Glader B, eds. Wintrobe's Clinical Hematology Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins ; 2004 ,p:2063-76
 36. Brunning RD,Matutes E, Flandrin G, et al.:Acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes ,therapy related.İçinde. : Jaffe ES, Harris NL,Stein H, et al.eds:Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues,Lyon ,France :IARC press, 2001 ,World Health,Organization classification of tumours ,3, pp 89-91
 37. Leone G,Voso MT,Sica S,et al, 2001: Therapy related leukemias :susceptibility prevention and treatment .Leuk. Lymphoma **41** (3-4):255-76.
 38. Sheinberg DA,Maslak PG,Weiss MA:Acute leukemias .In:De vita VT jr.,Hellman S,Rosenberg SA,eds:Cancer: Principles and practise of Oncology. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins ; 2005 ,pp:2088-116
 39. Wiernik PH: Diagnosis and treatment of acute nonlymphocytic leukemia. In: Wiernik PH,Canellos GP,Dutcher JP,et al.:eds:Neoplastic diseases of the blood. 3rd. Ed. New York,NY: Churchill Livingstone,1996,pp:283-302
 40. Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins *J Cell Biochem* 2003 **89**(1): 9-18.
 41. Shigesada K, van de Sluis B, Liu PP. Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBFB/PEBP2B-MHY11. *Oncogene* 2004, **23**(24):4297-307.
 42. Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lv CJ, van Deursen JM. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal

definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors *Blood* 1998, **91**(9):3134-43.

43. Natasa Colovic, Natasa Tozic, Sanja Aveic, Marija Djuric, Natasa Milic, Vladimir Bumbasirevic, Milica Colovic, Sonja Pavlovic. Importance of early detection and follow-up of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* (2007) **86** : 741-7
44. Masaru Kondo, Keizo Horibe, Yoshiyuki Takahashi, Kimikazu Matsumoto, Minoru Fukuda, Jun Inaba, Koji Kato, Seiji Kojima, Takaharu Matsuyama. Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. *Medical and pediatric oncology* **33**(6): 525-9, 1999.
45. Der-Cherng Liang, Lee-Yung Shih, Iou-Jih Hung, Chao-Ping Yang, Shu-Huey Chen, Tang-Her Jaing, Hsi-Che Liu, Wan-Hui Chang 2002.. Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *American Cancer Society, Cancer*, **94**(12): 3292-8
46. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993; **82**(4): 1110–1119.
47. Rosnet O, Stephenson D, Mattei MG, Marchetto S, Shibuya M, Chapman VM et al. Close physical linkage of the FLT1 and FLT3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse *Oncogene* 1993; **8**(1): 173–9.
48. Meierhoff G, Dehmel U, Gruss HJ, Rosnet O, Birnbaum D, Quentmeier H et al. Expression of FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia–lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995; **9**(8): 1368–72.
49. Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996; **10**(4): 588–99

50. F.M Abu Duhier , A.C. Goodeve ,G,A. Wilson, M.A. Gari, I.R. Peake, D. C. Rees, E. A. Vandenberghe, P. R. Winship and J. T. Reilly. Molecular hematolohy unir, division of molecular and genetic medicine ,Royal Hallamshire Hospital, Sheffield ,UK.British Journal of Haematology, 2001, 111, 983-88
51. Wang D, D'Costa J, Civin CI, Freidman AD. C/EBPalpha directs monocytic commitment of primary myeloid progenitors. Blood 2006, **108**(4):1223-9.
52. Cammenga J. Gatekeeper pathways and cellular background in the pathogenesis and therapy of AML. *Leukemia* 2005, **19**(10): 1719-28.
53. Lowry J.A. Mackay J.P. GATA-1: one protein, many partners. Int J Boichem Cell Biol 2006 **38**(1): 6-11
54. Roel G.W. Verhaak, Chantal S. Goudswaard, Wim van Putten, Maarten A. Bijl, Mathjis A. Sanders, Wendy Hugens, Andre G. Uitterlinden, Claudia A.J.Erpelink, Ruud Delwel, Bob Löwenberg, Peter J.M.Valk. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance . Blood, 2005 **106**(12): 3747-54
55. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype .New England Journal medicine ,2005; **352**(3): 254-66
56. Susanne Schnittger, Claudia Schoch, Wolfgang Kern, Cristina Mecucci, Claudia Tschulik, Massimo F. Martelli, Torsten Haferlach, Wolfgang Hiddemann, Brunangelo Falini. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. Blood, 1 december 2005, volume **106**(12), 3733-9
57. Brunangelo Falini ,Lido Nicoletti, Niccolo Bolli, Maria Paola Martelli, Arcangelo Liso, Paolo Gorelio, Franco Mandelli, Cristina Mecucci, Massimo Fabrizio Martelli. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. Haematologica/the hematology journal, 2007 ; **92**(4) , 519-32

58. Jaffe, E.S., Harris, N. L. Diebold, J. and Muller-Hermelink, H.K (1999) *Am. J. Clin. Pathol.* **111**, 8-12
59. Alcalay M., Tiacci E., Bergomas R.,et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc⁺ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* 2005; **106** :899-902
60. Valk P.J., Delwel R., Lowenberg B. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2005; **12**: 76-81
61. Diverio D, Rossi V, Avvisati G et al. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RAR α fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA –AIEOP multicenter “AIDA” trial. *Blood*, 1998; **92**: 784-9
62. Milica Colovic, Vladimir Jurisic, Sonja Pavlovic, Tatjana Terzic, Natasa Colovic. FLT3/D835 mutation and inversion of chromosome 16 in leukemic transformation of myelofibrosis. *European Journal of Internal Medicine* **17**,2006, 434-5
63. Soheil Meshinchi, Todd A. Alonzo, Derek L., Stirewalt, Michel Zwaan, Martin Zimmerman, Dirk Reinhardt , Gertjan J.L. Kaspers, Nyla A. Heerema, Robert Gerbing, Beverly J. Lange and Jerald P. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood*, 2006; **108**: 3654-61

FORMLAR

TC.

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
GENETİK ANABİLİM DALI**

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Proje Adı: “Çocukluk çağı akut myeloid lösemi hastalarında kromozomal değişiklikler ve FLT3 geni mutasyonlarının araştırılması ”

Bu incelemede, AML ön tanısıyla gelen vakalarda, meydana gelen kromozomal değişiklikleri ve FLT3 geni mutasyonlarının tespiti ile hastalığın kesin tanısına ve sınıflandırılmasına yardımcı olunacak ve tedavinin düzenlenmesine yardım sağlanmış olacaktır.

Aşağıdaki Bilgilendirilmiş Onay Formunu okuduktan sonra çalışmaya katılma /-velisi bulunduğunuz çocuğunuzun veya yakınınızın katılmasına- kararı verirsiniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı: İncelememizde, Akut myeloid lösemi hastalarındaki kromozomal değişikliklerin ve FLT3 geni mutasyonlarının saptanmasını amaçlamaktayız. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

1. Yapılması planlanan genetik incelemeler için sizden öncelikle 10 ml. Periferik kan / kemik iliği alınacaktır.
2. Alınan kan /kemik iliği örneğinde DNA/RNA materyaliniz ayrılarak saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.
3. Hastalığınıza neden olduğu düşünülen genlerde mutasyon, hastalığa özel füzyon gen tespiti yapılacaktır.
4. Hastalığa neden olan yeni genlerin bulunması için DNA/RNA örneğinizde genetik haritalama çalışması yapılacaktır.

5. Araştırma kapsamında yapılacak olan çalışmanın süresi 1 yıldır ve sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir.
6. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda araştırmadan ayrılabilirsiniz.
7. Elde edilen genetik bilgi sonuçları şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacak olup, sadece size/velinize ve hekiminize bilgi verilecek, üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Bu incelemeler için sizden alınan kan/kemik iliği materyalinden elde edilecek örneklerinizin saklanması konusunda lütfen aşağıdaki seçeneklerden birini seçiniz:

a.Elde edilen doku örneğimin /-velisi bulunduğum yakınımın- çalışma bittikten sonra bölümünüz örnek bankasında saklanmasına izin veriyorum

b.Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra imha edilmesini istiyorum

Doku örneğiniz saklandığı takdirde size sorulmadan, izniniz alınmadan hiçbir şekilde başka bir çalışma için kullanılmayacaktır

2. Olası riskler ve faydalar:

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin ya da velinizin iznimize bağlı olacaktır.

Olası yararlar :Bu incelemelerin esas amacı hastalığınız sırasında ortaya çıkan/çıkma olasılığı bulunan anomalileri araştırmaktır.

İzin: Yukarıda tanımlanan incelemenin uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin / çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım.

Tarih :

Doktorun Adı Soyadı,imzası:

Hasta Adı Soyadı , İmzası

Velisinin Adı, Soyadı, İmzası:

Bağlantı kurulabilecek kişiler:

Prof. Dr.Uğur Özbek
Bio. Ender Coşkunpınar

Ulaşılabilecek Tel. No.'ları:

(0 212) 414 20 00 - 33318
0532 2407157

Ulaşım Adresi:

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Genetik Anabilim Dalı 34093 Çapa-Şehremini Fatih/
İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi:

.ecoskunpınar@gmail.com

**LÖSEMIYE ÖZGÜN KROMOZOMAL
TRANSLOKASYONLARIN TESPİTİ İÇİN GEREKLİ
HASTA BİLGİ FORMU**

HASTA ADI,SOYADI	:	DR. ADI, SOYADI	:	
YAŞ,	:	ÇALIŞTIĞI KURUM	:	
CİNSİYET	:	E ☐ K ☐		
BOY , KİLO	:	 cm,kg	TARİH :	/ /200...

KLİNİK TANI	:	
İMMÜNFENOTİP	:	
SİTOGENETİK SONUÇ	:	
MATERYALİN ALINMA ZAMANI	:	TANI ☐ TEDAVİ SONRASI ☐ RELAPS ☐

YAPILAN HEMATOLOJİK TETKİKLER

TROMBOSİT	:	/mm3	
LÖKOSİT	:	/mm3	
TROMBOSİT	:	/mm3	
HEMOGLOBİN	:	g/dl.	
HEMATOKRİT	:	%	
PT	:	saniye	
INR	:		
APTT	:	saniye	

PERİFERİK YAYMA SONUÇLARI

NÖTROFİL(SEG.)	:	%	
LENFOSİT	:	%	
MONOSİT	:	%	
EOZİNOFİL	:	%	
BAZOFİL	:	%	
MORFOLOJİ	:		
KEMİK İLİĞİ BLAST	:	%	

KLİNİK VERİLER

LENFADENOPATİ	:VAR	YOK	
SPLENOMEGALİ	:VAR	YOK	
HEPATOMEGALİ	:VAR	YOK	
TÜMÖR LYSİS	:VAR	YOK	
BOS TUTULUMU	:VAR	YOK	
MSS TUTULUMU	:VAR	YOK	
TEDAVİYE BAŞLAMA TARİHİ	:	/ /200...	
UYGULANAN TEDAVİ	:		
RİSK GRUBU	:	DÜŞÜK ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ YÜKSEK ☐	

BİYOKİMYASAL TETKİKLER

LDH	:	U/L	
CD33	:		
CD34	:		
DİĞER	:		

AİLE BİLGİLERİ

AİLEDE KANSER	:VAR	YOK	
RADYASYONA MARUZİYET	:VAR	YOK	
ANNE-BABA MESLEĞİ	:		
ANNE-BABA DOĞUM YERİ	:		

HASTANIN SON DURUMU	:	REMİSYON ☐	RELAPS ☐	EXITUS ☐
---------------------	---	-----------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 21/11/2007

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 11

Sorumlu araştırmacılığını Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Uğur ÖZBEK'in, üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Ender Mehmet COŞKUNPINAR'ın,yürüteceği 2007/2703 dosya no'lu "Çocukluk Çağı Akut Myeloid Lösemi Hastalarında Kromozomal Değişiklikler ve FLT3 Geni Mutasyonlarının Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU (Katılmadı)

Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU (Katılmadı)

Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR (Katılmadı)

Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)

Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK

İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR (Katılmadı)

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER

Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek Temiz ÖZBEK (Katılmadı)

Hukukçu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ender Mehmet	Soyadı	Coşkunpınar
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	20.05.1971
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	32176049620
Email	ecoskun@istanbul.edu.tr	Tel	05322407157

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2008
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi	1997
Lise	Bakırköy Lisesi	1988

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İ.Ü. DETAE Genetik Anabilim Dalı	2005-
2.	Biyolog	İ.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü KVC AD	1991-2005
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Zayıf	Orta	60	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	54,153	54,206	54,258
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

At binmek, basketbol, futbol, çocuklarımla ilgilenmek.

