



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

**KML ve ALL TANILI HASTALARDA BCR/ABL FÜZYON GENİ
MUTASYONLARININ TARANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAP ARSLAN

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. OĞUZ ÇİLİNGİR

2014



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

**KML ve ALL TANILI HASTALARDA BCR/ABL FÜZYON GENİ
MUTASYONLARININ TARANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAP ARSLAN

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. OĞUZ ÇİLİNGİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Serap ARSLAN' ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**KML ve ALL Tanılı Hastalarda BCR-ABL Füzyon Geni Mutasyonlarının Taranması** " başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

19.08.2014

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS



Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR (Danışman)



Üye: Yrd.Doç.Dr. Hüseyin ASLAN



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22.08./...2014. tarih ve 1012./...4720 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof.Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

KML ve ALL TANILI HASTALARDA BCR/ABL FÜZYON GENİ MUTASYONLARININ TARANMASI

KML, pluripotent kök hücrenin myeloid progenitör hücrelerde artmış proliferasyon ve azalmış apoptozu ile karakterize klonal bir bozukluktur. Kromozom 9 ile 22 arasında karşılıklı translokasyon sonucu BCR/ABL füzyon geni oluşmaktadır. ABL ve BCR genleri üzerindeki kırılma noktası değişebilmektedir. Bu nedenle değişik moleküler kütelere sahip füzyon protein kinaz ürünleri meydana gelmektedir. Hastalarda BCR/ABL gen füzyonunun yanı sıra ABL ve BCR genlerinde farklı yapıda büyük delesyonlar ve mutasyonlar rapor edilmiştir. Saptanan delesyonların, hastanın prognozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. BCR/ABL geni üzerindeki mutasyon tiplerinin belirlenmesi, tanı, tedavi ve tedaviye yanıtta önemlidir. KML ve ALL'li hastalarda direncin erken dönemde tanımlanması ve optimal tedavi şeklinin belirlenmesi açısından önemi bilinmektedir. Bu çalışmada, Ph+ olan elli dokuz hasta Minisekans metoduyla BCR/ABL füzyon genindeki en sık görülen 6 mutasyon taranmıştır. Yirmi dokuz Ph+ KML hastası dirençli grup, yirmi Ph+ KML kontrol ve 10 Ph+ ALL hasta grubu, negatif kontrol olarak Philadelphia (-) DNA örneği kullanılmıştır. Nokta mutasyon analizi için olguların kan ve/veya kemik iliği örneklerinden izole edilen BCR/ABL füzyon geni DNA'sı üzerinde toplam 6 mutasyon incelenmiştir. Bir hastada G250E (%1.69) mutasyonu saptanmış, Y253H, T315I, E255K, F317L ve M351T mutasyonları ise saptanamamıştır. Hiç mutasyonu olmayan hastaların oranı %98.30 (58) olarak bulunmuştur. İlaçlara direncin moleküler temelini anlaşılabilmesi için özellikle BCR /ABL füzyon genindeki mutasyonların daha ayrıntılı ve geniş popülasyonlarda araştırılması gerekmektedir. KML ve ALL'li hastalarda mutasyon tipinin belirlenmesiyle, mutasyona uygun tedavi şeklinin planlanmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: KML, ALL, BCR/ABL, Ph kromozomu, TKI, Minisekans

SUMMARY

In Patients with ALL and CML, BCR/ABL Fusion Gene Mutations Screening of

CML, of pluripotent stem cells, at myeloid progenitor cells of increased proliferation and decreased apoptosis is characterized by a clonal disorder. Of BCR/ABL fusion gene the reciprocal translocation of chromosomes 9 and 22 is caused. Of BCR and ABL genes breaking point can vary on. Therefore kinase fusion protein products having different molecular mass is formed. In patients with BCR/ABL of gene fusion as well as of BCR and ABL genes in different structures large deletions and mutations have been reported. Deletions detected, has been shown to be related to patient prognosis. BCR/ABL gene mutations on the identification of the types, diagnosis, treatment and response to treatment is important. In CML and ALL patients, of the resistance diagnosed early identification and determination of the optimal treatment for planning plays an important role. In this study, fifty-nine patients with Ph+, BCR/ABL fusion gene by the method of minisequence most common six mutations were screened. Twenty-nine Ph+ CML patients resistant group, twenty Ph+ CML patients control group and ten Ph+ ALL patients was used. For point mutation analysis of patients blood or bone marrow sample isolated from BCR/ABL fusion gene on the total six DNA mutations were examined. Mutations were detected in one of fifty-nine patients (%1.69), this mutation is G250E. Y253H, T315I, E255K, F317L and M351T mutations were not detected. Ninety-eight percent of patients without the mutation. For an understanding of the molecular basis of drug resistance, particularly BCR/ABL fusion gene mutations in large populations need to be studied in more detail. In patients with CML and ALL with determining the type of mutation, mutations that contribute to the planning of appropriate treatment is considered.

Key Words: CML, ALL, BCR/ABL, Ph chromosome, TKI, Minisequence

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| ÖZET..... | iii |
| SUMMARY..... | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| TABLolar DİZİNİ..... | x |
| SİMGE VE KISALTMALAR..... | xii |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.1.Kronik Myeloid Lösemi(KML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi(ALL)'nin Özellikleri..... | 2 |
| 2.1.1.Kronik Myeloid Lösemi (KML)..... | 2 |
| 2.1.2.Akut Lenfoblastik Lösemi(ALL)..... | 4 |
| 2.2.KML ve ALL'nin Genetik Mekanizması..... | 4 |
| 2.2.1.ABL Geninin Yapısı ve Fonksiyonu..... | 5 |
| 2.2.2.BCR Geninin Yapısı ve Fonksiyonu..... | 6 |
| 2.2.3.BCR/ABL Füzyon Geni ve Moleküler Mekanizması..... | 7 |
| 2.2.3.1.BCR/ABL'nin Adezyon Özelliklerinin Değişmesi..... | 10 |
| 2.2.3.2.Mitojenik Sinyalizasyonun Aktivasyonu..... | 10 |
| 2.2.3.2.1.Ras ve MAP Kinaz Yolağı..... | 11 |
| 2.2.3.2.2.Jak-Stat Yolağı..... | 12 |

| | Sayfa |
|---|-------|
| 2.2.3.2.3.PI3 Kinaz Yolağı..... | 12 |
| 2.2.3.2.4. Myc Yolağı..... | 13 |
| 2.2.3.3. Apoptozis İnhibisyonu..... | 13 |
| 2.3. KML ve ALL'de Tedavi Yöntemleri..... | 13 |
| 2.3.1. KML'de Geleneksel Kemoterapi..... | 14 |
| 2.3.2. Küratif Tedavi..... | 14 |
| 2.3.3. Allojenik Hematopietik Kök Hücre Nakli(AHKHN)..... | 15 |
| 2.3.4. İnterferon-alfa (IFN- α)..... | 15 |
| 2.3.5. Tedavide Uygulanan TKI'lere Verilen Yanıtın Değerlendirilmesi..... | 16 |
| 2.3.6. BCR-ABL İnhibitörleri..... | 17 |
| 2.3.6.1. Birinci Nesil TKI..... | 17 |
| 2.3.6.2. İkinci Nesil TKI..... | 18 |
| 2.3.6.3. Üçüncü Nesil TKI..... | 21 |
| 2.3.6.4. Imatinib'e Karşı Direnç Gelişmesi..... | 22 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER..... | 27 |
| 3.1. Hasta Grubu..... | 27 |
| 3.2. Gereçler..... | 27 |
| 3.2.1. Kullanılan Gereçler..... | 27 |
| 3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler..... | 28 |
| 3.3. Yöntemler..... | 28 |
| 3.3.1. Kan ve Kemik İliği Örneklerinden DNA Elde Edilmesi..... | 29 |
| 3.3.2. PZR İçin Örneklerin Hazırlanması..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.3.3. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması..... | 31 |
| 3.3.4. Mini Dizileme Reaksiyonu..... | 31 |
| 3.3.5. Kapiller Elektroforez (Dizileme Cihazı) Cihazına Örneklerin Yüklenmesi..... | 32 |
| 3.3.6.Yürütülen Örneklerin Analiz Edilmesi..... | 33 |
| 4. BULGULAR..... | 34 |
| 4.1. Araştırma Grubunun Prognostik Özellikleri..... | 34 |
| 4.2. Kan ve Kemik İliği Örneklerinde Elde edilen Bulgular..... | 37 |
| 4.2.1. G250E Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi..... | 40 |
| 4.2.2. Y253H Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi..... | 41 |
| 4.2.3. E255K Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi..... | 41 |
| 4.2.4. T315I Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi..... | 41 |
| 4.2.5. F317L Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi..... | 41 |
| 4.2.6. M351T Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi..... | 42 |
| 5. TARTIŞMA..... | 43 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 49 |
| 7. KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 50 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 60 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil.2.1. ALL'de görülen kromozomal translokasyonlar ve sıklıkları..... | 4 |
| Şekil.2.2. <i>Philadelphia kromozomu</i> , t(9;22) (q34;q11)..... | 5 |
| Şekil.2.3. Abl proteininin moleküler yapısı..... | 6 |
| Şekil.2.4. BCR geninin moleküler yapısının şematik gösterimi..... | 7 |
| Şekil.2.5. Bcr proteininin moleküler yapısı..... | 7 |
| Şekil.2.6. <i>BCR</i> ve <i>ABL1</i> genlerindeki farklı kırık noktaları ve oluşan mRNA'ların şematik gösterimi..... | 8 |
| Şekil.2.7. <i>BCR</i> , <i>ABL1</i> ve <i>BCR-ABL</i> genlerinin ve proteinlerinin şematik gösterimi..... | 9 |
| Şekil.2.8. <i>Philadelphia kromozomunun yapısı(Ph)</i> | 9 |
| Şekil.2.9. KML kök hücre nesli ve malign yeniden düzenlemenin şematik diyagramı..... | 10 |
| Şekil.2.10. <i>BCR/ABL geni</i> , sinyal yolları..... | 11 |
| Şekil.2.11. Potansiyel Mitojenik <i>BCR-ABL</i> Sinyal Yolları..... | 11 |
| Şekil.2.12. KML'de SRC ve JAK/STAT Aktivitesi..... | 12 |
| Şekil.2.13. KML Tedavisinin Tarihçesi..... | 14 |
| Şekil.2.14. <i>İmatinib'in</i> kimyasal yapısı..... | 18 |
| Şekil.2.15. <i>İmatinib Mesilat'in</i> etki mekanizması..... | 18 |
| Şekil.2.16. Dasatinib etki mekanizması..... | 20 |
| Şekil.2.17. Nilotinib etki mekanizması..... | 20 |
| Şekil.2.18. İmatinib direncinin bilinen mekanizmaları..... | 24 |

| | |
|--|----|
| Şekil.2.19. İmatinib Direnci olan hastalarda <i>ABL</i> kinaz bölgesinde mutasyonların görülme sıklığı..... | 24 |
| Şekil.2.20. <i>Imatinib</i> 'e karşı klinik direnç ile ilişkili BCR-ABL kinaz bölge mutasyonlarının haritalanması..... | 25 |
| Şekil.2.21. <i>İmatinib</i> ile <i>ABL kinaz bölgesinin</i> yapısı hot spot noktalar..... | 26 |
| Şekil.3.1.Minisekans tekniğinin şematik açıklaması..... | 29 |
| Şekil.4.1. KML dirençli grubundan G250E mutasyonu saptanan olguya ait minisekans görüntüsü..... | 40 |

TABLolar DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Tablo.2.1. KML'li hastalarda, hastalığın fazına göre vücuttaki kan değerleri..... | 3 |
| Tablo.2.2. KML'nin tipik klinik seyri..... | 3 |
| Tablo.2.3. KML tanısında kullanılan testler ve sonuçları..... | 17 |
| Tablo.2.4. <i>ENESTnd</i> , <i>DASISION</i> ve <i>BELA</i> klinik denemelerinin 12 ay sonraki sonuçları..... | 19 |
| Tablo.2.5. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin isimleri ve T315I mutasyonuna etkileri..... | 21 |
| Tablo.2.6. KML tedavisinde kullanılan ilaçlar ve hedefleri..... | 22 |
| Tablo.2.7. İmatinib direnç mekanizmaları..... | 23 |
| Tablo.3.1. 1 Örnek İçin PZR Karışımının Hazırlanma Protokolü..... | 30 |
| Tablo.3.2. PCR programı..... | 31 |
| Tablo.3.3. Saflaştırma Programı..... | 31 |
| Tablo.3.4. Mini Dizileme Reaksiyonu..... | 32 |
| Tablo.3.5. Mini Dizileme PZR Programı..... | 32 |
| Tablo.3.6. Kapiller Elektroforez Programı..... | 32 |
| Tablo.3.7. Elektroforogamdaki mutasyonlar..... | 33 |
| Tablo.4.1. Çalışma Grubunun Karakteristikleri..... | 34 |
| Tablo.4.2. KML Dirençli Olgu Grubunun Klinik Bilgileri..... | 35 |
| Tablo.4.3. KML Kontrol Grubunun Klinik Bilgileri..... | 36 |
| Tablo.4.4. ALL Hasta Grubunun Klinik Bilgileri..... | 37 |

| | |
|---|----|
| Tablo.4.5. Hastalarda Saptanan Mutasyonların Özellikleri..... | 37 |
| Tablo.4.6. KML dirençli grubun sonuçları..... | 38 |
| Tablo.4.7. KML kontrol grubunun sonuçları..... | 39 |
| Tablo.4.8. ALL hasta grubunun sonuçları..... | 40 |
| Tablo.5.1. Dirençli olgu grubu bulgularının literatür ile karşılaştırılması.... | 48 |

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

| | |
|--------------------|--|
| TKI | : Tirozin Kinaz İnhibitörü |
| PZR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| ddH ₂ O | : Ultra distile su |
| DMSO | : Di Metil Sülfoksit |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| dNTP | : Dioksi Nükleotit Trifosfat |
| ddNTP | : Didioksi Nükleotit Trifosfat |
| KML | : Kronik Myeloid Lösemi |
| ALL | : Akut Myeloid Lösemi |
| Ph | : Philadelphia kromozomu |
| <i>BCR/ABL</i> | : Breakpoint Cluster Region/Abelson Leukemia |
| KF | : Kronik Faz |
| AF | : Akselere Faz |
| BF | : Blastik Faz |
| t(9;22) | : 9.ve 22. Kromozom arasındaki translokasyon |
| P-loop | : Fosfat loop |
| A-loop | : Aktivasyon loop |
| ATP | : Adenozin Trifosfat |
| IM | : İmatinib |
| DA | : Dasatinib |
| NI | : Nilotinib |
| THY | : Tam Hematolojik Yanıt |
| TSY | : Tam Sitogenetik Yanıt |

Simgeler Açıklama

| | |
|---------------|---|
| MSY | : Majör Sitogenetik Yanıt |
| TMY | : Tam Moleküler Yanıt |
| GIMEMA | : Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Adulto |
| FISH | : Floresan Insitu Hibridizasyon |
| ABL | : Abelson Leukemia |
| BCR | : Breakpoint Cluster Region |
| Kb | : Kilobaz |
| kDa | : kilo dalton |
| GTP | : Guanozin Trifosfat |
| AHKHN | : Allojenik Hematopietik Kök Hücre Nakli |
| IFN- α | : İnterferon- α |
| TK | : Tirozin Kinaz |
| ENEST | : Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials |
| DASISION | : Dasatinib versus Imatinib Study In treatment-Naive CML patients |
| BELA | : Bosutinib Efficacy and Safety in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Amerika'nın Philadelphia eyaletinde 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından kanserli hücrelerde anormal bir kromozom keşfedildi. Araştırmacılar buldukları şehre atfen bu kromozoma *Philadelphia kromozomu (Ph)* adını verdiler (O'Brien S, Cortes J, 2009). Rowley 1973 yılında, 9.ve 22.kromozom arasında bir t(9;22) sonucu oluştuğunu bulmuştur (Saglio G., Kim D.-W., Issaragrisil S. vd. , 2010). Bu anormal kromozom KML tanılı erişkin hastaların yaklaşık %95'inde, ALL tanısı almış çocukların %5'inde ve erişkinlerin %30'unda bulunmaktadır (Maekawa T, Ashihara E, Kimura S. 2007, Rosti G., F. Palandri, F. Castagnetti vd. , 2009). Daha sonraları yapılan birçok çalışma ile *Ph* kromozomunun moleküler yapısı aydınlatılmıştır. Bu kromozom *BCR/ABL* füzyon geninin oluşmasına neden olur. Bu genin en önemli özelliği ürettiği proteinin tirozin kinaz (*TK*) aktivitesine sahip olmasıdır. Bu hastalarda hedefe yönelik tedavi stratejisi olarak *TK* aktivitesini inhibe edici ajanların (*TKI*) kullanımı gündeme gelmiştir. Bunun sonucunda da *Imatinib (IM)* adlı bir *TKI* geliştirilmiştir. *IM*'in ticari olarak onay alması kanser tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur. Ama çeşitli nedenlerle bir süre sonra *IM* tedavisi alan hastalarda *TKI*'ne karşı direnç gelişimi ortaya çıkmıştır. Bu durum *BCR/ABL* füzyon geninin moleküler olarak daha ayrıntılı incelenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Hastalarda dirence neden olan mekanizmalar incelendiğinde önümüze iki ana mekanizma çıkmaktadır. Bunlar *BCR/ABL*'ye bağlı ve bağımsız mekanizma olarak adlandırılır. *BCR/ABL*'ye bağımlı mekanizmada genin amplifikasyonu, duplikasyonu ve nokta mutasyonları oluşumu söz konusudur. Nokta mutasyonları *BCR/ABL* kinaz domain ve nonkinaz domainin her ikisinde de tanımlanmıştır. Çalışmaların çoğu kinaz domaindeki nokta mutasyonları üzerine yoğunlaşmış ve şimdiye kadar yüzün üzerinde nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Direnci aşabilmek, remisyonu sağlayabilmek ve hastaların sağ kalım oranını artırabilmek için bu mutasyonların moleküler anlamda taranması önem arz etmektedir. Bu nedenle biz de yaptığımız bu çalışma ile KML ve ALL tanılı hastalarda direnç gelişiminin nedenini tespit etmek ve buna göre hastalığın tedavisinde izlenecek algoritmayı belirleyebilmek için kliniğe yardımcı olmayı amaçlıyoruz. Mutasyon tipine bağlı olarak tedavi şeklinin belirlenmesi ve direnç gelişiminin erken safhada tespit edilmesine katkıda bulunulabileceği umulmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Myeloid Lösemi (KML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'nin Özellikleri

2.1.1. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

KML pluripotent kök hücrenin myeloid progenitör hücrelerde artmış proliferasyon ve azalmış apoptozu ile karakterize klonal bir bozukluktur (Albano vd. , 2013). KML yetişkinlerde görülen lösemilerin yaklaşık %20'sini oluşturur. Genelde orta ve ileri yaşta görülür. KML'nin dünya çapında insidansı 1-2/100.000'dir. Erkek/Kadın oranı:3/2'dir (Faderl S. vd., 1999).

KML ilk olarak 19. yüzyılda tanımlanmış olup, üç farklı klinik evre ile karakterizedir. Bu evreler KML hastalığının sınıflandırılmasında kullanılır ve bu sayede hastalığın aşamaları belirlenerek izlenecek tedavi yönteminin seçilmesi sağlanır. Bu fazlar aşağıda anlatılmaktadır (Sardas OS, Koc H, Beksac M. 1991):


1. Kronik Faz (KF): Olgunlaşma gösteren myeloid hücrelerin artışı söz konusudur. Hastalara tanı en sık KF'da konur. KF'daki hastanın kanında veya kemik iliğinde lökosit sayısı oldukça artmıştır. Aynı zamanda blast sayısı %10'dan daha azdır. Diğer fazlara göre semptomları daha hafiftir (Talpez M, Guilhot F. 2005).
2. Akselere Faz (AF): Hastaların yaklaşık %10'u bu evrede tanı alırlar. AF'da blast sayısındaki artış %10-30 arasında görülür ve trombositopeni ortaya çıkar. Dalak büyümesi görülür (Talpez M, Guilhot F. 2005).
3. Blast Faz (BF): Blast sayısı %30'dan fazladır. Kemik iliği ve kandaki blast hücre sayısı artar, eritrosit ve trombosit sayısı azalır (Talpez M, Guilhot F. 2005). BF'ye giren hastaların ortalama yaşam süreleri oldukça kısalmıştır. Hastalık BF'ye geçtiğinde olguların yaklaşık %85'inde *Ph kromozomunun* yanında ek kromozomal anomaliler geliştiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu anomalilerden en sık rastlanılanları, trizomi 8, trizomi 17, trizomi19, izokromozom 17, Y kromozom delesyonu ve ekstra *Ph kromozomu*dur (Von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. 2002, Yüksel ve ark, Mayıs 2005). KML evrelerinde kan değerlerinin miktarları Tablo.2.1'de gösterilmektedir (The Leukemia & Lymphoma Society,2003).

Tablo.2.1.KML'li hastalarda, hastalığın fazına göre vücuttaki kan değerleri (The Leukemia & Lymphoma Society,2003).

| KML evrelerinde kan tablosu | | | |
|------------------------------------|------------------------------|-----------------|--------------|
| | Kronik | Akselere | Blast |
| Lökosit | ≥ 20x10⁹/L | ↑ | ↑ |
| Blast | < %15 | %10-%30 | >%30 |
| Bazofil | ↑ | ≥20 | --- |
| Trombosit | Normal ya da ↑ | ↓ ↓ | ↓ |
| Kemik iliğindeki hücre miktarı | ↑ | ↑ | ↑ |
| Sitogenetik | t(9;22) | t(9;22) | t(9;22) |

KML'de hastaların fazlara göre ortalama yaşam süreleri farklılık göstermektedir. Hastaların sağ kalım süresi KF'de ortalama 5-6 yıl, AF'de 6-9 ay, BF'de ise 3-6 aydır (Tablo.2.2.) (Ren R., 2005).

Tablo.2.2.KML'nin tipik klinik seyri (Ren R., 2005 kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.)

| Kronik Faz | Akselere Faz | Blastik Faz |
|--|---------------------------------|---------------------------------|
| Ortalama yaşam süresi 5-6 yıl | Ortalama yaşam süresi 6-9 ay | Ortalama yaşam süresi 3-6 ay |
|  | | |

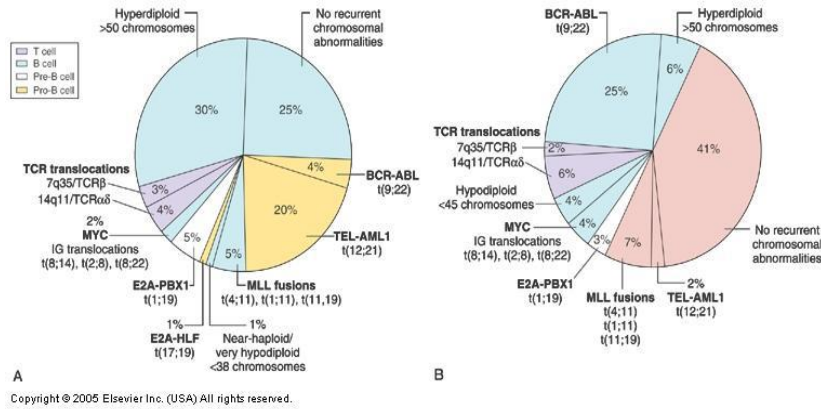
KML tanısı almış hastaların %95'inde *Ph kromozomu (Ph+)* mevcuttur. KML'li hastaların %50-90'ında dalak büyümesi (splenomegali), %10-20'sinde karaciğer büyümesi (hepatomegali) gözlenir (Corbin A.S. vd., 2011, Puttini M. vd. , 2006).

Lösemiler içinde en yavaş ve belirtisiz seyreden hastalık KML'dir. KML'ye sebep olan majör etken kan veya kemik iliğinde *Ph kromozomunun* varlığıdır. Kromozom 9 ile kromozom 22 arasındaki karşılıklı translokasyon sonucu *Ph kromozomu* oluşur. Oluşan bu kromozom yeni bir kimerik füzyon genin ortaya çıkmasına neden olur. Bu gen *BCR/ABL* genidir. Bu genin ürünü tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hücrede proliferasyonu, farklılaşmayı, hücresel sinyal yollarını ve büyüme faktörlerini uyarır (Arthur C, JF, Joske D, Lynch K, Hughes T. 2003).

2.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Normal lenfoid hücre topluluğu, immünglobin ve T hücre reseptörü genlerinin farklı ve klonal yeniden yapılanma sürecini geçirerek, B ve T hücrelerine proliferere olma ve farklılaşma sürecini tamamlar. Bu sürecin herhangi bir safhasında meydana gelen somatik genetik değişiklikler proliferasyonun bozulmasına, klonal olarak hücre popülasyonunda artışa ve ALL'ye neden olur. ALL'lerin yaklaşık % 75'inde kromozomal translokasyonlar mevcuttur (Haznedaroğlu İC, 2010).

ALL, çocukluk çağında en sık rastlanılan kanser türüdür. Ancak yetişkinlerde de görülebilir. Yetişkin ALL hastalarının yaklaşık %30'unda *Ph kromozomu* varlığı söz konusudur, daha zayıf bir prognoz görülür. ALL'li çocukların yaklaşık %5'inden daha azında *Ph kromozomu* vardır (Şekil.2.1.) (Druker BJ. vd., 2006).

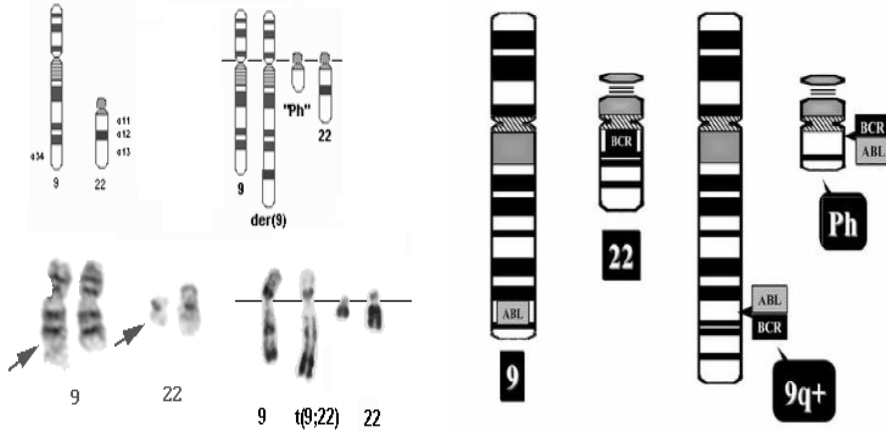


Şekil.2.1.ALL'de görülen kromozomal translokasyonlar ve sıklıkları (A. Çocukluk çağı, B. Erişkin yaş grubu) (Robinson LL. , 1987)

2.2. KML ve ALL'nin Genetik Mekanizması

Nowell ve Hungerford adlı iki araştırmacı 1960 yılında, KML hastalarından elde ettikleri tümörlü hücreleri incelediklerinde küçük bir kromozomun varlığını keşfettiler. Daha sonra bu kromozoma buldukları şehre atfen *Philadelphia (Ph) kromozomu* adını verdiler (Nowell P. C. , Hungerford D. A. ,1960). Rowley adlı araştırmacı ise 1973 yılında, *Philadelphia* adlı bu anormal kromozomun, kromozom 9 ile kromozom 22 arasında gerçekleşen bir resiprokal translokasyon sonucu oluştuğunu keşfetmiştir (Rowley J. D. ,1973). Oluşan bu translokasyonun kromozom 9 üzerinde bulunan, tirozin kinaz aktivitesine sahip olan *Abelson (ABL)* onkogeni ile kromozom 22 üzerinde bulunan fonksiyonu tam olarak bilinmeyen, çok sayıda kırılma noktası içeren *Breakpoint cluster region*

(BCR) geninin, bir araya gelmesi ile sonuçlandığı 1985 yılında gösterilmiştir (Şekil.2.2.) (Abelson, HT, Rabstein LS, 1970, Jabbour E., Cortes J. E. , Kantarjian H. M. , 2009).



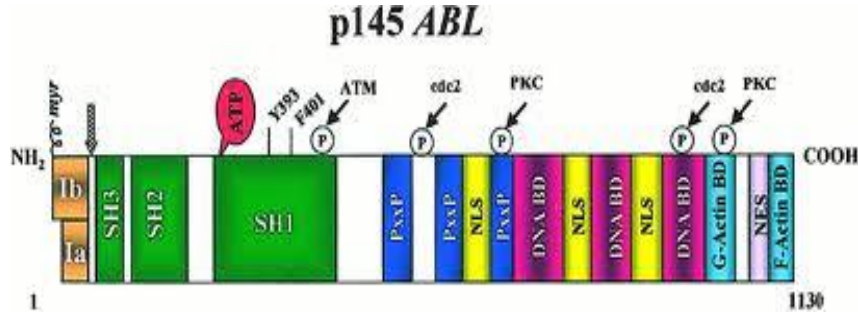
Şekil.2.2.Philadelphia kromozomu, t(9;22) (q34;q11) (Abelson, HT, Rabstein LS. 1970, Litzow, M. , 2006)

Bu translokasyon sonucunda *BCR/ABL* adı verilen yeni bir füzyon onkogen ortaya çıkar. *BCR/ABL* adını *Breakpoint Cluster Region-Abelson Leukemia*'dan alır. Bu onkogen 210 kDa (8.5 kb) büyüklüğünde kimerik bir *Bcr-Abl* proteini üretir. Bu proteine *p210^{BCR-ABL}* adı verilir (Akçora Dilara, 2007, Arthur C, JF, Joske D, Lynch K, Hughes T. , 2003) ve en önemli özelliği aktive olmuş bir tirozin kinaz bölgesine sahip olmasıdır. Bu nedenle sürekli eksprese olma eğilimindedir. KML'nin malign bir forma dönüşmesinin altında yatan temel mekanizma da budur (Nardi, V., Azam, M., Daley, G.V., 2004).

2.2.1. *ABL* Geninin Yapısı ve Fonksiyonu

ABL geni *9q34*'de yerleşmiştir. Bu genin eksprese olması sonucunda 145 kDa büyüklüğünde, 11 ekzonlu ve 230 kb genişliğinde *Abl* adlı bir protein oluşur. *Abl* proteini, nonreseptör tirozin kinaz özelliğine sahip, sinyal iletimi ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde görevli bir proteindir. *ABL1* geni, *v-ABL* (*Abelson murin Lösemi Virüs*) adlı onkogenin insandaki homologudur ve reseptöre bağlanmayan bir tirozinkinaz kodlar (Apperley JF., 2007, Ito T,2013, Jamieson C. H. M., Ailles L. E., Dylla S. J. vd. , 2004). *ABL*'nin N-terminal ucu üç tane *SRC Homoloji bölgesi* (*SH*) içerir. Bunlar *SH1*, *SH2* ve *SH3*'tür. *ABL*'nin Tirozinkinaz (TK) özelliğini bu bölgeler düzenler (Laneuville P. , 1995). Bunların içinde en önemlisi *SH1* bölgesidir. Bu bölge TK aktivitesine sahiptir. *SH2* bölgesinin fonksiyonunda eksiklik olduğunda fosfotirozine bağlanma ilgisinde azalma görülür

ve *ABL*'nin transforme olma kapasitesinde düşme meydana gelir. *SH3* bölgesi ise, *TK* fonksiyonunun negatif düzenleyicisidir (Deininger, M., Vierra, S, 2000). *ABL* geninde ekzon 1 alternatif splicinge uğrar ve sonucunda iki farklı *Abl* proteini oluşur. Bunlar; Tip 1a ve Tip 1b'dir. Tip 1a izoformu 1b'den daha kısadır (Cilloni D, Saglio G, 2012, Khorashad vd. , 2008, O'Hare T., Eide C. A. , Deininger M. W. N. , 2007). *ABL* geninin merkezinde *PxxP* adlı prolinden zengin bir dizi bulunur. Bu bölge sayesinde *SH3* bölgelerine, DNA bağlanma bölgelerine (DNA-BD), nükleer lokalizasyon sinyallerine (NLS), nükleer export sinyallerine (NES), G- (monomerik) ve F- (filamentous) aktin- bağlanma bölgelerine bağlanır. *ABL* geninin C-terminal ucunda üç tane NLS, üç tane DNA-BD, bir tane NES, bir tane G-Aktin BD ve bir tane F-Aktin BD bölgeleri yer alır. Fosforilasyon bölgeleri ise; *Ataxia teleangiectasia mutated (Atm)*, *cdc2*, *protein kinaz c (PKC)* ve *tirozin 393 (Y393)*'dir (Şekil.2.3.) (Cömert Melda, Baran Yusuf, Saydam Güray, 2013). *ABL* geni *BCR* genine göre daha karardır.

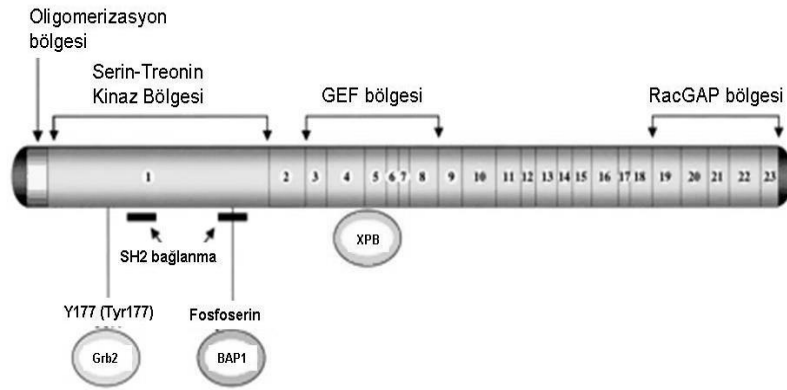


Şekil.2.3. *Abl* proteininin moleküler yapısı (Cömert Melda, Baran Yusuf, Saydam Güray, 2013)

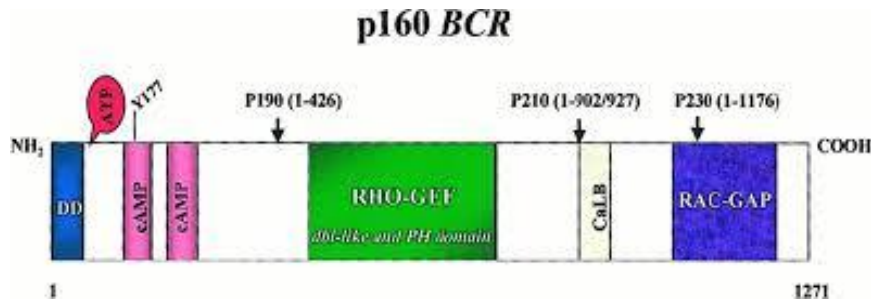
2.2.2. *BCR* Geninin Yapısı ve Fonksiyonu

BCR geni *22q11*'de yerleşmiş, 23 ekzonlu, 130 kb uzunluğunda, ekspresyon aktivitesi sürekli ve 160 kDa büyüklüğünde sitoplazmik bir protein üretir. Bir *serin-treonin kinaz* olarak görev alır (Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, vd. , 2004) (Şekil.2.6.). İnsanda en çok beyin dokusunda ve hematopoetik hücrelerde eksprese olmaktadır. Hematopoetik hücrelerde özellikle myeloid farklılaşmanın erken evrelerinde etkin olduğu, hücre olgunlaştıkça ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. *BCR* geninin ayrıca 130 kDa ağırlığında ikinci bir protein ürettiği de bilinmektedir. *Bcr* proteininin NH_2 ucundaki ilk ekzon, 14-3-3 protein ailesindedir ve *serin treonin kinaz* kodlar. *BCR*'nin N-terminal ucunda 'coiled-coil' in vivo ortamda dimerizasyona olanak sağlar. Merkezde dbl benzeri ve pleckstrin-homoloji (PH) bölgelerini içerir.

PH bölgesi, Rho guanidin exchange faktörleri üzerindeki guanidin trifosfatın (GTP) guanidin difosfata (GDP) dönüşümünü uyarır. Rho guanidin exchange faktörleri, nükleer faktör kapa beta ($NF-K\beta$) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlar. CaB adlı kalsiyum lipid bağlanma bölgesi yer alır. C-terminal ucu ise, Ras-GTPaz aktivitesine sahiptir ve Ras guanozin trifosfat-aktivatör protein (RAC-GAP) bölgesi olarak adlandırılır (Şekil.2.4.). Üç ana kırık noktasına sahiptir; makro-bcr (M-bcr), minör-bcr (m-bcr) ve mikro-bcr (μ -bcr) (Hanfstein B. vd. , 2011) (Şekil.2.5.).



Şekil.2.4. *BCR* geninin moleküler yapısının şematik gösterimi (Hanfstein B. vd. , 2011)



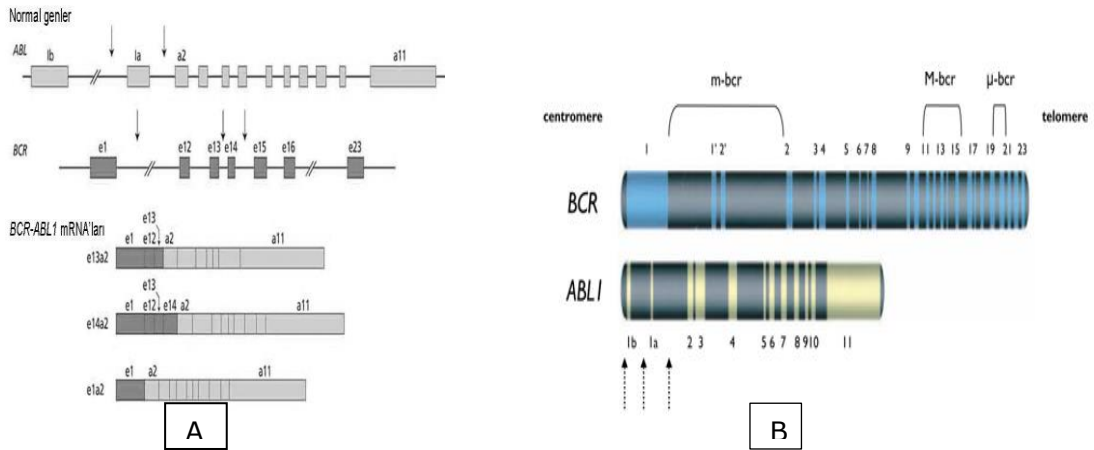
Şekil.2.5. *Bcr* proteininin moleküler yapısı (Hanfstein B. vd. , 2011)

2.2.3. *BCR/ABL* Füzyon Geni ve Moleküler Mekanizması

9.kromozomun uzun kolunun 34 bölgesi ($9q34$) ile 22.kromozomun uzun kolunun 11 bölgesi ($22q11$) arasında bir mutasyon sonucunda resiprokal translokasyon meydana gelir. *BCR/ABL* füzyon geni kromozom $9q34$ lokusundaki *ABL* onkogeninin 3' ucu ile kromozom 22'deki *BCR* geninin 5' ucunun bir araya gelmesiyle oluşur

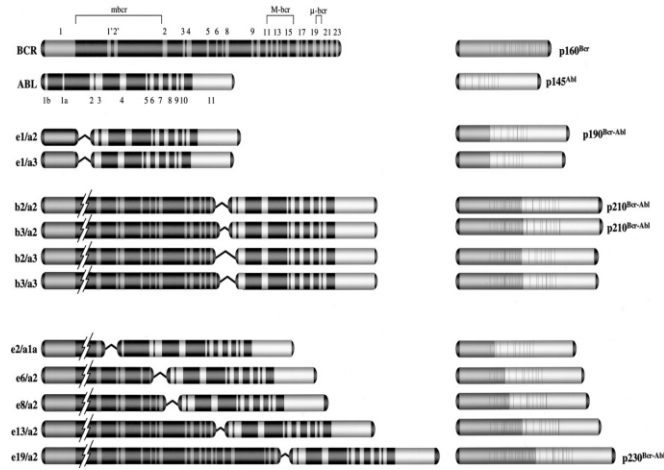
(Walz, C., and Sattler, M. , 2006). *ABL1* geninde kırık 5' ucunda 300 kb'lık bölgede herhangi bir yerde gerçekleşebilir. Bu kırık genelde alternatif 1. ekzonlar arasındaki intronda oluşur (Reddy Premkumar E. , Aggarwal K. Aneel, 2012). BCR geninde üç farklı kırık noktası oluşabilir (Şekil.2.6.) :

1. KML'li hastaların yaklaşık %95'inde ve Ph+ ALL hastalarının yaklaşık 1/3'ünde Majör-BCR (M-BCR) bölgesinde kırık oluşur. Genelde 13. ekzondan ya da 14. ekzondan sonraki intronda meydana gelir. Her iki durumda da oluşan hibrid transkript 210 kDa ağırlığındadır ve *p210^{BCR-ABL}* adlı bir füzyon proteini oluşturur.
2. KML ve AML'lilerin çok azında, Ph+ ALL'lilerin 2/3'ünde minör-BCR (m-BCR) bölgesinde kırık oluşur. Kırık 1. ekzondan hemen sonra meydana gelir. Oluşan hibrid transkript 190 kDa ağırlığındadır ve *p190^{BCR-ABL}* adlı bir protein kodlar.
3. KML ve nötrofilik KML vakalarında üçüncü kırık noktası mikro-BCR (μ -BCR)'dir. 19. ekzondan sonra oluşur. Oluşan hibrid transkript 230 kDa ağırlığındadır ve *p230^{BCR-ABL}* proteinini kodlar.



Şekil.2.6. A)BCR ve ABL1 genlerindeki farklı kırık noktaları ve oluşan mRNA'ların şematik gösterimi B)BCR ve ABL genlerinin kırılma noktaları (Melo, V. J. , Deininger W.N.M. 2004, Quintas-Cardama A, Cortes J. 2009).

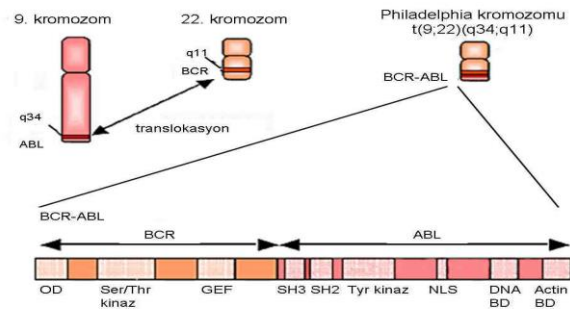
Bazı ALL ve KML hastalarında en sık gözlenen üç kırılma noktası haricinde farklı ve nadir görülen noktalar da bildirilmiştir (Arthur C, JF, Joske D, Lynch K, Hughes T. , 2003) (Şekil.2.7.)



Şekil.2.7. *BCR*, *ABL1* ve *BCR-ABL* genlerinin ve proteinlerinin şematik gösterimi. Farklı kırk noktalarına göre olası füzyon genleri sol tarafta, oluşacak proteinler ise sağ tarafta gösterilmiştir (Arthur C, JF, Joske D, Lynch K, Hughes T. , 2003).

Translokasyon sonucu oluşan kimerik gene (*BCR-ABL*) bağlı olarak gelişen ilk yeniden düzenlenme *Ph kromozomudur* ve küçük bir akrosentrik kromozom yapısındadır. KML'li hastaların yaklaşık %95'inde bu kromozom gözlenir (Baccarani vd. , 2006). Oluşan *BCR/ABL* geni *TK* aktivitesi kazanarak, anormal hücre lokalizasyonuna sahip bir *Ab11* proteini üretir (*p210 füzyon proteini*) (Hochhaus A, La Rosee P, Muller MC, Ernst T, Cross NC, 2011) (Şekil.2.8.).

ALL'li hastaların yaklaşık %20'sinde *BCR/ABL füzyon geni* gözlenir. KML hastalarındaki *BCR/ABL* geninden farklılık gösterir. Translokasyon oluşurken *BCR* genindeki kırık farklı bir bölgede meydana gelir ve oluşan *BCR/ABL* füzyon proteini (*p185*) *p210* proteininden daha küçüktür (Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.S. , 2002).



Şekil.2.8. *Philadelphia* kromozomunun yapısı (*Ph*) *t(9;22)* translokasyonunun kırık noktalarının, *Ph kromozomunun* ve *BCR/ABL1* füzyon molekülünün şematik gösterimi (OD: Oligomerizasyon bölgesi, Ser/Thr kinaz: Serin-Treonin kinaz bölgesi, GEF: *Guanin exchange factor*, SH3: Src Homology 3, SH2: Src Homology 2, NLS: Nukleer lokalizasyon sinyalleri bölgesi, DNA BD:DNA bağlanma bölgesi, Actin BD: Aktin bağlanma bölgesi (Jabbour E, Kantarjian H, 2012)

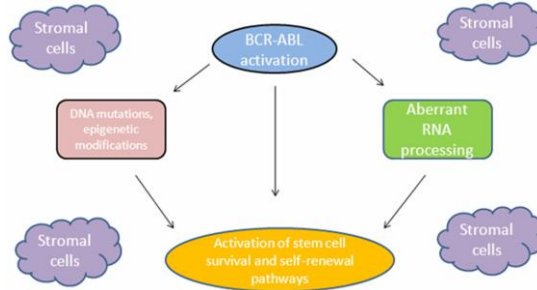
Sentezlenen $p210^{BCR-ABL}$ onkogenik füzyon proteini sürekli kinaz aktivitesine sahiptir. Bu aktivite hücre proliferasyonu, apoptozis ve adezyon ile ilgili kontrolsüz sinyal iletimlerine neden olur.

BCR/ABL proteininin 4 yoldan malignite oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir (Capdeville R, Silberman S., 2003).

1. Hücrenin adezyon özelliklerini değiştirir.
2. Mitojenik aktivasyona yol açar.
3. Apoptozu inhibe eder.
4. ABL TK aktivitesini inhibe edici proteinlerin yıkımına yol açar.

2.2.3.1. BCR/ABL 'nin Adezyon Özelliklerinin Değişmesi

KML öncül hücrelerinin kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse adezyonu azalır. Stroma hücreleri adezyon hücre çoğalmasını negatif olarak düzenler (Şekil.2.9.). KML hücreleri ise değişen adezyon özellikleri ile bu düzenden kaçış gösterirler. Yapılan çalışmalar stroma ile öncül hücreler arasındaki etkileşimde β -integrinlerin önemli rolü olduğunu göstermiştir. KML hücreleri normal öncül hücrelerde bulunmayan $\beta 1$ -integrinin adezyon inhibitör varyantını eksprese ederler (Deininger, M., Vierra, S, 2000, Moraes G. Nestal de , Souza P. S. , 2012).

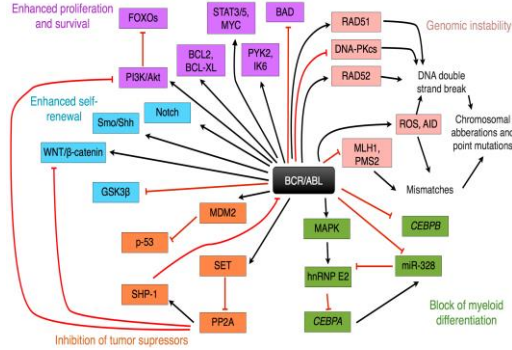


Şekil.2.9. KML kök hücre nesli ve malign yeniden düzenlemenin şematik diyagramı (Corbin A.S. vd. , 2011).

2.2.3.2. Mitojenik Sinyalizasyonun Aktivasyonu

BCR/ABL 'nin karıştığı sinyal yolları *Ras*, *mitojen-aktivatör protein (MAP) kinazlar*, "*signal transducers and activators of transcription*" (*STAT*), *fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-K)*, ve *Myc*'dir. Etkileşimlerin birçoğu tirozin fosforilasyonu aracılığıyla ve *GRB-2*, *DOK*, *CRK*, *CRK benzeri protein (CRK like protein; CRKL)*, *SRC homoloji içeren protein (SHC)* ve *casitas-B-lineage lymphoma protein (CBL)* gibi adaptör proteinlerin BCR/ABL 'ye bağlanması ile sağlanır (Cilloni D, Saglio G, 2012).

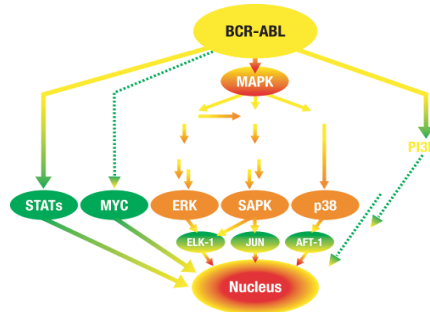
BCR/ABL onkoproteini, Ras, Jak/STAT, PI3-Kinaz ve Myc sinyal yolları gibi birçok mitojenik sinyal yolağının aktivasyonuna sebep olur ve hücrenin çoğalmasını indükler (Franks, L. M., Teich, N. M., 2001) (Şekil.2.10.).



Şekil.2.10. *BCR/ABL* geni; büyüme, çoğalma, genomik istikrarsızlık, kansere dönüşüm ve sağ kalım gibi birçok hüresel faaliyette rol alan sinyal yollarını etkilemektedir (Nardi, V., Azam, M., Daley, G.V., 2004).

2.2.3.2.1. Ras ve MAP Kinaz Yolağı

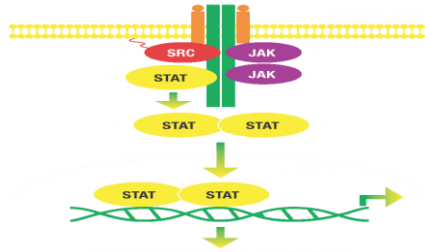
Tirozin 177'nin otofosforilasyonu ile *Ras*, inaktif *GDP* bağlı durumdan aktif *GTP* bağlı duruma geçer. *Ras*'ın aktivasyonu *Ph+* lösemilerin patogeneğinde önemlidir. *IL-3* gibi sitokin reseptörlerinin uyarılması *Ras*'ın aktivasyonuna neden olur ve aktif *Ras* proteini *serin-threonin kinaz Raf*'a bağlanır ve *Raf* proteini hücre membranında toplanır. Burada *serin-threonin* amino asitlerinden fosforillenen *Raf* proteini aktif hale geçer. *Raf*, gen transkripsiyonunun aktivasyonuna neden olan *Mek1/Mek2* ve *Erk* üzerinden sinyal yolağını başlatır. *MAP kinaz* yolağının üçüncü kolu *p38*'in *BCR/ABL* transforme hücreler ve diğer mitojenik potansiyeli olan yollarda aktif olduğuna dair kanıtlar vardır (Şekil.2.11.) (Yokoyama T, Kanno Y, Yamazaki Y, Takahara T, Miyata S, Nakamura T, 2010).



Şekil.2.11. Potansiyel Mitojenik *BCR/ABL* Sinyal Yolları (Yokoyama T, Kanno Y, Yamazaki Y, Takahara T, Miyata S, Nakamura T, 2010)

2.2.3.2.2. Jak-Stat Yolağı

Normal hücre sinyalizasyonunda sitokinlerin non reseptör TK'a bağlanması ile reseptör aktive olur ve hücre içi bölgesi ile ilişki kuran *Janus ailesi kinazları (JAKs)* tirozin fosforilasyonu ile aktifleşir. *Jak*'ın fosforile olmuş bölgelerine *Stat (Signal transducer and activator of transcription)* proteini bağlanır ve fosforillenir. Fosforillenmiş *Stat* proteinleri birbirine bağlanarak dimer oluşturur, nukleusa geçer ve DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatır. *Stat transkripsiyon faktörlerinin (Stat1 ve Stat5)* sürekli fosforilasyonu birkaç *BCR/ABL* pozitif hücre serisinde ve primer KML hücrelerinde rapor edilmiştir ve *Stat5* aktivasyonunun malign dönüşüm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *BCR/ABL* transforme hücrelerde *Stat5*'in etkisinin anti-apoptotik olduğu ve *Bcl-xL*'in transkripsiyonel aktivasyonuna karıştığı görülmüştür. Fizyolojik uyarı tarafından *Jak/Stat* yolağının aktivasyonunun aksine *BCR/ABL*, *Jak* proteinlerinin fosforilasyonu olmadan doğrudan *Stat1* ve *Stat5*'i aktive edebilir. *P210^{BCR-ABL}*'in aksine *P190^{BCR-ABL}*'da özellikle *Stat6* aktivasyonu söz konusudur (Şekil.2.12.). *JAK/STAT* yolağı, hücre çoğalmasını, farklılaşmayı ve hücre göçünü stimüle eder. *Jak/STAT* ve *transkripsiyon-5-aktivatör*, *BCR/ABL* downstream etki gösterir. *Bcr-Abl* nin fosforilasyonundan dolayı yapı aktive olur. *STAT 5*'in yokluğunda farelerde KML gelişmediği keşfedildikten sonra KML için *STAT 5* tedavi edici geçerli bir hedef olmuştur. *STAT 5* fosforilasyonunun inhibe olması lösemik kök hücrelerin elimine edilmesi için ilginç bir hedef olarak gösterilmektedir (Wang X. , Zeng J. , Shi M., 2011).



Şekil.2.12. KML'de SRC ve JAK/STAT Aktivitesi (Baran Y. , 2007).

2.2.3.2.3. PI3- Kinaz Yolağı

BCR/ABL pozitif hücrelerin çoğalması için *PI3-kinaz* aktivitesi gereklidir. *PI3* kinaz yolağının aktivasyonu bir *serin-threonin kinaz* olan *Akt* kaskadını aktifleştirir. *Akt* anti-apoptotik sinyalizasyona karışır ve aktive *Akt*, *Bad*, *MDM2*, *IκB-kinaz α* gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu ve hücre içi lokalizasyonu düzenler (Şekil.2.11.) (Ito T. , 2013).

2.2.3.2.4. Myc Yolağı

Birçok insan malignitesinde *Myc* onkoproteininin aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. *Myc*'in transkripsiyon faktörü gibi etki yaptığı düşünölmekte ancak hedef genleri geniş çapta tam olarak bilinmemektedir. *Myc*'in aktivasyonu *BCR/ABL*'nin *SH2* bölgesine bağlanmasıyla sağlanır. *v-abl*-transforme hücrelerde elde edilen sonuçlar göstermiştir ki *Ras/Raf* sinyali, *siklin bağımlı kinazlar (cdck)* ve *E2F* transkripsiyon faktörü üzerinden *Myc* promotorunu aktive etmektedir (Jorgensen HG, Holyoake TL, 2007).

2.2.3.3. Apoptosis İnhibisyonu

BCR/ABL pozitif hücre dizileriyle yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin DNA hasarı tarafından indüklenen apoptozise karşı dirençli oldukları gözlemlenmiş, ancak altında yatan mekanizmalar tam anlamıyla anlaşılammıştır. Bu konuyla ilgili öne sürölen iki göröş vardır. Görüşlerden biri *BCR/ABL*'in kaspazları aktive ederek mitokondriden *sitokrom c* salınımını engellemesidir. Kaskad şeklinde gerçekleşen kaspaz aktivasyonuna *Bcl-2* ailesi üyelerinin aracılık ettikleri düşünölmektedir. *Baf3* hücre dizisinde *BCR/ABL*'in *Ras* yolağı üzerinden *Bcl-2* proteinini arttırdığı yine *32D* hücrelerinde de *BCR/ABL*'in *PI3-kinaz* yolağı üzerinden *Bcl-2* proteinini arttırdığı belirlenmiştir. Diğer bir göröş ise, pro-apoptotik bir protein olan *Bad*'in fosforilasyonudur. *Bad*'in iki serin aminoasidinden *Akt*, *Raf* ve *Ras* proteinleri tarafından fosforile edildiği, ayrıca "*Interferon consensus sequence binding protein*" (*ICSBP*)'in regölasyonunu değiştirerek apoptozisi inhibe ettiği düşünölmektedir (Sahli Ahmad Hamad Zeyad, Maya El Sabban, Maha Mouterik , Nasr Rihab, 2013).

2.3. KML ve ALL'de Tedavi Yöntemleri

On dokuzuncu yüzyılda KML için sadece arsenik kullanımı söz konusuydu. Bazı toksik etkilerine rağmen arsenik 1900'lerin başlarında radyoterapi yöntemi uygulanıncaya kadar kullanılmaya devam etti. Daha sonra radyoterapinin yerini 1960'larda busölfan ve hidroksiüre aldı. Ancak bu tedavilerin *Ph* (-) oluşturma ya da sağ kalımı iyileştirme kapasitesi yoktu. Allojenik kök hücre nakli 1980'lerde, KML için önemli bir ölüm oranıyla tek küratif tedavi şekli olmuştur. *İnterferon a*, nakil için uygun olmayan hastalarda kullanılmaya başlandı. *IF- a* giderek KML tedavisinde busölfan ve hidroksiüreanın yerini aldı. Bu tedavi ile hastaların yaklaşık 1/3'ünde sağ kalım ve uzun süreli sitogenetik yanıt elde edilmiştir. KML için iki ana tedavi seçeneği 1998 yılında, değiştirilerek *Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin (TKI)* dönemi başlamış oldu.

Bu hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi ile öncesinde uygulanan geleneksel tedavilerin karşılaştığı sınırlamalar da aşılmış oldu. *TKI*'lerin keşfi sadece KML hastaların sağ kalımı üzerinde etkili olmamış aynı zamanda diğer kanserlerin tedavisinde de etkili olmuştur (Bitencourt Roberta, Zalcborg Ilana, Iúri Drumond Louro, 2011) (Şekil.2.13.).



Şekil.2.13. KML Tedavisinin Tarihçesi. Yıllar boyunca KML hastalarının tedavisinde kullanılan yöntemler gösterilmektedir (Bitencourt Roberta, Zalcborg Ilana, Iúri Drumond Louro, 2011).

2.3.1. KML'de Geleneksel Kemoterapi

1. Busülfan: KML tedavisinde ilk kullanılan kimyasaldır, özellikle dönüşü olmayan yan etkileri fazladır. Hidroksiüreye göre en büyük dezavantajı, etkisi geç başlar ve geç sonlanır. Hidroksiüre ve busülfan hastaların %50-80'inde tam hematolojik remisyon sağlarken sitogenetik remisyon nadirdir ve hastalığın doğal seyrini değiştirmez.

2. Hidrosiüre: Ribonükleotid redüktaz inhibitörüdür. Hücre siklusunda DNA sentezi sırasında spesifik inhibitör olarak görev yapar. İlaç kesilince etkisi hemen sonlanır, *Ph kromozomunu* negatifleştirmez (Banerji L, Sattler M. , 2004).

2.3.2. Küratif Tedavi

Güncel ilaç tedavileri ile KF KML tanısı alan vakaların çoğu kaliteli bir yaşam sürdürebilirler. KML hastaları üzerinde yapılan çalışmaların hedefi küratif tedaviler geliştirmek ve tedavinin yan etkilerini azaltmaktır. Tanı anındaki KML fazına, test sonuçlarına ve yaşa göre özellikle kök hücre naklinin mümkün olup olmamasına bağlı olarak her bir hastaya yönelik tedavi yaklaşımı özel olarak belirlenir (Branford S. vd. , 2002) .

Günümüzde KML tedavisinde üç seçenek vardır: *İnterferon-alfa (IFN-a)*, *tirozin kinaz inhibitörü (İmatinib)* ve allojenik hematopoietik kök hücre nakli (AHKHN).

2.3.3. Allojenik Hematopoietik Kök Hücre Nakli (AHKHN)

AKHN özellikle genç hastalar için uygundur ki bu hastalarda hastalıktan bağımsız yaşam süresi %60-70, nakil ile ilgili ölüm %10 ve relaps oluşma ihtimali %20'dir. Yaşlı hastalarda ise tedaviyle ilişkili ölümün artmasından dolayı durum daha kötü olup tedaviden 5 yıl sonra hastalıktan bağımsız yaşam süresi %30'dur. Hastaların çoğunda hematolojik remisyon ve TSY sağlanır. Ayrıca hastalığın fazı tedavinin başarısında önemlidir (Bixby D, Talpaz M. , 2009).

2.3.4. İnterferon-alfa (IFN-a)

İnterferonlar, malign hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi antijenik uyarılara cevap olarak ökaryotik hücreler tarafından üretilen glikoproteinlerdir. Antiviral, immünomodülatör, antiproliferatif ve antianjiyogenik aktiviteye sahiptirler. Hem solid hem de hematolojik malign tümörlerde en yaygın *interferon a* kullanılmaktadır. *İnterferon a* (IFN) ile tedavide hastaların %46-80'inde tam hematolojik yanıt (THY), hastaların %13-32'sinde tam sitogenetik yanıt (TSY) ve %11-16'sında kısmi sitogenetik yanıt (KSY) sağlar (Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM, 1999). AKHN planlanmayan hastalarda tedavi seçeneklerinden biridir. IFN'nin KML'deki etki mekanizması tam bilinmemektedir. Antiproliferatif, immün modülatör, antianjiyogenetik ve stromal hücreler ile adezyon molekülleri arasındaki ilişkiyi düzenler. Sardaş ve arkadaşları IFN'nin KML tedavisinde çok etkili bir ajan olduğunu göstermişlerdir (Sardaş OS, Koç H, Beksaç M. , 1991).

ALL'li hastalarda tedavinin amacı, hastalığın remisyonla girmesini sağlayarak, hastalığın seyrini korumak ve tamamen ortadan kalkmasını sağlamaktır. Eğer hastalık relaps olursa tekrar remisyonla girmesi için çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Tedavi sırasında lösemili hücrelerin yanında sağlıklı hücreler de zarar görür ve hastada tedavi sırasında çeşitli yan etkiler baş gösterir. İlaç tedavisi başarılı olmaz ve hastalık tekrar ortaya çıkarsa kök hücre nakline gidilir (Cortes J. E. , Kim D-W, Pinilla-Ibarz J. vd. , 2012).

KF KML hastalarının tedavisinde hedef, hastaların kan sayımını normal seviyeye getirmek ve KML hücrelerini elimine etmektir. Tedavi kan hücresi sayımını genellikle normal değerlere geri çevirir ve normal veya normale yakın seviyede tutar. Dalak normal boyutlarına ulaşıncaya kadar küçülür.

2.3.5. Tedavide Uygulanan TKI'lere Verilen Yanıtın Değerlendirilmesi

KML tanılı hastalarda hastalığın kontrol edilebilmesi için uygulanan tedavinin başarılı olup olmadığını anlamak için üç aşamada bir algoritma izlenir (Castagnetti F. , Palandri F. , Amabile M. vd. , 2009):

1. *Tam Hematolojik Yanıt (THY)*, kan hücre sayımı normal değerlerdedir ve splenomegali gelişmemiştir.

2. *Sitogenetik Yanıt (SY)*, incelenen kemik iliği örneklerinde ortalama yirmi metafaz plağında görülen *Ph+* hücrelerin oranına göre gruplandırma yapılır.

(i) *Tam Sitogenetik Yanıt (TSY)*: *Ph* kromozomu yoktur ($Ph = \%0$).

(ii) *Kısmi Sitogenetik Yanıt (KSY)*: *Ph* kromozomu varlığı oranı % 1-35 arasındadır ($Ph = \%1-35$).

(iii) *Minör Sitogenetik Yanıt (MSY)*: *Ph* kromozomu varlığı oranı % 35-95 arasındadır ($Ph = \%35-95$).

3. *Moleküler Yanıt (MY)*, Uluslararası skala temel alınıp, *Real-Time PCR (RT-PCR)* kullanılarak oluşan *bcr-abl* transkriptinin kantitatif olarak düzeyinin ölçülmesi yöntemine dayanır.

(i) *Major Moleküler Yanıt (MMY)*: Oluşan *bcr-abl* transkriptinin düzeyi %0.1 veya daha azdır (*bcr-abl* transkript ≥ 3 log azalma).

(ii) *Tam Moleküler Yanıt (TMY)*: Yapılan *Real-Time PCR* yöntemiyle *bcr-abl* transkriptine rastlanmaz (Tablo.2.3.).

European LeukemiaNet (ELN)'nin 2009 yılında yayınladığı skalaya göre;

(i) İmatinib uygulandığında *THY* ilk yanıt alma süresi optimum 3 ay; *KSY* 6 ay içinde ve *TSY* 12 ayda, *MMY* ise 18 ayda ortaya çıkar.

(ii) İmatinib tedavisi başarısız olduğunda 3 ayda *THY* görülmez, 12 ayda daha az *KSY* görülür ve 18 ayda *MMY* görülmez.

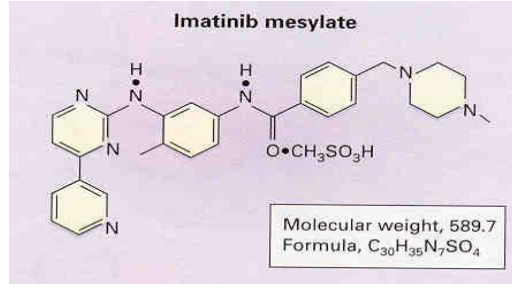
Tablo.2.3.KML tanısında kullanılan testler ve sonuçları
(www.kronikmyeloproliferatifhastaliklar.com, 30.12.2013)

| Yanıt Türü | Test | Testin Anlamı | Örnek |
|-------------------|----------------------------|---|-----------------------|
| Hematolojik yanıt | Tam Kan Sayımı (TKS, CBC) | BK Kırmızı Küre Platelet | Kan |
| Sitogenetik yanıt | FISH Klasik Sitogenetik | Philadelphia (Ph) kromozomu taşıyan hücreler | Kan ya da kemik İliği |
| Moleküler yanıt | RT-PCR | BCR-ABL transkripsiyonu | Kan ya da Kemik İliği |

2.3.6. **BCR/ABL İnhibitörleri (Tirozin Kinaz İnhibitörleri, TKI)**

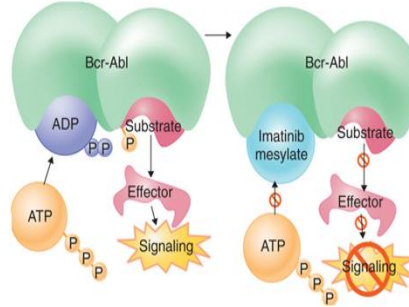
2.3.6.1. **Birinci Nesil TKI**

İmatinib mesilat (ST1571, CGP57148B,IM), ölümcül ve kronik bir hastalık olan KML'yi tedavi edebilen bir ilk nesil TKI'dir (Golemevic M. vd. , 2005). *IM* bir 2-fenil aminopirimidin bileşiği olan, KML hücrelerinde bulunan *BCR/ABL* onkoproteinini inhibe eden ticari bir ilaçtır. *IM*, *BCR/ABL* otoposforilasyonunun ve substrat fosforilasyonunun inhibisyonunu gerçekleştirip, hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek, apoptozisin indüklenmesi aracılığıyla *BCR/ABL* onkoproteinini bloke eder (Corbin AS, Rosee PL, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW, 2003). Etkisini *ABL* Kinazın katalik bölgesine bağlanan Adenozin trifosfatın (ATP) yerine bağlanarak gösterir (Şekil.2.14.). *IM*, *ABL* kinaz domainindeki amino asitlere bağlanır ve ATP'nin bağlanmasını engelleyerek *BCR/ABL* proteininin inaktif konformasyonda kalmasını indükler. Bu durumda ATP'den fosfat transferini engeller ve downstream sinyal iletim yollarını bloke ederek büyümenin duraklamasına ya da apoptozise neden olur (Şekil.2.15.) (Cortes J. , Goldman J. M. , Hughes T. , 2012).



Şekil.2.14. *İmatinib*'in kimyasal yapısı (Walz, C. , Sattler, M. , 2006)

Oldukça etkili bir oral ilaç tedavidir ve tedavi edilen birçok kişide istikrarlı remisyon sağlar. *IM* yeni tanı almış *Ph+* KF-KML hastaları ile BF, AF ya da *IF-a* tedavisine cevap vermeyen KF-KML hastaları için Faz I ve II klinik denemelerinin yüksek başarı göstermesinden sonra FDA tarafından Mayıs 2001 yılında onay almıştır. Yeni tanıli KF-KML hastalarında *International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS)* çalışmaları, *IF* ile karşılaştırıldığında *IM*'in KML'nin BF ya da AF'ye ilerleme sıklığında azalma ve hematolojik ve sitogenetik yanıt oluşmasında daha üstün olduğunu ve iyi tolere edilebildiğini göstermiştir (Haznedaroğlu İC, 2010). Bu başarının altında yatan neden, ilacın hedefe yönelik olmasıdır. *IM*, normal hücrelere minimal düzeyde zarar verir. Bu yüzden yaşam kalitesi açısından önemli bir avantaj sağlar (Hughes T. P. vd. , 2010).



Şekil.2.15. *İmatinib Mesilat*'in etki mekanizması (Haznedaroğlu İC. Kronik Myelofibrozis. www.thd.org.tr. 12.12.2013).

2.3.6.2. İkinci Nesil TKI

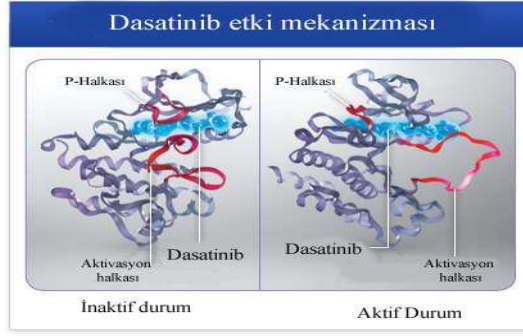
Başlangıçta *IM* ile tedavi edilen bazı hastalarda zamanla ilacı almalarının kısıtlayacak veya tedaviyi sonlandırmayı gerektirecek (intolerans) yan etkiler gelişebilir ya da *IM* yeterli cevap vermez veya tedaviye direnç oluşabilir. Bu durumu aşabilmek için 2.nesil ajanların geliştirilmesi gündeme gelmiştir. Yapılan çok sayıda çalışma (*ENESTnd*, *ASISION*, *BELA*) *IM* tedavisi alan KML hastalarında 2.nesil *TKI*'lerin daha etkili ve üstün olduğunu göstermiştir (Goldman J. M. , 2007) (Tablo.2.4.).

2. Nesil TKI'ler daha hızlı ve daha iyi yanıt oluşmasına izin vermekte ve sonuçta hastalığın ilerleme oranında önemli derecede azalma sağlamaktadır. Bu nedenle günümüzde yeni tanı almış KML hastalarına uygulanacak ilk tedavide *IM* ek olarak İkinci Nesil TKI seçenekleri arasında gösterilmektedir (National Cancer Institute [homepage on the Internet]. Accessed July 23, 2013).

Tablo.2.4. *ENESTnd*, *DASISION* ve *BELA* klinik denemelerinin 12 ay sonraki sonuçları 2.nesil TKI'lerin *Tam Sitogenetik Yanıt (TSY)* ve *Major Moleküler Yanıt (MMY)* oranının 1.nesil TKI olan *IM*'e karşı başarısını göstermektedir (National Cancer Institute [homepage on the Internet]. Accessed July 23, 2013).

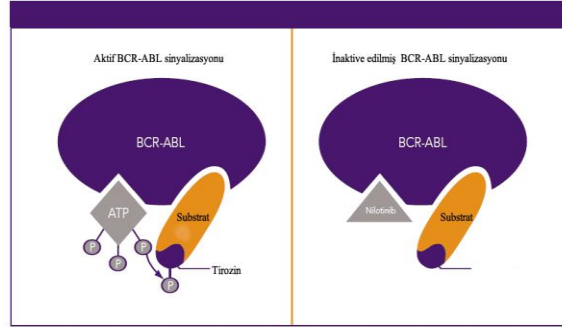
| Sonuçlar | DASISION trial | | ENESTnd trial | | BELA trial | |
|-------------------|----------------|----------|---------------|----------|------------|----------|
| | Dasatinib | İmatinib | Nilotinib | İmatinib | Bosutinib | İmatinib |
| TSY(12 ay sonra%) | 83 | 72 | 78 | 65 | 70 | 68 |
| MMY(12 ay sonra%) | 46 | 28 | 44 | 22 | 41 | 27 |

İkinci nesil TKI, *Dasatinib (DA)*, *Nilotinib (NI)* ve *Bosutinib (BO)*'tir. *DA (BMS-354825)*, bir 2. nesil TKI'dir. FDA tarafından 2007 yılında, KF-KML hastalarında *IM*'ten sonra ikinci aşamada kullanılacak bir ilaç olarak onay almıştır. *Dasatinib*'in avantajları, ATP bağlanma bölgesine daha kuvvetli ve kolay bağlanması ve *ABL Kinazın* hem inaktif hem de aktif formuna bağlanabilme yeteneğine sahip olmasıdır. Aynı zamanda *Src ailesi*, *c-Kit*, *Platelet Derived Growth Factorreceptor (PDGFR)* ve *efrin-A-reseptör* gibi diğer onkogenik kinazları da etkiler (Muller M. C. vd. , 2009) (Şekil.2.16.). *DA*, en çok *IM*'e direnç oluşturan *ABL* mutasyonlarına etki eder. Ama *T315I* mutasyonuna etki edemez. *START-C* denemelerinde KF-*IM* dirençli hastalarda *DA* kullanımı değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda *DA* kullanımının bir yan etkisi olarak hastaların bazılarında plevral efüzyon gelişmiş ama başarılı bir şekilde bu durum düzeltilmiştir. *DA*'e karşı direnç gelişimine neden olan mutasyonlar; *V299L*, *T315A*, *F317L/N/C* ve *T315I* mutasyonlarıdır (Nicolini FE vd., 2013).



Şekil.2.16. Dasatinib etki mekanizması (O'Hare T. , Eide C. A. , Deininger M. W. N. , 2007'den değiştirilerek alınmıştır.)

Nilotinib (AMN107) bir ikinci nesil *TKI'dır*. FDA tarafından 2007 yılında KF-KML hastalarında ikinci aşamada kullanılabilecek bir tedavi seçeneği olarak onay almıştır. *BCR/ABL'nin* sadece inaktif formuna bağlanır (Şekil.2.17.). ATP bağlama bölgesine *IM'ten* daha kuvvetli bağlanır ve TK aktivitesini inhibe etme yeteneği 20-50 kat daha fazladır. Rosti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yeni tanılı KF-KML'lilerde 12 ay sonra *TSY* %96 olduğu saptanmıştır. Moleküler yanıtın ise 12 ay sonra %85 ulaştığı görülmüştür. *NI T315I, E255K/V, F359V/C ve Y253H* mutasyonları hariç diğer *IM* direnç mutasyonlarına karşı etkilidir (Saglio G. , Kim D-W. , Issaragrisil S vd, 2010). Önemli bir yan etkisi ise, hiperglisemiye neden olmasıdır. Bu nedenle diyabetik hastalarda bu ilaca başlanmadan önce önlem alınmalıdır (Rosti G. , F. Palandri, F. Castagnetti vd., 2009).



Şekil.2.17. Nilotinib etki mekanizması (Rosti G. , F. Palandri, F. Castagnetti vd., 2009).

Bosutinib (BO-SKI-606) yeni bir 2. nesil oral yoldan *Src/Abi* etkili *TKI'dır*. Hücre kültürü çalışmalarında KML hücre dizilerinde *IM'e* karşı daha etkili olduğu gösterilmiştir. *BO'nin* klinik sonuçları birinci, ikinci ve üçüncü aşama KML tedavisinde ümit verici bir ajan olarak görünmektedir. *IM* ile karşılaştırıldığında 12 ay sonra oluşan *TSY* benzer oranlarda olmasına rağmen ilk *TSY* oluşumu *BO* kullanılan hastalarda daha erken ortaya çıkmaktadır.

MMY oluşumu ise 12 ay sonra *IM*'te %27, *BO*'te %41'dir. *IM*, direnç mutasyonlarından *V299L* ve *T315I* hariç diğerlerinde oldukça etkilidir (Tablo.2.5.). Yan etkileri ise, ishal ve karaciğer enzim düzeylerinin yükselmesidir (Ohanian M. , Cortes J. , Kantarjian H. , Jabbour E., 2012).

Tablo.2.5.Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin isimleri ve T315I mutasyonuna etkileri (Ohanian M. , Cortes J. , Kantarjian H. , Jabbour E., 2012, kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

| <i>TKI</i> | Orijinal ismi | <i>TKI</i> nesli | T315I mutasyonuna etkisi |
|------------------|---------------|------------------|--------------------------|
| <i>İmatinib</i> | STSI571 | Birinci | Yok |
| <i>Dasatinib</i> | BM-354825 | İkinci | Yok |
| <i>Nilotinib</i> | AMN107 | İkinci | Yok |
| <i>Bosutinib</i> | SKI-606 | İkinci | Yok |
| <i>Ponatinib</i> | AP24534 | Üçüncü | Var |

2.3.6.3. Üçüncü Nesil TKI

Ponatinib (*PO-AP24534*) oral yoldan alınan bir *TKI*'dir. Özellikle bütün *TKI*'lere (*IM*, *DA*, *NI* ve *BO*) direnç geliştiren *T315I* mutasyonunu hedef alan bir ajandır. *PO*, *M244V*, *G250E*, *Q252H* *Y253F/H*, *E255K/V*, *F317L* *M351T* ve *F359V* mutasyonlarını da inhibe etme özelliğine sahiptir. *PO* ile *IM*'in *BCR/ABL* bağlanma mekanizması benzerdir. Ancak *PO*, yapısında metilfenil ve pürin grupları arasında karbon-karbon üçlü bağına sahiptir. Bundan dolayı *T315I* mutasyonunun oluşumunu inhibe eder (O'Hare T. , Zabriekie M. , Eiring A. vd. , 2012) (Tablo.2.6.).

Tablo.2.6.KML tedavisinde kullanılan ilaçlar ve hedefleri (O'Hare T. , Zabriekie M. , Eiring A. vd. , 2012' kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

| Ajan | Hedefi | Çalışma alanı |
|--|--|---|
| FDA onayı alan Imatinib Dasatinib Nilotinib | Bcr-Abl,Kit,PDGFR-A,PDGFR-B Bcr-Abl,Src kinaz ailesi,Kit,PDGFR-A,PDGFR-B Bcr-Abl,PDGFR,c-Kit,EPHB4 | |
| Araştırma adı SKI-606[100] INNO-406[100] MK-0457[100] LBH589[100] XL-228[100] PHA739358[100] | Bcr-Abl, Src Bcr-Abl, PDGFR, c-Kit, Lyn kinazlar Aurora kinaz, Jak-2, Bcr-Abl Histon deasetilaz Aurora kinaz Aurora kinaz | Faz I,II Faz I Faz I,II Faz I,II, III Faz I Faz II |
| Klinik öncesi SGX70393[96] WP1130[98] | | <i>İn vivo</i> (mice) <i>İn vivo</i> (mice) |

2.3.6.4. *Imatinib'e Karşı Direnç Gelişmesi*

Antibiyotikler, antiviral ajanlar ve antilösemik ilaçlara karşı vücut tarafından direnç gelişebilir. Elde edilen klinik raporlardan *IM'* e karşı da direnç gelişebildiği görülmektedir (Ray A. , Cowan-Jacob S.W. , Manley P. W. , Mestan J. and Griffin J.D. , 2007). Hastaların yaklaşık %25'inde *IM* karşı direnç gelişir. Bunun sebebi, *BCR/ABL'nin* aşırı ekspresyonu, *BCR/ABL'nin* amplifikasyonu, P-glikoprotein (P-gb) dâhil olması, Lyn tirozin kinaz aktivasyonu, serumdaki α -asit glikoprotein (orosomukoid) ve hOCT1'in (insan organik geçiş transport sistemi 1) artışı, 9q34 gen bölgesindeki büyük submikroskopik delesyonlar ve nokta mutasyonlarıdır. Bunlardan en önemlisi nokta mutasyonlarıdır (Von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. , 2002).

IM'e dirençte primer ve sekonder olmak üzere iki tip direnç gelişimi görülür. Bazı hastalarda ilk *IM* tedavisine karşı hiç yanıt görülmez, bu primer dirençtir. Primer dirençte, 3 ay içinde *THY*, 6 ayda *TSY* ve 12 ayda *MSY* alınamaz.

Uygulanan tedaviye ilk cevaptan sonra yanıt alınamadığı, *THY*, *MSY* ve *TSY* kaybedilmesi; AF ve BF'ye geçiş durumunda ise sekonder ya da kazanılmış direnç ortaya çıkar (Talpaz M, Guilhot F. , 2005).

KML hücrelerinde *TKI* direnci oluşması iki ana mekanizma ile açıklanır (Reddy Premkumar E. and Aggarwal K. Aneel , 2012) (Şekil.2.18.). *BCR/ABL*'den bağımsız mekanizma ve *BCR/ABL*'ye bağımlı mekanizma. *BCR/ABL*'den bağımsız mekanizmada, farmokokinetik nedenler, *MDR1* geninin aşırı ekspresyonu sonucunda yüksek *P-glikoprotein* seviyesi, serum proteini olan *a1 asid glikoprotein (AGP)* 'inin artmış ekspresyonu, sitogenetik klonal evrim ve Src kinaz ailesinin aşırı ekspresyonu söz konusudur. *BCR/ABL* onkogeninden bağımsız olarak *Src/Ras/Raf/MEK/Lyn/*, *STAT*, *Wnt/β-katenin*, *Hedgehog*, *FoxO* ve *SIRT1* gibi sinyal yollarının aktivasyonu KML'nin ilerleyişi ve direnç oluşumunda önemli bir rol oynayabilir (Reya T, vd., 2003). Bağımlı mekanizmada ise; *BCR/ABL* onkogeninin aşırı amplifikasyonu veya duplikasyonu, *BCR/ABL* Kinaz bölgesindeki nokta mutasyonları sonucu meydana gelir ve *ABL* kinaz aktivitesinin yükselmesine yol açar. *BCR/ABL* mutasyonları *IM*-direnç gelişiminde önemli bir yere sahiptir ve dirençli hastaların yaklaşık %40-90'ında mutasyon görülebilir. *IM* sadece *ABL* enzimidaki ATP bağlama bölgesi ile etkileşime girebilir (*ABL* inaktif olduğunda). *BCR/ABL* bağlama alanında mutasyonlar meydana gelir ve *IM* bağlanmasını etkileyerek direnç gelişmesine neden olur. *Bcr/Abi* onkoproteininde yüzün üzerinde *IM* bağlanmasını etkisiz kılan mutasyon tipi saptanmıştır. Bu mutasyonlar *IM*-bağlanma yerinde konformasyona neden olarak aktif formdaki onkoproteini değiştirir ve *IM* bağlanamayabilir (Tablo.2.7.) (Druker BJ, vd. , 2006).

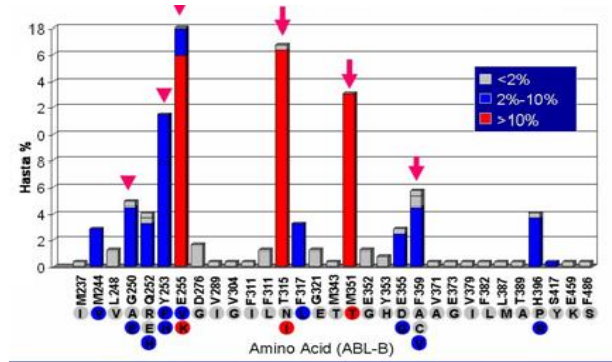
Tablo.2.7. İmatinib direnç mekanizmaları (Druker BJ, vd. , 2006' kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

| Kinaz-domain mutasyonları | Mutasyon-bağımsız | Duplikasyon | Diğer hedefler |
|---|--|---------------------------------|---------------------------------------|
| T315I P-loop -M244V -G250E -Y253F/H -E255K/V M351T F359V SH2,SH3 Cap | PI3K/Akt MD-1, Pgb HIF-1 Ceramide metabolizmasında değişiklik | Abl dizisinin amplifikasyonu | P53 Bcl-2 Jak2/STAT-5 hOCT-1 |



Şekil.2.18. İmatinib Direncinin Bilinen Mekanizmaları (Kocacıyık Vasfiye Betül, 2011)

Mutasyonlar 4 grup şeklinde kategorize edilir. İlk grup *IM* bağlanma bölgesidir. *ABL 1a* proteinin 315. pozisyonunda, *1b* proteininde 334 pozisyonundaki *treonin (Thr,T)* amino asidinin izolösine (*Ile,I*) dönüşümü dirençli hastalarda saptanan ilk mutasyondur ve bu mutasyonun varlığı tedaviye direnç gelişmesine neden olmaktadır (Şekil.2.19.). İlacın bağlanma ilgisini azaltan bu dönüşümün iki şekilde etki yapabileceği öne sürülmektedir. İlkinde, *Thr 315'in* yan zinciri tarafından sağlanan oksijen atomunun bulunmaması ve bu durumun da *IM'in* ikinci amino grubu ile *ABL* arasındaki hidrojen bağının oluşmasını engellemesi; ikinci olarak da *İzolösinin (Ile)* yan zincirinde ekstra hidrokarbon grubu içermesi nedeniyle *IM'e* bağlanmayı engellemesi şeklindedir. Sonuçta *T315I* mutasyonu *IM'in* bağlanabilme yeteneğine zarar vermekte ancak ATP'nin bağlanmasını etkilememektedir (Hanfstein B. vd. , 2011).

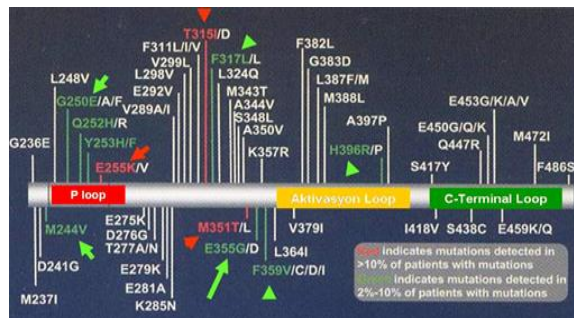


Şekil.2.19. İmatinib direnci olan hastalarda *ABL* kinaz bölgesinde mutasyonların görülme sıklığı (Hanfstein B. vd. , 2011).

IM bağlanma bölgesindeki diğer mutasyon ise *ABL* proteininin 317. pozisyonundaki *fenilalaninin (Phe, F)* lösine (*Leu, L*) dönüşmesine neden olan *F317L* mutasyonudur. *F317L* orta derecede *IM* direncine neden olup daha az sıklıkla görülürken *T315I* daha geniş ilaç duyarsızlığına neden olur (Izzo B, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Martinelli G, 2006)

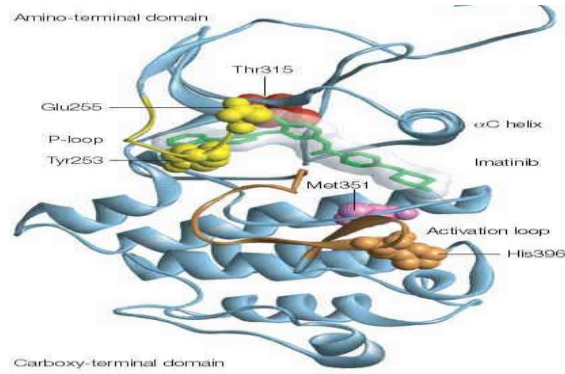
İkinci grup mutasyonlar ATP bağlanma bölgesinde (fosfat ya da P-loop) bulunur. Bu bölge aşırı derecede esnek, oldukça korunmuş glisince zengin, 248-256 aminoasit genişliğinde olup, *IM* ile hidrojen ya da van der Waals bağları ile etkileşime girer. Burada meydana gelen mutasyonlar P-loop'un esnekliğini modifiye eder ve *IM*'in bağlanması için gerekli konformasyonun kararlılığını bozar. Burada görülen mutasyonlar tirozin253fenilalanin/ histidin (Y253F/H), glutamikasit255lizin/ valin (E255K/V), glisin250glutamik asit / alanin/ fenilalanin (G250E/A/F) ve glutamin252histidin/ arjinin (Q252H/R) 'dir. *IM* tedavisi alan P-loop mutasyonlarına sahip olan hastaların, P-loop mutasyonlarına sahip olmayan hastalara göre daha kötü prognoza sahip olduğu düşünülmekte ve bunun ispatı için daha geniş serilerle çalışma yapılması önerilmektedir (Jabbour E, Cortes J. E, Kantarjian HM, 2009).

Üçüncü grup mutasyonlar aktivasyon bölgesinde yer alırlar. *ABL* kinazın aktivasyon loop'u oldukça korunmuş 3 aminoasit rezidüsü (aspartat-fenilalanin-glisin) ile 381.aminoasitten başlar. Kinazın bu bölgesi inaktif ya da aktif konformasyonu adapte eder ve *flexible* aktivasyon-loop'u katalitik aktiviteyi kontrol eder. Molekülün aktif veya inaktif durumuna bağlı olarak konformasyonu değişir. *IM*, *ABL*'yi inaktif konformasyonda stabil kılar ve *ABL* aktif durumdayken bağlanamaz. Aktivasyon loop'daki mutasyonlar; fenilalanin382lösin (F382L), glisin383aspartik asit (G383D), lösin384metiyonin (L384M), lösin387fenilalanin / metiyonin (L387F/M), metiyonin388lösin (M388L), histidin396arjinin / prolin (H396R/P), alanin397prolin (A397P) loopun kapalı konformasyonunun istikrarı için gerekli enerji dengesini bozar ve böylece aktif konformasyon meydana gelir (Şekil.2.20.) (Kantarjian H, Shah N. P, Hochhaus A, vd. , 2010).



Şekil.2.20. Imatinib'e karşı klinik direnç ile ilişkili BCR-ABL kinaz bölge mutasyonlarının haritalanması. Yeşil ile gösterilmiş amino asit yer değişimleri mutasyon görülen hastaların 2-10% taranmış; kırmızı ile gösterilmiş amino asit yer değişimleri ise mutasyon görülen hastaların >10% 'unda saptanmıştır (Ramirez P, Dipersio J. F. , 2008).

Dördüncü grup mutasyonlar ise katalitik bölgede yer alır. Katalitik bölge, molekülün P-loop ile aktivasyon bölgesi arasında yer alıp, aktivasyon loop ile kapalı topolojik ilişki içindedir ve 351-359 rezidülerini kapsar. Katalitik bölge molekülün *IM* ve diğer küçük molekülü *TKI*'nin bağlandığı aralıkta yer alır. Hem *ABL* hem de *SRC*; in aktif konformasyon ve katalitik olarak aktif konformasyon arasında yer değiştirir. Bu in aktiften aktif duruma yer değiştirme, otoinhibisyon işlemi olarak bilinen kinazın kendini regüle etmesi ile gerçekleşir. İn aktif durumda, aktivasyon loop katalitik bölgeye doğru içe katlanır; aktif durumda ise bu aktivasyon loop katalitik bölgeden uzaklaşır. Buradaki mutasyonlar *Metiyonin351treonin/lösin (M351T/L)*, *glutamikasit355glisin/ aspartik asit (E355G/D)*, *lizin357arjinin (K357R)*, *fenilalanin359valin/sistein/aspartik asit/izolösin (F359V/C/D/I)* 'dir. *M351T*, *ABL SH2 bölgesi* ile ilişki halindedir. Katalitik bölgede meydana gelen mutasyonlar *IM*'in bağlanmasını etkiler. İlginç olarak *M351T* mutasyonu kinaz aktivitesinde önemli düşüşle sonuçlanır (Şekil.2.21.) (Schindler T. vd. , 2000).



Şekil.2.21. *Imatinib* (yeşil renk) ile kompleks halde bulunan *ABL kinaz bölgesinin* yapısı ve *BCR/ABL*'ye *imatinib* direncini kazandıran mutasyonel hot spot noktalar (Schindler T. vd. , 2000).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamızda ESOĞÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda tanısı konmuş, *Ph+* olan ve *TKI* tedavisi uygulanan yirmi dokuz KML ve *Ph+* olan 10 ALL hastası olgu grubu olarak değerlendirilmiştir. Aynı bölüme gelen KML hastalarından rastgele seçilmiş *Ph+* yirmi KML hasta ise kontrol grubu olarak seçilmiştir. Toplam elli dokuz tane KML ve ALL hastası çalışmaya dâhil edilmiştir. Bu hastalardan yirmi dokuzu KML dirençli hasta grubu olarak seçilmiştir. Sağlıklı bir bireyden elde edilen DNA örneği de negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Hastaların yirmi yedisi kadın (%45.76), otuz ikisi erkek (%54.24). Hastaların yaş aralığı 21-77 arasında değişmekte olup, ortalama yaş 55.95'tir. Hastaların hepsi kronik fazdadır. Çalışmamız ESOĞÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *BCR/ABL* füzyon geninde en sık gözlenen 6 farklı mutasyon 3130 Dizi Analiz Cihazında Minisekans (SNaPshot) yöntemi ile taranmıştır. Çalışılan mutasyonlar; T315I, G250E, Y253H, F317L, M351T ve E255K mutasyonlarıdır.

3.2. Gereçler

Mini sekans analizlerinde kullanılan cihaz ve sarf malzemeler aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

3.2.1. Kullanılan Gereçler

- ✓ Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)
- ✓ Nanodrop 1000 (peqLab)
- ✓ Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- ✓ 3130 Applied Biosystems Multiwell 96-well plate
- ✓ 3130 Applied Biosystems Multiwell 96-well septa
- ✓ Thermal cycler (PE GeneAmp PCR System 9700)
- ✓ Vorteks (Heidolph)
- ✓ Deep-freeze (Arçelik)
- ✓ Buzdolabı (Arçelik)
- ✓ Mikro pipet takımı (2-20-100-1000 µl) (Gilson)
- ✓ 0.2 ml'lik micro amplifikasyon strip tüpü ve kapakları (Greiner bio-one)
- ✓ Ependorf Tüpü (1,5 ml'lik)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- ✓ ABL1 PCR Primer Mix
- ✓ ABL1 MSQ Mix
- ✓ PCR Master Mix
- ✓ DMSO
- ✓ Taq DNA Polimeraz
- ✓ Ultra distile su (ddH₂O)
- ✓ dNTP
- ✓ ddNTP
- ✓ MSQ Mix (SNaPshot Miks)
- ✓ MSQ Primer Mix (ABL1 Primer Miks)
- ✓ HI-DI Formamide
- ✓ Polimer Tampon Solüsyonu (Pop-7)
- ✓ Exonuclease I + Sap (Shrimp Alkaline Phosphatase)Enzimi
- ✓ Distile su (ddH₂O)
- ✓ DNA İzolasyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I)

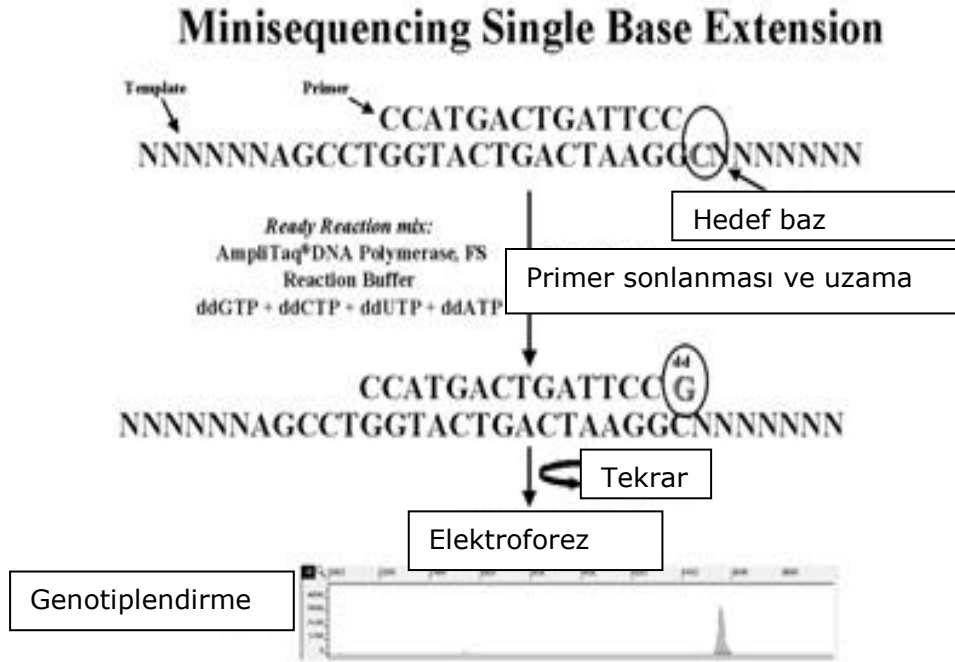
3.3. Yöntemler

Minisequencing (SNaPshot) Analiz Yöntemi

Minisekans tekniği, işaretlenmemiş oligonukleotid primerleri ve tek bir ddNTP'nin uzamasına dayalı bir tekniktir. Primer uzama reaksiyonu amplifiye olmuş hedef bölgenin pürifiye edilmesinden sonra başlar. Spesifik mini sekans primerleri, incelenecek her bir mutasyon için ayrı ayrı mutasyonun yanındaki tek bir baza uygun tasarlanmıştır. Primerler Taq DNA Polimeraz ve floresan işaretli ddNTP'lerin varlığında komplementer olduğu DNA bölgesine bağlanır. Polimeraz enzimi hedef diziyeye komplementer olarak her bir primerin 3' ucuna tek bir ddNTP'yi ekler. Reaksiyon işaretlenmiş ddNTP'leri içerir, dNTP'leri içermez. Reaksiyon sırasında diziyeye ddNTP'ler eklendiğinde dizi sonlanır. Sonuçta farklı uzunluklarda farklı renklerde DNA fragmentleri oluşur. Bu fragmentler kapiller elektroforez cihazında analiz edilir (Şekil.3.1). Mutasyonlu bölgeye komşu baza uygun primer tasarlanır. Primerlerde 5' ucunda nonspesifik poly (dA) veya poly (dGACT) kuyrukları vardır. Bu poly kuyrukları farklı uzunluklardadır ve nonspesifik background piklerin oluşumunu önlemek ve diziyi uzatmak için kullanılır. Cihazda analiz sırasında oluşan pikler farklı renkte ortaya çıkar. İlgili bölgede 3 farklı pik görme olasılığı vardır. Homozigot wild piki, homozigot mutant piki ve heterozigot wild-mutant piki. Görülen bu piklere göre yorum yapılır.

Minisekans yönteminin diğer mutasyon tarama yöntemlerine göre önemli avantajları vardır. Mutasyon bölgesindeki tek nükleotid değişimini tam olarak saptayabilir. Heterozigot ve homozigot ayrımını aynı reaksiyonda her bir mutasyon bölgesinde piklerin sayısını ve rengini temel alarak tam olarak yapabilmektedir. Basit, kolay, hızlıdır ve mutasyon bölgeleri genin farklı bölgelerine dağılmış olsa bile kullanılan primerlerin sayısına göre multipleks olarak aynı anda araştırılabilir. Multipleks reaksiyonlarda birden fazla primer/şablon kombinasyonları, tek bir tüpte reaksiyona girebilir ve oluşan ürünler tek bir elektroforez cihazında analiz edilebilir. Minisekans analizini dizi analiziyle karşılaştırdığımızda bu teknik daha hızlıdır. Aynı zamanda bu teknikte cihazda verilerinin analizi dizi analizine göre basit, kolay bir yazılımla yapılabilmektedir.

Yöntemin dezavantajı ise iyi optimize edilmesi, diğer tekniklerle konfirme edilerek sonuçların daha sağlıklı hale getirilme ihtiyacının söz konusu olmasıdır.



3.3.1. Kan ve Kemik İliği Örneklerinden DNA Elde Edilmesi

Çalışmamızda olgu ve kontrol grubu kemik iliği ve periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde robotik DNA ekstraksiyon sistemi "MagNA Pure Compact" ekstraksiyon robotu ve "MagNA pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit" kitleri kullanılmıştır. Kan ve kemik iliği örnekleri için robotik sistemdeki üretici firmanın protokolü aynen uygulanmıştır. Kan ve kemik iliği örnekleri doğrudan robotik sisteme yüklenmiştir.

“Sample volüme” 400 µl, “Elution volume” 200 µl ve “DNA isolation blood” protokolü seçilmiştir. Örnek tüplerine kan ve kemik iliği örnekleri doldurularak robot sistemine yüklenmiştir. Robotik sistemde proteinaz K, yıkama solüsyonları ve DNA’yı tutmak için manyetik boncukların ve pipetaj için boş kuyucukların bulunduğu bir kartuş sistemi, pipet uçlarının yerleştirilmesi için tip trayler, örnek ve elüsyon tüpleri için bir rak bulunmaktadır. Robotik sisteme kartuş ve pipet uçları yerleştirilip örnek ve elüsyon tüpleri koyulduktan sonra bütün işlemler otomatik gerçekleştirilir. İşlem yaklaşık 25 dakika sürer. Cihazın işlemi bittikten sonra elde edilen DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20⁰C’de saklanır.

3.3.2. PZR İçin Örneklerin Hazırlanması

- PZR Miks ve Primer Miks -20⁰C’de saklandığı dolaptan çıkarılır, oda ısısında erimesi sağlanır, vorteks ve spin atılarak malzemelerin tam olarak karışması sağlanır.
- PZR Miks, ddH₂O (distile su), DMSO, ABL 1 Primer Miks, Taq DNA Polimeraz ve DNA örneği aşağıda belirtilen oranlarda 0,2 ml’lik PZR tüplerine konulur, vortekslenip, spin atılır ve ürünlerin homejinasyonu sağlanır.

Tablo.3.1.1 Örnek İçin PZR Karışımının Hazırlanma Protokolü

| Bileşen | Miktar (µl) |
|--------------------|-------------|
| ddH ₂ O | 15,6 |
| PCR Master Mix | 4,2 |
| DMSO | 2 |
| ABL1 Primer Mix | 1 |
| TaqDNA Polimeraz | 0,2 |
| DNA (~10-100 ng) | 2 |
| Toplam volüme: | 25 |

- Hazırlanan PZR tüpleri PZR cihazına yüklenir ve aşağıdaki program protokolü uygulanır. PZR işlemi için Thermal cycler (PE GeneAmp PCR System 9700) cihazı kullanılmıştır.

Tablo.3.2. PCR programı

| | | |
|-------|--------|-------|
| 94° C | 5 dk. | |
| 94° C | 30 sn. | 35 |
| 55° C | 30 sn. | döngü |
| 72° C | 30 sn. | |
| 72° C | 10 dk. | |
| 4° C | ∞ | |

3.3.3. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR reaksiyonu sonrası ürünlerin saflaştırılması için Exonuclease I + SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) kullanılmıştır. Her bir örnek için ayrı PZR tüplerinde 0,5 µl Exonuclease I, 1 µl SAP ve 8 µl PZR ürünü karıştırılarak kısa bir pipetaj yapılır. Tüpler PZR cihazına yerleştirilir ve aşağıdaki program uygulanır. PZR işlemi için Thermal cycler (PE GeneAmp PCR System 9700) cihazı kullanılmıştır. Pürfikasyon işlemi yaklaşık 1,5 saat sürer.

Tablo.3.3. Saflaştırma Programı

| | |
|-------|--------|
| 37° C | 70 dk. |
| 72° C | 20 dk. |
| 4° C | ∞ |

3.3.4. Mini Dizileme Reaksiyonu

ABL1 Mini Dizileme Kiti sık rastlanan 6 mutasyonu içerir. Bu bölgeler: ABL1 geni ekzon 4'te bulunan G250E (**G>A**), Y253H (**T>C**), E255K (**G>A**); ekzon 6'da bulunan T315I (**C>T**), F317L (**T>C**) ve M351T (**T>C**) değişimleridir. Test, multipleks mini dizileme prensibine dayanır. ABL1 panelindeki mutasyon bölgeler multipleks PZR ile çoğaltılır. PZR ürünlerinin saflaştırılmasını takiben, test sistemi içerisindeki ABL1 mutasyon primerleri mini dizileme reaksiyonuna alınır. Ortamda bulunan floresan işaretli ddNTP'ler, her bir mutasyon için ayrı ayrı dizayn edilen spesifik mutasyon primerine polimeraz enzimi sayesinde eklenir ve primer uzama reaksiyonu sonlanır. Primerlere eklenen ddNTP'ler, mutasyonun varlığı ya da yokluğuna göre normal veya mutant nükleotide ait floresan sinyali verir. Sinyallerin görüntülenmesi ve analizi Kapiller Elektroferez cihazında yapılır.

Saflaştırılan PZR ürünleri Mini Dizileme (SNaPshot) Reaksiyonuna tabi tutulur. Reaksiyon için her bir örnek için ayrı ayrı PZR tüplerine 1 µl ABI PRISM® SNaPshot™ Mix, 9,5 µl ABL1 MSQ Primer Mix ve 1 µl saflaştırılmış PZR ürünü konularak kısa bir pipetaj yapılır. Thermal cycler (PE GeneAmp PCR System 9700) cihazına yüklenir. Cihazda işlem yaklaşık 30 dakika sürer.

Tablo.3.4. Mini Dizileme Reaksiyonu

| Bileşen | Miktar (µl) |
|----------------------------------|-------------|
| ddH ₂ O | 1,5 |
| MSQ MIKS(SNaPshot Mix) | 0,5 |
| MSQ Primer Miks(ABL1 Primer Mix) | 1 |
| Pürifiye PCR Örneği | 1 |
| Toplam volume: | 4 |

Tablo.3.5. Mini Dizileme PZR Programı

| | | |
|-------------------|--------|-------------|
| 96 ⁰ C | 10 sn. | 25 döngü |
| 50 ⁰ C | 5 sn. | |
| 60 ⁰ C | 30 sn. | |
| 4 ⁰ C | ∞ | |

3.3.5. Kapiller Elektforez (Dizileme Cihazı) Cihazına Örneklerin Yüklenmesi

Mini Dizileme reaksiyon ürünleri Applied Biosystems 3130 cihazına aşağıda belirtilen koşullara göre yüklenir:

Tablo.3.6. Kapiller Elektforez Programı

| Bileşen | Miktar (µl) |
|---------------------|-------------|
| HI-DI Formamide | 12 |
| Mini Dizileme Ürünü | 2 |
| Toplam volume: | 14 |

3.3.6. Yürütülen Örneklerin Analiz Edilmesi

Kapiller elektroforez cihazında yürütülen DNA örneklerinden elde edilen sinyaller aşağıdaki tabloya göre analiz edilmiştir. Elektroforogramdaki mutasyonlar tablodaki sıraya göre sıralanmıştır.

Tablo.3.7. Elektroforogramdaki mutasyonlar (Not: **G**: Mavi renk, **C**: Siyah renk, **T**:Kırmızı renk, **A**:Yeşil renk)

| Bölge | Nükleotid Değişimi | Değerlendirme | |
|--------------|--------------------|------------------|------------------|
| G250E | G>A | G= Normal | A= Mutant |
| Y253H | T>C | T= Normal | C= Mutant |
| E255K | G>A | G= Normal | A= Mutant |
| T315I | C>T | C= Normal | T= Mutant |
| F317L | T>C | T= Normal | C= Mutant |
| M351T | T>C | T= Normal | C= Mutant |

4. BULGULAR

4.1. Araştırma Grubunun Prognostik Özellikleri

Çalışmamızda toplam *Ph* + elli dokuz KML ve ALL hastası incelenmiştir. Bunlardan 10'u ALL olgu ve yirmi dokuz KML hastası *TKI* karşı dirençli grup olarak değerlendirilmiştir. *Ph*+ yirmi KML hastası kontrol grubu ve 1 normal DNA örneği negatif kontrol olarak seçilmiştir. Toplamda otuz dokuz hasta KML-ALL olgu, yirmi hasta KML kontrol grubu olarak çalışılmıştır. KML dirençli grubunda E/K oranı:13E/16K, ALL hasta grubunda E/K oranı:7E/3K, kontrol grubunda E/K oranı:12E/8K. Çalışma gruplarımızın özellikleri aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Tablo.4.1. Çalışma Grubunun Karakteristikleri

| Çalışma Grubu | Olgu Sayısı | E/K oranı | Yaş Aralığı | Yaş Ortalaması |
|--------------------------------|---------------------|-----------|-------------|----------------|
| KML dirençli | 29 KML | 13/16 | 38-72 | 54.14 |
| ALL hasta | 10 ALL | 7/3 | 22-69 | 45.5 |
| KML kontrol | 20 KML | 12/8 | 21-85 | 53.6 |
| Negatif kontrol (<i>Ph</i> -) | 1 normal DNA örneği | - | 30 | 30 |

Tablo.4.2. KML Dirençli Olgu Grubunun Klinik Bilgileri (Not: TBY; TKI tedavisine başlama yılı (2005 ve sonrası baz alınmıştır), DA:Dasatinib, NI: Nilotinib, IM: Imatinib, TKI:Tirozin kinaz inhibitörü)

| H. No | Cinsiyet | Yaş | TKI | Faz | TBY |
|-------|----------|-----|-----|-----|------|
| K1 | E | 51 | DA | K | - |
| K2 | E | 69 | NI | K | 2010 |
| K3 | E | 69 | NI | K | 2008 |
| K4 | K | 43 | DA | K | - |
| K5 | K | 70 | NI | K | 2007 |
| K6 | E | 48 | DA | K | - |
| K7 | K | 51 | NI | K | 2006 |
| K8 | E | 54 | NI | K | 2011 |
| K9 | K | 38 | DA | K | 2006 |
| K10 | K | 65 | DA | K | - |
| K11 | K | 67 | İM | K | - |
| K12 | E | 39 | DA | K | - |
| K13 | E | 41 | NI | K | 2008 |
| K14 | K | 63 | NI | K | - |
| K15 | E | 59 | NI | K | 2006 |
| K16 | K | 63 | NI | K | 2008 |
| K17 | K | 57 | NI | K | 2007 |
| K18 | K | 44 | NI | K | 2009 |
| K19 | E | 58 | NI | K | 2010 |
| K20 | K | 55 | İM | K | 2010 |
| K21 | K | 52 | DA | K | 2010 |
| K22 | E | 45 | NI | K | 2005 |
| K23 | K | 72 | DA | K | 2005 |
| K24 | E | 57 | İM | K | - |
| K25 | E | 72 | NI | K | - |
| K26 | E | 60 | DA | K | - |
| K27 | K | 32 | NI | K | 2011 |
| K28 | K | 55 | DA | K | 2006 |
| K29 | K | 50 | NI | K | 2007 |

Tablo.4.3. KML Kontrol Grubunun Klinik Bilgileri (Not: *İM*: İmatinib; TBY; TKI tedavisine başlama yılı (2005 ve sonrası baz alınmıştır), TKI: Tirozin kinaz inhibitörü)

| H. No | Cinsiyet | Yaş | TKI | Fazı | TBY |
|-------|----------|-----|-----|------|------|
| KK1 | K | 39 | İM | K | - |
| KK2 | E | 21 | İM | K | 2013 |
| KK3 | K | 31 | İM | K | - |
| KK4 | E | 23 | İM | K | 2012 |
| KK5 | E | 80 | İM | K | - |
| KK6 | E | 52 | İM | K | - |
| KK7 | E | 42 | İM | K | 2005 |
| KK8 | K | 53 | İM | K | - |
| KK9 | E | 42 | İM | K | 2011 |
| KK10 | K | 76 | İM | K | - |
| KK11 | E | 59 | İM | K | 2009 |
| KK12 | K | 75 | İM | K | - |
| KK13 | K | 60 | İM | K | 2005 |
| KK14 | E | 61 | İM | K | - |
| KK15 | E | 53 | İM | K | - |
| KK16 | E | 75 | İM | K | - |
| KK17 | K | 55 | İM | K | 2008 |
| KK18 | E | 50 | İM | K | 2005 |
| KK19 | K | 60 | İM | K | 2006 |
| KK20 | E | 65 | İM | K | 2008 |

Tablo.4.4. ALL Hasta Grubunun Klinik Bilgileri (TBY: TKI tedavisine başlama yılı, 2005 ve sonrası baz alınmıştır)

| H. No | Cinsiyet | Yaş | TBY |
|-------|----------|-----|------|
| A1 | K | 64 | - |
| A2 | E | 69 | - |
| A3 | E | 22 | 2006 |
| A4 | E | 60 | - |
| A5 | E | 30 | 2005 |
| A6 | E | 55 | - |
| A7 | K | 40 | 2005 |
| A8 | E | 60 | - |
| A9 | E | 25 | - |
| A10 | K | 30 | 2010 |

4.2. Kan ve Kemik İliği Örneklerinde Elde edilen Bulgular

Tablo.4.5. Hastalarda İncelenen Mutasyonların Özellikleri (Not: ND: Nükleotid değişimi AD: Amino asit değişim)

| ABL-Kinaz Domainindeki Lokusu | ND | Protein | AD | Mutasyon |
|-------------------------------|---------------------|---------|----------------------|----------|
| P-loop | c.749G>A G749A | p.G250E | Glisin>Glutamik asit | G250E |
| P-loop | c.757T>C T757C | p.Y253H | Tirozin>Histidin | Y253H |
| P-loop | c.763G>A G763A | p.E255K | Glutamik asit>Lizin | E255K |
| ATP bağlanma bölgesi | c.944C>T C944T | p.T315I | Treonin>İzolösin | T315I |
| ATP bağlanma bölgesi | c.949T>C T949C | p.F317L | Fenil alanin>Lösin | F317L |
| Katalitik bölgede | c.1052T>C T1052C | p.M351T | Metiyonin>Treonin | M351T |

Tablo.4.6. KML Dirençli Grubun Sonuçları(TKI: Tirozin kinaz inhibitörü)

| H. No | Cinsiyet | Sonuç | TKI |
|-------|----------|-------------------|-----|
| K1 | E | Wild | DA |
| K2 | E | Wild | NI |
| K3 | E | Wild | NI |
| K4 | K | G250E Heterozigot | DA |
| K5 | K | Wild | NI |
| K6 | E | Wild | DA |
| K7 | K | Wild | NI |
| K8 | E | Wild | NI |
| K9 | K | Wild | DA |
| K10 | K | Wild | DA |
| K11 | K | Wild | IM |
| K12 | E | Wild | DA |
| K13 | E | Wild | NI |
| K14 | K | Wild | NI |
| K15 | E | Wild | NI |
| K16 | K | Wild | NI |
| K17 | K | Wild | NI |
| K18 | K | Wild | NI |
| K19 | E | Wild | NI |
| K20 | K | Wild | IM |
| K21 | K | Wild | DA |
| K22 | E | Wild | NI |
| K23 | K | Wild | DA |
| K24 | E | Wild | IM |
| K25 | E | Wild | NI |
| K26 | E | Wild | DA |
| K27 | K | Wild | DA |
| K28 | K | Wild | DA |
| K29 | K | Wild | NI |

Tablo.4.7. KML Kontrol Grubunun Sonuçları (TKI: Tirozin kinaz inhibitörü)

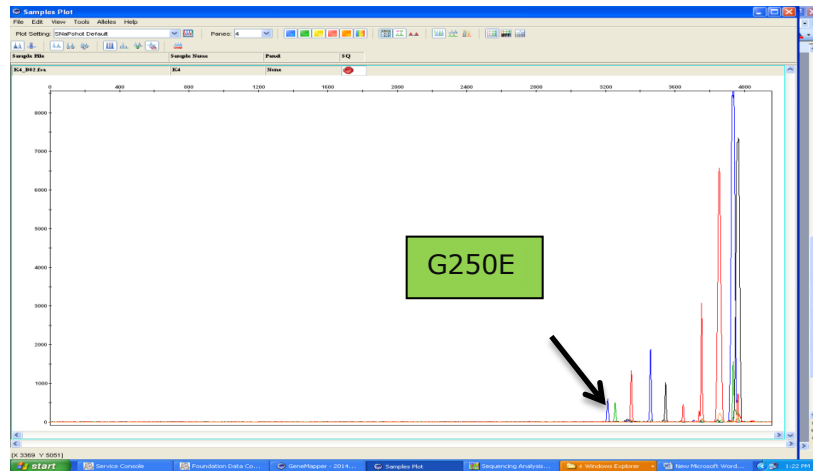
| H.No | Cinsiyet | Sonuç | TKI |
|------|----------|-------|-----|
| KK1 | K | Wild | IM |
| KK2 | E | Wild | IM |
| KK3 | K | Wild | IM |
| KK4 | E | Wild | IM |
| KK5 | E | Wild | IM |
| KK6 | E | Wild | IM |
| KK7 | E | Wild | IM |
| KK8 | K | Wild | IM |
| KK9 | E | Wild | IM |
| KK10 | K | Wild | IM |
| KK11 | E | Wild | IM |
| KK12 | K | Wild | IM |
| KK13 | K | Wild | IM |
| KK14 | E | Wild | IM |
| KK15 | E | Wild | IM |
| KK16 | E | Wild | IM |
| KK17 | K | Wild | IM |
| KK18 | E | Wild | IM |
| KK19 | K | Wild | IM |
| KK20 | E | Wild | IM |

Tablo.4.8. ALL Hasta Grubunun Sonuçları

| H. No | Cinsiyet | Sonuç |
|-------|----------|-------|
| AH1 | E | Wild |
| AH2 | K | Wild |
| AH3 | E | Wild |
| AH4 | E | Wild |
| AH5 | K | Wild |
| AH6 | K | Wild |
| AH7 | E | Wild |
| AH8 | E | Wild |
| AH9 | E | Wild |
| AH10 | E | Wild |

4.2.1.G250E Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi

KML hastalarında BCR/ABL kinaz domainde P-loopta lokalize olan G250E mutasyonu kötü prognostiktir. Bu mutasyon ekzon 4'te meydana gelir. Mutasyon ile guanin nükleotidinin adenin nükleotidine değişmesi sonucu glisin glutamik aside (*glisin250glutamik asit (G250E)*) (G>A) dönüşmüştür. Çalışmamız sonucunda elli dokuz hastadan 1'inde (%1.69) G250E mutasyonu saptadık. Literatürde G250E mutasyonunun görülme sıklığı yaklaşık % 4-6 arasındadır. Sonucumuz literatür ile uyumlu çıkmamıştır.



Şekil.4.1. KML Dirençli Grubundan G250E Mutasyonu Saptanan Olguya Ait Minisekans Görüntüsü

4.2.2.Y253H Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi

Y253H mutasyonu P-loopta lokalizedir ve kötü prognostiktir. Y253H mutasyonu ekzon 4'te meydana gelir. Mutasyon sonucu timin nükleotidi sitozen nükleotidine değişerek tirozin histidine (*tirozin253/ histidin (Y253/H)*) (T>C) dönüşmüştür. Çalışmamızda Y253H mutasyonu tespit edilemedi. Bu mutasyonun görülme oranı yaklaşık % 10-12 arasındadır. Sonucumuz literatür ile uyumlu çıkmamıştır.

4.2.3. E255K Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi

E255K mutasyonu P-loopta lokalizedir ve kötü prognostiktir. E255K mutasyonu ekzon 4'te meydana gelir. Mutasyonla guanin nükleotidi adenin nükleotidine değişerek glutamik asit lizine (*glutamikasit255lizin (G>L;E255K)*) (G>A) dönüşmüştür. Yapılan çalışmada E255K mutasyonu tespit edilemedi. Bu mutasyonun görülme sıklığı yaklaşık % 14-16 arasındadır. Sonucumuz literatür ile uyumlu değildir.

4.2.4. T315I Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi

T315I mutasyonu ATP bağlanma bölgesinde lokalizedir ve kötü prognostiktir. T315I mutasyonu ekzon 6'da meydana gelir. KML ve ALL *Ph+* hastalarda *TKI* direnç oluşumunda en etkili mutasyondur. *IM, DA, NI* ve *BO'e* karşı dirençlidir. Son zamanlarda geliştirilen 3.nesil *TKI* olan *Ponatinib* diğer *TKI* göre oldukça etkilidir, gatekeeper mutasyon olarak da adlandırılır. Mutasyon sonucunda treonin amino asidi izolösine (*Thr>I*) ve nokta mutasyonu neticesinde sitozen nükleotidi timin nükleotidine dönüşmüştür (C>T). Çalışmamız sonucunda T315I mutasyonu saptanmamıştır. Görülme oranı yaklaşık % 20-25 arasındadır. Sonucumuz literatür ile uyumlu değildir.

4.2.5. F317L Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi

F317L mutasyonu ATP bağlanma bölgesinde lokalizedir. F317L mutasyonu ekzon 6'da meydana gelir. 317.pozisyonundaki *fenilalaninin (Phe, F) lösine (Leu, L)* dönüşmesine neden olan *F317L* mutasyonunda Phe>Leu söz konusudur. Nokta mutasyonu sonucunda timin nükleotidi sitozen nükleotidine dönüşmüştür (T>C). Çalışmamızda F317L mutasyonu tespit edilemedi. Görülme oranı yaklaşık % 2-10 arasındadır. Sonucumuz literatür ile uyumlu değildir.

4.2.6. M351T Mutasyonu İle ALL ve KML Hastalarının İlişkisi

M351T mutasyonu katalitik bölgede lokalizedir. M351T mutasyonu ekzon 6'da meydana gelir. Nokta mutasyonu sonucunda 351.pozisyonda Metiyonin amino asidi Treonin amino asidine ve timin nükleotidi sitozin nükleotidine dönüşmüştür (T>C). Görülme oranı yaklaşık % 12-14 arasındadır. Çalışmamızda M351T mutasyonu saptanmamıştır. Sonucumuz literatür ile uyumlu değildir.

5. TARTIŞMA

Tirozin Kinaz İnhibitörlerine karşı gelişen direncin en önemli sebeplerinden biri *ABL* kinaz domainde oluşan nokta mutasyonlarıdır. Bu nokta mutasyonlarından P-loopta; G250E/A/F, Q252H/R, Y253H/R ve E255K/V, bağlantı bölgesinde; T315I/A/D, F317L/I, katalitik bölgede; M351T/L, F359V/C/D/I, F311L/I/V, aktivasyon bölgesinde H396/P, A397P en sık gözlenen mutasyonlardır. Nokta mutasyonları *IM* direnci gelişen hastaların yaklaşık %35-70'inde görülmektedir (Nicolini vd., 2013). T315I mutasyonu şimdiye kadar geliştirilmiş bütün tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç geliştirmektedir (%25). Eğer mutasyonlar önceden fark edilebilirse klinik olarak *IM* direnç oluşumu ve gelişimi önceden öğrenilebilir ve önlem alınabilir. Biz çalışmamızda olgu grubumuzdaki, en sık gözlenen 6 mutasyonun sıklığını incelemeyi amaçladık. Bu 6 mutasyon; G250E, Y253H, T315I, E255K, F317L ve M351T mutasyonlarıdır.

Günümüzde yaklaşık yüzün üzerinde *BCR/ABL* kinaz domain mutasyonları saptanmıştır. Soverini ve ark, bütün *IM* dirençli hastaların yaklaşık %85'indeki mutasyonların 7 yerde amino asit değişimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu 7 yerdeki mutasyonların, P-loopta: M244V, G250E, Y253H/F ve E255K/V, bağlantı bölgesi: T315I, katalitik bölge: M351T ve F359V mutasyonları olduğu rapor edilmiştir (Soverini S, 2011).

Soverini ve ark, tanı anındaki KML hastalığının fazına göre mutasyonların frekansını rapor etmişlerdir. Çalışmada, hastaların %27'sinin KF-KML, %52'sinin AF-KML ve %75'inin BF-KML olduğu tespit edilmiştir. Bu durum göstermektedir ki, hastalığın fazı KF'den BF'ye ilerledikçe mutasyonların görülme sıklığı ve direnç gelişimi artmaktadır (Soverini S. vd. , 2011). GIMEMA çalışmasında hastaların yaklaşık %43'ünde P-loop mutasyonları saptanmıştır. KML hastaları bu fazlarda *IM* direnç mutasyonu gelişimine KF'a göre daha yatkındırlar. P-loop mutasyonlarının direnç gelişmeden 2.8 ay önce, T315I mutasyonu 6.3 ay önce, M351T mutasyonu 10.8 ay önce saptanabildiği rapor edilmiştir (Sahli Ahmad Hamad Zeyad, Maya El Sabban, Maha Mouterik, Nasr Rihab, 2013). Türkiye'de yapılan bir çalışmada otuz hastanın on altısında (%53) mutasyon saptanmıştır (Akçora Dilara, 2007). Zhang ve ark.'nın yaptıkları çalışmada altmış sekiz hastanın kırk dördünde (%65) mutasyon bulunmuştur (Zhang J, Adrian FJ, Jahnke W, vd. , 2010). Soverini ve ark.'nın 2006 yılında yaptığı çalışmada iki yüz doksan yedi hastanın yüz yirmi yedisinde (%43) (Soverini S vd. , 2006), bizim çalışmamızda ise toplam elli dokuz KML ve ALL'li hastasının 1'inde (% 1.69) mutasyon tespit edilmiştir.

Hochhaus, Shindler ve ark, ilk kez *IM* bağlanma bölgesine spesifik mutasyonların *BCR/ABL* kinaz bölgesinde 4 bölgede toplandığını göstermişlerdir (Hochhaus A, La Rosee P, Muller MC, Ernst T, Cross NC, 2011, Schindler T vd. ,2000). Bunlardan P-looptaki mutasyonlar direnç gelişimi için önemlidir. P-loop mutasyonlarının hastalığın ilerleme süresi ve toplam yaşam süresinin kötü sonuçlanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Böylece P-loop mutasyonları daha erken saptanabildiği takdirde tedavi edici ajanların yeniden gözden geçirilmesiyle hastalar için klinik yarar sağlanabilir.

T315I mutasyonunun *IM* ile *BCR/ABL*'nin inhibisyonundan kısmi sorumlu, korunmamış bir rezidüde yer aldığı rapor edilmiştir (Gorre M. E., Mohammed M., Ellwood K. vd. ,2001, Rosti G., F. Palandri, F. Castagnetti vd. , 2009). *IM* dirençli KML hastalarında görülen mutasyonlardan en sık rastlanılanı T315I mutasyonudur. T315I mutasyonu kötü prognostiktir. Onkogenik aktivite artışı ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkilidir (Laneuville P. 1995, Moraes G. Nestal de, Souza P. S. , 2012).

Hochhaus ve ark yaptıkları başka bir çalışmada ise, hastalığın ilerleme süresine göre mutasyonlu ve mutasyonsuz hastalar arasında hematolojik direnç koyma arasında herhangi bir fark bulamamışlardır (Hochhaus A, La Rosee P, Muller MC, Ernst T, Cross NC, 2011).

Capdeville ve ark, çalışmalarında geç KF-KML'de *IM* tedavisi sonucu hastaların yaklaşık %40'ında MSY ve hastalığın sitogenetik remisyona girmesinden sonra BF'a ilerlemesinin daha hızlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu durumun, hastalık için kötü prognozla sonuçlandığını ve sağ kalım süresini azalttığı gösterilmiştir (Capdeville R, Silberman S. , 2003).

In vitro çalışmalar, *IM* direncinin farklı mutasyonlarda farklı derecelerde ortaya çıktığını öne sürmektedir. *In vitro* çalışmalarla kinaz domainin dışındaki komşu bölgelerde SH2, SH3 ve Cap domainlerindeki mutasyonların *IM* direnci oluşturabildiği gösterilmiştir. Bu domainler otoinhibitör etkiye sahiptir ve mutasyonlar bu bölgede enzimi aktive edebilirler. *BCR/ABL* geninin C-terminal loop, A-loop, C-helix ve substrat bağlama bölgesinde bazı ek mutasyonlar oluşabilir (Puttini M. , Coluccia A. M. L. , Boschelli F. vd. , 2006).

Direnç mekanizmalarından bir diğeri de *BCR/ABL* genini aktive edebilen çeşitli sinyal yollarının indüklenmesidir. Burchert ve ark, heterojen bir Akt-sinyal-kaskad aktivasyonunun *BCR/ABL-kinaz* mutasyonlarından bağımsız olarak *IM*-direnç gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Burchert A., 2007). *PI3-K/Akt* sinyal yolağının aktivasyonu KML'de lösemik hücrelerin çoğalması ve sağ kalımı için önemlidir. *PI3-K/Akt* aktivasyonu *BCR/ABL*'ye bağlı olarak bir kinaz mutasyonu gibi güçlü *IM*-direnç gösterir. Erken fazda *IM*-direnç gelişiminden önce sağ kalım için önemlidir. *PI3-K/mTOR* sinyalinin aktive

olması reaktif oksijen türlerinin formasyonunu arttırarak *BCR/ABL* transformasyonuna katkıda bulunur. *MDR-1* geninin ekspresyonu ile çoklu ilaç direnç proteini olan *P-glikoprotein* (*Pgp*) kemoterapilerin çoğunda ilaç direnç mekanizması oluşturur (Bitencourt Roberta, Zalberg Ilana, Iúri Drumond Louro, 2011). Mahon ve ark, BF-KML hastalarında bu durumu göstermişlerdir (Mahon FX vd. ,2000). Sun ve ark, *JAK2/STAT-5* sinyal kaskadının *BCR/ABL*'den bağımsız aktivasyonu ile antiapoptotik etki oluşturduğunu ve *IM*-dirençinin ortaya çıktığını ileri sürmektedir (Sun X, Layton JE, Elefanty A, Lieschke GJ. , 2001).

Malezya'da KF-KML IM dirençli kırk hasta ile çalışılmış. *BCR/ABL* geninin amplifikasyonu FISH yöntemi ile *BCR/ABL* kinaz domain mutasyonları DHPLC ve sekanslama yöntemiyle gösterilmiş. Hastaların on üçünde (%32,5) mutasyon saptanmış. 5 farklı tipte mutasyon tespit edilmiş. Bunlar; T315I, E255K, Y253H, M351T, V289F. Hastaların yirmi yedisinde *BCR/ABL* gen amplifikasyonu bulunamamıştır (Elias M. H. vd. , 2012). Khorashad ve ark yaptığı çalışmada iki yüz on sekiz farklı mutasyon saptamışlardır. Bu mutasyonların çoğunluğu missense mutasyonlardır. Hastaların %5,4'ünde F317L, %4,9'unda T315I, %3,5'inde G250E, %3,2'sinde M351T, %2,7'sinde F359 ve %2,4'ünde V299 mutasyonu saptanmış. Mutasyonların %90'ı transisyon şeklinde ve en yaygın nükleotid değişimi A>G ve T>C'dir (Khorashad vd. , 2008).

Yapılan bir çalışma sonucunda T315I mutasyonu on üç hastada, E255K mutasyonu 3 hastada, M351T mutasyonu ise 9 hastada saptanmıştır. Bu üç mutasyonun görülmediği hasta oranı ise %43,3 olarak saptanmıştır (Akçora Dilara, 2007). Bulunan mutasyonlardan, T315I ve E255K mutasyonunun kötü prognostik olduğu bildirilmektedir.

Lange T ve ark'nın yaptığı çalışmada yüz yetmiş yedi hastadan %20,9'unda T315I mutasyonu bulunmuştur. Bu oranı %19,2 ile E255K ve %15,3 ile de M351T izlemektedir (Lange T. vd. , 2013). Türkiye'de yapılan çalışmalardan birinde toplam altmış yedi vakadan on dördünde mutasyon saptanmıştır. Hastaların 3'ünde F311I, 7'sinde F317L, 2'sinde M351T, 3'ünde F359V ve 1'inde T315I mutasyonu saptanmıştır. İki hastada iki mutasyon birlikte bulunmuş, 1 kişide M351T ve F317L, 1 kişide T315I ve F317L mutasyonları tespit edilmiştir (Kocabıyık Vasfiye Betül, 2011). Birden fazla mutasyona sahip olgularda prognoz daha kötü seyrettiği bildirilmektedir.

Ürdün'de toplam yüz seksen beş KML hastası ile yapılan çalışmada, *IM* tedavisi sırasında, yirmi bir hastada on iki farklı mutasyon saptanmış (%11.35), T315I (4), L248V (3), G250E (3), F317L (3), M244V (2), T277A (2), H396R (29), M318T (1), Y326H (1), Q252H (1), F311I (1), F359A (1), F359I (1).

Yirmi bir hastanın 3'ünde birden fazla mutasyon bulunmuş. M244V+G250E (1), F317L+M318T+Y326H (1), T277A+F359A/P. Çalışmaya katılan hastaların yirmisi KF, 1'i BF'dadır (Awidi vd. , 2012).

Jabbour ve ark, yaptıkları çalışmada yirmi üç amino asidi etkileyen altmış altı mutasyon saptamıştır. Hastaların % 36 IM tedavisine dirençlidir. Yüz yetmiş bir hastanın altmış ikisinde direnç gelişmiştir. P-loop mutasyonları en sık rastlanan mutasyonlar olmuştur (%36) (Jabbour E., Cortes J. E. , Kantarjian H. M. , 2009). Bu durumda göstermektedir ki, P-loop mutasyonu görülen olgularda direnç gelişimi gözlenmekte ve hastalığın seyrinin aklere veya blast faza doğru ilerlediği görülmektedir.

Gorre ve ark *IM* dirençli 9 KML hastasından 3'ünde *BCR/ABL* amplifikasyonu tespit etmiştir (Gorre M. E. vd. , 2001). Hochhaus ve ark, otuz yedi *IM* dirençli KML hastasının 4'ünde *BCR/ABL*'de mRNA'nın overekspresyonu gösterilmiştir (Hochhaus A, La Rosee P, Muller MC, Ernst T, Cross NC, 2011). *BCR/ABL* geninin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu ile *IM* direnci arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.

Bir faz II çalışmasında *IM* dirençli ve intoleranslı hastalarda 2. aşamada *NI* kullanıldığında hastalarda T315I mutasyonu gözlenmemiştir. Y253H, E255V ve F359C/V mutasyonu olan hastalarda TSY elde edilmiştir. *NI* tedavisi sırasında hastalığın ilerlemesi ile ilişkili en yaygın mutasyonlar; E255K/V, F359C/V, Y253H ve T315I mutasyonlarıdır (Santos F.P.S, Kantarjian H., Quint'as-Cardama A. , Cortes J. , 2011). Bir faz III çalışmasında KF-KML hastalarda yeni gelişmiş mutasyonlar ile *DA* verilen yanıtın kaybı arasında ilişki bulunmuş. Bu mutasyonlar; T315I, F317L, V299L ve E255K'dır (Cortes J. E. , Kim D -W, Pinilla-Ibarz J. vd. , 2012). Bir başka çalışmada bin kırk üç kişide *DA* klinik etkileri incelenmiş. T315I mutasyonu saptanmamış. Sadece %7'sinde F317L mutasyonu gözlenmiş ve TSY elde edilememiştir (Melo, V. J. , Deininger W.N.M., 2004). Branford ve ark yaptıkları çalışmada dirençli KML hastalarının %43'ünde klinik ile ilgili mutasyon saptamışlardır. Saptanan mutasyonların %28'i *DA* ve *NI* ile ilgilidir (Baran Y. , 2007). Muller ve ark yaptığı 3 klinik çalışmada, toplam kırk dokuz amino asidi etkileyen altmış üç farklı Bcr-Abl kinaz domain mutasyonları saptanmıştır. Saptanan bu mutasyonların dağılımı; G250 (61), T315I (21), M351T (54), Y253H (26), E255K (25), M244 (46), F359 (42), H396 (37) (Muller M. C. , Cortes J. E. , Kim DW. vd. , 2009).

Hochhaus ve ark, toplam sekiz yüz kırk altı KF-KML hastasına *IM* ve *NI* tedavisi uygulamışlar. Hastalar 3 gruba ayrılmış. 1.grupta yirmi üç kişiye günde 2 kez 300mg *NI*, 2.grupta yirmi kişiye günde 2 kez 400 mg, 3.grupta on yedi kişiye günde 1 kez 400 mg *IM* uygulanmış. Hastalar 3 yıl takip edilmiş. *IM* tedavisi alan yirmi bir hastada ve *NI* uygulanan on bir hastada mutasyon saptanmıştır. Toplamda on üç amino asit rezidüsünde on altı farklı mutasyon tespit edilmiş. *NI* uygulanan hastaların 3'ünde, *IM* uygulananların ise 2'sinde birden fazla mutasyon bulunmuş. Bu hastaların

%66,7'sinde *IM* direnç gelişimine neden olabilecek mutasyonlar önceden saptanmış. *NI* tedavisi alanların %20'sinde mutasyon saptanmış. Bunlar; Y253H, E255K ve F359C/V mutasyonlarıdır. T315I mutasyonunun insidansı *IM* ve *NI* alanlarda benzer oranda saptanmış (Hochhaus A, La Rosee P, Muller MC, Ernst T, Cross NC, 2011).

Farklı mutasyonların direnç düzeyleri de farklıdır. Bu yüzden, Tirozin kinaz domain mutasyonlarının tanımlanması ve belirlenmesi KML hastalarının tedavisinde izlenecek yol için çok önemlidir. Kinaz domain mutasyonları KF-KML hastaların yaklaşık %30-50'inde *IM*'e ikincil direnç gelişimi ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonların frekansı AF ve BF hastalarında artış göstermektedir. Mutasyonların frekansı KML ile karşılaştırıldığında *Ph+* ALL hastalarında çok daha yüksek oranda relaps görülür (%80-90). KF-KML'de *Ph+* iyi prognostikken, ALL, AF veya BF-KML'de *Ph+* kötü prognostiktir. Yapılan birçok çalışmada KML hastalarında T315I mutasyonunun varlığının kötü prognostik olduğu gösterilmiştir. Mutasyonlar klinik ile birlikte değerlendirilmelidir. Tüm mutasyonlar aynı klinik ve biyokimyasal özellik göstermez. Bazı mutasyonlar fonksiyonel olmayabilir. Elde edilen verilere göre KML ve ALL'li hastalarda *IM*'e direnç oluşturan mutasyonların ve klinik yönünün belirlenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

Yapılan araştırmaların birinde *IM* tedavisi sırasında relaps olan yirmi üç hastadan 6'sında (%26) T315I, 3'ünde (%13) E255K ve 4'sinde (%17) M351T mutasyonları saptanmıştır. Yine bu çalışmada klinik olarak uygulanan *IM* dozlarına T315I ve/veya E255K mutasyonu taşıyanlarda yanıt alınmazken M351T mutasyonu taşıyanlarda orta derecede yanıt alındığı saptanmıştır. T315I ve/veya E255K mutasyonuna sahip hastaların taşıdıkları mutasyon nedeniyle, hastalıklarının KF'dan AF'a hatta BF'a ilerlemesinde yakın ilişki olduğu bildirilmektedir (Corbin A.S. vd., 2011). Hem AF hem de KF hastalarında, kötü prognoz ile P-loopta yer alan mutasyonlar arasındaki güçlü ilişki ilk olarak Branford ve ark tarafından gösterilmiştir. Avustralya'da yapılan bu çalışmada P-loop mutasyonları saptanan *IM* tedavisi alan on üç KML hastasından on ikisinin öldüğü ve mutasyon saptandığı tarihten itibaren ortalama yaşam süresinin 4.5 ay olduğu ve mutasyonlarla AF ya da geç KF evreleri arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir. Bu on üç hastadan 5'inde P-loop bölgesinde yer alan E255K mutasyonu saptanmıştır. P-loop mutasyonlarından özellikle E255K'ı taşıyan hastaların yüksek *IM* direncine sahip olduğu bildirilmektedir (O'Brien S, Cortes J, 2009). Zhang ve ark. 2006 yılında yayınladıkları çalışmada bir hastada T315I ve E255K mutasyonunu beraber saptadıklarını bildirmişlerdir (Zhang J, Adrian FJ, Jahnke W, vd., 2010). Birden fazla mutasyona sahip hastaların hastalık seyrinin tek mutasyona sahip hastaların hastalık seyrine göre daha riskli olduğunu göstermektedir.

Literatürü incelediğimizde yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular arasında farklılıklar gözlenmektedir. Gözlenen bu farklılıklar, hastaların özelliklerinden, çalışma grubunu oluşturan hasta sayıları arasındaki farklardan ve mutasyonları saptamada kullanılan yöntemlerden kaynaklanabilir. Elde edilen verilere göre KML ve ALL'li hastalarda *IM*'e direnç oluşturan mutasyonların ve klinik yönünün belirlenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda saptanan mutasyon missense mutasyonudur. Hastaların elli dokuzundan 1'inde (%1.69) mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyon G250E %1.69'dir. Çalışmamızda 6 farklı mutasyonun sıklığını taramayı amaçladık. Ama E255K, Y53H, T315I, F317L ve M351T mutasyonlarını tespit edemedik. Mutasyon saptayamadığımız hastaların oranı % 98.30. Elde edilen bulgular mutasyon oranlarının genel olarak literatür ile uyumlu olmadığını göstermektedir. Yaptığımız çalışmada olgu ve kontrol grubundaki örnekleri iki kez çalıştık. Çünkü ilk analizde hem olgu hem de kontrol grubumuzda yüksek oranda Y253H ve T315I mutasyonu tespit ettik. Hastaların klinik seyrine baktığımızda durumlarının stabil olduğunu ve bulduğumuz sonuçlar ile uyumlu olmadığını gördük. Bunun sonucunda da örnekleri konfirme etme ihtiyacı ortaya çıktığından tekrar analiz yaptık ve sadece bir hastada G250E mutasyonunu bulduk. Bu durum da göstermektedir ki kullandığımız SNaPshot tekniğinin başka tekniklerle konfirme edilmesi ve tekrar optimize edilmesi gerekmektedir. Mutasyon saptama oranımızın düşük olmasının sebepleri arasında; çalışma popülasyonumuzun sayısının az olması, oluşturulan olgu gruplarının randomize olmaması, klinik faz açısından heterojen bir grup oluşturulamaması ve kullandığımız mutasyon tarama tekniğinin tam optimize olmaması sayılabilir. Mutasyonlar klinik ile birlikte değerlendirildiğinde hem dirençli grupta hem de kontrol grubunda hastaların durumunun stabil devam ettiği belirlenmiştir. Hastalarda mutasyon tespit edilmemesine rağmen, hastaların takibinde belirli aralıklarla mutasyon taraması yapılması önerilir. Çalışmamızın ileride yapılacak araştırmalara ışık tutması, direnç gelişimini en düşük seviyeye çekerek ortadan kaldırılmasına yardımcı olunması umulmaktadır.

Tablo.5.1. Dirençli Olgu Grubu Bulgularının Literatür İle Karşılaştırılması

| Çalışma | Olgu Sayısı | Mutasyon Saptama Oranı | Yöntem |
|--------------------|-------------|------------------------|-----------------------|
| Soverini vd., 2006 | 127/297 | %43 | DHPLC-Sekanslama |
| Akçora, 2007 | 16/30 | %53 | RFLP-DHPLC |
| Zhang vd., 2010 | 44/68 | %65 | DHPLC-Sekanslama |
| Kocabıyık, 2011 | 14/67 | %20.8 | DHPLC-RFLP |
| Awidi vd., 2012 | 21/185 | %11.35 | DHPLC-Sekanslama |
| Çalışmamız | 1/59 | %1.69 | SNaPshot (Minisekans) |

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Optimal tedavi şeklinin belirlenmesi açısından KML hastalarında direnç erken dönemde tanımlanmalı, mutasyon tipi belirlenerek mutasyona göre gerçekçi tedavi şekli planlanmalıdır. *BCR/ABL* mutasyonları KF-KML ile AF-KML karşılaştırıldığında IM dirençli hastalarda daha yüksek frekansta meydana gelir. Mutasyonlar klinik ile birlikte değerlendirilmelidir. Tüm mutasyonlar aynı klinik ve biyokimyasal özellik göstermez. Bazı mutasyonlar fonksiyonel olmayabilir. Mutasyonlar hastalarda klinik direnç gelişmeden önce saptanabilir. TKI tedavisi mutasyon dinamiklerini değiştirebilir. Bazı hastalarda *IM* tedavisi sırasında mutasyon varlığı yüksek oranda saptanırken, *IM* tedavisi sonlandırıldığında mutasyon oranının azaldığı saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmada Ph (+) KML ve ALL tanılı hastalarda *BCR/ABL* geninde oluşan 6 mutasyon açısından analiz ettik. Araştırma sonucunda G250E mutasyonu %1.69 oranında bulunmuş, Y253H, E255K, T315I, F317L ve M351T mutasyonları ise bulunamamıştır. Literatürde G250E mutasyonunun görülme sıklığı %4-6, Y253H %10-12, E255K %14-16, T315I %16.6-26, F317L % 4-8 ve M351T %12-14'tür. Görüldüğü üzere bulgularımız literatürle benzer bulunmamıştır. Hastalarda mutasyon saptama oranı %1.69 ve mutasyon saptanmayan hastaların oranı ise %98.30 olarak bulunmuştur. Literatürü incelediğimizde yapılan çalışmalar arasında tam bir birliktelik bulunmamaktadır. Bu nedenle çok daha geniş spektrumlu popülasyonlarla mutasyon taramalarının yapılması ve minisekans (SNaPshot) tekniğinin bir başka teknik ile konfirme edilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Hastalarda mutasyon tespit edilmemesine rağmen, hastaların takibinde belirli aralıklarla mutasyon taraması yapılması önerilir.

BCR/ABL nokta mutasyonları ALL ve KML'de önemli bir prognoz belirleyicisi olarak görünmektedir. KML hastalarında direnç erken dönemde tanımlanmalı, mutasyon tipi belirlenerek mutasyona göre rasyonel tedavi şekli planlanmalıdır. Bu çalışma ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında 6 mutasyona rutin olarak bakılması planlanmaktadır. Bu durum Ph(+) KML ve ALL hastalarının tedavisinin planlanmasında önemli olacaktır. Bu çalışma ile özellikle ALL ve KML *Ph* (+) hastalarında kliniğe yardımcı olmak amaçlanmaktadır. Bu mutasyon taramaları sayesinde *TKI* karşı direnç gelişimini önceden tahmin etmek mümkün olabilecektir. Bu da hastalığın prognozunda önemli bir biyomarker olma özelliğini güçlendirmektedir. Çalışmamızın yapılacak daha geniş araştırmalara ışık tutması umulmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abelson HT, Rabstein LS, 1970, Lymphosarcoma: virus-induced thymic independent disease in mice, *Cancer Res*, 30: 2213-22.

Akçora Dilara, 2007, İmatinib Tedavisi Alan Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında T315I, E255K ve M351T Mutasyonlarının Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 100 s.

Albano F, Zagaria A, Anelli L, Coccaro N, Impera L, Minervini CF, Minevini A, Rosi AR, Tota G, Casieri P, Specchia G , 2013, Gen expression profiling of chronic myeloid leukemia with variant t(9;22) reveals a different signature from cases with classic translocation, *Molecular Cancer*, 12:36, <http://www.molecular-cance.com7content/12/1/36>

Apperley JF, 2007, Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Lancet Oncol*, 8: 1018-1029.

Arthur C, JF, Joske D, Lynch K, Hughes T, 2003, Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis, *Blood*, 102:276-83.

Awidi A, Ababneh N, Magablah A, Bsoul N, Mefleh R, Marei L, Abbasi S, 2012, ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia in Jordan, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, volume 1, number 11:1317-1320

Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Alpelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, 2006, Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: ecommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet, *Blood*, 108:1809-1820.

Banerji L, Sattler M, 2004, *Expert Opin Ther Targets*, 8:221-239.

Baran Y, 2007, Kronik myeloid lösemi genetiği, *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*.

Branford S, Rudzki Z, Wals S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, 2002, Seymour chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571)therapy," *Leukemia*, vol. 16, no. 11, pp. 2190-2196.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Bitencourt Roberta, Zalcborg Ilana, Iúri Drumond Louro, 2011, Imatinib resistance: a review of alternative inhibitors in chronic myeloid leukemia. Rev Bras Hematol Hemoter,33(6):470-5.

Bixby D, Talpaz M, 2009, Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 461-476.

Burchert A, 2007, Roots of imatinib resistance: a question of self-renewal? Drug Resist Updat, 10: 152-161

Capdeville R, Silberman S, 2003, Imatinib: A targeted clinical drug development. Semin Hematol, 40: 15-20.

Castagnetti F, Palandri F, Amabile, Testoni N, Luatti S, Soverini S, Iacobucci I, Breccia M, Rege Ambin G, Tagnò F, Specchia G, Galieni P, Iuliano F, Pane F, Saglio G, Alimena G, Martinelli G, Baccarani M, Rosti G, 2009, "Results of high dose imatinib mesylate in intermediate Sokal risk chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase: a phase 2 trial of the GIMEMA CML Working Party," Blood, vol. 113, no. 15, pp.3428-3434.

Cilloni D, Saglio G, 2012, Molecular pathways:BCR/ABL, Clin Cancer Res, 18(4):930-937.

Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW and Druker BJ, 2011. "Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity," Journal of Clinical Investigation, vol. 121, no. 1, pp.396-409.

Corbin AS, Rosee PL, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW, 2003, Several BCR-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib, Blood, 101:4611-4614

Cortes JE, Goldman JM and Hughes T,2012. "Current issues in chronic myeloid leukemia: monitoring, resistance, and functional cure," Journal of the National Comprehensive Cancer Network vol. 10, supplement 3, pp. S1-S13.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Cortes JE , Kim D -W, Pinilla-Ibarz J, Ie Coutre P, Paquette R, huah C, Nicolini FE, Appeley JF, Khoury HJ, Talpaz M, DiPersio J, DeAngelo DJ, Abruzzese E, Rea D, Baccarani M, Müller MC, Gambacorti-Passerini C, Wong S, Lustgarten S, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Guilhot F, Deininger MW, Hochhaus A, Hughes T, Goldman JM, Shah NP, Kantarjian H, 2012. "PACE: a pivotal phase 2 trial of ponatinib in patients with CML and Ph+ALL resistant or intolerant to dasatinib or nilotinib, or with the T315I mutation," in Proceedings of the 17th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam, The Netherlands.

Cortes J. E., Kim D-W., Kantarjian HM, Brümmendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L, Malhotra H, Powell C, Gogat K, Countouriotis AM, Gambacorti-Passerini C, 2012, "Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial," Journal of Clinical Oncology, vol. 30, no. 28, pp. 3486-3492.

Cömert Melda, Baran Yusuf, Saydam Güray, 2013, Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor area, Am J Blood Res, (3):191-200.

Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, Griffin JD, Fabbro D, Furet P, Liebetanz J, Mestan J, Manley PW, 2004. İmatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. Mini Rev Med Chem, 4(3):285-99.

Deininger, M, Vierra, S, 2000. Bcr-Abl thyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of CML, Cancer Research, 60; 2049- 2055.

Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, 2006, Five year follow-up of patients 534 receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Eng J Med, 355:2408-2417.

Elias MH, Baba AA, Husin A, Abdullah AD, Hassan R, Sim GA, Wahid SF, Ankathil R, 2012, Contribution of BCR/ABL kinase domain mutations to Imatinibmesylate-resistance in Philadelphia chromosome positive Malaysian chronic myeloid leukemia patients, Hematology reports, volume 4:e23, 86-90

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM, 1999. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy, Ann Intern Med, 131:207-219.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM, 1999. The biology of chronic myeloid leukemia, *NEJM*, 341:164-172

Franks, LM, Teich, NM, 2001, Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. New York: Oxford University Pres, Inc., 3rd Edition. Chapter 12.

Golemevic M, Verstovsek S, Giles F, Cortes J, Manshour T, Manley PW, Mestan J, Dugan M, Allan D, Griffin JD, Arlinghaus RB, Sun T, Kantarjian H, Beran M. 2005, AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib resistance chronic myeloid leukemia, *Clin Cancer Res*, 11:4941-7.

Goldman JM, 2007, "How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib area," *Blood*, vol. 110, no. 8, pp. 2828-2837

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL, 2001, "Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification," *Science*, vol. 293, no. 5531, pp. 876-880.

Hanfstein B, Müller MC, Kreil S, Ernst T, Schenk T, Lorentz C, Schwindel U, Leitner A, Hehlmann R, Hochhaus A, 2011, *Haematologica*, Dynamics of mutant BCR/ABL positive clones after cessation of tyrosine kinase inhibitor therapy, 96(3): 360-36.

Hantschel O, Warsch W, Eckelhart E, Kaupe I, Grebien F, Wagner KU, Superti-Furga G, Sexl V, 2012, "BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia," *Nature Chemical Biology*, vol. 8, no. 3, pp. 285-293.

Haznedaroğlu İ.C, *Kronik Myelofibrozis*. www.thd.org.tr. 12.12.2013.

Haznedaroğlu İC, 2010: Imatinib Mesylate targeted to BCR-ABL and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia (CML) *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 30(Suppl 1):S22-S28.

Hochhaus A, La Rosee P, Muller MC, Ernst T, Cross NC, 2011, Impact of BCR-ABL mutations on patients with chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle*, 10(2):250-60.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Shoch C, Coss NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R, 2002, "Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy," *Leukemia*, vol. 16, no. 11, pp. 2190–2196.

Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, Müller MC, Kaeda JS, Foroni L, Druker BJ, Guilhot F, Larson RA, O'Brien SG, Rudoltz MS, Mone Mi Wehrle E, Modur V, Goldman JM, Radich JP, 2010, "Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571(IRIS)," *Blood*, vol. 116, no. 19, pp. 3758–3765.

Ito T, 2013, Stem cell maintenance and disease progression in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*; DOI.10.1007/s12185-013-1318-8. [Epub ahead of print].

Izzo B, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Martinelli G, 2006; GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia, Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*, 12: 7374-7379.

Jabbour E, Cortes JE and Kantarjian HM, 2009, "Suboptimal response to or failure of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia: what is the optimal strategy?" *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 84, no. 2, pp. 161–169.

Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring and management. *Am J Hematol*, 87(11),1037-1045.

Jorgensen HG, Holyoake TL, 2007, Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans*, 35: 1347-1351.

Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Hugut F, Boque C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Szatrowski T, Shapiro , Baccarani M, 2010, "Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia," *New England Journal of Medicine*, vol. 362, no. 24, pp. 2260–2270

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kocabıyık Vasfiye Betül, 2011, ALL ve KML'li Hastalarda BCR ve ABL Genlerindeki Mutasyonların İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 61s.

Khorashad JS, de Lavallade H, Apperley JF, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, Szydlo R, Olavarria E, Kaeda J, Goldman JM, Marin D, 2008, Finding of kinase domain mutations in patients with chronic phase myeloid leukemia responding to imatinib may identify those at high risk of disease progression, *J. Clin Oncol.*, 26(29): 4806-13.

Lange T, 2013, T315I mutant BCR/ABL quantification in CML; *Haematologica* 98(5): 714-720.

Laneuville P, 1995, Abl tyrosine protein kinase, *Semin Immunol*, 7:255-66.

Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. 2000, Selection and characterization of BCR/ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance, *Blood*, 96. 1070-1079.

Melo, VJ and Deininger WNM, 2004, Biology of chronic myelogenous leukemia-signaling pathways of initiation and transformation, *Hematol Oncol Clin N Am.*,18;545-568.

Muller MC, Cortes JE, Kim DW, Druker BJ, Erben P, Pasquini R, Pasquini R, Branford S, Hughes TP, Radich JP, Ploughman L, Mukhopadhyay J, Hochhaus A, 2009, "Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations," *Blood*, vol. 114, no. 24, pp. 4944-4953.

Moraes G. Nestal de and Souza P. S. , 2012. "The interface between BCR-ABL-dependent and independent resistance signaling pathways in chronic myeloid leukemia," *Leukemia Research and Treatment*, vol. 2012, Article ID 671702, 19 pages.

Nasr R. and Bazarbachi A, 2012, "Chronic myeloid leukemia: "archetype" of the impact of targeted therapies", *pathologie Biologie*, vol. 60, no. 4, pp. 239-245.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Nardi V, Azam M, Daley GV, 2004, Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL. *Current Opinion in Hematology*, 11:35-43.

National Cancer Institute[homepage on the Internet]. Accessed July 23, 2013. Chronic Myelogenous Leukemia Treatment, Available from. <http://www.cancer.gov>.

Nicolini FE, Ibrahim AR, Soverini S, Martinelli G, Müller MC, Hochhaus A, Dufva IH, Kim DW, Cortes J, Mauro MJ, Chuah C, Labussière H, Morisset S, Roche-Lestienne C, Lippert E, Hayette S, Peter S, Zhou W, Maguer-Satta V, Michallet M, Goldman J, Apperley JF, Mahon FO, Marin D, Etienne G, 2013, The BCR-ABL T315I mutation compromises survival in chronic phase chronic myelogenous leukemia patients resistant to tyrosine kinase inhibitors, in a matched pair analysis. *Haematologica*; doi:10.3324/haematol.2012.080234. [Epub ahead of print].

Nowell PC and Hungerford DA ,1960, "Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 25, pp. 85-109.

O'Hare T, Eide CA, and Deininger MWN, 2007, "Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia," *Blood*, vol. 110, no. 7, pp. 2242-2249.

Ohanian M, Cortes J, Kantarjian H , and Jabbour E , 2012, "Tyrosine kinase inhibitors in acute and chronic leukemias," *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 13, no. 7, pp. 927-938.

O'Hare T, Zabriskie M, Eiring A, Deininger MW, 2012, "Pushing the limits to targeted therapy in chronic myeloid leukemia," *Nature Reviews*, vol. 12, no. 8, pp. 513-526.

Quintas-Cardama A, Cortes J. 2009, Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*;113:1619-1630.

Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleis L, Marchesi e, Donella-Deana A, Ahmed S, Redaelli S, Piazza R, Magistroni V, Andreoni F, Scapozza L, Formelli F, Gambacoti-Passerini C, 2006, "In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells," *Cancer Research*, vol. 66, no. 23, pp. 11314-11322

Ramirez P, Dipersio JF, 2008, Therapy options in imatinib failures. *The Oncologist*;13:424-434.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Ray A, Cowan-Jacob SW, Manley PW, Mestan J, and Griffin JD, 2007, "Identification of BCR-ABL point mutations conferring resistance to the Abl kinase inhibitor AMN107 (nilotinib) by a random mutagenesis study," *Blood*, vol. 109, no. 11, pp. 5011-5015

Reddy Premkumar E and Aggarwal K Aneel, 2012, The Ins and Outs of Bcr-Abl Inhibition, *Genes & Cancer*;3(5-69) 447-454.

Ren R, 2005, Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 5: 172-183.

Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. 2003, A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423: 409-414.

Robinson LL, 1987, Environmental exposures as risk factor for childhood ALL. *Cancer Research*, 28: 249-255.

Rosti G, Palandri F, Castagnetti F, Breccia M, Levato L, Gugliotta G, Capucci A, Cedrone M, Fava C, Intermesoli T, Cambrin GR, Stagno F, Tiribelli M, Amabile M, Luatti S, Poerio A, Soverini S, Testoni N, Martinelli G, Alimna G, Pane F, Saglio G, Baccarani M; GIMEMA CML Working Party, 2009, "Nilotinib for the frontline treatment of Ph+ chronic myeloid leukemia," *Blood*, vol. 114, no. 24, pp. 4933-4938.

Rowley JD, 1973, "A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining," *Nature*, vol. 243, no. 5405, pp. 290-293.

Saglio G, Kim D-W, Issaragrisil S, Ie Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hohhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM; ENESTnd Investigators, 2010, "Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia," *New England Journal of Medicine*, vol. 362, no. 24, pp. 2251-2259.

Sahli Ahmad Hamad Zeyad, Maya El Sabban, Maha Mouterik and Nasr Rihab, 2013, Emerging therapeutic Strategies for targeting Chronic Myeloid leukemia Stem Cells, Hindawii Publishing Corporation *Stem Cells International* Volume 2013, Article ID 724360, 12 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/724360>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Sardas OS, Koc H, Beksac M. 1991, Interferon-alpha2b therapy and monitorization of serum IL-2R, TNF, G-CSF and GM-CSF in chronic myelogenous leukemia. *Eur J Cancer, Suppl2*, 1380.

Santos FPS, Kantarjian H, Quint'as-Cardama A and Cortes J, 2011. "Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia," *Cancer Journal*, vol. 17, no. 6, pp. 465-476.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J., 2000, Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*, 289: 1938-1942.

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL, 2002, Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal

resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2(2):117-25.

Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, Iacobucci I, Amabile M, Abruzzese E, Orlandi E, Radaelli F, Ciccone F, Tiribelli M, di Lorenzo R, Caracciolo C, Izzo B, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Martinelli G, 2006, GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*, 12: 7374-7379.

Soverini S, Houchhaus A, Nicolini Fe, Gruber F, Lange T, Saglio G, 2011, BCR/ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations form an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*, 118(5):1208-15.

Sun X, Layton JE, Elefanty A, Lieschke GJ. 2001, Comparison of effects of the tyrosine kinase inhibitors AG957, AG490, and STI571 on BCR-ABL-expressing cells, demonstrating synergy between AG490 and STI571. *Blood*, 97: 2008-2015.

Talpaz M, Guilhot F, 2005, Imatinib induced hematologic and cytogenetic responses in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 11:4941-7.

The Leukemia & Lymphoma Society, Novartis Oncology, 2003.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. 2002, BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia chromosome-positive leukemia to STI571: a prospective study. *Lancet*, 359: 487-491

Walz, C, and Sattler, M, 2006, Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 57, 145- 164.

Wang X, Zeng J, Shi M. et al., 2011, "Targeted blockage of signal transducer and activator of transcription 5 signaling pathway with decoy oligodeoxynucleotides suppresses leukemic K562 cell growth," *DNA and Cell Biology*, vol. 30,no. 2, pp. 71-78

www.kronikmyeloproliferatifhastaliklar.com, 30.12.2013

www.osmanilhan.com, 30.12.2013.

Yokoyama T, Kanno Y, Yamazaki Y, Takahara T, Miyata S, Nakamura T, 2010, Trib 1 links the *MEK1/ERK* pathway in myeloid leukemogenesis, *116:2768-2775*.

Yüksel ve ark, *Mayıs 2005*, İmatinib Mesilat ile Tedavi Edilen Kronik Myeloid Lösemi Vakalarında Belirlenen Trizomi 8, *Kocatepe Tıp Dergisi, Cilt 6 No: 2*.

Zhang J, Adrian FJ, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Li AG, Iacob RE, Sim T, Powers J, Dierks C, Sun F, Guo GR, Ding Q, Okram B, Choi Y, Wojciechowski A, Deng X, Liu G, Fendrich G, Strauss A, Vajpai N, Grzeiek S, Tuntland T, Liu Y, Bursulaya B, Azam M, Manley PW, Engen JR, Daley GQ, Warmuth M, Gray NS, 2010, Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature*; 463(7280):501-6.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Serap ARSLAN

Doğum tarihi ve yeri: 28.08.1976-Eskişehir

Uyruğu : T.C.

Medeni durumu : Bekâr

İletişim adresi : 71 Evler Mah. Kilit Sok. No:9/2 Odunpazarı/Eskişehir

serkus76@gmail.com, [0536 5482291](tel:05365482291)

Eğitim Durumu:1983-1988 Erdal Abacı İlkokulu-Eskişehir
İlkokul

1988-1991 Sami Sipahi Ortaokulu-Eskişehir
Ortaokul

1991-1994 Yunus Emre Lisesi- Eskişehir
Lise

1995-2010 Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü-Eskişehir
Lisans

2012-2014 ESOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik
A.B.D.-Eskişehir
Yüksek Lisans

