

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKUT MİYELOBLASTİK LÖSEMİ'Lİ
HASTALARDA FLT3 DUPLİKASYON VE
MUTASYONLARININ SAPTANMASI**

Hale AKFIRAT

**HEMATODİAGNOSTİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Akın UYSAL**

2005 – ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKUT MİYELOSİTER LÖSEMİLİ HASTALARDA
FLT3 DUPLİKASYON VE MUTASYONLARININ SAPTANMASI**

Biyolog Hale AKFIRAT

**Hematodiyagnostik Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Akın UYSAL**

Bu tez, “Türk Hematoloji Derneği Bilimsel Araştırma Proje Desteği” ile gerçekleştirilmiştir (2005-05).

2005-ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vi
Tablolar	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 AML'DEKİ MUTASYONLAR	2
1.2. FLT3	4
1.2.1. FLT3 Ligandı	5
1.2.2. FLT3 Mutasyonu ve Lösemi	7
1.3. İNSAN LÖSEMİLERİNDE FLT3 MUTASYON TİPLERİ	8
1.3.1. ITD (Internal Tandem Duplikasyonu)	8
1.3.2. TKD (Tirozin Kinaz Domain Mutasyonu)	9
1.4. FLT3 MUTASYONLARI ve AML OLUŞMASI	10
1.5. FLT3 MUTASYONLARININ DÜZEYİ ve KLİNİK İLİŞKİSİ	11
1.5.1. İlk Teşhis Konduğunda ve Relapsta FLT3 Mutasyonu	11
1.5.2. Takip Belirleyicisi Olarak FLT3 Mutasyonları	13
1.5.3 FLT3-ITD Pozitifliği İçin Kabul Gören Sonuçlar	13
1.6. FLT3 MUTASYONLARI İLE BİRLİKTELİK GÖSTEREBİLEN DİĞER MUTASYONLAR	14
1.7 ÇALIŞMANIN AMAÇLARI	15
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. HASTA ve GEREÇLER	16
2.2 YÖNTEM	16
2.2.1. DNA izolasyonu	16
2.2.2. PCR ve PCR Yöntemi ile FLT3 Mutasyonlarının Saptanması	17
2.2.3. Enzim Kesim Protokolü	20
2.2.4. İstatistik	20
3. BULGULAR	21
4. TARTIŞMA	28
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	32
ÖZET	33
SUMMARY	34
KAYNAKLAR	35

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı gerçekleştirirken benden her türlü desteğini ve yol göstericiliğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Akın Uysal'a, değerli hocam Prof. Dr. Meral Beksaç' a, ve Doç. Dr. Mutlu Arat'a katkılarından dolayı minnettarlığımı bildiririm . Bu tez “Türk Hematoloji Derneği Bilimsel Araştırma Proje Desteği” ile gerçekleştirilmiş olup; Derneğe ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Klara Dalva'ya ve Uzm.Dr. Pervin Topçuoğlu'na, her zaman manevi ve maddi desteği ile yanımda olan sevgili ablam Uzm. Dr. Hülya Aydın'a ve eşim Ertuğrul Akfırat'a sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AML	Akut Miyelodisplastik Lösemi
ATP	Adenosine Three Phospate
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
bp	Baz çifti
CD34	Kök Hücre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DH	Dendritik hücre
dNTPs	Di Nükleotid Three Phospates
FLT3	FMS-Benzeri Tirozin Kinaz (FMS-Like Tyrosine Kinase 3)
FL	FLT3 Ligand
FLK2	Fetal Liver Kinase 2
ITD	İnternal Tandem Duplication
IL3	İnterlokın 3
inv16	İnversiyon 16
JM	Juksta Membran
KML	Kronik Lenfoblastik Lösemi
Kİ	Kemik İliği
mRNA	Mesaj Ribonükleik Asit
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
ml	Mililitre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PER	Perifer
RBC	Kırmızı Kan Hücresi (Red Blood Cell)
RTK-3	Reseptor Tyrosine Kinase -3
STK-1	Stem Cell Tyrosine Kinase-1
TKD	Tyrosine Kinase Domain
t(8;21)	Translokasyon (8;21)
TBE	Tris Borik EDTA
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: FLT3 reseptörünün şekli	5
Şekil 3.1: 1,2,3 ve 4 no'lu hastaların FLT3-ITD jel görüntüsü	24
Şekil 3.2: 5,6,7,8 ve 9 no'lu hastaların FLT3-ITD jel görüntüsü	24
Şekil 3.3: 10,11,12,13,14 ve 15 no'lu hastaların FLT3-ITD jel görüntüsü	25
Şekil 3.4: 16,17,18,19,20,21,22,23 ve 24 no'lu hastaların FLT3-ITD jel görüntüsü	25
Şekil 3.5: 1,2,3 ve 4 no'lu hastaların FLT3-TKD jel görüntüsü	26
Şekil 3.6: 5,6,7,8,9,10 ve 11 no'lu hastaların FLT3-TKD jel görüntüsü	26
Şekil 3.7: 12,13,14, ve 15 no'lu hastaların FLT3-TKD jel görüntüsü	27
Şekil 3.8: 16,17,18,19,20,21,22,23 ve 24 no'lu hastaların FLT3-TKD jel görüntüsü	27

TABLÖLAR

Tablo 2.1. FLT-3 ITD Protokolü	18
Tablo 2.2. PCR Amplifikasyon Programı	18
Tablo 2.3 FLT3 TKD Protokolü	19
Tablo 2.4. Enzim Kesim Protokolü	20
Tablo 3.1. Hastaların klinik özellikleri	22
Tablo 3.2. FLT3 ITD mutasyonu olan ve olmayanların tanıdaki özelliklerinin karşılaştırılması	23

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

ADI SOYADI: HALE AKFIRAT

DOĞUM TARİHİ
ve YERİ: 01.08.1974 – IZMIR

MEDENİ HALİ: EVLİ

ÇOCUK SAYISI: BİR

UYRUĞU : T.C.

YABANCI DİL : İNGİLİZCE , İTALYANCA

CİNSİYET : KADIN

ENSTİTÜ ADRESİ : ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İBN-İ SİNA HASTANESİ HEMATOLOJİ
BÖLÜMÜ- 06100 SIHHİYE/ANKARA

İLETİŞİM ADRESİ: MELİS SİTESİ A2 BLOK NO: 32 ÜMITKOY -
ANKARA

TELEFON: 0 312 235 6750

EĞİTİM

2002- ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İBN-İ SİNA HASTANESİ,
HEMATODİAGNOSTİK MASTER

1994-1999: HACETTEPE UNİVERSİTESİ, FEN
FAKÜLTESİ FAKÜLTESİ BİYOLOJİ
BÖLÜMÜ, ANKARA

1993-1994: HACETTEPE UNİVERSİTESİ, SAĞLIK
BİLİMLERİ YÜKSEK OKULU ADİOMETRİ
BÖLÜMÜ, ANKARA

1985-1992: ANTALYA ANADOLU LİSESİ

1980-1985: ANKARA BAYRAK İLKOKULU

İŞ TECRÜBESİ

- 2000- ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İBN-İ SİNA HASTANESİ HEMATOLOJİ
BÖLÜMÜ,RUTİN HEMATOLOJİK
TESTLER;MOLEKÜLER DOKU TAYİN
TESTLERİ, RT-PCR, FISH VE KİMERİZM
ANALİZİ
- 1999-2000: ÖZELBİR KLİNİKTE RUTİN
HEMATOLOJİK TESTLER

KATILDIĞI KONGRE VE KURSLAR

23 – 26 Nisan 2005 :XIX. EUROPEAN IMMUNOGENETICS &
HISTOCOMPATIBILITY CONFERENCE, ISTANBUL

12-13 Mart 2005:COURSE OF BASIC MOLECULAR HEMATOLOGY, MERSİN

15 – 16 Nisan 2004 :IV. HLA SYSTEM AND IMMUNOLOGY OF
TRANSPLANTATION SYMPOSIUM, ANKARA

20 – 22 Şubat 2003 :IV. HLA SYSTEM AND IMMUNOLOGY OF
TRANSPLANTATION SYMPOSIUM, KAYSERİ

26 – 28 Ekim 2002 :VI. EDUCATION AFTER GRADUATION COURSE AND X
XIX. NATIONAL HEMATOLOGY CONGRESS, KEMER, ANTALYA

25 Ekim 2002 :II. HEMATOLOGY FIRST STEP COURSE, KEMER, ANTALYA

POSTER SUNUMU

“Bcr-abl Fusion Binding HLA Molecule Frequencies Among Patients With CML”

Klara Dalva, Esin Serbest, Funda Güngör, **Hale Akfırat**, Meral Beksaç XIX. European
Immunogenetics & Histocompatibility Conference, Istanbul, 23-26 Apr. 2005

SERTİFİKALAR :

- 13 – 15 Eylül 2004 : SYSMEX XT 2000İ OPERATOR TRAINING COURSE
- 11 – 15 Eylül 2002: BECKMAN COULTER LH-750 OPERATOR TRAINING COURSE
- 30 – 31 Mayıs 2002 : BECKMAN COULTER LH-755 OPERATOR TRAINING COURSE
- 20 – 21 Haziran 2002: BECKMAN COULTER HMX/AL OPERATOR TRAINING COURSE

1-GİRİŞ

Akut miyeloblastik lösemi (AML), tüm dünyada her yıl yüz binde 2-3 kişide görülme sıklığıyla ve son 20 yıldır görülme sıklığında çok büyük değişikliklerin gözlenmediği, günümüzde hala oldukça ölümcül seyirli, klonal hematopoietik kök hücrelerden kaynaklanan malin hastalık grubudur. (Thiede ve ark 2002, R.E Gale, 2003)

Günümüzde bu hastalıkla mücadelede uygulanan yöntemler; önce bu hastaların etiopatogenezinde rol alan muhtemel risk faktörleri ve genetik faktörleri belirlemek, prognostik değeri belirlenen bu faktörlere yönelik uygun tedavi yöntemlerini uygulamak şeklindedir (R.E Gale, 2003).

Bu amaçla yapılan sınıflandırmalardan biri, sitogenetik analizlere göre AML'yi 3 farklı gruba ayırmaktadır (Harris ve ark.,1997).

- 1) Dengeli kromozomal aberasyonlar: Bu gruptaki hastalar iyi prognostik grupta yer alırlar.
- 2) Dengesiz kromozomal aberasyonlar: Kötü prognozla birliktelik göstermektedir.
- 3) Normal karyotipi: Bu gruptaki hastalar, tüm AML'lerin % 45'ini oluşturan ve orta klinik prognozu olduğu bildirilen hastalardır. Bu gruptaki hastalarda prognostik değeri olan alt sınıflandırmalarda kullanılabilir veya takipte risk değerlendirmesi yapılabilecek herhangi bir işaretleyici tanımlanamamaktadır. Bu grup hastalar için, yeni moleküler işaretleyicilerin araştırılması gereği görülüp, çok merkezli çalışmalar başlatılmıştır (Wheathey ve ark., 1999).

Bu araştırmalardan bildirilen sonuçlar, bu hastalarda fms benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3) molekülünü ve bunun mutasyonlarını işaret etmektedir. Yani, herhangi bilinen bir sitogenetik anormallik taşımayan AML hastalarında, FLT3 mutasyonlarının yüksek görülme sıklığı, şimdiye kadar kategorize edilememiş AML alt gruplarında patogenezi belirlemede yeni bir pencere açacağı ve bu hastalardaki

prognozu belirlemede bir kriter olabileceği, dahası tedavide hedef molekül olabileceği konusunda ümit veren sonuçlar olarak değerlendirilmektedir (R.E Gale, 2003).

Bir çok çalışma sonuçlarına bakıldığında; FLT3 proteinlerinin erken kök hücre hayatta kalımında ve miyeloid hücre farklılaşmasında çok önemli rolü olduğunu, FLT3'ün aktivasyonuna neden olan FLT3 internal tandem duplikasyonu (FLT3-ITD) ve FLT3 nokta (FLT3-TKD) mutasyonlarının AML hastalarında en sık rastlanan mutasyon tipi olduğu , FLT3-ITD mutasyonlu hasta popülasyonunda, hastaların daha kötü klinik seyirli (daha yüksek lökosit sayısı) olduğu ve kötü prognoz (sık relapslar) gözlendiği, yine bu mutasyonların çoğunlukla normal karyotipli hastalarda rastlandığı belirtilmektedir (Levis&Small, 2003, Kottaridis 2001, Frohling 2002, Schnittger, 2002).

1.1. AML'DEKİ MUTASYONLAR

AML, hemotopoetik sistemden kaynaklanan neoplastik hücrelerin kan, kemik iliği ve diğer dokuları infiltre etmesi ile karakterize, heterojen fenotipik ve genotipik özellikler gösterebilen klonal hemotopoetik kök hücre hastalığıdır. Araştırmalarda, kök hücre kompartmanında normal hematopoezis sırasında herhangi bir basamakta hücre tipinin farklılaşmasında yetersizlik ve/veya bazı kök hücre tiplerinin aşırı proliferasyonu ve/veya fonksiyonel olmayan miyeloblastların birikmesi gibi anormallikler saptanmıştır. Neoplastik değişimin birden fazla mutasyonun, normal hücre proliferasyonu veya farklılaşma basamağını bozması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Örneğin; nokta mutasyonları, gen replasmanları, kromozomal translokasyonlar) Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, lökomogenezin iki tip mutasyon modelinde varlığı gözlenmiştir. Bu mutasyonların spektrum analizlerine bakıldığında; iki geniş mutasyon grubu karşımıza çıkmaktadır (Stone ve ark., 2004).

1- Hematopoietik öncü hücrelerde proliferasyon ve/veya yaşam süresini artıran mutasyonlar: Miyeloid lösemik hücrelerin % 50 sinde bulunduğu bilinen başlıca proliferasyon ve/veya yaşam süresini artıran mutasyonlar şunlardır:

- *RAS* aile üyelerinde aktivasyon mutasyonları,
- Reseptör tirozin kinaz KİT ve FLT 3 ün aktivasyon mutasyonları,
- *NF-1*'in fonksiyon kaybı mutasyonları,
- Hematopoietik fosfotaz SHP-2'de fonksiyon mutasyonları,

2- Hematopoietik hücre değişimini etkileyen mutasyonlar: Bu grup mutasyonlar, çoğunlukla transkripsiyon faktörlerini veya kofaktörlerini etkilerler (Örneğin; CDF) (Stone ve ark.,2004).

Bu mutasyonlar birbirlerini tamamlayıcı niteliktedirler. Bu mutasyonlardan herhangi biri; lösemik hücrelere çoğalma veya sağ kalım avantajı kazandırmak için yeterlidir. Bu mutasyonlardan AML'de en sık görülenlerinin, FLT3'ün aktivasyon mutasyonları olduğu bilinmektedir (Thiede ve ark., 2002).

Her AML vakasında, hastalığı başlatan faktör bilinmese de genetik incelemeler arttıkça, tedavide de yeni genetik hedefler belirleme ümitleri artmaktadır. Bu ilerlemelere rağmen hala AML hastalarının büyük bir kısmı hastalıktan dolayı kaybedilmektedir (Stone ve ark., 2004).

AML'de genetik çalışmalar sonucu çeşitli tedavi örnekleri ve prognostik yaklaşımlar bulunmaktadır. Son zamanlarda prognostik ve terapötik önem taşıdığı düşünülen bazı moleküller ve moleküler değişiklikler belirlenmekte ve bunların tedavi ve prognoz açısından önemleri araştırılmaktadır. FLT3 geni ve bu genin mutasyonları bunlardan biri ve belki de en önemlisi olarak karşımıza çıkmaktadır (R.E Gale ve ark., 2003).

Miyeloid lösemilerin kök hücre orijinli olduğu son 30 yıldır bilinmesine rağmen, lösemik kök hücrelerin normal hematopoietik kök hücrelerden farklılıklarının deneysel yollar ile kanıtlanması, son birkaç yıl içinde gerçekleşebilmiştir.

Lösemik kök hücrelerine özgü belirlenebilen gelişimsel, hücrel ve moleküler özellikler içinde muhtemelen en önemlisi, kendini yenileme kriteridir. Bennet ve Dick'in çalışmalarında; bir çok FAB alt tiplerinde, insan AML kök hücrelerinin kendilerini yenileyebilme kapasitelerinin olduğu bildirilirken, birçok çalışmada ise lösemik kök hücrelerin bu kapasitelerinin olmadığı gözlemlenmiştir (Gilliland ve ark., 2004).

Yine bir çok çalışmada; normal insan kök hücrelerinde kendini yenileme kapasitesi gözlenirken, miyeloid lösemik kök hücrelerinde bu yeteneğin olmadığı bildirilmiştir. Bunun da oluşan bir mutasyon sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Kendini yenileme kapasitesini bozan mutasyonun, miyeloid lösemilerde patogeneze rol oynadığı kesin olarak bilinmektedir. Bu nedenle de bu malin hücrelerin standart kemoterapilere dirençli oldukları bilinmesine karşın, henüz altta yatan mutasyon tipleri tam olarak tanımlanamamış ve yeterli cevap alınabilen tedavi yöntemleri de geliştirilememiştir (Gilliland ve ark., 2004).

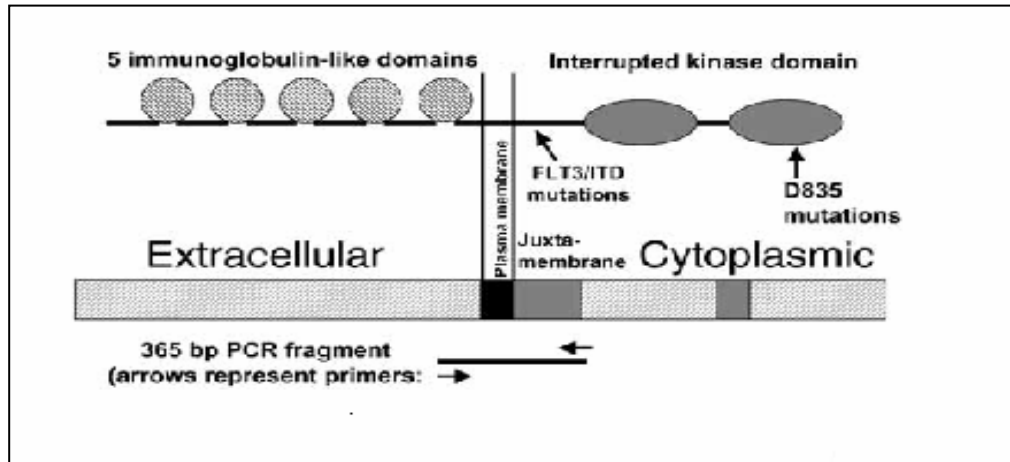
Son zamanlarda, AML hastalarında en sık rastlanan mutasyon olan FLT3 aktivasyonuna yol açan gen mutasyonları (% 30-35) hem patogeneze rolü ve tedavi yöntemlerinde kullanılabilirlik açısından hem de hastalığın klinik seyrinde, tedavi sonrası minimal kalan hastalık takibi açısından bir çok merkezde araştırılmaktadır. FLT3' ün malin kök hücre patogenezindeki rolü henüz tam olarak bilinmese de FLT3 inhibisyonunun lösemik kök hücrelerin, hücrel ölüme hassasiyetini artırdığı düşünülmektedir (Stone ve ark., 2004).

1.2. FLT-3

FLT3; İmmatür bir tirozin kinaz reseptörüdür. İmmatür hematopoietik hücreler tarafından sentezlenir. Myeloid monositer hücrelerin, normal multipotent kök hücrelerin gelişiminde önemli bir rolü vardır. 13q12 geni tarafından kodlanır. Ekspresyonu şu hücrelerde yapılır :Kemik iliği (Kİ) hematopoietik hücreler, timus ve lenf bezleri, plasenta, beyin ve gonadlar tarafından eksprese edilir (Levis ve Small, 2003).

FLT3, Klas3 tirozin kinaz reseptör ailesinin bir üyesidir. FLT 3 diğer bilinen isimleri; Fetal Liver Kinaz 2 (FLK2) ve Human Stem Cell Kinaz1 (STK1) olup, FLT3 ile klas3 tirozin kinaz reseptör ailesinin (RTK 3) güçlü bir sekans benzerliği bulunmaktadır. Bu ailenin karakteristik ortak yönleri 5 Ig benzeri bölgeden oluşur. Sitoplazmik tirozin kinaz bölgesi ayrı bir tirozin kinaz motifi içerir. Hücre içi Juksta membran (JM) bölgesi ve C terminal kuyruğu içerir (Levis & Small, 2003) (Şekil 1.1).

FLT3 ligandı (FL) ile dimerizasyonu sonucunda FLT3 reseptörü aktive olduğu ve sonuçta pluripotent kök hücrelerinin, erken öncü hücrelerin ve immatür lenfositlerin proliferasyonunu kontrol eden sinyalleşmeleri başlattığı bildirilmektedir (Levis ve Small, 2003).



Şekil 1.1.: FLT3 reseptörünün şematik şekli (Levis ve Small 2003)

1.2.1. FLT 3 Ligandı:

FLT3 Ligandı, FLT-3 reseptörünün ligandıdır. İmmatür miyeloid hücreler ve kök hücrelerinin gelişme ve farklılaşmasını uyarır. Katil hücreleri (NK), dendritik hücreleri (DH) ve CD 34 hücrelerini artırır (Levis ve Small, 2003).

FL; Tip 1 transmembran proteinidir. Çözünebilir homodimerik protein olarak salgılanır. Hematopoietik kemik iliği, mikro çevresindeki hücrelerde eksprese edilir (kemik iliği fibroblastları, miyeloid hematopoietik hücre serileri , B ve T hücre serileri vb.) (Abu-Duhier ve ark.,2001).

Farelerde FL geni yok edildiğinde immun sistem yetmezliği, miyoleid öncü hücre, B öncü hücre, dendritik hücre ve doğal öldürücü hücre sayısında belirgin oranda azalma gözlenmiştir (Lyman ve ark.,1995).

DH, T hücrelerine antigen sunan hücrelerdir. DH'ler, kanser hastalarında hücresele immunoteropötik ajanlar olarak araştırılmaktadır. FL'nin, NK hücre gelişiminde de önemli rolü vardır. FL'nin, DH ve NK hücrelerinin proliferasyonunu uyarması, FL'nin geniş spektrumlu bir anti tümör ajan olma potansiyelinin olabileceğini düşündürmektedir (R.E. Gale, 2003).

FL'nin, FLT3 taşıyan AML hücreleri ve miyeloid – monositer hücre serilerinin çoğalmasını uyardığı, diğer büyüme faktörleri ile birlikte ALL (Akut lenfosit lösemi) ve primer AML girişimini uyardığı, FL'nin bu hücreler üzerinde önemli bir anti-apoptotik ve yaşam süresini uzatıcı etkisi olduğu bildirilmektedir (Rombouts ve ark.,2000).

Lösemi tedavisinde FL-FLT3 ligand reseptör sisteminin inhibisyonu veya aktivasyonu yöntemleri, daha geniş serilerde çok dikkatli araştırılmalıdır. FL verilmesinin, anti tümör immunitiyi artırabileceği gibi, aynı zamanda lösemik blastların da gelişimini hızlandırıyor ve yaşam sürelerini uzatıyor olabileceği düşünülmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, retrovirüs transdüksiyonu ile kronik FL üretimi sağlanması sonucunda bu canlılarda ; lökosit sayısında artış, derin anemi, belirgin dalak büyümesi, dokularda fibrotik değişiklikler, DH'lerin sayılarının artması, aktif T lenfositlerinin artması görülmüştür (Whitmann ve ark., 2001).

FLT3'ün inhibisyonu, AML için iyi bir tedavi yaklaşımı gibi görülse de aynı zamanda anti lösemik immunitenin inhibe edilme olasılığının da bulunduğu bildirilmektedir. (R.E.Gale, 2003)

1.2.2. FLT3 Mutasyonu ve Lösemi:

Dünya Sağlık Örgütü tarafından kabul görmüş AML sınıflandırması, sitogenetik anormalliklere göre dört alt gruba ayrılrsa da genelde AML hastaları, sitogenetik özelliklerine göre başlıca üç farklı risk grubuna ayrılırlar:

- 1- İyi risk
- 2- Ortaya ya da standart risk
- 3- Kötü risk

İyi risk grubundaki hastalarda dengeli kromozomal aberasyonların faktörlerini kodlayan genleri bozmayı hedefleyen spesifik tekrarlayıcı kromozomal translokasyonlardan oluştuğu ve bu hastaların klinik seyrinin daha iyi olduğu, molekül spesifik tedavilerin (örnek: akut promiyelositer lösemide, All-trans retinoik asit tedavisi) 5 yıllık sağ kalım süresini % 20-30 oranında artırdığı bildirilmektedir (R.E Gale, 2003).

Kötü risk grubundaki hastalarda 5 yıllık sağ kalım % 20'den az olduğu (Grimwade ve ark. 1998), bu gruptaki karyotipik anormalliklerin antionkojenleri etkileyen kayıplar şeklinde oldukları ve bunların şimdilik hedeflenmiş tedaviler için uygun hedefler olmadıkları bildirilmektedir (R.E Gale, 2003).

Orta risk grubu hastaların ise tüm AML'lerin % 45'ini oluşturduğu ve bu grupta normal karyotip gözlendiği ve bu grupta relapsın çok sık görüldüğü bildirilmektedir. İşte bu son grup tüm AML hastalarının, klinik takipte kullanılabilecek ve prognostik değeri olabilecek molekül ve moleküler değişikliklerin henüz bulunamamış olması nedeniyle bu grup hastalar çok merkezli çalışmalarda ilgi odağı olmaktadır (R.E Gale, 2003)

FLT3, AML hastalarının % 93 ünde (% 70-100) pozitif bulunmaktadır (Drex ve ark.1996). Kronik lenfositer lösemnin (KML), kronik fazında bulunmazken

hastalığın blastik transformasyon döneminde yüksek oranda FLT3 ekspresyonu olduğu bildirilmektedir (Zwaan ve ark.,2003).

1.3. İNSAN LÖSEMİLERİNDE FLT3 MUTASYON TİPLERİ

1.3.1. ITD (İnternal Tandem Duplikasyonu) :

FLT3-ITD'na, ilk kez 1996'da Nakao ve arkadaşları tarafından yetişkin AML ve çocuk ALL hastalarında FLT3 mesaj ribonükleik asit (m RNA) sıklığı ve dağılımını araştırırken, polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) JM bölgesinde beklenmedik şekilde uzun fragmanlar olarak rastlanmış ve tanımlanmıştır (Nakao ve ark.1996). Bu fragmanlar incelendiğinde, çeşitli uzunluklarda sekanslar, adım adım tekrarlar halinde araya girmiş halde bulunmuşlardır. Bu duplike olmuş fragmanların tümünün tirozinden zengin olduğu , tümünün exon 14-15 tarafından kodlanan JM bölgesi içinde olduğu, uzunluklarının 12-240-bp arasında değişebildiği gözlenmiştir (Frohling ve ark. 2002, R.E Gale, 2003).

JM bölgesinde ITD mutasyonu taşıyan hastalar incelendiğinde; çoğunlukla FLT3'ün iki allelinden birinde ITD mutasyonu olurken, diğer allelin "wild" tip allel olarak kaldığı veya daha az sıklıkla da biallellik mutasyona uğrayıp, "wild" tip allelin de kaybolduğu gözlenmiştir (Levis and Small, 2003).

AML'lerde en sık görülen mutasyon FLT3-ITD mutasyonudur. Sıklığının yetişkinlerde % 13,2 - % 32 arasında olduğu, miyelodisplastik sendromların (MDS) % 3'ünde , akut lenfoblastik lösemilerde (ALL) ise çok nadiren rastlandığı bildirilmektedir. FLT3-ITD mutasyonuna, KML, Hodhgin dışı lenfoma, multiple miyelom (MM) hastalarında ve sağlıklı bireylerde hiç rastlanmamıştır (Levis and Small, 2003).

FLT3-ITD'nin büyüme faktörlerinden bağımsız büyümeye neden olduğu, dolayısıyla normalde FLT3-FL reaksiyonu sonucu proliferasyon için büyüme faktörü gerekliyken (İnterlökin 3 (IL-3) bağımlı), FLT-ITD varlığında proliferasyon için bir büyüme faktörüne gerek olmadığı bildirilmektedir. Dolayısıyla proliferasyon

artarken inhibitör aktivitenin azaldığı, lösemik blastlar ve proliferasyonun arttığı, inhibitör sinyallerin ise azaldığı gözlenmiştir. Buna karşın ITD mutasyonu eğer heterojen tipte yani wild tip FLT3'de var ise büyüme faktöründen bağımsız proliferasyon olmamıştır. Homojen tip mutasyonda ise wild tip FLT3 yoktur. Dolayısıyla biallellik mutasyon oluşmuş ve faktör bağımsız proliferasyon daha da artmıştır. Lökosit sayısı ise çok daha yüksektir (Levis ve Small,2003).

ITD mutasyonu, AML tipleri içinde en çok M3 ve M5 ve daha sıklıkla M6, M7 de gözlenmiştir. Kısmi ve tam wild tip allel kaybı sonucu, mutant band hakimiyetinin her hastada farklı olduğu ve bunun da altta yatan genetik instabiliteye bağımlı olarak geliştiği bildirilmiştir. Genetik materyal kaybının mitotik rekombinasyon sonucu olduğu düşünülmektedir. (R.E.Gale, 2003)

1.3.2. TKD (Tirozin Kinaz Domain Mutasyonu):

AML hastalarında, FLT3 –ITD mutasyonu dışında, FLT3'ün aktivasyon loop bölgesindeki tirozin kinazlarda da mutasyon gözlenmektedir (Yamamoto ve ark.2001). Bu mutasyon, ikinci tirozin kinaz domainin 20. exonundaki aspartik asit 835(D835) ve isoleüsin 836(I836) noktalarında amino asit yer değişimi ve araya girmesi olarak tanımlanmaktadır (R.E.Gale, 2003).

Aktivasyon loop bölgesi , tirozin kinazlarda ortak bir bölgedir. Tirozin kinaz aktif değilken, bu loop Adenosine Three Phosphate (ATP) ve substrat girişini durdurur. Bu durum ATP' leri kinaz bölgesine yönlendirir. Tirozin kinaz aktif duruma geçtiğinde ise bu loop'taki spesifik bir tirozin rezidüsü fosforilize edilir. Böylece loop'ta bir konfigürasyon değişikliği oluşur ve aktif hale gelir. Böylece kinaz için ATP ve substrat girişlerine serbest kılar. TKD mutasyonları, FLT3 reseptöründeki 2. tirozin kinaz bölgesinin inhibitör etkisini bozar. Sonuç olarak; yapısal kinaz aktivasyonuna neden olur. Bu etki, ITD mutasyonlarında gözlenen otoinhibitör mekanizmasının ortadan kalkması ile aynı sonucu doğurur. Yani kinaz aktivasyonu ile sonuçlanır (Levis ve Small, 2003).

TKD mutasyonu AML'de % 7 oranında pozitif bulunmaktadır. TKD mutasyonuna daha çok M4 ve M5 alt tiplerinde rastlanmaktadır. Bu konuda yapılmış çok sayıdaki çalışmaların sonuçları bir araya getirildiğinde; AML hastalarının yaklaşık % 30'unda FLT3 mutasyonunun mevcut olduğu, bunun ya FLT3-ITD (%24), yada FLT3-TKD (% 7) olduğu görülmektedir (Thiede ve ark.,2002).

1.4. FLT3 MUTASYONLARI ve AML OLUŞMASI

Birçok çalışmada, AML fenotipinin oluşmasında FLT3 mutasyonunun yetmediği, bu mutasyona ek olarak çeşitli mutasyonların da gerektiği bildirilmiştir. Bunun nedeninin; AML'deki karakteristik bozukluğun hematopoietik öncü hücrelerin farklılaşmasında bozukluk ve yetersizlik olduğu, tirozin kinazı aktive eden mutasyonların ise daha çok blast hücre sayısı ile ilgili (proliferatif etki) oldukları ve daha çok miyelodisplastik sendromları ortaya çıkarabilecekleri varsayılmaktadır (R.E Gale, 2003).

KML'deki blastik krizlerinde (AML'ye dönüşmesinde), artmış tirozin kinaz aktivitesi sayesinde oluştuğu bildirilmektedir. Ancak bu dönüşüm için de ilave mutasyonların gerekliliği gözlenmiştir (R.E Gale, 2003).

Birçok deneysel çalışmaların sonuçlarında; FLT3-ITD'nin artmış proliferasyon ve uzamış hücre yaşamına neden olabileceği ancak bu mutasyona ek olarak hücresel değişimi bozan mutasyon varlığına da gereksinim olduğu gözlenmektedir (Örn; FLT3-ITD t(15;17) birlikteliği AML hastalarının % 40'ında görülmektedir) (Levis ve Small, 2003).

AML gelişebilmesi için FLT3-ITD aktivasyon mutasyonunun tek başına yeterli olmadığı bildirilmektedir. Bunun nedeni olarak da AML'deki hatanın hücre değişimi basamaklarındaki duraklama dolayısı ile ITD mutasyonu ile ortaya çıkan mutasyonun hücre çoğalmasını artırdığı ancak farklılaşma duraklaması için bir başka mutasyonun da varlığının gerekliliği bildirilmektedir. MDS'deki hatası artmış kontrolsüz hücre çoğalmasındadır. ITD'ler ile oluşan aktivasyon mutasyonu bu duruma

neden olabilir. Ancak AML oluşumu için ITD tek başına yeterli değildir (R.E.Gale, 2003).

1.5. FLT3 MUTASYONLARININ DÜZEYİ VE KLİNİK İLİŞKİSİ

AML hastalarında birden fazla FLT3-ITD varlığını araştıran bir çalışmada; daha kötü bir klinik seyir, daha yüksek lökosit ve kemik iliği blast sayısı ve daha kötü bir hastalısız sağ kalım ile birliktelik gözlemlendiği bildirilmiştir (Kottaridis ve ark., 2001).

Whitman ve arkadaşları (2001) ve Thide ve arkadaşları (2002) çalışmalarında, “wild” tip FLT3 alleleline göre daha yüksek oranda mutant FLT3 alleli taşıyan hastalarda, daha kötü bir klinik seyir bildirmişlerdir. Bu hastalarda daha yüksek lökosit sayısı, kemik iliğinde blast yüzdesi ve daha kısa genel ve hastalısız sağ kalım olduğu da bildirilmiştir. Her iki çalışmada da normal sitogenetikli orta risk grubunda kabul edilen hastalarda, sadece wild tip FLT3 olduğunu bildirmişlerdir (Whitman ve ark., 2001, Thide ve ark., 2002).

Bu verilere göre; mutant homodimerlerin, altta yatan genetik instabilite sonucunda oluştukları ve bu hastalarda daha kötü klinik seyir olduğu söylenebilir (Whitman ve ark., 2001, Frohling ve ark., 2002).

FLT3-ITD mutasyonu taşıyan hastalarda mutant tip wild tip FLT3 oranının birden büyük olmasının kötü prognozla birliktelik gösteren önemli bir prognostik faktör olduğu pek çok çalışmada vurgulanmaktadır (Whitman ve ark., 2001, Frohling ve ark., 2002).

1.5.1. İlk Teşhis Konduğunda ve Relapsta FLT3 Mutasyonu:

Bir çok çalışmada, hem hastanın ilk tanı aldığı anda, hem de relaps örneklerinde, FLT3 mutasyonu araştırma sonuçları bildirilmiştir (Nakao ve ark.1996, Hovland ve ark.,2002, Kottaridis ve ark.,2001, Schinitger ve ark.,2002)

Bu çalışmalarda amaç; FLT3 mutasyon varlığının (özellikle normal sitogenetik taşıyan hastalarda) minimal residüel hastalık varlığının belirteci olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmak iken, elde edilen sonuçlar, FLT3 mutasyonlarının, AML patogenezindeki rolü hakkında önemli sorunların belirmesine yol açmıştır. AML'nin gelişme sürecinde “wild” tip allel kaybı eğilimi bildirilmektedir. Çalışmaların üçünde hastaların büyük bir kısmında (% 86), hem ilk tanıda hem de relapsta aynı tip FLT3 mutasyon durumu gözlenmiştir (Hovland ve ark., 2002, Kottaridis ve ark., 2001, Schinitger ve ark., 2002).

Ancak ilk AML tanısı konduğunda, FLT3-ITD pozitif hastaların, relaps ile geldikleri dönemde mutant oranının daha yüksek olduğu, genellikle wild tip allel kaybı ile birlikte olduğu gözlenmiştir. İlk tanı konduğunda birden fazla tip mutasyon taşıyan hastaların, relaps dönemlerinde ise sadece bir tip mutasyonun daha fazla arttığı belirlenmiştir (Kottaridis ve ark.2001, R.E Gale 2003).

Bunların dışında birçok hastanın relaps örneklerinde, ilk tanıdaki örneklerde var olan mutasyonlardan daha farklı mutasyon varlığı gözlenmiştir. İlk rastlanan mutasyonların kaybolduğu, tamamen yeni mutasyonlar kazanıldığı belirlenmiştir. Bu hastaların relaps örneklerinin % 10'unda, yeni edinilmiş mutasyonlar bulunurken, % 3,9'unda önceki FLT3 mutasyonunun kaybı olduğu ve yeni bir başka mutasyon oluştuğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar hem FLT3 mutasyonlarının minimal residüel hastalık belirteci olarak kullanımını kısıtladığı hem de FLT3 mutasyonlarının hastalığın başlangıcında olmayıp, hastalığın sürecinde daha sonradan edinilebildiğini, FLT3 mutasyonlarının ikincil bir olay olduğunu göstermektedir. Bu mutasyonlar farklı proliferatif veya sağ kalım avantajı olan yeni alt klonların oluşumuna neden olabilmektedir (Thiede ve ark,2002, R.E. Gale , 2003, Levis and Small, 2003).

Diğer bir çalışmada; FLT3-ITD mutasyonlarına kantitatif olarak bakıldığında, lösemik hücrelerin sadece bir alt grupta görülüp tüm hücrelerde olmayışının, FLT3 mutasyonlarının ikincil bir rolünün varlığını desteklediğini düşündürmektedir. Kottaridis ve arkadaşları (2001), FLT3'ü kantitatif olarak değerlendirmiş ve toplam FLT3 mutant düzeyinin % 0,5 ile % 97 arasında değiştiği, ve hastaların % 64'ünde ise % 40'dan az mutant olduğunu göstermişlerdir (Kottaridis ve ark., 2001).

1.5.2. Takip Belirleyicisi Olarak FLT3 Mutasyonları:

AML'nin tanınmasında, erken relapsın tanınmasında, tedavi yanıtının izlenmesinde ve minimal residüel hastalığın tesbitinde çok duyarlı PCR metodlarının önemi giderek artmaktadır. Ancak AML hastalarının sadece % 25'inde PCR ile iyi tanınabilen füzyon genleri bulunabilmektedir (R.E. Gale, 2003).

FLT3 – ITD, PCR tarafından saptanabilen yeni bir hedef olmuştur ve AML'li hastaların % 20'lik bir bölümüne daha ışık tutacaktır. Çünkü FLT3-ITD pozitif AML hastaları, relapsa daha yatkındırlar ve bu mutasyonun PCR ile erken dönemde saptanması hastalığın relaps tedavisinin de başarısını artıracak ve klinik seyrini de önemli oranda olumlu etkileyebilecektir (Thiede ve ark., 2002, R.E. Gale, 2003).

1.5.3. FLT3-ITD Pozitifliği İçin Kabul Gören Sonuçlar:

1- 60 yaş altı AML hastalarında bağımsız önemli bir prognostik faktör olmasına rağmen, 60 yaş üstü AML hastalarında FLT3-ITD pozitifliği ile kötü prognoz birlikteliği gençlerdeki kadar belirgin değildir (Thiede ve ark., 2002, R.E. Gale, 2003).

2- Yetişkin AML hastalarında FLT3-ITD varlığı ile toplam remisyon hızı arasında anlamlı bir ilişki olmadığı, ancak artmış relaps riski, kısalmış hastaliksız sağ kalım ve toplam sağ kalım olasılığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu yaygın kabul görmektedir (Frohling ve ark., 2002, Thiede ve ark., 2002, R.E. Gale, 2003).

3- FLT3 aktivasyonu, hematopoietik hücrelerde proliferasyon artışı ve apoptozise hassasiyette azalma ve sonuçta azalmış hücresel hayatta kalım ve AML hücrelerinde ilaç direnci ile seyretmektedir (Thiede ve ark., 2002, R.E. Gale, 2003).

FLT3-ITD taşıyan AML hastalarında toplam sağ kalımın daha kısa, bir başka deyişle relaps sonrası sağ kalımın çok kısa olduğu bir çok yayında bildirilmektedir. Bunun nedeni olarak da bu mutasyonu taşıyan hastalarda muhtemelen bir genetik

insitabilitenin varlığı ve buna bağı olarak da her relapsta yeni mutasyonların eklenip, prognozu kötüleştirici etki oluşturabildiği yorumları yapılmaktadır (Thiede ve ark., 2002, R.E. Gale, 2003).

AML patogenezindeki hedef moleküller araştırılırken aynı zamanda bu alt grup hastalarda klinik ve prognostik özellikler de araştırılmaktadır.

İşte FLT3-ITD ve TKD mutasyonları bu hedeflerden biri belki de en önemlisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Birçok çalışmada, AML hastalarında kötü prognostik değeri olan FLT3 aktivasyon mutasyon varlığı, bu hastalarda en sık rastlanan genetik mutasyon olarak bildirilmektedir. Bu araştırmaların sonuçlarında, FLT3 reseptöründe inhibisyon yapan tedavi yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Birçok merkezde geliştirilen FLT tirozin kinaz reseptör inhibisyonu yapabilen ve halen araştırma-geliştirme aşamasında olan teröpotik ajanlardan (FLT3 inhibitörü), klinikte de iyi sonuçlar alındığı bildirilmeye başlanmıştır (Arrigoni ve ark., 2003).

Dolayısı ile görülüyor ki; ilk tanı konduğunda FLT3-ITD mutasyon varlığına bakılması, bizlerin bu hastalardaki prognozu kestirebilmemize yardımcı olurken aynı zamanda bu mutasyonu taşıyan alt grup hastalarda farklı yeni tedavi yöntemlerinin de uygulanabilirliğini, yani tedavi protokolü seçimlerimizi de etkileyebileceği artık kabul görmektedir. Biz de tek merkezli çalışmamızda, prospektif, ilk tanı konmuş *de novo* AML olgularında FLT3-ITD mutasyon sıklığını araştırdık.

1.6. FLT3 MUTASYONLARI İLE BİRLİKTELİK GÖSTEREBİLEN DİĞER MUTASYONLAR

AML hastaları üzerinde yapılan birçok çalışmada, FLT3 mutasyonlarının sıklıkla diğer gen translokasyonları ve nokta mutasyonları ile birlikte olduğu gösterilmiştir. FLT3 taşıyan hastalarda t(8;21), t(15;17), inv16 ve 11q23 gen rearanjmanlarının da birlikte varlığı gösterilmiştir (R.E Gale, 2003).

1.7. ÇALIŞMANIN AMAÇLARI

Biz bu çalışmada; yeni AML tanısı almış ve rastgele seçilmiş geniş bir hasta grubunda;

1-) FLT3-ITD ve FLT3-TKD mutasyonlarının sıklığını belirlemeyi,

2-) Mutant ve “wild” tip FLT3-ITD allelerinin oranlarındaki farklılıkları araştırmayı amaçladık. Bu çalışmaya, kliniğimize başvuran tüm yeni tanı *de novo* AML hastalarından yazılı onaylarını takiben kan örneği alarak başladık.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. HASTA ve GEREÇLER

2004-2005 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji bölümünde takip edilen, 6 ile 85 yaşları arasında 24 yeni tanı konmuş *de novo* AML hastası çalışmaya alınmıştır. Hastalardan yazılı onaylarını takiben, tedavi öncesi 4 ml EDTA'lı tüpe periferik kan veya kemik iliği örnekleri alınmıştır. Örnekler bekletilmeden oda sıcaklığında hematoloji laboratuvarına iletilmiştir.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) İzolasyonu (Gentra Systems, USA) :

1200µl eritrosit liziz tamponu (RBC) (Gentra Systems) içeren tüpe 400 mikrolitre (µl)tam kan ilave edilir. 10 kez ters düz edilerek 10 dakika oda ısısında enkübe edilir. 20 saniye 11000-14000 rpm'de oda ısısında santrifüj edilir. Süpernatant olabildiğince uzaklaştırılır. Geride 10-20µl sıvı ve lökosit pelleti kalması sağlanır. 400 µl hücre liziz solüsyonu (Gentra Systems) eklenir. Pipet ile altüst edilerek hücre lizisi sağlanır. Partikül varsa çözünene kadar beklenir. Hücre lizat'ı üzerine 2µl RNase solüsyonu (Gentra Systems) eklenir. 25 kez altüst edilerek karıştırılır. 37°C'de 30 dakika inkübe edilir. Oda ısısında 10 dakika beklenerek soğutulur. 125 µl protein presipitasyon solüsyonu eklenir ve 20 saniye maksimum hızda vortekslenir. Üç dakika 13000-16000 g'de santrifüj edilir. Oluşan pellet; koyu kahverengi ve koyu kıvamda olmalıdır. Süpernatant, 300 µl % 100 Isopropanol (Carlo Erba, Milano) içeren 1,5 ml'lik temiz tüpe aktarılır. 50 kez ters düz edilerek nazikçe karıştırılır. 13000-16000 g'de oda ısısında 1 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Tüp, kurutma kağıdında yaklaşık 3 dakika kurutulur. 300 µl % 70'lik etanol (Carlo Erba, Milano) eklenir. Birkaç kez ters düz edilir ve pelletin yıkanması sağlanır. 13000-16000 g'de oda ısısında 1 dakika santrifüj edilir. Etanol dikkatli bir şekilde atılır. Tüp kurutma kağıdında 10-15 dakika kurutulur. 250 µl

DNA hidrasyon solüsyonu (Gentra Systems) eklenir. 5 saniye orta hızda vortekslenir. 65°C'de 1 saat ısı bloğunda (Thermolyne, USA) enkübe edilir. Enküasyon sonunda 5 saniye orta hızda vortekslenir. Böylece DNA içeren sıvı ependorfta toplanmış olur. +4°C derecede çalışma zamanına kadar saklanır.

2.2.2. PCR ve PCR Yöntemi ile FLT3 Mutasyonlarının Saptanması:

Moleküler Biyoloji alanında önemli yer tutan ve bir invitro nükleik asit çoğaltma metodu olan PCR geniş uygulama alanı olan bir tekniktir. İlk kez 1983 yılında Kary Mullis'in buluşu olan ve kendisine Nobel ödülü kazandıran PCR, nükleik asitlerin in-vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Hücre içinde gerçekleşen doğal DNA replikasyonu PCR ile bir tüp içinde taklit edilir.

PCR ile DNA' nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında şu maddeler yer almalıdır. Çoğaltılacak olan kalıp DNA, bu DNA' da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler, bu primerlere bağlanıp onların 3' ucuna nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz enzimi, sentezde kullanılacak olan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs), DNA polimerazın çalışabilmesi için tampon görevi yapacak olan maddeler, tuzlar ve magnezyum (Mg) gibi +2 değerlikli iyonlar PCR, üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde yaklaşık 25-30 kez tekrarlanması ile gerçekleşir.

PCR aşamasında DNA'nın çift sarmal yapısını bozup, tek zincir haline getirmek (denatürasyon) için 92-95°C, primerlerin hedef bölgeye tutunması (annealing, priming) için 37-72°C, primerlerin uzayarak (ekstensiyon) tutundukları tek zincir DNA'nın karşılığını komplementer oluşturmaları için 72 °C sıcaklık gerekmekte ve bu üç farklı sıcaklığı ardarda uygulanmasından oluşan siklusun 25-45 kez tekrarlanması thermal cyler adı verilen cihazla sağlanabilmektedir. PCR ile DNA'nın ilgili parçası 107 kat çoğaltılabilir ve bu ürün reaksiyon sonrası özel yöntemlerle (agar jel elektroforez, poliakrilamid jel elektroforez) boyanma işlemini takiben gözlenir. Primerlerin sınırladığı sekansın uzunluğu bilindiğinden, çoğaltılan

ürünün hangi baz çiftinde (bp=baze pair) bant oluşturduğu DNA belirleyicileri ile karşılaştırılarak belirlenir. Bu aşamada bilgisayar programlarından da yararlanılabilmektedir

FLT3-ITD mutasyonu için PCR reaksiyon miksi 1,5 µl'lik steril ependorf içinde soğuk blok üzerinde hazırlanır. Her hasta için FLT3-ITD Master Mix'den (Invivoscribe, USA) 45 µl ve 0,25 µl DNA polimeraz enzimi (AmpliTaq Gold 5U/µ) konur (Çizelge 2.1.). Bu PCR reaksiyon miksi, üzerlerinde hasta isimleri, tarih ve FLT3 ITD yazılmış, 1,5 µl'lik steril hasta ependorflarına 45 µl dağıtılır (soğuk blok üzerinde). Bu miksin üzerine 5 µl hasta DNA'sı konur (soğuk blok üzerinde). Çalışmanın negatif ve pozitif kontrolleri için de birer ependorf hazırlanır. Negatif kontrol ependorfuna 45 µl reaksiyon miksi ve 5 µl distile su, pozitif kontrol ependorfuna ise 45 µl reaksiyon miksi ve 5 µl FLT3-ITD pozitif kontrol DNA (Invivoscribe, USA)'sından konur. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olur. Ependorflar termal cycler (Corbett Research, Aust.)'a konarak PCR işlemi başlatılır. Termal cycler programı çizelge 2.3' de verilmiştir.

FLT3-ITD Master Mix	45 µl x hasta sayısı
AmpliTaq Gold 5U/µl	0,25 µl x hasta sayısı
DNA	5µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	50 µl

Tablo 2.1: FLT3 Protokolü

1.Basamak:	95°C'de 7 dakika
2.Basamak:	95°C'de 45 saniye
3.Basamak:	60°C'de 45 saniye
4.Basamak:	72°C'de 90 saniye
5.Basamak:	2-4.basamak arasını 34 kez tekrarla
6.Basamak:	72°C'de 10 dakika
7.Basamak:	15°C'de sonsuz

Tablo 2.2.: Corbett Research ya da PE 9700 Cihazları için PCR Amplifikasyon Programı

FLT3-ITD Mutasyonunun görüntülenmesi için % 2'lik Metafor agaroz (BioWhittaker Molecular Applications, USA) jeli hazırlanır. 1 gr metafor agaroz 50

ml yükleme tamponu TBE (Tris borik asit EDTA) ile karıştırılır.1 dakika mikro dalgada kaynatılarak erimesi sağlanır. Üzerine 20 µl Etidium bromür konur. Jel hazırlama tankına dökülür. Jelin soğuması için yaklaşık 15-20 dakika beklenir. Termal cycler’da çoğalan PCR ürününden 20 µl, 4 µl 6X jel TBE ile karıştırılarak jele yükleme yapılır. 5µl Marker (ABgene, USA), 1µl 6X jel TBE ile karıştırılarak jele yüklenir. 100 voltluk akım içeren elektroforez tankında 2 saat yürütme yapılır. FLT3- ITD mutasyonu için 331 bp’deki bantlar negatif, 335 bp ve daha ağır bantlar pozitif olarak değerlendirilir.

FLT3-TKD mutasyonu için PCR reaksiyon karışımı 1,5 µl’lik steril Ependorf içinde soğuk blok üzerinde hazırlanır. Her hasta için FLT3 D835 Master Mix’den (Invivoscribe, USA) 45µl ve 0,25 µl DNA polimeraz enzimi (AmpliTaq Gold 5U/µ) konur (Tablo 2.3). Bu PCR reaksiyon miksi, üzerlerinde hasta isimleri, tarih ve FLT3 D835 yazılmış, 1,5 µl’lik steril hasta Ependorflarına 45 µl dağıtılır (soğuk blok üzerinde). Bu karışımın üzerine 5 µl hasta DNA’sı konur (soğuk blok üzerinde). Çalışmanın negatif ve pozitif kontrolleri için de birer Ependorf hazırlanır. Negatif kontrol Ependorfuna reaksiyon miskinden sonra 5 µl distile su, pozitif kontrol Ependorfuna ise FLT3 D835 pozitif kontrol DNA (Invivoscribe, USA)’sından 5 µl konur. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olur. Ependorflar termal cycler’a konarak PCR işlemi başlatılır. Termal cycler programı tablo 2.2’ de verilmiştir.

FLT3-TKD Mutasyonunun ilk PCR örneklerinin görüntülenmesi için % 1,5’luk Agaroz (AppliChem, Germany) jel hazırlanır. 0,75 gr agaroz 50 ml TBE ile karıştırılır.1 dakika mikro dalgada kaynatılarak erimesi sağlanır. Üzerine 20 µl Etidium bromür konur. Jel hazırlama tankına dökülür. Jelin soğuması için yaklaşık 15-20 dakika beklenir.

FLT3-D835 Master Mix	45 µl x hasta sayısı
AmpliTaq Gold 5U/µl	0,25 µl x hasta sayısı
DNA	5µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	50 µl

Tablo 2.3: FLT3 Protokolü

2.2.3. Enzim Kesim Protokolü:

FLT3-TKD mutasyonu çalışmasında agaroz jelde yürütülen ve PCR'larının çalıştığı görülen örnekler daha sonra enzim kesim protokolüne tabi tutulur. Enzim kesimi için 1,5 µl'lik Ependorfa karışım hazırlanır. Her hasta için 11 µl distile su, 3µl 10X R Buffer ve 1µl EcoRV enzimi konur (Tablo 2.4). Hazırlanan bu karışım, üzerlerinde hasta isimleri, tarih ve FLT3 D835 enzim kesimi yazılmış, 1,5 µl'lik steril hasta Ependorflarına 15 µl dağıtılır (soğuk blok üzerinde). Bu karışımın üzerine 15 µl FLT3-D835 Master mix PCR ürünü konur (soğuk blok üzerinde) ve vortekslenir. Bir saat boyunca 37°C'lik ısı bloğuna konur.

Distile su	11µl x hasta sayısı
10X R Buffer	3µl x hasta sayısı
EcoRV endonuclease	1µl x hasta sayısı
FLT3 D835 Master mix PCR ürünü	15µl
Toplam hacim:	30µl

Tablo 2.4: Enzim Kesim Protokolü

FLT3-TKD Mutasyonunun enzim kesimi sonrası görüntülenmesi için tekrar % 1,5'luk agaroz jel hazırlanır. Enzim kesimi yapılan PCR ürününden 20 µl, 4 µl 6X jel yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yükleme yapılır. 5µl Marker (Specimen Control Size Ladder), 1µl 6X jel yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklenir. 100V'lik akım içeren elektroforez tankında 45 dakika yürütme yapılır. FLT3-TKD mutasyonu için yapılan ilk PCR örnekleri 150bp'da bant vermektedir. EcoRV enzimi ile kesim yapıldığında ise 81bp'da bant veren örnekler negatif, 130bp'da bant veren örnekler pozitif olarak değerlendirilir.

2.2.4. İstatistik:

Sayısal değişkenler ortanca ve dağılım olarak belirtildi. Bağımsız sayısal değişkenler Mann Whitney-U testi ile ve sayısal olmayan değişkenlerde Fisher-Exact testi kullanılarak karşılaştırıldı. P değeri < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 Hazır Paket Program kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

Yeni tanı *de novo* AML tanılı, ortalama yaşı 37,5 yıl (dağılım 6- 85 yıl) olan toplam 24 (15 erkek / 9 kadın) hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalardan tanı döneminde kemik iliği (n=18) veya periferik kan (n=6) örnekleri alınmış ve FLT3-ITD ve FLT3-TKD mutasyonları PCR yöntemi ile çalışılmıştır. Hastaların tanıdaki klinik özellikleri tablo 3.1’de görülmektedir.

Hastaların FLT3-ITD mutasyon çalışmasının jel görüntüleri Şekil 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4’de ve FLT3-TKD mutasyon çalışmasının jel görüntüleri Şekil 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8’de gösterilmiştir. Çalışmamızda toplam 5 hastada (% 20,8) FLT3-ITD mutasyonu saptanmış (Şekil 3.2 ve şekil 3.4, hasta no 5, 16, 17, 18 ve 21), ancak hiç birinde FLT3-TKD mutasyonu saptanmamıştır (% 0). FLT3-ITD mutasyonunun sıklığı kadınlarda erkeklere göre daha sıktır (% 44,4 karşı % 6,6, p=0,047) (Tablo 3.2). FLT3-ITD mutasyonları saptanan hastaların FAB sınıfına göre dağılımına bakıldığında; 2 hasta AML-M1 ve 1’er hasta AML-M2, AML-M3 ve AML-M4’tür (p=0,678).

FLT3-ITD mutasyon olan ve olmayan hastaların tanıdaki yaş, blast miktarı ve lökosit sayıları birbirlerine benzerdir(p>0,05) (Tablo 3.2).

Tanı esnasında hastalar ile ilgili konvansiyonel moleküler ve sitogenetik veriler yetersiz olduğu için herhangi bir istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

Hasta No	Hasta	Yaş (Yıl)	Seks	Lökosit (x 10 ⁹)	%Blast	Örnek Tipi	(15:17)	(8:21)	İnv16	ITD	TKD	FAB
1	MK	49	E	16,4	76	Kİ		—	—	—	—	AML-M2
2	NE	65	K	1,9	70	Kİ	+	—	—	—	—	AML-M1
3	AY	37	E	21,6	52	Kİ	—		—	—	—	AML-M4
4	MA	38	E	24,4	50	Kİ	—	—	—	—	—	AML-M2
5	SA	67	K	40,7	80	PER				+	—	AML-M1
6	FÇ	64	E	11,7	46	PER	—	—	—	—	—	AML-M2
7	HE	77	E	49,7	96	Kİ	—	—	—	—	—	AML-M3
8	AŞ	34	E	1,7	12	Kİ	—	—	—	—	—	AML-M6
9	NÖ	55	E	3,5	22	Kİ				—	—	AML-M6
10	KK	23	E	23,4	50	Kİ				—	—	AML-M4
11	GT	30	K	0,7	1	Kİ	+			—	—	AML-M3
12	RK	54	E	10,4	1	Kİ	—			—	—	AML-M4
13	ŞG	32	K	21,3	68	Kİ	—	+	—	—	—	AML-M2
14	BE	85	E	306,1	6	Kİ				—	—	AML-M4
15	MC	35	E	0,7	2	Kİ	+	—		—	—	AML-M3
16	FÖ	24	K	113,0	63	Kİ		—	—	+	—	AML- M4
17	AA	50	E	23,5	25	PER				+	—	AML-M3
18	SS	26	K	66	97	PER				+	—	AML-M1
19	OB	35	E	35,2	67	Kİ	—	—	—	—	—	AML-M2
20	FK	58	K	2	28	Kİ		—		—	—	AML-M4
21	GY	6	K	10,9	40	Kİ				+	—	AML-M2
22	İN	36	E	26,7	50	Kİ				—	—	AML-M2
23	ST	30	K	56,05	89	PER				—	—	AML-M0
24	HŞ	81	E	122,3	97	PER				—	—	AML-M1

Tablo 3.1. Hastaların klinik özellikleri: PER: Periferik kan, Kİ: Kemik iliği, —: Negatif, + : Pozitif, Boş: Çalışılmadı

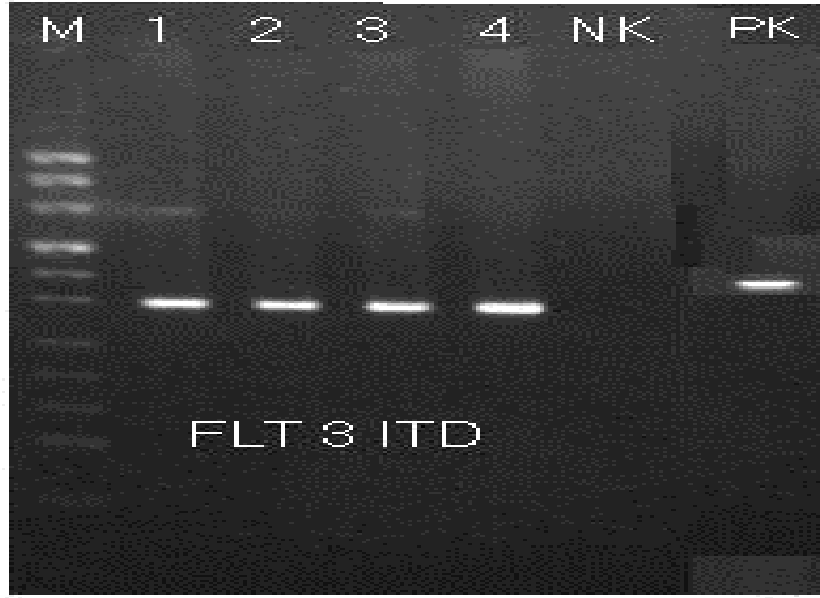
	FLT3-ITD Mutasyonu		p
	Var	Yok	
Cinsiyet (K/E)	4/1	5/14	0,047*
Ortanca Yaş, yıl (Dağılım)	26 (6-67)	38 (23-85)	0,208
Ortanca blast (%)	63 (25,0-97,0)	50 (1-97)	0,406
Ortanca lökosit sayısı (x10e9/L)	40,7 (10,9-113,0)	21,3 (0,7-306,1)	0,106

*p<0,05

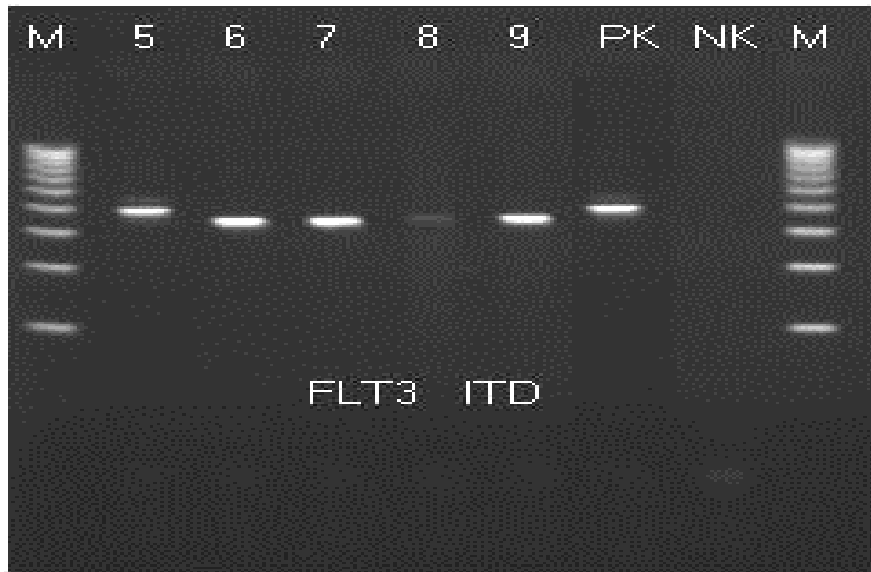
Tablo 3.2: FLT3-ITD mutasyon olan ve olmayanların tanıdaki özelliklerinin karşılaştırılması

Çalışmamızda FLT3-ITD mutasyonu saptanan hastalardan birinde “wild” tip allelin olmadığı saptanmıştır (5 nolu hasta) (Şekil 3.2). FLT3-ITD mutasyonu olan diğer hastalarda (hasta no 16, 17, 18 ve 21) “wild” tip allelin korunduğu gözlenmiştir. 17 no’lu hastada mutasyon “wild” tip allele göre dansitesi daha az iken, diğer hastaların mutasyon dansitesi “wild” tip allel ile aynı yoğunluktadır (Şekil 3.2 ve 3.4).

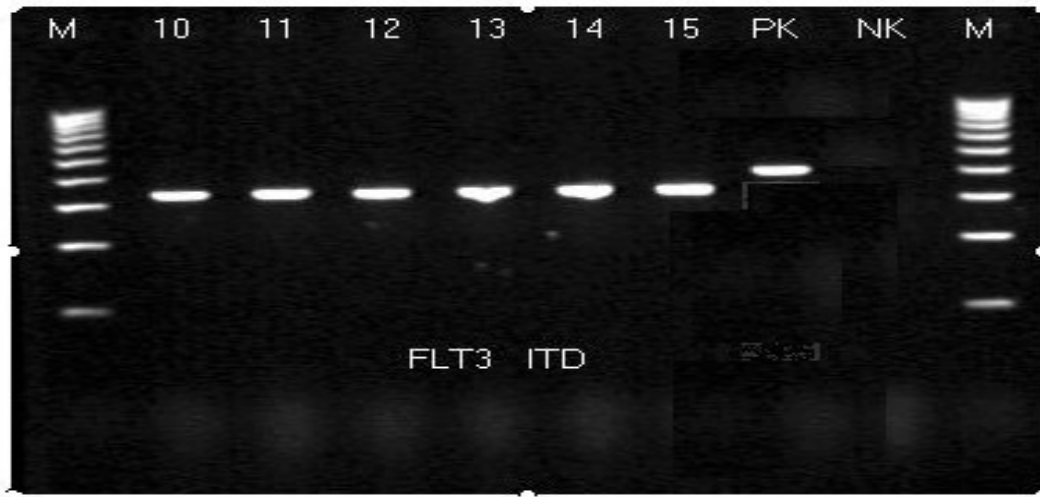
Çalışmamızdaki hiçbir hastada FLT3-TKD mutasyonu saptanmamıştır (Şekil 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8).



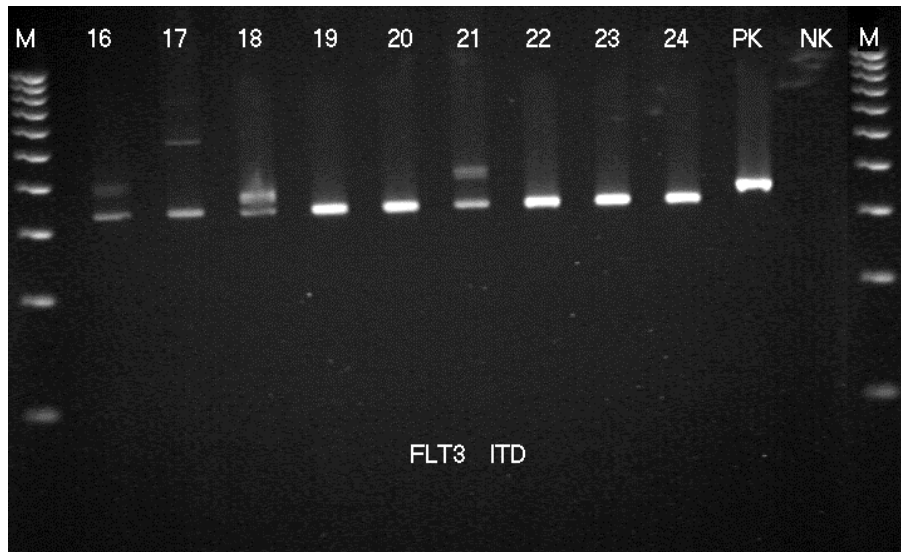
Şekil 3.1. 1,2,3 ve 4 nolu hastaların jel görüntüsü



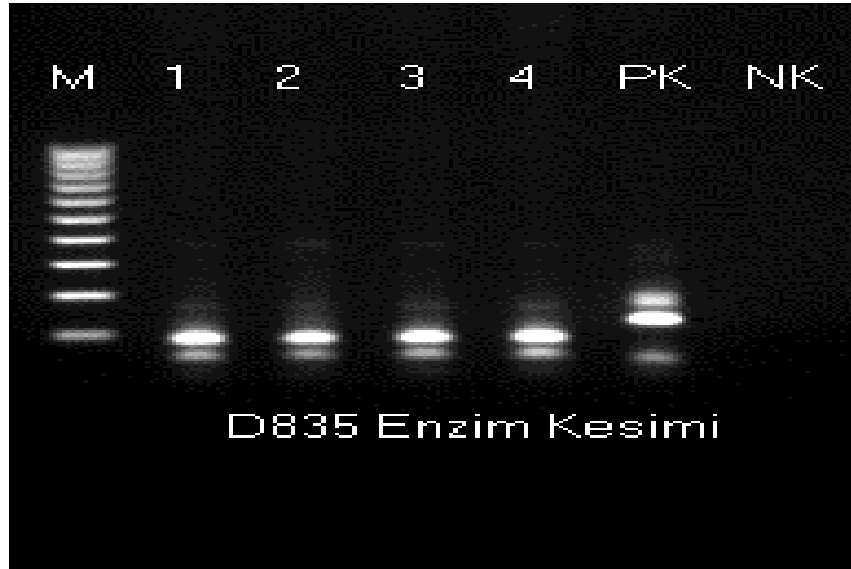
Şekil 3.2. 5,6,7,8,9 no'lu hastaların jel görüntüsü



Şekil 3.3. 10,11,12,13,14 ve 15 no'lu hastaların jel görüntüsü



Şekil 3.4. 16,17,18,19,20,21,22,23,24 no'lu hastaların jel görüntüsü



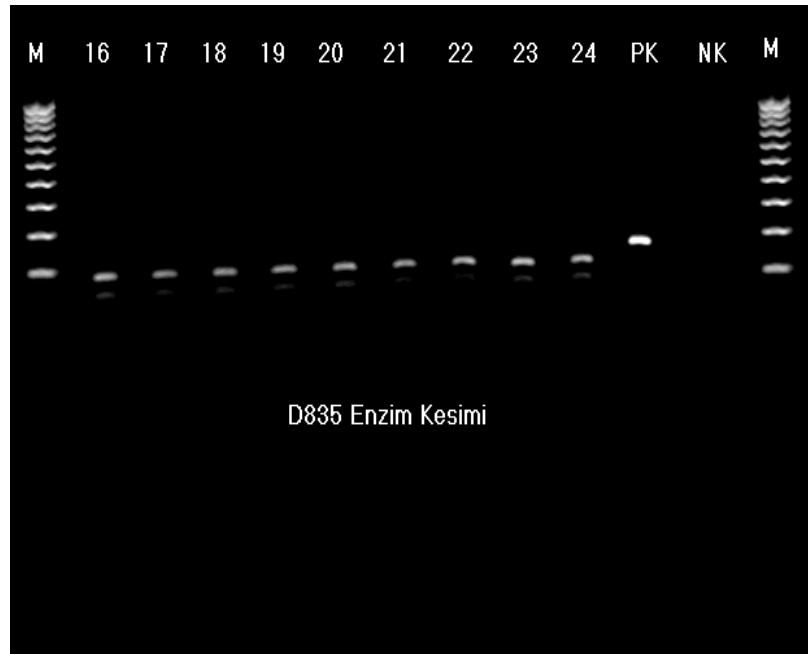
Şekil 3.5. 1,2,3 ve 4 no'lu hastaların jel görüntüsü



Şekil 3.6. 5,6,7,8,9,10 ve 11 no'lu hastaların jel görüntüsü



Şekil 3.7. 12,13,14 ve 15 no'lu hastaların jel görüntüsü



Şekil 3.8. 16,17,18,19,20,21,22,23 ve 24 no'lu hastaların jel görüntüsü

4. TARTIŞMA

AML hastalarının % 93'ünde, T-hücre ALL'de %87'inde, B-hücre ALL'de %100, pre-B hücre lösemilerinde %90, oranlarında FLT3 eksprese edildiği gözlenmiştir. Ayrıca miyeloid ve monositer lösemik hücre serilerinde % 40-80 oranlarında FLT-3 eksprese edildiği de bildirilmektedir (R.E.Gale, 2003). Sonuçta tüm çalışmalardan elde edilen verilere göre; AML hastalarının yaklaşık % 30'unda FLT3 mutasyonu mevcuttur. Bu mutasyonun ya FLT3-ITD mutasyonu (% 20-% 24) ya da FLT3 TKD mutasyonu (% 6-7) olduğu gözlenmiştir (R.E.Gale, 2003). Dolayısı ile AML hastalarında en sık rastlanan mutasyon FLT3-ITD mutasyonudur.

Thiede ve ark.ları 979 AML hastasında mutasyon sıklığını ve bu mutasyonların prognoz üzerindeki rolünü, yanısıra sitogenetik sonuçlar ile klinik cevaplar arasında ilişkiyi araştırmışlardır (C.Thiede, 2002). FLT3-ITD mutasyonlarına hastaların % 20,4'ünde, FLT3 TKD mutasyonlarına hastaların %7,7'sinde saptamışlardır. Her mutasyonun benzer klinik özellikler ve çoğunlukla da normal karyotipi olan hastalarda birlikteliğini gözlemişlerdir. FLT-3 mutasyonları, çoğunlukla normal karyotip ile birliktelik gösterirken, FLT3-ITD'ler t(15;17) taşıyan 42 hastanın 13'ünde gözlenirken, t(6;9) taşıyan 48 hastanın 9'unda FLT3-ITD varlığı gözlenmiştir. DNA düzeyinde ITD allel sıklığı heterojen olarak gözlenmiştir. Bazı hastalarda belirgin mutant bant gözlenemezken bazı hastalarda belirgin mutant bantlar gözlenmiştir. Tüm veriler bir araya getirildiğinde; FLT3 mutasyonlarının AML hastalarında çok sık rastlanan bir değişiklik olduğu desteklenmektedir. FLT3-ITD pozitif hastalarda yüksek mutant/wild tip oranının prognozu etkileyen önemli bir faktör olduğu da gözlenmiştir (C.Thiede, 2002).

TKD mutasyonuna daha çok M4 ve M5 AML subtiplerinde rastlanmaktadır. FLT3-ITD pozitif hastalarda yüksek mutant/wild tip allel oranının prognozu etkileyen önemli bir faktör olduğu gözlenmiştir Ancak bizim çalışmamızda, FAB sınıfına göre mutasyon sıklığı için anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

AML tedavisi başlangıcı ve devamında, her hasta için muhtemel prognostik kriterlerin değerlendirilmelerine dayandırılarak, her hastanın tedavi biçimi de çok çeşitlilik gösterebilir. Ancak bu amaçla halen geniş kabul görüp uygulanmakta olan ; karyotip analizlerine göre risk gruplarını ayırma ve bu temele göre tedavi planlama protokolleri yaygın şekilde tercih edilse de bu protokollerde AML prognozunun önceden kestirilmesinde yetersiz kaldığı belirtilmektedir. Ayrıca ilave prognostik belirleyicilere gerek duyulduğu, böylece daha iyi prognostik tahminler yapılabileceği ve tedavinin daha da çeşitlendirilebileceği düşünülmektedir.

FLT3 geni günümüzde potansiyel prognostik genetik belirleyici olarak bu beklentilere cevap verebilecek bir kriter gibi görülmekte ve yeni ümit kapıları açmaktadır.

Klas 3 tirozin kinaz reseptörü kodlayan bu genin hematopoezdeki önemli rolü, prognostik değerlendirmede ve tedavi çeşitlendirilmesinde de aynı önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bir çok çalışmada, AML vakalarının % 20- 30'unda FLT3-ITD varlığından ve bu hasta grubunda daha kötü prognozdan bahsedilmektedir. Çalışmamızda amaç FLT3 mutasyonlarının tanı anındaki sıklığını belirlemek olduğu için, hasta grubumuzda hastalık prognozu ile ilgili bir yorum yapamamaktayız.

2005 yılında yayınlanmış bir metaanalizde (Yanada ve ark., 2005) 2004 Kasım ayına kadar yayınlanmış orijinal yayınlardan yararlanılmış, karşılaştırmalar ve ortak sonuçlar çıkarılmıştır. Metaanalizde yer alan çalışmaların tümünde, sadece hiç tedavi almamış *de novo* AML hastaları FLT3 durumu açısından araştırılmış, FLT3 durumuna göre (ITD mutasyonu, TKD mutasyonu ve Wild tip allel), klinik seyir, hastalısız ve toplam sağ kalım prognostik bilgisi sağlanmıştır. Burada toplam sağ kalım ve/veya hastalısız sağ kalıma bakılarak prognostik veri değerlendirmesi yapılmıştır. Bu metaanalizde toplam 1160 *de novo* AML hastasının 833'ünde FLT3 wild tip, 243'ünde ITD, 84'ünde TKD mutasyonu saptanmıştır. Sonuçta, bu çalışmada ITD görülme sıklığı % 20-30, TKD %5-10 dur. FLT3 mutant vakalarda lökosit sayısının, wild tip vakalara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Hastaliksız sağ kalım veya toplam sağ kalım için istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Toplam sağ kalım ve hastaliksız sağ kalıma bakıldığında; FLT3-ITD varlığı kötü prognoz olarak görölmektedir. Bu metaanalizi yapan araştırmacıların ortak kanısı; şimdiye dek yapılmış çalışmaların prospektif kontrollü çalışmalar değil, tümünün gözlemsel çalışmalar olduğu yönündedir. Çalışmalarda uygulanan tedavilerin tek tip olmadığı ve dolayısı ile sonuçları etkileyebildiği görölmektedir. Bu durum daha standart duruma getirilmiş prospektif çalışmaların gerekliliğini gözler önüne sermiştir.

FLT3 mutasyonunun varlığı veya yokluğunun yanında, FLT3 ile ilgili prognostik değeri olabilecek çok çeşitli faktörlerin de bulunabileceğini düşünürsek bunların da beraber değerlendirilmeleri gereklidir. Örneğin FLT3 transkriptlerinin ekspresyon düzeyi, ITD mutantlarının mutant/ wild tip allel oranları, ITD-TKD birlikte mutantlar , TKD mutasyon tipleri vb. bir çok faktör göz önüne alınarak yeni prospektif çalışmalara gereklilik vardır.

FLT3-ITD mutasyonunun, çalışma kesitimizde, çoğunlukla kadın hastalarda sık olduğunu saptadık. Bu bulgu, Schnittger ve ark.larının (2002) alışması ile uyumluydu (Kadın/Erkek oranı 1,36/1, p=0,023). Ancak, bu çalışmadan farklı olarak biz mutasyon sıklığı ile hasta yaşı, lökosit sayısı ve blast oranı ile bir ilişki olduğunu gösteremedik.

Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu Avrupa ve Japonya'dandır. Türkiye'den ise İstanbul Üniversitesi yalnızca 29 AML-M3 hastasında FLT3 mutasyonlarını çalıştıklarında, FLT-3 ITD mutasyonunu % 56 gibi yüksek bir oranda olduğunu gözlemişler ve FLT3-TKD mutasyonunu ise saptamamışlardır (Atalar F. ve ark, 2005). Ancak tek bir FAB sınıfında mutasyon çalıştıkları için oranı yüksek bulmalarının, toplumumuzda görölme sıklığının yüksek olduğu yorumunu getirmediği kansındayız. Bizim ölkemize özđu genetik farklılıkların bu sonuçları nasıl etkileyeceğini görmek amacıyla başlattığımız bu prospektif çalışmamızda, mevcut sınırlı sayıdaki hasta ile yapabildiğimiz ön değerlendirmede ve tüm *de novo* AML olguları alınarak, ITD pozitifliği 20,8 % (5/24) bulunmuştur. Yaptığımız alışmada TKD mutasyonuna ise rastlanmamıştır (0%). Çalışmada olgu sayısının az

olması nedeniyle, mutasyon sıklığının şu anda ITD için yurt dışı ile uyumlular dışında ek bir çıkarım yapmak olanaklı değildir.

Schnitger ve arkadaşları (2002 ve 2004) AML’li hastalarda tedavi ve relapsta FLT3-ITD sıklığının yanı sıra wild tip FLT3 de değerlendirmişler. Bu çalışmada mutasyonların amplifikasyon fragmanlarını agaroz jelde semikantitatif analiz ettiklerinde mutasyon bantlarının her zaman “wild” tip allel gibi aynı dansitede olmadığını görmüşlerdir. Böylece FLT3-ITD mutasyonlarını 5 kategoride değerlendirmişlerdir: 1) mutant fragman “wild” tip banttandan daha az yoğun (düzey 1), 2) mutant fragman “wild” tip band ile aynı yoğunlukta (düzey 2), 3) mutant fragman “wild” tip banttandan daha yoğun (düzey 3), 4) “wild” tip bandın kaybı ve yalnızca mutant fragmanın olması (düzey 4) ve 5) birden fazla mutasyonun olması (düzey 5). Bu çalışmada tanıda veya relapsta “wild” tip mutasyonun kaybedilmesinin kötü prognoza eşlik ettiğini saptamışlar. Bizim çalışmamızda FLT3-ITD saptanan beş olgunun bir tanesinde “wild” tip FLT3 olmadığı gözlemlenmiştir (5 nolu hasta). Ancak çalışmalarımız ve uzun dönem takipler devam ettiği için “wild” tip FLT3 kaybının prognoz üzerine etkileri henüz değerlendirilememiştir. Ayrıca çalışmamızda bir hastadada mutant tipin “wild” tip allele göre zayıf bir fragman göstermektedir, bu da Schnitger ve arkadaşlarında (2002) bildirildiği gibi mutasyonun lösemik hücrelerin bir bölümünde olduğu şeklinde yorumlanabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

AML tanısı konmuş ve rasgele seçilmiş 24 hasta üzerinde yapılan prospektif çalışmalarımız sonucunda, beş hastada ITD mutasyonu bulgusu tespit edilmiştir (%20,8). TKD mutasyonuna ise rastlanmamıştır. FLT3-ITD mutasyonu saptanan bir hastada “wild” tip allelin kaybı gözlenmiştir (Düzev 4). Ayrıca bir hastada da FLT3-ITD fragmanının “wild” tip banda göre yoğunluğunun az olduğu görülmüştür (Düzev 1).

Mevcut çalışma sürecinde ulaşılabilen yeni AML tanısı konmuş hasta sayısında amaçlanan sayılara ulaşılabilmesi nedeniyle, mevcut durum itibariyle elde edilen sonucun sağlıklı bir değerlendirme yapmak için yeterli olmadığını düşünmekteyiz. Dolayısı ile hasta sayısının artırılarak çalışmanın kapsamının genişletilmesi gerekmektedir.

Mevcut hasta sayısı ile yapılan çalışmada ulaşılan FLT3-ITD mutasyonu ile ilgili oransal değer, benzer çalışmalar yapmış ülkeler ile aynı olarak gözlenmiştir. Fakat henüz TKD mutasyonu saptanmamıştır. Bu konuda kesin yargıya varabilmek ancak çalışmanın hasta sayısının ve kapsamının diğer ülkelerde yapılan çalışma sayılarına çıkarılması ile mümkün olabilecektir. Bu çalışma ile laboratuvarımız, sık görülen ve prognostik önemi yüksek olan, FLT3-ITD ve TKD mutasyonlarının PCR yöntemi ile de tanımlanmasını kazandırmış olduk.

Başlattığımız , *de novo* AML hastalarındaki FLT3 durumu ile prognoz , prognoz ve tedavi arasındaki ilişkileri değerlendirmelere katkıda bulunmayı ve kendi toplumumuzdaki muhtemel farklılıkları da belirlemeyi planladığımız bu prospektif çalışma, laboratuvarımızda uygulamaya geçmiştir. Bunun çok merkezli çalışmalarla birlikte yürütülmesi de dileğimiz ve hedefimizdir.

ÖZET

AML’li hastalarda FLT3 duplikasyon ve mutasyonlarının saptanması.

Yeni tanı *de novo* AML hastalarında FLT3 tirozin kinaz reseptörlerinin yapısal aktivasyonuna neden olan iki tip mutasyonun taraması yapıldı. Birincisi ; FLT3 geninin juksta membran bölgesini kodlayan ITD mutasyonudur. FLT3-ITD mutasyonu; FLT3 geninin juksta membran bölgesini kodlayan bölümünde bazı fragmanların çeşitli uzunluk ve sayıda duplikasyonları şeklinde oluşmuş mutasyondur. İkincisi mutasyon ise; FLT3 geninin aktivasyon loop bölgesinde, TKD (nokta mutasyonu) mutasyonudur.

24 AML hastasında bu mutasyon tiplerinin sıklığı analiz edildi. FLT3-ITD mutasyonu 24 hastanın 5’inde bulundu (% 20,8). FLT3-TKD mutasyonu söz konusu hasta grubunda bulunamadı.

FLT3-ITD mutasyon sıklığı diğer yurt dışı çalışmalar ile uyumludur. Hasta sayısının artırılmasına devam edilmektedir.

Anahtar Kelimeler : AML, FLT3, FLT3- ITD, FLT3-TKD

SUMMARY

Detection of FLT3 Tandem Duplications and Mutations in *de novo* AML patients .

The detection of two types of mutations causing structural activation of FLT3 tyrosine kinase receptors was studied . The first one of them is ITD mutation , which is some duplication fragments with various length and number coding of the FLT3 juxtamembrane region. The other one is a TKD (point mutation) mutation in the FLT3 gene activation loop region .

The prevalence of these mutations has been analysed in 24 AML patients. The FLT3-ITD mutation was found in 5 out of these 24 patients (20.8 %). FLT3-TKD mutation was not detected in any patient yet.

The incidence of FLT3-ITD mutations in our patient cohort is concordant with published international series. The number of patients should be increased for further analysis.

Key words : AML, FLT3, FLT3-ITD, FLT3-TKD

KAYNAKLAR

- THIEDE C, STEUDEL C, MOHR B, SCHAICH M, SCHAKEL U, PLATZBECKER U et al. (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*; 99; 4326- 4335.
- GALE R. E.(2003) ; Review –FLT 3 mutations and Leukemia British Journal of Haematology , 122, 523-538.
- LEVIS M, SMALL D. FLT3 (2003): It Does Matter In Leukemia. *Leukemia*; 17;1738-1752.
- R.M STONE, M.R. O'DONNELL, M.A SEKKERES, American Society of Haematology (2004); Acute myeloid leukemia ; 98-117.
- D.G GILLILAND, C.T JORDAN, A. FELIX (2004), American Society of Haematology; The molecular basis of Leukemia; 70-90.
- FROHLING, SCHLENK BREITRUCK (2002), Prognostic significance of activating FLT3 mutation in younger adults with AML and normal cytogenetics *Blood*,100 , 4372-4380.
- YAMAMOTO Y, KIYOI H, NAKANO Y, (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97; 2434-9.
- KOTTARIDIS, P.D., GALE,R.E., FREW, M.E., HARRISON, G., LAMGABEER, S.E., BELTON, A.A., WALKER, H., WHEATLEY,K., BOWEN, D.T., BURNETT , A.K., GOLDSTONE,A.H.& LINCH, D.C. (2001) The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854

patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 98, 1752-1759.

WHITMANN et al (2001), Absence of wild allele predicts poor prognosis in adult *de novo* AML with normal cytogenetics and ITD of FLT3. *Cancer Research* - 61, 7233-7239.

M.YANADA , K. MATSUO, T. SUZUKI ,H KYOI, T. NAOE (2005), Prognostic significance of FLT3 ITD and TKD mutations for AML – Meta analysis; *Leukemia*, 19, 1345-49.

ZWAAN CM, MESHINCHI S, RADICH JP, VEERMAN AJ, HUISMANS DR, MUNSKE L, (2003). FLT3 Internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia : prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood*; 102, 2387-94.

MESHINCHI, S., WOODS, W.G., STIREWALT, D.L., SWEETSER, D.A., BUCKLEY, J.D., TJOA, T.K., BERNSTEIN,L.L., & RADICH,J.P.(2001) Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*, 97, 89-94.

MORENO, I., MARTIN , G., BOLUFER, P., BARRAGAN, E., RUEDA, E., ROMAN, J., FERNANDER, P., LEON, P., MENA, A., CERVERA, J., TORRES, A., & SANZ,M.A. (2003) Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 88, 19-24.

PICCALUGA, P.P., BIANCHINI, M.& MARTINELLI, G. (2003). Novel FLT3 point mutation in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncology*, 4, 604.

SCHNITTGER,S., SCHOCH, C., DUGAS, M., KERN, W., STAIB, P., WUCHTER, C., LOFFLER, H., SAUERLAND, C.M., SERVE, H., BUCHNER, T., HAFERLACH, T., & HÏDDEMANN, W., (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 2003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG

study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 100, 59-66 .

KIYOI, H., OHNO, R., UEDA, R., SAITO, H., & NAOE, T., (2002) Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*, 21, 2555-2563.

MESHINCHI, S., WOODS, W.G., STIREWALT, D.L., SWEETSER, D.A., BUCKLEY, J.D., TJOA, T.K., BERNSTEIN, I.D., & RADICH, J.P., (2001) Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*, 97, 89-94.

NAKAO, M., YOKOTA, S., IWAI, T., KANEKO, H., HORIIKE, S., KASHIMA, K., SONODA, Y., FUJIMOTO, T., & MISAWA, S. (1996) Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 10, 1911-1918.

ROMBOUTS, W.J., BLOKLAND, I., LOWENBERG, B. & PLOEMACHER, R.E., (2000) Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the FLT3 gene, *Leukemia*, 14, 675-683.

PALLIS, M., SEEDHOUSE, C., GRUNDY, M., RUSSELL, N., (2003). Flow cytometric measurement of phosphorylated STAT5 in AML: lack of specific association with FLT3 internal tandem duplications *Leukemia*, 27, 803-805

JILANI, I., ESTEY, E., MANSHURI, T., CALIGUIRI, M., KEATING, M., GILES, F., THOMAS, D., KANTARJIAN, H., ALBITAR, M., (2003) Better detection of FLT3 internal tandem duplication using peripheral blood plasma DNA. *Leukemia*, 17, 114-119.

STONE, R.M., DEANGELO, D.J., KLIMEK, V., GALINSKY, I., ESTEY, E., NIMER, S.D., GRANDIN, WILSON., LEBWOHL, D., WANG, Y., COHEN, PAMELA., FOX, E.A., NEUBERG, D., CLARK, J., GILLILAND, D.G., GRIFFIN, J.D. (2005) Patients with acute myeloid leukemia and an

activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*; 105, 54-60 .

ILLMER T, THIEDE C, (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroup with poor prognosis *Blood*; V99, N12, 4326-35.

KAINZ B, HEINTEL D, MARCULESCU R, SCWARZINGER I, SPERR W, LE T et al. (2002). Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv 16. *Haematol J*; 3; 283-289.

MORENO I, MARTIN G, BOLUFER P, BARRAGAN E, RUEDA E, ROMAN J et al. (2003). Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*; 88; 19-24.

TSE K-F, ALLEBACH J, LEVIS M, SMITH BD, BOHMER FD, SMALL D. (2002) Inhibition of the transforming activity of FLT3 internal tandem duplication mutants from AML patients by a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia*; 16;2027-2036.

SUSANNE SCHNITTGER S, SCHOCH C, KERN W, HIDDEMANN W, HAFERLACH T. (2004). FLT3 Length Mutations as Marker for Follow-Up Studies in Acute Myeloid Leukaemia. *Acta Haematol*; 112; 68-78.

ATALAR F, AYDIN-SAYITOĞLU M, HATIRNAZ O, OZBEK UĞUR. (2005). FLT3-Receptor tyrosine kinase activation mediates its leukemogenic effect though WNT signalling pathway in AML patients. *Turk J Haematol.*; 22; 195 (abstract:451).

HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., DIEBOLD, J., FILANDRIN,G., MULLER-HERMENLINK, H.K., VARDIMAN, J., LISTER, T.A and BLOOMFIELD,

C.D. (1999) .World Health Organisation clasification of neoplastic diseases of the hematopoietik and limphoide tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. Journal of Clinical Oncology, 17, 3835-3849.

WHEATLY,K., BURNETT, A.K., GOLDSTONE, A.H., GRAY, R.G., HANN, I.M., HARRISON, C.J., REES, J.K., STEVENS, R.F. and WALKER, H. (1999) A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk- directed therapy in acut myeloid leukaemia derivate from the MRC AML 10 trio. British Journal of Haematology, 107, 69-79 .

ABU-DUHIER, F.M., GOODEVE, A.C., WILSON, G.A., CARE, R.S., PEAKE, I. R. and REILLY, J.T. (2001) Genomic structure of human FLT3:Implications for mutational analysis. British Journal of Haematology,113, 1076-1077.

HOVLAND, R., GJERTSEN, B.T. and BRUSERUD, O.(2002) Acut myelogenous leukemia with internal tandem duplication of the FLT3 gene appearing or altering at the time of relapse: A report of two cases. Leukemia and Lymphoma, 43, 2027-2029.

LYMAN, S.D., (1995) Biology of flt 3 ligand and receptor. International Journal of Hematology, 62, 530a.

ARRIGONI, P., BERETTA, C., SILVESTRI, D., ROSSI, V., RIZZARI, C., VALSECCHI, M.G., CAZZANIGA, G. and BIONDI, A. (2003) FLT3 internal tandem duplication in childhood acute leukaemia: association with hyperleucocytosis in acute promyelocytic leukaemia. British Journal of Haematology, 120, 89-92.