

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKUT MİYELOİD LÖSEMİ (AML) HASTALARINDA GÖRÜLEN *NPM1* GEN
MUTASYONUNUN TÜRK POPULASYONUNDA TARANMASI**

Gülşah ÖZTÜRK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Gülşah ÖZTÜRK tarafından hazırlanan “**Akut Miyeloid Lösemi (AML) Hastalarında Görülen *NPM1* Gen Mutasyonunun Türk Populasyonunda Taranması**” adlı tez çalışması 28.02.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY

Eş Danışman: Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Nesrin Özsoy
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: A. Münici Yağcı
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Reyhan Çolak
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Yrd. Doç. Dr. Suna Cebesoy
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Orhan ATAOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AKUT MİYELOİD LÖSEMİ (AML) HASTALARINDA GÖRÜLEN *NPM1* GEN MUTASYONUNUN TÜRK POPULASYONUNDA TARANMASI

Gülşah ÖZTÜRK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY
Eş Danışman: Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Akut miyeloid lösemi (AML), hematopoetik progenitor hücrelerin malign karakter kazanması sonucu gelişen klonal bir hastalıktır. Nükleofosmin (NPM), ribozom biyogenezi, sentrozom duplikasyonu, genomik kararlılık, hücre döngüsünün progresyonu ve apoptozisin de dahil olduğu birçok hücresel süreçte önemli roller üstlenen nükleolar bir fosfoproteindir. NPM geninin (*NPM1*) 12. ekzonunda meydana gelen somatik mutasyonlar, AML vakalarında en sık görülen genetik anomalilerdir. Tüm AML vakalarının yaklaşık %35'inde *NPM1* gen mutasyonlarına rastlanırken, söz konusu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %60'ından fazlası normal karyotipe sahiptir. *NPM1* mutasyonlarını taşıyan AML vakaları, karakteristik klinik ve prognostik özelliklere sahiptirler. Bu çalışmada, *NPM1* gen mutasyon sıklıkları Türk AML hastalarında araştırılmıştır. AML tanısı almış 44 hasta ve 12 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. *NPM1* mutasyonları nested PCR yöntemiyle, genotipler ise poliakrilamid jel elektroforezi ve jel görüntüleme sistemi kullanılarak belirlenmiştir. *NPM1* gen mutasyonları 44 hastanın 8'inde (%18,18) saptanırken, sağlıklı kontrollerde mutasyon saptanmamıştır. *NPM1* gen mutasyonları, önemli ölçüde normal karyotipli AML hastaları ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca söz konusu mutasyonlar ileri yaş, yüksek beyaz küre sayısı, primer AML, yüksek kemik iliği blast yüzdesi, FAB alttipleri M1/M5 ve CD34'ün negatif ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Fakat bu sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, AML'li hastaların tedavilerinin yönlendirilmesine ve hastalığın sınıflandırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Şubat 2011, 77 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nükleofosmin, akut miyeloid lösemi, normal karyotip

ABSTRACT

Master Thesis

DETECTION OF *NPM1* GENE MUTATION SEEN IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML) PATIENTS IN TURKISH POPULATION

Gülşah ÖZTÜRK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied of Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY
Co-Supervisor: Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Acute myeloid leukemia (AML) is a clonal disorder that results from gain of malignant characteristics of hematopoietic progenitor cells. Nucleophosmin is a nucleolar phosphoprotein that plays key roles in several cellular processes including ribosome biogenesis, centrosome duplication, genomic stability, cell cycle progression and apoptosis. Somatic mutations occurring in exon 12 of the NPM gene (*NPM1*) are the most common genetic abnormalities seen in AML cases. *NPM1* gene mutations are found in approximately 35% of all AML cases and up to 60% of AML cases carrying these mutations have normal karyotype. AML cases carrying *NPM1* mutations have characteristic clinical and prognostic features. In this study, *NPM1* gene mutation frequencies are assessed in Turkish AML patients. 44 AML diagnosed patients and 12 healthy controls were admitted to the study. *NPM1* mutations were determined by nested PCR assay, genotypes were determined by using polyacrylamide gel electrophoresis and image analyzer system. *NPM1* gene mutations were detected in 8 of the 44 (%18,18) patients but not in healthy controls. *NPM1* gene mutations were significantly associated with AML patients with normal karyotype. Additionally these mutations were associated with old age, high white blood cell count, primer AML, high bone marrow blast percentage, FAB subtypes M1/M5 and negative expression of CD34. But these results were not found statistically significant. It is thought that the results obtained from this study contribute to routing of the treatment of patients with AML and classification of the disesia.

February 2011, 77 pages

Key Words: Nucleophosmin, acute myeloid leukemia, normal karyotype

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımı yönlendiren ve çalışma sürecinde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), tez konumun seçiminde ve tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi, öneri, destek ve yardımlarıyla beni yönlendiren eş danışmanım Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı), çalışma sırasında kullanılan örneklerin temininde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. A. Münici YAĞCI'ya (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı), çalışmada kullanılan hastalara ait klinik bilgilerin düzenlenmesinde yardımcı olan Uzm. Bio. Buket ALTINOK'a, hastalara ait örneklerin ve klinik bilgilerin toplanmasında ve laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan Uzm. Bio. N. Seda ILGAZ'a, çalışmalarım sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji asistanları, çalışanları ve öğrencilerine teşekkür ederim.

Hep yanımda olduklarını bildiğim annem Neslihan ÖZTÜRK ve babam Fahri ÖZTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Gülşah ÖZTÜRK

Ankara, Şubat 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Lösemi.....	3
2.1.1 Risk faktörleri.....	4
2.1.2 İnsidans.....	4
2.1.3 Patogenez.....	5
2.1.4 Klinik belirti ve bulgular.....	6
2.2 Akut Lösemiler.....	6
2.3 Akut Miyeloid Lösemi.....	7
2.3.1 İnsidans.....	7
2.3.2 AML'nin sınıflandırılması.....	8
2.3.3 AML'de moleküler genetik ve prognoz.....	11
2.4 Nükleofosmin ve Kanser.....	13
2.5 <i>NPM1</i> Geni ve Nükleofosmin Proteininin Yapısı.....	15
2.6 Nükleofosmin Proteininin Fonksiyonları.....	17
2.6.1 Ribozom biyogenezi.....	17
2.6.2 Sentrozom duplikasyonu.....	20
2.6.3 NPM ve tümör baskılayıcı proteinler.....	23
2.7 NPM Ekspresyonu.....	25
2.8 Yaban Tip NPM'nin Nükleositoplazmik Trafığı.....	25
2.9 <i>NPM1</i> Gen Mutasyonları.....	27
2.10 Mutant Nükleofosminin Nükleositoplazmik Trafığı.....	29
2.11 <i>NPM1</i> Gen Mutasyonlarının Prognostik Önemi.....	31
2.12 <i>NPM1</i> Mutasyonlarının Klinik Önemi.....	33

3. MATERİYAL YÖNTEM.....	34
3.1 Çalışma Grubu.....	34
3.2 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler.....	34
3.2.1 RNA izolasyonu için kullanılan sarf malzemeler.....	34
3.2.2 cDNA sentezi için kullanılan sarf malzemeler.....	35
3.2.3 Nested PCR için kullanılan sarf malzemeler.....	37
3.2.4 Agaroz jel elektroforezi için kullanılan sarf malzemeler.....	38
3.2.5 Poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan sarf malzemeler.....	38
3.2.6 Jel yükleme tamponu için kullanılan sarf malzemeler.....	39
3.2.7 Yürütme tamponu için kullanılan sarf malzemeler.....	40
3.2.8 EDTA solüsyonu için kullanılan sarf malzemeler.....	40
3.2.9 Etidyum bromür solüsyonu için kullanılan sarf malzemeler.....	41
3.3 Çalışmada Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar.....	41
3.3.1 10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu (pH 8).....	41
3.3.2 0.5M EDTA.....	42
3.3.3 %30'luk akrilamid stoğu (29:1).....	42
3.3.4 %10 APS.....	42
3.3.5 Yükleme tampon.....	42
3.3.6 Yürütme tamponu.....	43
3.3.7 Etidyum bromür (10 mg/ml stok).....	43
3.4 Agaroz ve Poliakrilamid Jelin Hazırlanması.....	43
3.4.1 Agaroz jelin hazırlanması (100 ml).....	44
3.4.2 %12'lik poliakrilamid jelin hazırlanması (60 ml).....	44
3.5 RNA İzolasyonu.....	44
3.6 cDNA Sentezi.....	46
3.6.1 cDNA kontrol PCR.....	47
3.7 Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	49
3.8 Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	50
3.9 İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR.....	64

EKLER.....	70
EK 1 Etik Kurul Onayı.....	71
EK 2 Sağlıklı Birey Bilgilendirme ve Onam Formu.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER DİZİNİ

ALL	Akut lenfoid lösemi
AML	Akut miyeloid lösemi
APL	Akut promiyelositik lösemi
APS	Amonyum per sülfat
BKH	Beyaz kan hücresi (White blood cell [WBC])
CEBPA	CCAAT/enhansır bağlanma proteini, alfa
CFU	Koloni oluşturan unite (colony forming unit)
cDNA	Komplementer DNA (complementary DNA)
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DTT	Ditiyotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EtBr	Etidyum bromür
FAB	Fransız Amerikan İngiliz (French-American-British)
FLT3	FMS benzeri tirozin kinaz 3
FLT3 ITD	FLT3 internal tandem duplikasyonu
HCl	Hidroklorikasit
HKH	Hematopoetik kök hücre
KCl	Potasyum klorür
KHT	Kök hücre transplantasyonu
KLL	Kronik lenfoid lösemi
KML	Kronik myeloid lösemi
KOH	Potasyum hidroksit
LDH	Laktat dehidrojenaz
MgCl ₂	Magnezyum klorür

MLL	Miyeloid lenfoid lösemi geni
MRH	Minimal rezidüel hastalık
NaOH	Sodyum hidroksit
NPM	Nükleofosmin
NPM1	Nükleofosmin geni
N-RAS	Nöroblastoma RAS viral onkogen homologu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
TEMED	Tetrametil-Etilendiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>NPM1</i> 'in yapısal ve fonksiyonel domainleri.....	17
Şekil 2.2 Sentrozom yapısı.....	21
Şekil 2.3 Sentrozom duplikasyonu.....	22
Şekil 2.4 NPM ve sentrozom duplikasyonu.....	23
Şekil 2.5 ARF-NPM aracılı p53 aktivasyonu.....	25
Şekil 2.6 Yaban tip NPM'nin nükleositol plazmik trafiği.....	26
Şekil 2.7 Mutant NPM'nin nükleositol plazmik trafiği.....	30
Şekil 4.1 Sağlıklı kontrollerden sağlanan kan veya kemik iliği örneklerinden izole edilen RNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüsü.....	55
Şekil 4.2 cDNA kontrol PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jel görüntüsü.....	55
Şekil 4.3 Hastalara ait olan cDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı I. aşama nested PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.4 Hastalara ait olan cDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı II. aşama PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin % 2'lik agaroz jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.5 Hastalara ait olan cDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı II. Aşama PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin % 12'lik poliakrilamid jel görüntüsü.....	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Akut miyeloid lösemide FAB sınıflaması.....	9
Çizelge 2.2 Akut miyeloid lösemide WHO sınıflaması.....	10
Çizelge 2.3 Nükleofosmin ve kanser patogenezi.....	15
Çizelge 3.1 RNA izolasyonu için kullanılan reaktif maddeler.....	35
Çizelge 3.2 Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti'nin içeriği.....	36
Çizelge 3.3 PCR için kullanılan reaktifler.....	37
Çizelge 3.4 Agaroz jel elektroforezi için kullanılan kimyasal malzemeler.....	38
Çizelge 3.5 Poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan kimyasal malzemeler.....	39
Çizelge 3.6 Jel yükleme tamponu için kullanılan kimyasal malzemeler.....	39
Çizelge 3.7 Yürütme tamponunun hazırlanması için kullanılan kimyasal malzemeler.....	40
Çizelge 3.8 EDTA solüsyonu için gerekli olan kimyasal malzemeler.....	40
Çizelge 3.9 Etidyum bromür solüsyonu için gerekli olan kimyasal malzemeler.....	41
Çizelge 3.10 Agaroz ve poliakrilamid jel hazırlanması için gerekli olan kimyasalların kullanım miktarları.....	43
Çizelge 3.11 cDNA sentezi.....	47
Çizelge 3.12 cDNA kontrol PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve PCR koşulları.....	48
Çizelge 3.13 <i>NPM1</i> geni 12. ekzon mutasyonlarının gerçekleştiği gen bölgesinin amplifikasyonu için gerekli olan primer dizileri, reaksiyon koşulları ve reaksiyon karışımları.....	49
Çizelge 4.1 Çalışmaya katılan hastalara ait klinik özellikler.....	54
Çizelge 5.1 Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilen <i>NPM1</i> mutasyon sıklıkları.....	59

1. GİRİŞ

Akut miyeloid lösemi (AML) fenotipik olduğu kadar, genotipik olarak da heterojenite gösteren kompleks bir hastalıktır (Ferrara vd. 2008). Heterojen bir hastalık grubu olan AML’de görülen genetik değişiklikler, hastalığın karakterini yansıtır. Tekrarlayan kromozomal anomalilerin AML’de tanımlanması ve bu değişimlerin prognoz üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ile hastalığın moleküler genetiği önem kazanmıştır. Örneğin, AML’de t(8;21) translokasyonu ya da inv(16) varlığı iyi prognozlu hastaları tanımlarken, t(9;22) translokasyonu varlığı kötü gidişli hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Özbek 2009). Ancak AML hastalarının yaklaşık % 45’i en önemli prognostik faktörlerden biri olan klonal kromozomal anomalilerden yoksundur ve normal bir karyotipe sahiptir. Sözü edildiği gibi, bariz sitogenetik anomali göstermeyen AML’ler “intermediate” prognoza sahip hastalıklar olarak ele alınırlar (Fröhling vd. 2005). Fakat yapılan çalışmalar sonucunda, normal karyotipli AML vakalarının aynı risk grubuna dahil edilmelerine karşın moleküler seviyede heterojenite gösterdiği ve bu hastaların yalnızca %40’ının uzun dönem sağ kalımının mümkün olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle klonal kromozomal anomalilerden yoksun olan hastaların prognozlarının takibi, nüks öngörüsü ve uzun süreli takipleri için moleküler belirteçlere ihtiyaç vardır. (Özbek 2009).

Nükleofosmin (NPM), ribozom biyogenezi, sentrozom duplikasyonu, genomik kararlılık, apoptozis ve hücre döngüsünün ilerleyişinde görev alan nükleolar bir fosfoproteindir. Temel anlamda nükleolusda yerleşik olmasına karşın, hücrede nükleus ve sitoplazma arasında sürekli olarak taşınır. Nükleofosmini kodlayan *NPM1* geninde meydana gelen mutasyonlar AML hastalarında en sık rastlanan genetik anomalilerdir. Tüm AML vakalarının yaklaşık %35’inde *NPM1* gen mutasyonlarına rastlanırken, söz konusu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %60’ından fazlası normal karyotipe sahiptir. Ayrıca insidansının etnik köken ve coğrafik dağılıma bağlı olarak değişim gösterdiği düşünülen *NPM1* mutasyonlarına batı ülkelerinde daha sık rastlandığı yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (Falini vd. 2007a, b, Rau ve Brown 2009).

NPM1 mutasyonlarını taşıyan AML vakaları ayırıcı klinik ve prognostik özelliklere sahiptirler. Yüksek remisyon indüksiyon oranı ve artmış sağkalım ile ilişkilendirilen *NPM1* mutasyonlarını taşıyan AML vakalarında *FLT3/ITD* mutasyonunun görülme sıklığı oldukça yüksektir. Ancak *NPM1* mutasyonunu taşıyan AML vakalarının, *FLT3/ITD* mutasyonunun yokluğunda, tedaviye daha iyi yanıt verdikleri belirlenmiştir. Ayrıca, *NPM1* mutasyonları AML gelişimi sırasında kararlılık gösteren değişimlerdir ve nüks durumunda bu mutasyonların kaybına çok nadir rastlanır. Sonuç olarak, söz konusu mutasyonların minimal rezidüel hastalıkların (MRH) tespitinde ve nüks riskinin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Yüksek görülme sıklıkları, MRH takibi ve tedavinin optimizasyonu açısından *NPM1* mutasyonlarının AML vakalarında rutin genetik takibi önerilmektedir (Falini vd. 2007a, Rau ve Brown 2009).

Bu çalışmada, ayırıcı klinik ve biyolojik özelliklerle ilişkilenen, etnik köken ve coğrafik dağılıma bağlı olarak insidansının değişim gösterdiği düşünülen ve yapılan çalışmalar sonucunda batı ülkelerinde daha sık görüldüğü rapor edilen (Rau ve Brown 2009) *NPM1* gen mutasyon sıklıklarının Türkiye’de tespiti amaçlanmıştır. Bu çalışmanın, batı ülkelerinde insidansının daha yüksek olduğu bilinen *NPM1* mutasyon sıklıklarını Türkiye’de belirleyen ilk çalışma olması nedeniyle literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Lösemi

Lösemiler, hematopoetik (kan yapan) hücrelerin habis transformasyonu sonucu gelişen neoplastik bir hastalık grubudur. Kemik iliğinde bulunan bir hücrenin lösemik değişime maruz kalması ve söz konusu hücrenin kontrolsüz olarak çoğalması hastalığın başlangıcını oluşturur. Lösemik hücreler kemik iliğini istila ederek, normal hematopoez sürecini baskılamaktadır (Pekçelen vd. 2003). Hastalık morfolojik açıdan hastalığa tutulan hücre dizisinin tipine göre; miyeloid ya da lenfoid, sağkalım ve olgunlaşma özellikleri esas alınarak; akut ya da kronik olarak sınıflandırılır. Akut lösemiler tedavi edilmediği takdirde sağkalım süresi haftalar veya birkaç ayla sınırlı olan hastalıklar olarak tanımlanırken kronik lösemilerde sağkalım süresi yıllarla ölçülebilir. Ayrıca akut lösemilerde ön planda immatür (öncül) hücreler-blastlar görülürken kronik lösemilerde olgun hücreler ön plandadır. Lenfoid-miyeloid ayrımı ise hematopoetik kök hücrenin farklılaşmaya başladığı ilk basamak ile ilişkilidir. Kök hücre lenfoid koloni yapan üniteye (CFU-L) farklılaşırsa lenfoid; granülosit, eritrosit, megakaryosit, makrofaj yapan üniteye (CFU-GEMM) farklılaşırsa miyeloid dizi oluşur. Bu nedenle CFU-L'den köken alan malignitelere lenfoid, CFU-GEMM'den kaynaklananlara da miyeloid adı verilir. Böylece lösemileri 4 temel gruba ayırmak mümkündür (Pekçelen vd. 2003, Kern 2004, <http://www.leukemia-lymphoma.org>, 2011).

- 1) Akut miyeloid lösemi (AML)
- 2) Akut lenfoid lösemi (ALL)
- 3) Kronik miyeloid lösemi (KML)
- 4) Kronik lenfoid lösemi (KLL)

2.1.1 Risk faktörleri

Löseminin nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda lösemi ile ilişkilendirilmiş bazı risk faktörlerinin vakaların bir kısmında lösemi gelişiminden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. İyonize radyasyon ve kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçların, lösemi riskini arttırdığı bildirilmiştir. Trizomi 21, Fankoni anemisi, ataksi-telanjektazi ve Bloom sendromu da lösemiye yatkınlık yaratan faktörler arasındadır. Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalar sonucunda obezitenin lösemi riskini arttırdığı ortaya konmuştur. Aile öyküsü KLL için en önemli risk faktörlerinden biridir. Benzen ve türevlerinin miyeloid lösemi riskini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca AML hastalarının birinci derece yakınlarında AML riski 3 kat artmış olarak bulunmuştur. Aynı şekilde tek yumurta ikizlerinde de AML sıklığı konkordans gösterir. Ayrıca sigara içenlerde, sigara dumanı içinde bulunan benzen ve diğer karsinojenik kimyasallara bağlı olarak miyeloid lösemi riski daha yüksektir (Kern 2004, <http://www.cancer.org>, 2011).

2.1.2 İnsidans

Tüm kanserlerin yaklaşık %3'ünü temsil eden lösemiler nadir görülen hastalıklar olmalarına karşın, kanser sağkalım istatistikleri üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yaklaşık 259,889 kişinin lösemi tanısı ile takip edildiği veya tedavi sonrası remisyonda olduğu tahmin edilmektedir. Amerikan Kanser Derneği'nin verilerine göre 2010 yılında yaklaşık 43,050 kişiye lösemi teşhisi konmuş ve 21,840 vaka (12,660 erkek, 9,180 kadın) ölümle sonuçlanmıştır. 2010 yılında ABD'de kanser nedeniyle ölümler arasında lösemi erkeklerde altıncı kadınlarda ise yedinci sırada yer almıştır (<http://www.leukemia-lymphoma.org>, 2011, <http://www.cancer.org>, 2011).

Kronik lösemiler (19,860 vaka) akut lösemilere (17,660 vaka) oranla daha sık gözlenmektedir. Lösemi tanısı alan yetişkinlerin sayısı, lösemi teşhisi konulan çocukların sayısından 10 kat daha fazladır. Çocukluk çağında en sık görülen malignite ALL'dir. ALL, 0-19 yaş arası çocuklarda görülen lösemi vakalarının yaklaşık % 74'

ünü oluşturur. Yetişkinlerde en sık rastlanan lösemi çeşitleri ise AML ve KLL'dir. AML ve KML görülme sıklığı 55 yaş ve üzeri vakalarda oldukça yüksektir. (<http://www.leukemialymphoma.org>, 2011, <http://www.cancer.org>, 2011).

Hastalığın insidansı ırka ve cinse bağlı olarak da değişim gösterir. Lösemiye erkeklerde ve beyaz ırkta (12,9/100 000) daha sık rastlanırken, Kızılderili/Alaska yerlileri (6.5/100 000), Asyalı ve Pasifik adalılarda (7.2/100 000) löseminin görülme sıklığı düşüktür. Çocuklarda lösemi en sık 20 yaşın altındaki İspanyollarda görülmektedir. Bunun dışında Kızılderili, Alaska yerlileri, Asyalı, Pasifik adalı ve beyaz ırk popülasyonlarında da, Afrika kökenli Amerikalılara oranla çocukluk çağı lösemilerine sık rastlanmaktadır (<http://www.leukemia-lymphoma.org>, 2011).

Sağlık Sigortası Bilgi Merkezi -SAGMER, Bona Finans ve ODTÜ ile ortaklaşa yapılan ve Türkiye'nin ölüm ve hastalık haritasının çıkartılması amacıyla başlatılan Mortalite-Morbalite çalışmasının verilerine göre Türkiye genelinde Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK) şemsiyesi altında 2008 yılında Lösemi nedeniyle sağlık kuruluşlarına başvuran toplam kişi sayısı 20,825'dir. Türkiye'de de lösemi erkeklerde daha sık gözlenmektedir. SGK'ya bağlı olarak sağlık kuruluşlarına lösemi nedeniyle başvuran kişilerin % 77'sini 21 yaş üzerindeki yetişkinler oluşturmaktadır. Lösemi nedeniyle sağlık kuruluşlarına başvuran kişilerin yaş ortalamalarına bağlı olarak, ülkemizdeki belli başlı iller karşılaştırıldığında, yaş ortalaması en düşük olan ilin Antalya ve Adana, en yüksek olan ilin ise Tekirdağ olduğu saptanmıştır. Lösemi nedenli ölümlerin en sık görüldüğü il %3 ile Trabzon'dur. Trabzon'da özellikle 84 yaş üzerindeki erkeklerde lösemi sık görülür. (www.sagmer.org.tr, 2011)

2.1.3 Patogenez

Lösemiye yol açan neoplastik transformasyonun mekanizması henüz anlaşılmış değildir. Ancak, löseminin temelde bir DNA lezyonu sonucu geliştiği kabul edilir. Kromozomlardaki yeniden düzenlenmeler, translokasyonlar, delesyonlar, gen amplifikasyonu ve nokta mutasyonları gibi sitogenetik değişiklikler, normal hücrenin farklılaşma ve proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli işlevleri olan genlerin

malign karakter kazanmasına yol açabilir. Bu durum hematopoezin gelişiminin ve regülasyonunun bozulmasına neden olur. Kan hücreleri kemik iliğindeki pluripotent ve “committed” (belirli bir hücre dizisinin yapımına yönelmiş) hematopoetik kök hücrelerinden türerler. Lösemik transformasyon herhangi bir farklılaşma düzeyindeki hücrede kendini gösterebilir. Bazı vakalarda lösemik transformasyon pluripotent kök hücre düzeyinde meydana gelirken, bazı vakalarda progenitor hücre düzeyinde meydana gelir (Pekçelen vd. 2003).

2.1.4 Klinik belirti ve bulgular

Lösemi hücrelerinin kemik iliği ve diğer organlarda birikimi sonucu hastalığın klinik belirtileri ortaya çıkar. Öncelikle kemik iliği kendi dokusu içinde çoğalan bu habis hücrelerin varlığından zarar görür ve görevini yapamaz. Böylece kan pıhtılaşmasında rol oynayan trombositler ve enfeksiyonlara karşı savunmada rol oynayan lökositlerin sayısı azalmaya başlar. Trombosit sayısındaki düşüş lösemi hastalarında zedelenmelerin ve kanamaların yoğun görülmesine yol açarken, lökosit sayısındaki düşüş hastalarda yüksek ateş ve kolay enfeksiyon görülmesine neden olur. Savunma mekanizması zayıflar. İleri aşamalarda kırmızı kan hücresi eksikliği anemiye ve buna bağlı olarak, halsizliğe, nefes darlığına, kolay yorulmaya neden olur. Bunun dışında kilo kaybı, dişetlerinde şişkinlik ve eklem ağrıları görülebilir. (Pekçelen vd. 2003, <http://www.thd.org.tr>, 2011)

2.2 Akut Lösemiler

Akut lösemiler olgunlaşma ve farklılaşma özelliğini yitirmiş miyeloid ya da lenfoid dizi hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize bir hastalık grubudur. Lösemi tek bir miyeloid ya da lenfoid progenitor hücrenin habis transformasyona uğraması ve bu transforme hücrenin çoğalarak gittikçe büyüyen bir klon oluşturması sonucu gelişir. Akut lösemi hücrelerinin temel karakteristik niteliği farklılaşma yeteneğini kaybetmiş olmalarıdır. Bu hücrelerin olgunlaşması AML’de miyeloblast ya da promiyelosit, ALL’de lenfoblast düzeyinde kalmıştır. Gerek diferansiyasyon bozukluğu, gerekse aşırı proliferasyon sonucu lösemi hücreleri kemik iliğinde birikir. Lösemi hücrelerinin kemik

iliğini istila etmesi sonucu normal kan hücrelerinin (eritrosit, granülosit ve trombosit) üretimi engellenir ve buna bağlı olarak gelişen anemi, infeksiyon ve kanamalar hastalığın ana belirti ve bulgularını oluştururlar. Öncelikle kemik iliğinde proliferen olan lösemi hücreleri daha sonra çevre kanına geçer ve diğer dokuları infiltre eder. Akut lösemilerin her iki tipi de tedavi edilmezse kısa sürede ölümle sonuçlanan hastalıklardır (Pekçelen vd. 2003, Kern 2004).

2.3 Akut Miyeloid Lösemi

Akut miyeloid lösemi (AML), hematopoez sürecinde olgun kan hücrelerine farklılaşan miyeloid kökenli öncü kan hücrelerinin, farklılaşma yeteneklerini kaybederek klonal çoğalan neoplastik hücrelere dönüşümleri ile karakterizedir. Hastalık sürecinde olgunlaşmamış (blastik) miyeloid kökenli hücreler kemik iliğı, çevre kanı ve diğer dokularda birikir. Lösemi hücrelerinin kemik iliğini istila etmesi sonucu normal kan hücrelerinin üretimi engellenir. Hastalık tedavi edilmediğı takdirde ölümcüldür (Pekçelen vd. 2003, Shipley ve Butera 2009).

2.3.1 İnsidans

Amerikan Kanser Derneğı'nin verilerine göre ABD'de 2010 yılında yaklaşık 12,330 kişiye AML teşhisi konmuş ve 8,950 vaka ölümle sonuçlanmıştır. Her yaşta rastlanabilen bir lösemi tipi olan AML daha çok erişkinlerde görülür. Hastalığın insidansı yaşla birlikte artar. AML'ye 40 yaş öncesi yetişkinlerde nadir rastlanırken hastalığa yakalanma ortalama yaşı yaklaşık 67'dir. Erkeklerde daha sık görülür. (<http://www.leukemia-lymphoma.org>, 2011, <http://www.cancer.org>, 2011).

2.3.2 AML'nin sınıflandırılması

Akut miyeloid lösemi oldukça heterojen bir hastalıktır. AML, granülositik, eritroid, megakaryositer veya monositer serilerin herhangi birinden kaynaklanabileceği gibi karma farklılaşma da (hem granülositik hem de monositik) gösterebilir. AML'de kritik ayırım de novo ile sekonder AML arasındadır. De novo (primer) AML daha önce hematolojik hastalığı olmayan hastalarda görülür. Bu hastalar daha gençtir, tedaviye yanıt ve sağkalım oranları daha iyidir. Karakteristik olarak resiprokal translokasyonlar görülür. Sekonder AML ise daha önceden myelodisplastik sendrom veya kronik myeloproliferatif hastalık gibi hematolojik hastalığı olanlarda veya bir başka malignite için kemoterapi almış kişilerde görülür. Sekonder AML genelde bir ileri yaş hastalığıdır. Tedaviye yanıt ve prognoz kötüdür. Sitogenetik incelemede resiprokal anomalilerden çok sayısal kromozomal bozukluklar dikkat çeker (Kern 2004).

AML sınıflandırmasında ikinci bir kritik nokta da akut promiyelositer löseminin (APL) diğer alttiplerden ayrımının yapılmasıdır. Çünkü APL için özgün bir tedavi yöntemi vardır. Diğer tüm alttipler benzer şekilde tedavi edilmektedir (Kern 2004).

French American British (FAB) sınıflaması

AML'nin standart sınıflaması, olgunlaşma derecesi ve seri farklılaşmasına dayalı tanımlanmış 8 alttipten oluşan French American British (FAB) sınıflamasıdır (Çizelge 2.1). FAB sınıflaması büyük ölçüde standart morfoloji ve basit sitokimyasal boya yöntemlerine dayanır ancak AML için prognostik önemi olan sitogenetik anomaliler, displastik değişimlerin varlığı veya daha önce kemoterapi görmüş olmak gibi faktörler göz önüne alınmaz. FAB sisteminde AML tanısı için temel kriter kemik iliğindeki hücrelerin en az % 30'unun myeloblastlardan oluşmasıdır. FAB alttipleri arasında bazı klinik farklılıklar vardır. Ayrıca belli FAB alttipleri ile bazı tekrarlayan kromozomal translokasyonlar arasında da ilişki gösterilmiştir. Ancak FAB sınıflamasının prognostik değeri sınırlıdır (Kern 2004).

Çizelge 2.1 Akut miyeloid lösemide FAB sınıflaması (Kern 2004)

ALT TİP	ÖZELLİKLER	YORUM
M0: Minumum farklılaşma gösteren AML	Blastların <%3'ünde MPO veya SB pozitifdir ancak akım sitometrisinde miyeloid antijen ekspresyonu vardır.	AML'lerin % 5-10'udur; morfolojik olarak ALL'ye benzer; AUER cisimcikleri ve lenfoid antijen ekspresyonu olmamalıdır.
M1: Olgunlaşma göstermeyen AML	Miyeloid hücrelerin >%90'ı blastik hücrelerden oluşur; blastların >%3'ü MPO ve SB ile boyanır.	AML'lerin %10-20'sini oluşturur.
M2: Olgunlaşma gösteren AML	Miyeloid hücrelerin >%10'u promiyelosit düzeyi veya daha geç evrede olgunlaşmıştır. Myeloblastların oranı >%30'dur.	AML'nin % 30-45'ini oluşturur. t(8;21) olguların %25'inde görülür.
M3: Akut promiyelositer Lösemi (APL) • Hipergranüler varyant • Mikrogranüler varyant	Hipergranüler (%75): büyük stoplazmik granüller, promiyelositler baskındır. Mikrogranüller (%25): küçük granülleri ve katlanmış çekirdekleri olan promiyelositler baskındır.	AML'lerin % 5-10'unu oluşturur. 17. kromozom üzerindeki RAR-alfa ile ilişkilendirilir.
M4: akut miyelomonositik lösemi (AMML) Alt tip: İlikte anormal eozinofillerin bulunduğu AMML (M4Eo)	Çevresel kanda monositoz; Kemik iliği hücrelerinin >%20'si monositik hücrelerden oluşur -M4Eo: kemik iliğinde büyük bazofilik granüllü anormal eozinofiller bulunur.	AML'lerin % 15-25'ini oluşturur. -M4Eo varyantı inv(16) veya t(16;16) ile ilişkilendirilmiştir. AML-M4'lerin yaklaşık %15-30'unu oluşturur.
M5: Akut monositik lösemi • M5A • M5B	M5A: Kİ hücrelerinin >%80'i monoblastlardan oluşmuştur. M5B: Promonositler ön plandadır.	-M5A, AML'lerin % 5-8'ini oluşturur. Genç erişkinlerde daha sık rastlanır. -M5B, AML'lerin % 5-6'sını oluşturur. Daha çok ileri yaşlarda görülür.
M6: Akut eritrolösemi	Kİ hücrelerinin >%50'si eritroid öncüllerden ve noneritroid hücrelerin >30'u miyeloblastlardan oluşur.	AML'lerin %5'ini oluşturur. İleri yaş hastalarda daha sıktır.
M7: Akut megakaryositik lösemi	Miyeloblastların >%50'si akım sitometri incelemesinde megakaryositik antijenleri ifade eder.	AML'lerin % 8-10'unu oluşturur; tanı için akım sitometrik inceleme gerekir.

(MPO: miyeloperoksidaz, SB: Sudan Black, Kİ: kemik iliği [MPO ve SB blastik hücrelerin birbirinden ayrılmasında kullanılan sitokimyasal boyalardır]) (Kern 2004).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflaması

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflaması (Çizelge 2.2) prognostik ve tedaviye yönelik anlamı olan translokasyonların varlığına göre AML'leri ayırır. Aynı şekilde bu sınıflamada myelodisplastik sendromların varlığı ve daha önce kemoterapi görmüş olmak (tedaviye bağlı AML) gibi faktörler de dikkate alınmaktadır.

WHO sınıflamasının FAB'dan önemli bir farkı FAB'da % 30 olan kemik iliğindeki blastik infiltrasyon oranının bu sınıflamada % 20'ye indirilmiş olmasıdır. FAB sınıflamasında kemik iliğindeki myeloblast sayısı % 20-30 arasında olan olgular myelodisplastik sendrom olarak adlandırılmıştır. WHO sınıflamasında bu olgular AML tanısı almaktadır (Kern 2004).

Çizelge 2.2 Akut miyeloid lösemide WHO sınıflaması (Kern 2004).

Akut Miyeloid Lösemi
1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML - t(8;21)(q22;q22); (AML1/ETO) ilişkili AML. İyi prognoz - Akut promiyelositer lösemi (t(15;17)(q22;q11-12) ilişkili AML ve varyantları;PML/RAR α) . İyi prognoz -İlkte anormal eozinofillerle karakterize AML (inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q11); CBF β /MYH11). İyi prognoz - 11q23 (MLL) anomalileriyle ilişkili AML. Kötü prognoz
2. Çoklu dizi displazisi gösteren AML: Genellikle kötü prognozludur - Öncesinde MDS olan AML - Öncesinde MDS olmayan AML
3. İlaça bağlı AML ve MDS (myelodisplastik sendrom): Genellikle kötü prognozludur - Alkilleiyici ajanlarla ilişkili - Epipodofillotoksin ilişkili
4.Diğer tipler - Başka türlü kategorize edilemeyen AML * - Minimal farklılaşma gösteren AML - Olgunlaşma göstermeyen AML - Olgunlaşma gösteren AML - Akut miyelomonositik lösemi - Akut monositik lösemi - Akut eritroid lösemi - Akut megakaryositik lösemi - Akut bazofilik lösemi - Miyelofibroza giden akut panmiyeloz

* Sitogenetik/moleküler analiz yapılmıyorsa veya normal bulunursa bu kategori kullanılabilir

2.3.3 AML’de moleküler genetik ve prognoz

AML olgularının çoğu, hematopoetik progenitör hücrelerde meydana gelen sporadik mutasyonlar sonucu gelişmektedir. AML’nin moleküler genetiği ve moleküler biyolojisi ile ilgili olarak yapılan araştırmalar sonucunda 100’den fazla genetik anomalinin ve çeşitli genlerdeki mutasyonların hastalığın patogenezinde rol oynadığı ortaya konmuştur. Ancak AML patogenezinde rol alan genetik değişimlerin her birinin hastalık üzerindeki etkisi tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir. Çünkü AML’nin biyolojisi ve AML hastalarının tedaviye verdikleri yanıt tek bir mutasyon tarafından değil bir kombinasyon tarafından belirlenir. Bu durum AML’nin fenotipik olduğu kadar genotipik olarak da heterojenite gösteren kompleks bir hastalık olduğunun göstergesidir (Avivi ve Rowe 2004, Fröhling vd. 2005, Ferrara vd. 2008, Özbek 2009).

Lösemilerin moleküler genetiği tekrarlayıcı kromozom anomalilerinin bu hastalıkta tanımlanmaları ile başlamıştır. Normal kan hücrelerinin oluşumunda ve homeostazisinde görev alan genlerin translokasyonlar sonucunda bir araya gelerek onkogenik özellikli bir füzyon geni oluşturabildiği ve meydana gelen füzyon genlerinin anormal protein ürünlerinin öncü kan hücrelerinde proliferasyon, farklılaşma veya apoptozis sürecinde probleme neden olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca kromozomal anomaliler sonucunda gerçekleşen karşılıklı yer değişim bir taraftaki genin fonksiyonunun artarak onkogenik özellik kazanmasına ya da mevcut olan baskılayıcı özelliğini kaybederek hücreyi lökomogenez (lösemi gelişimi) sürecine sokacak kazanımlara karşı engelleyememesine neden olabilir. Translokasyonlar sonucu fonksiyonu değişen/bozulan genlerin incelenmesi hematopoetik hücrelerin ana kontrol yollarının tespitini ve bozulduklarında lökomogeneze nasıl yol açtıklarının anlaşılmasını sağlamıştır. Ayrıca olguların yüksek bir bölümünde gözlenen çeşitli genlerdeki nokta mutasyonları da lökomogeneze katkıda bulunmaktadır. Bunlar arasında FLT3 ve KIT gibi reseptör tirozin kinaz genlerindeki ya da RAS gen ailesinde meydana gelen aktive edici mutasyonlar sayılabilir. Ayrıca, AML1, CEBPalfa, GATA1 gibi çeşitli hematopoetik transkripsiyon faktörlerinin ve nükleolar bir fosfoprotein olan NPM’nin fonksiyonlarını bozucu nokta mutasyonları da AML etiyolojisine katkıda bulunan genetik değişimlerdendir (Özbek 2009).

Hastanın sitogenetik özelliklerinin veya taşıdığı moleküler alterasyonlardan bazılarının hastanın yaşıyla birlikte değerlendirmeye alındığında hastalığın takibi, nüks öngörüsü ve uygun tedavi seçiminde kullanılabilecek nitelikte olan uygun parametreler olduğu belirlenmiştir (Ferrara vd. 2008). Non random (tesadüfi olmayan, daha önce tanımlanmış) klonal kromozomal anomaliler (örn. Dengeli translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar, monozomiler ve trizomiler) AML’li yetişkinlerin yaklaşık % 55’inde lösemik blastlarda görülen değişimlerdir (Fröhling vd. 2005). Söz konusu değişimler geçmiş yıllarda tam remisyonun gerçekleşmesi, nüks riskinin belirlenmesi ve ortalama yaşam süresi üzerinde etkili olan en önemli prognostik faktörler olarak tanımlanmıştır. Örneğin, AML’de t(8;21) translokasyonu ya da inv(16) varlığı iyi prognozlu hastaları tanımlarken, t(9;22) translokasyon varlığı kötü gidişli hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca 60 yaş üstü hastalar genellikle kötü prognozlu hastalardır ve söz konusu hastalarda gözlenen kötü klinik seyir, kötü prognozla ilişkilenen kromozomal anomalilerin yüksek görülme sıklığından kaynaklanmaktadır (Avivi ve Rowe 2004, Döhner ve Döhner 2008, Özbek 2009). Bu nedenle tedavi öncesinde karyotip analizinin yapılması klinik seyrin öngörülmesi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca belirli sitogenetik altgruplara uygulanan diferansiyel tedavi iyi prognozun sağlanmasına önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Sonuç olarak akut lösemilerde tanı ve prognoz tahmini açısından oldukça önemli ve gerekli olan sitogenetik analizler AML’nin rutin tanısında vazgeçilmez bir yöntem haline gelmiştir (Fröhling vd. 2005, Ferrara vd. 2008). Ancak yapılan sitogenetik analizler sonucunda AML vakalarının yaklaşık %45’inin kromozomal anomalilerden yoksun olduğu ortaya konmuş ve normal karyotipli vakalar “intermediate” (orta) prognozla ilişkilendirilmiştir (Fröhling vd. 2005). Fakat normal karyotipli AML vakaları aynı risk grubuna dahil edilmelerine karşın, bu hastaların tedaviye verdikleri yanıtın farklı olduğu ve bunların yalnızca % 40’ının uzun dönem sağ kalımının mümkün olduğu görülmüştür. Bu durumun normal karyotipli vakalarda görülen gen ekspresyonunun ve gen mutasyonlarının çeşitliliğinden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Son yıllarda birtakım gen mutasyonları ve bunların yanı sıra kısıtlanmış gen ekspresyonları normal karyotipli AML hastalarında tanımlanmış olup söz konusu mutasyonların bazıları ayırıcı prognostik ve klinik özelliklerle ilişkilendirilmiştir. Bu durum normal karyotip içeren AML vakalarının büyük çoğunluğunda prognostik açıdan muazzam bir heterojeniteye

işaret eder. Bu bağlamda söz konusu gen mutasyonlarının karakterizasyonu, hastaların prognozlarının takibi, nüks öngörüsü ve uygun tedavi seçimi açısından oldukça önemlidir (Döhner ve Döhner 2008, Shipley ve Butera 2009, Özbek 2009).

AML'nin güncel tedavisi ile 60 yaş altı hastaların yaklaşık % 80'inin tam remisyonu sağlanabilmektedir. Ancak yüksek orandaki hasta grubunda ilk 4 yılda ciddi oranda lösemi nüksü görülmekte ve hastalık ölümle sonuçlanmaktadır. Löseminin genetik profili, hastanın yaşı göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde bugün için en önemli tedavi yanıt kriteridir. Örneğin, iyi prognostik genetik profili olan olguların tam remisyona girme şansları % 90 ve sonrasında hastalıksız sağ kalımları % 70 iken, aynı yaş grubunda kötü prognostik genetik profili olan olgular için tam remisyon oranı % 60 ve nüks olasılığı ise % 70'dir. Benzer olarak 60 yaş üstü hastaların tedaviye tam yanıt oranı % 50 ve 4 yıllık sağ kalım olasılıkları ise % 10 civarındadır. Bu nedenle hastanın prognostik genetik profilinin belirlenmesi oldukça önemlidir ve bu bağlamda hastanın genetik profilini belirleyebilecek nitelikte uygun moleküler belirteçlere ihtiyaç vardır (Shipley ve Butera 2009, Özbek 2009).

2.4 Nükleofosmin ve Kanser

Nükleofosmin (NPM), B23, NO38 ve numatrin olarak da bilinen, nükleolar bir fosfoproteindir ve nükleolusun granüler bölgesinde yüksek oranda ifade edilir. Nükleer şaperonların nükleoplazmin/nükleofosmin ailesine dahil olan protein yüksek oranda korunmuştur. Nükleofosmin fonksiyonları ve interaksiyonları üzerine yapılmış olan çok sayıda çalışma proteinin proliferatif ve büyüme baskılayıcı rolüne işaret etmektedir. Canlılık için temel bir protein olan nükleofosmini kodlayan *NPM1* geninin inaktivasyonu fare germ hattında orta-gestasyonda embriyonik ölüme neden olan gelişimsel bozukluklara yol açar. İnsanlarda ise NPM'nin direkt olarak kanser patogenezi ile ilişkilendiği rapor edilmiştir. Kolon tümörleri, karaciğer tümörleri, mide tümörleri, yumurtalık tümörleri ve prostat tümörlerini de kapsayan çok sayıda histolojik orjinli solid tümörde NPM'nin yüksek ekspresyonu söz konusudur. Ayrıca *NPM1* hematopoetik tümörlerde genetik değişimlere en sık maruz kalan genlerden biridir. Çeşitli hematolojik malignitelerde *NPM1* lokusunun kaybı veya NPM'de fonksiyon

kaybına neden olan translokasyonların varlığı bildirilmiştir. *NPM1*, onkologlar tarafından çeşitli kromozomal translokasyonlar için partner gen olarak tanımlanmıştır. Söz konusu kromozomal translokasyonlar onkogenik füzyon proteinlerinin oluşumu ile sonuçlanır. t(2;5) translokasyonu sonucu anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALCL) da görülen NPM-anaplastik lenfoma kinaz (*ALK*) ürünü, t(5;17) translokasyonu sonucu akut promiyelositik lösemi (APL) de görülen *NPM-RARα* ürünü, t(3;5) translokasyonu sonucu AML’de ve myelodisplastik sendrom (MDS) da görülen *NPM-MLF1* ürünü oluşur. Ayrıca de novo MDS hastalarında ve bazı solid tümörlerde *NPM1*’in lokalize olduğu kromozom bölgesinin delesyonu söz konusuyken, tedaviye bağlı MDS (sitotoksik kemoterapi ve/veya radyoterapi sonrasında tedaviye bağlı olarak gelişen MDS tipi) hastalarında kromozom 5’in kaybı görülür. Hematopoetik malignitelere *NPM1* geni ile ilgili olarak tanımlanan ikinci genetik olay ise AML hastalarında görülen *NPM1* gen mutasyonlarıdır (Çizelge 2.3) *NPM1* geninin 12. ekzonunda meydana gelen AML spesifik mutasyonlar Falini ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan çalışma sonucunda tanımlanmıştır. Söz konusu mutasyonların lösemik blastlarda NPM’nin anormal sitoplazmik yerleşimi (NPMc+) ile sonuçlandığı rapor edilmiştir. Bu mutasyonlar AML vakalarında en sık rastlanan genetik anomalilerdir. Tüm yetişkin AML vakalarının yaklaşık %35’inde *NPM1* gen mutasyonlarına rastlanırken, söz konusu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %60’ından fazlası normal karyotipe sahiptir. *NPM1* mutasyonunu taşıyan tüm vakalarda total NPM miktarının, gen dozajının (bir genin ekspresyonunun kantitatif ölçüsü) redüklenmesinden dolayı azaldığı görülmüştür. NPM fonksiyon kaybının, mutant proteinlerin yaban tip proteinler üzerindeki potansiyel negatif etkisi nedeniyle de arttığı düşünülmektedir (Naoe vd. 2006, Lim ve Wang 2006, Grisendi vd. 2006, Falini vd. 2007b, Lindström 2011).

Çizelge 2.3 Nükleofosmin ve kanser patogenezi (Grisendi vd. 2006)

Alterasyon	Malignite	Mutant Ürün
Yüksek ekspresyon	Çeşitli histolojik orjinli tümörler (Kolon , karaciğer, mide, yumurtalık ve prostat tümörleri gibi)	Proteinin artan ifadesi
Dengeli Translokasyonlar		
t(5;17)(q35;q12)	APL	NPM-RAR α
t(2;5)(p23;q35)	ALCL	NPM-ALK
t(3;5)(q25;q35)	MDS ve AML	NPM-MLF1
Gen mutasyonları (ekzon 12)	AML (özellikle normal karyotipli vakalarda olmak üzere, çoğunlukla FAB-M4 ve FAB-M5 alttiplerinde)	NPMc+ sitoplazmik mutant
Delesyon (-5q35, -5)	MDS (de novo, tedavi ilişkili), AML ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	

(ALCL, anaplastik büyük hücreli lenfoma; ALK, anaplastik lenfoma kinaz; AML, akut miyeloid lösemi; APL, akut promyelositik lösemi; FAB, löseminin Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırması; MDS, myelodisplastik sendrom; MLF1, myelodisplazi/miyeloid lösemi faktör 1; NPM, nükleofosmin; RAR, retinoik asit reseptörü)

2.5 NPM1 Geni ve Nükleofosmin Proteininin Yapısı

İnsanda kanser gelişimi ile direkt olarak ilişkilendirilen NPM proteini *NPM1* geni tarafından kodlanır. *NPM1* geni insanlar, kemirgenler, tavuklar ve balıklar arasında yüksek oranda korunmuş olup 12 ekzon içerir ve insanlarda 5q35 bölgesinde lokalize olur. NPM proteini 2 alternatif izoforma sahiptir (Lindström 2011):

1. Tüm dokularda en sık rastlanan izoform olan, B23.1, 294 aminoasit içerir. B23.1 temel olarak nükleolusda lokalize olurken, proteinin çok az bir kısmı sentrozomlarda bulunur (Falini vd. 2007b). Yalnızca B23.1 de bulunan C-terminal bölgesi nükleolar lokalizasyon için esastır (Okuwaki 2007).
2. B23.2 kesimlenmiş bir proteindir ve B23.1 izoformunun C terminalinde bulunan son 35 aminoasiti içermez. Çok düşük seviyelerde ifade edilir (Falini vd. 2007b).

Nükleofosmin multifonksiyonel bir proteindir ve çoklu biyokimyasal fonksiyonlarının gerektirdiği şekilde özelleşmiş bölgelere sahiptir. Proteinin korunmuş olan N-terminal kısmı, molekülün oligomerizasyon ve şaperon aktivitesini düzenleyen hidrofobik bir bölgeye sahiptir. Dinlenme halindeki hücrelerde proteinin %95'inden fazlası bir oligomer olarak bulunur ve NPM şaperon aktivitesi için oligomer formasyonuna ihtiyaç duyar. Bu bölgede meydana gelen bir delesyon sonucunda proteinin şaperon aktivitesinin neredeyse tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir. Ayrıca NPM'nin oligomerizasyon domaini *in vivo* koşullarda bir tümör baskılayıcı protein olan ARF proteininin bağlanması için de kritik olan korunmuş bir motif içerir. Proteinin ortasında yer alan iki asidik kısım histon bağlanması, dolayısıyla da histon şaperon aktivitesi için esastır. Asidik parçaların proteinden ayrılması histon şaperon aktivitesinin büyük ölçüde redüklenmesine neden olur. Proteinin orta kısmında yer alan asidik parçalar arasındaki segment NPM'nin ribonükleaz aktivitesi için gerekli bir bölgedir. Proteinin C terminal kısmı nükleik asit bağlanma aktivitesinden sorumludur. C terminalinde bulunan nükleik asit bağlanma segmentinin her iki ucunda yer alan aromatik ve bazik bölgeler söz konusu aktivite için önemlidir. Ayrıca proteinin C terminal kısmı, kısa bir aromatik bölge içerir. Söz konusu aromatik bölge 288. ve 290. pozisyonunda iki adet triptofan bulundurur. Bu aromatik bölge, proteinin büyük çoğunluğunun, nükleolusda lokalize olması açısından önemlidir ve bu nedenle nükleolar lokalizasyon sinyali (NoLS) olarak adlandırılır. B23.1 ayrıca bipartite (çift taraflı) nükleer lokalizasyon sinyali ve lösin zengini nükleer eksport sinyal (NES) motifleri ve çeşitli fosforilasyon kısımları içerir. NPM'nin nükleolusa ve diğer çekirdek içi kompartmanlara bağlanmasını düzenleyen fosforilasyon kısımları mevcuttur. Fosforilasyon, NPM'nin nükleolus ve nükleoplazma arasında taşınmasını (ribozom biyogenezine katılan nükleolar komponentlerin ortak özelliği) indüklerken, gerekli olan bazı durumlarda, diğer nükleolar komponentlere karşı olan ilgisini indirger. Bipartit nükleolar lokalizasyon sinyali (NLS) ve nükleer eksport sinyal (NES) motifleri de NPM'nin nükleositol plazmik trafiğini düzenler (Herrera vd. 1995, Hingorani vd. 2000, Falini vd. 2007a, Şekil 2.1, Falini vd. 2007b).

NPM izoformları, hücre içi dağılımda farklı paternlere sahiptir. B23.1 nükleolusun, olgunlaşan pre-ribozomal partikülleri içeren, granüler komponentinde bulunurken, daha nadir görülen B23.2 izoformu çoğunlukla nükleoplazma da lokalize olur. B23.1'in

nükleolusdaki lokalizasyonu nükleik asit bağlanma domaini sayesinde gerçekleşir (Falini vd. 2007b).



Şekil 2.1 *NPM1*'in yapısal ve fonksiyonel domainleri (Falini vd. 2007a)

NES: Nükleer ekspert sinyali, MB: metal bağlanma bölgesi, NLS: nükleer lokalizasyon sinyali
NoLS: nükleolar lokalizasyon sinyali

2.6 Nükleofosmin Proteininin Fonksiyonları

2.6.1 Ribozom biyogenezi

Ribozomların yapılanması nükleolusda gerçekleşir. Nükleolus, denetimli ve yeterli rRNA sentezi ve işlenmesi ile ribozomal alt birim yapılanması gereksinimini karşılayan bir ribozom fabrikası olarak çalışır. Ribozomların yapılanması, ribozomal öncül RNA ile ribozomal proteinlerin ve 5S rRNA'nın bir araya gelmesini gerektirir (Cooper ve Hausman 2006). NPM, ribozom biyogenezinde anahtar bir rol üstlenir. Ribozom komponentlerinin nükleustan sitoplazmaya taşınması için gerekli olan ekspert sinyallerini ve şaperon aktivitesini sağlar. Ayrıca RNaz aktivitesi, nükleus ve sitoplazma arasında taşınabilmesi, ve nükleik asitlere bağlanabilme özelliği ile de ribozom biyogenezine katkıda bulunur (Falini vd. 2007a).

Yapılan çalışmalar sonunda, NPM'nin 45S öncü rRNA'nın belirli bölgelerinde ribonükleaz aktivitesi gösterdiği ortaya konmuştur. Nükleofosmin pre-rRNA'da bulunan ITS2 dahilinde endonükleotik olarak kesim yapar. 5.8S rRNA'nın 3'-ucunun yaklaşık 250 nükleotid aşağısında bulunan bir bölge içinde enzimin kesim yaptığı görülürken, diğer dizilerde özgün NPM kesimlerine rastlanmamıştır. Ancak NPM'nin kesim yapacağı diziyi nasıl tanıdığı tam olarak bilinmemektedir (Savkur ve Olson 1998).

NPM ribozomal proteinlerden biri olan S9 ile interaksiyona girerek S9'un ribozomal yapılanmaya dahil olmadığı zamanlarda nükleolusda yerleşimini ve depolanmasını sağlayarak ribozom biyogeneze katkıda bulunur. Normal şartlar altında S9'un önemli bir kısmı metabolik olarak stabildir. Ancak hücrede ribozom biyogenezi durdurulduğunda yeni sentezlenen S9 proteinleri stabil halde kalamaz. Bu durumda NPM ile interaksyonu S9'u stabil kılar. Memelilerde S9 proteininin görevi tam olarak bilinmemektedir. Ancak bakteri ve mayalarda yapılan çalışmalar sonucunda S9 proteinin ribozom biyogenezi ve olgun ribozom fonksiyonları için önemli olduğu görülmüştür. Ayrıca S9 normal hücre bölünmesi ve proliferasyonu için de oldukça önemlidir. Çünkü S9 seviyelerindeki azalma protein sentezinin düşmesiyle sonuçlanır. Protein sentezindeki düşüş sonucunda hücre döngüsü G1 evresinde durdurulur ve p21 seviyeleri yükselir. (Lindström ve Zhang 2008).

Ayrıca NPM, 5S rRNA'nın nükleolusa taşınmasında ve sitozole taşınmasında aracılık eden bir şaperon olan ribozomal L5 proteini ile interaksiyona girerek, Crm-1 bağımlı bir mekanizma ile L5/5S ribozomal RNA alt ünite kompleksinin nükleer eksportuna aracılık eder. Aslında L5'i de kapsayan çok sayıda ribozom komponenti kendi NES motiflerini kodlar. Ancak tek bir NES'in CRM1 ile girdiği interaksyon yayıftır ve L5/5S kompleksinin sitozole çıkışı için ek NES motiflerine ihtiyaç duyulur. Bu durumda NPM'nin L5/5S rRNA kompleksinin sitozole transportu için gerekli olan ek nükleer eksport sinyallerini sağladığı ve bu nedenle kompleksin sitozole taşınmasının NPM aracılığıyla gerçekleştiği düşünülür (Yu vd. 2006).

Bir proteinin doğru üç boyutlu yapıya ulaşması için gerekli bilgi aminoasit dizisinden sağlanıyor olsa da, proteinlerin hücre içindeki doğru katlanması başka proteinlerin aktiviteleri aracılığı ile sağlanır. Diğer proteinlerin katlanmasını kolaylaştıran yapılar moleküler şaperonlar olarak adlandırılır. Nükleolus, ökaryotlarda ribozom yapılanmasının gerçekleştiği özelleşmiş bir yapıdır. Ribozomun yapılanma sürecinde oldukça fazla sayıda protein görev alır ve sonuç olarak özellikle ribozom biyogenezi sırasında nükleolusdaki protein konsantrasyonunun oldukça yüksek olduğu görülür. Ribozom yapılanmasında görev alan proteinlerin yüksek konsantrasyonu agregasyon ve immobilizasyon riskini beraberinde getirir. Ancak çok sayıda biyolojik sistemde olduğu

gibi proteinlerin agregasyon eğilimi moleküler şaperonlarla engellenir. Nükleolusda şaperon proteinlerine duyulan ihtiyaç termal stres şartları altında nükleolusdaki Hsp 70 lokalizasyonunun gözlenmesi ile desteklenmiştir. Hsp 70'in büyük olasılıkla, altüniteleri kısmen bir araya gelen ribozomları ve ribozom alt ünitelerinin bir araya gelmesinde rol alan molekülleri koruduğu ortaya konmuştur (Welch ve Feramisco, 1984). Normal fizyolojik koşullar altında NPM'nin de Hsp70 ile benzer bir görev üstleniyor olması muhtemeldir. Ribozomal proteinler, ribozom dahilinde bulunmadıkları zamanlarda insolubl (çözünmez) olma eğilimindedir. Sonuç olarak, NPM-ribozomal protein kompleksleri proteinlerin ribozom bünyesinde toplanması sırasında bir geçiş fazı olarak görev yapar. NPM nükleus ve sitoplazma arasında sürekli olarak taşınan bir protein olduğu için, sitoplazma içinde NPM ile kombine olan doğal substratların kotranslasyonel protein katlanmasında NPM'nin rol alıyor olabileceği ve daha sonra söz konusu proteinlerin NPM ile kompleks oluşturarak nükleolusa gidiyor olabileceği düşünülmektedir (Szebeni ve Olson, 1999).

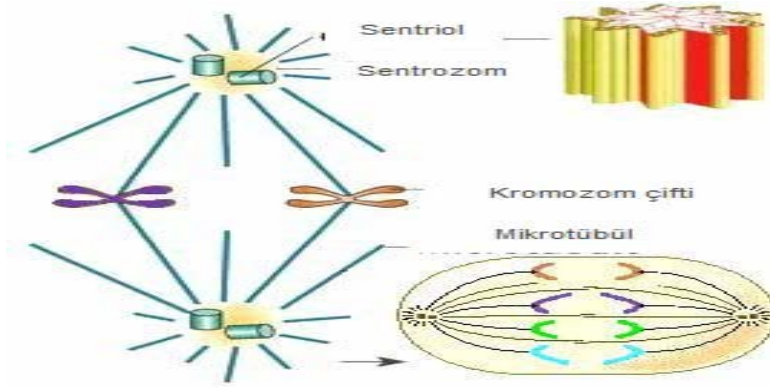
Ökaryotik hücrelerin DNA'sı, bu DNA'yı hücre nükleusunda düzenli bir şekilde paketleyen küçük bazik proteinlere (histonlara) sıkıca bağlıdır. Hatasız nükleozom oluşumu ve üst seviye kromatin yapılanması için nükleer şaperonlara ihtiyaç duyulur. NPM histon şaperon aktivitesine sahip olan bir moleküldür (Cooper ve Hausman 2006) Histon şaperon aktivitesi taşıyan birçok molekülde olduğu gibi NPM de çekirdek histonlara bağlanabilir (Okuwaki vd. 2001). H3 ve H4 her birinden iki molekül içeren, (H3/H4)₂, bir tetramer yaparken H2A ve H2B dimerler, (H2A-H2B), ve daha yüksek oligomerik karmalar yapar. Fizyolojik koşullarda bu histon tetramerlerinden iki tanesi histon oktameri yapmak üzere bir araya gelir (<http://www.genetiklab.com>). NPM H3-H4 tetramerlerine ve H2A-H2B dimerlerine eş zamanlı olarak bağlanır ve bu bağlanma histon oktamerlerinin yıkımı ile sonuçlanır. NPM, H3, H4 ve H2B ile interaksiyona girerken H2A ile interaksiyona girmez. Diğer histon şaperonlarda olduğu gibi NPM'nin de histonlara bağlanmasından içerdiği asidik bölgeler sorumludur (Okuwaki vd. 2001).

Nükleofosmin transkripsiyon aktivasyonunun regülasyonunda da görev alır. Ökaryotik DNA'nın kromatinle paketlenmesi transkripsiyon için kalıp olarak kullanılabilme koşullarını büyük oranda etkilediğinden kromatin yapısı ökaryot hücrelerde gen

ekspresyonunu önemli ölçüde etkiler. Birçok hücre tipinde histon asetillenmesi transkripsiyonel olarak aktif kromatinle ilişkilendirilir. Asetillenme, histonların net pozitif yükünü azaltır ve hem DNA'ya bağlanmasını hem de diğer proteinlerle etkileşimini zayıflatır. Ayrıca histonların asetillenmesi nükleozomal DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını ve DNA'ya bağlanan proteinlerin kromatinlere ulaşabilirliğini artırır (Cooper ve Hausman 2006). Nükleofosmin asetilasyon bağımlı kromatin transkripsiyonunun regülasyonunda görev alır. Asetil transferazlar tarafından gerçekleştirilen asetilasyon reaksiyonlarında nükleofosmin asetilasyon yoluyla sağlanan transkripsiyonel aktivasyonu 2,5 kat artırırken NPM'nin C terminalinde meydana gelen delesyonların transkripsiyonel aktivite üzerindeki etkisini engellediği görülür. Nükleofosmin transkripsiyonel aktivasyonun gerektirdiği şekilde bir asetiltransferaz olan p300 tarafından asetillenir. Nükleofosminin asetillenmesi, asetillenmiş histonlara karşı olan affinitesini ve nükleofosminin histon transfer yeteneğini güçlendirir. Sonuç olarak NPM asetilasyon bağımlı olarak transkripsiyonel aktivitenin artırılmasında görev alır (Swaminathan vd. 2005).

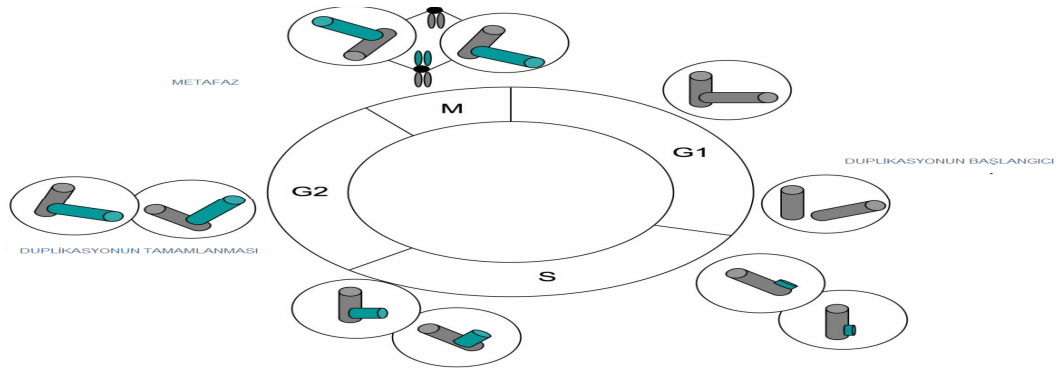
2.6.2 Sentrozom duplikasyonu

Mitozun başlıca fonksiyonu, hücrede iki set halinde bulunan kromozomların kendilerini eşledikten sonra ayrılmalarını sağlamaktır. Bu mekanizma da en büyük rolü mitotik iğ iplikleri üstlenir. Mitotik iğ iplikleri kardeş kromatidlerin ayrılmasını sağlar ve oluşan 2 kromozom setinden her birini hücrenin zıt kutuplarına taşırlar. Sentrozomlar hayvan hücrelerinin başlıca mikrotübül organizasyon merkezleridir. Mitoz sırasında mikrotübüller, mitotik iği oluşturmak üzere, kopyalanmış sentrozomlardan dışarı doğru uzanırlar. Çoğu hayvan hücresinin sentrozomu, birbirine dik yerleşmiş, amorf bir sentriyol çevre maddesi ile çevrelenmiş, bir çift sentriyol içerir. Sentriyoller dokuz adet üçerli mikrotübülden oluşan silindirik yapılardır (Şekil 2.2). Sentriyollerin hücre döngüsündeki görevleri tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, sentrozomun mikrotübül düzenleyici görevleri için gerekli değildirler ve bitki hücrelerinde, tek hücreli ökaryotların ve mayozdaki hayvan hücrelerinin çoğunda (fare yumurta hücreleri gibi) bulunmazlar. Sentriyoller değil, sentriyol çevre maddesi mikrotübül yapısını başlatır (Cooper ve Hausman 2006).



Şekil 2.2 Sentrozom yapısı (<http://universe-review.ca/I10-82-centrosome.jpg>, 2011)

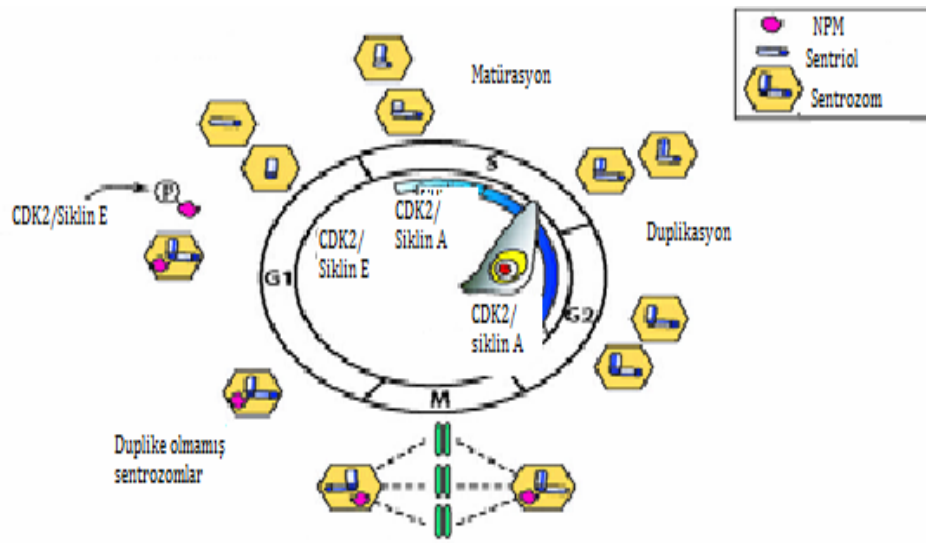
Sentriyoller ve sentrozomun diğer elemanları interfaz hücrelerinde iki katına çıkar ve sitokinez sonrasında her bir kardeş hücre kalıtım yoluyla bir sentrozom kazanır (Şekil 2.3). Sentrozom duplikasyonu her bir hücre döngüsü sırasında yalnızca bir kez gerçekleşmelidir. Bu nedenle memeli hücrelerinde sentrozom duplikasyonu kontrol edilen bir süreçtir. Somatik hücrelerde sentrozom duplikasyonu G1 evresinden S evresine geçiş sırasında başlar ve S evresinde DNA replikasyonu ile eş zamanlı olarak tamamlanır (Budhu ve Wang 2005, Lim ve Wang 2006). Sentrozomların her bir hücre döngüsünde bir kez duplike olmalarını güvence altına almak, normal hücrelerde bulunan kompleks bir düzenleyici ağıdır. Çünkü anormal hücre sentrozom duplikasyonu hemen hemen tüm kanser tipleri ile ilişkilenen anöploidi ile sıkı bir şekilde bağlantılıdır (Lim ve Wang 2006).



Şekil 2.3 Sentrozom duplikasyonu (<http://www.retrovirology.com>, 2011)

Sentrozom duplikasyonunun regülasyonuna ilişkin mekanizma tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Ancak birçok hücresel faktör bu süreçte katkıda bulunur (Budhu ve Wang 2005). NPM sentrozomların bir bileşenidir ve duplike olmamış sentrozomlarla spesifik olarak ilişkilenecek sentrozom duplikasyonunu her hücre bölünmesinde bir kere olacak şekilde sınırlandırır. Hücre bölünme sürecine girildiğinde, NPM hücre bölünmesi için gerekli olan sentrozom duplikasyonunu takiben sentrozomlardan ayrılır. NPM'nin sentrozomların duplikasyonundan sonra ortadan kaybolması CDK2/siklin E bağımlıdır. CDK2/siklin E, NPM'nin 199. pozisyonundaki threoninini fosforiller. Bu fosforillenme NPM'nin sentrozomlardan ayrılmasını sağlar ve sentrozom duplikasyonunun başlamasına neden olur. Kısacası NPM geç G1 fazında CDK2/siklin E tarafından gerçekleştirilen Thr199 fosforilasyonu üzerine sentrozomlardan ayrılır (Hinchcliffe ve Sluder 2001, Lim ve Wang 2006, Tsou ve Stearns 2006). S ve G2 fazları sırasında sitoplazmada bulunan NPM'nin potansiyel CDK2 /siklinA aktivitesi aracılığıyla sentrozomlarla tekrar ilişkilmesi engellenir. Siklin E özünde unstabil (kararsız) olduğu için siklin E bağımlı CDK2 aktivitesi S fazı sırasında minimal olacaktır. Aksine siklin A seviyesi geç G1 fazında düşüktür fakat S ve G2 fazları sırasında yükselir. CDK2/siklin A NPM yi Thr199 üzerinden spesifik olarak fosforilleyerek CDK2/siklinE ile benzer bir etki gösterir. Sonuç olarak aktif CDK2/siklin A'nın, S ve G2 fazları sırasında sitoplazmik NPM'nin sentrozomlarla tekrar ilişkilmesini engellemekten sorumlu olması muhtemeldir. S fazından G2 fazına dek olan hücre bölünmesinin gelişimi sırasında, NPM nin önemli bir bölümü nükleolusda lokalize olur ve temel olarak ribozom biyogenezinin ve hücre

proliferasyonunun bir regülatörü olarak fonksiyon gösterir. Mitozun başlangıcında nükleer membran yıkılır. Nükleer membran yıkıldıktan sonra NPM Ran/CRM1 kompleksi ile interaksiyona girerek mitotik sentrozomlarla tekrar ilişkilendirir ve böylece sentrozom duplikasyonu her hücre bölünmesinde bir kez olacak şekilde sınırlandırılır. Yalnızca mitoz sırasında NPM sentrozomlarla tekrar ilişkilendirilmiş olarak bulunur. Yeni bölünmüş G1 hücresi NPM bağlı bir sentrozom içerir. Sonuç olarak Ran ağı substratlarıyla beraber hatasız hücre bölünmesini güvence altına almak için hücre döngüsünü regüle eder (Okuda 2002, Lim ve Wang 2006, Şekil 2.4).



Şekil 2.4 NPM ve sentrozom duplikasyonu (Lim ve Wang 2006)

2.6.3 NPM ve tümör baskılayıcı proteinler

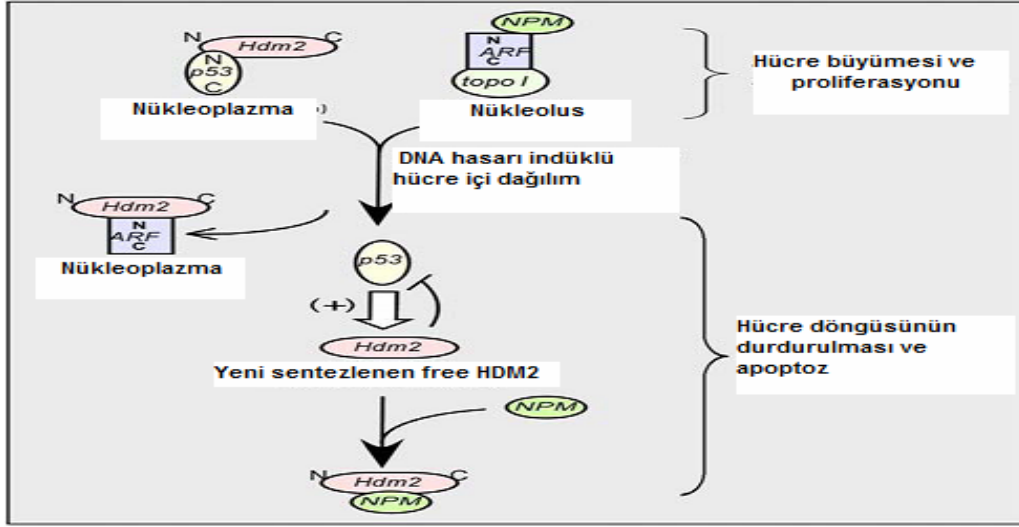
NPM, bir tümör baskılayıcı olan ARF ile interaksiyona girerek büyüme baskılayıcı yolların düzenlenmesine katkıda bulunur. ARF, (insanda $P14^{ARF}$, farede $P19^{ARF}$ olarak da bilinir) siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan $p16^{INK4a}$ ’yı kodlayan, $INK4\alpha/ARF$ lokusunun alternatif bir transkriptidir. 4 ekzon içeren $INK4\alpha/ARF$ lokusu 9p21’de yer alır. Siklin bağımlı kinaz aktivitesine sahip olmayan ARF, p53’ün pozitif regülatörüdür. NPM-ARF interaksiyonu ARF’nin stabilizasyonunu sağlar ve molekülün hücre içi lokalizasyonunu belirler. Yüksek moleküler ağırlıklı bir kompleks dahilinde NPM ile interaksiyona giren ARF nükleolusda lokalize olur. NPM, ARF’yi proteozom bağımlı yıkımdan korur. NPM kaybı ARF’nin destabilizasyonu ve inaktivasyonuna neden olur.

Bu duruma paralel olarak NPM'ye bağlanma yeteneğini kaybeden ARF mutantları da stabilizasyonunu koruyamaz ve proteozom aracılı yıkıma maruz kalarak fonksiyonel anlamda etkinliğini yitirir. Ayrıca ARF-NPM kompleksinin p53 bağımlı ARF aktivitesini engellediği düşünülmektedir. ARF-NPM kompleksi ARF'nin stabilizasyonunu ve akümüasyonunu düzenleyen bir regülatör olarak görev yapar. Söz konusu kompleks ARF'nin nükleolusda lokalizasyonunu sağlayarak ihtiyaç duyulmadığı takdirde p53 yolağının ARF aracılı aktivasyonunu engeller. NPM ARF'yi nükleolusda inaktif halde tutar (Gjerset 2006, Falini vd. 2007b)

Nükleolar bir protein olan ARF ribozom biyogenezinde de regülatör bir rol üstlenir. ARF ve NPM'nin nükleolusda gerçekleşen interaksiyonunun ARF'nin ribozom biyogenezindeki düzenleyici rolü ile de ilgili olduğu düşünülmektedir. Onkogenik strese cevaben yükselen ARF seviyeleri NPM poliubikitinasyonunu etkiler. NPM poliubikitinasyonu NPM yıkımını düzenlerken birçok NPM fonksiyonunu etkileyen nükleo-sitoplazmik mekik özelliğini engeller. Nükleolusda ARF'nin NPM'yi destabilize ederek rRNA işlenmesini baskıladığı saptanmıştır. ARF tarafından gerçekleştirilen P53 bağımsız tümör baskılanmasının bu mekanizma aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Proteinin bu fonksiyonu p53 ve MDM2'den bağımsızdır. ARF'nin, NPM ile interaksiyona girerek NPM'nin ubikitinasyon aracılı yıkımını düzenlediği ileri sürülmüştür. (Gallagher vd. 2006, Falini vd. 2007b).

DNA hasarına neden olan etmenlere maruz kalan insan tümör hücrelerinde, hücresel strese cevaben ARF ve NPM birlikte nükleoplazmaya çıkarlar. Gerekli durumlarda hücre döngüsünün durdurulmasını tetikleyen ve onkogenik uyarıya cevaben apoptotik programlarda görev alan ARF, p53'ün negatif regülatörü olan MDM2'yi inhibe eder. MDM2, p53'ü hedefleyen spesifik bir E3 ubikitin ligazdır. P53'ün tümör baskılayıcı fonksiyonlarını engelleme potansiyeline sahip olan MDM2 çeşitli tümör tiplerinde yüksek oranda ifade edilir. Mdm2 ve NPM nükleoplazmada ARF'ye bağlanmak için yarışır. Sonuç olarak Mdm2-NPM ve ARF-Mdm2 ikili kompleksleri oluşur. Mdm2'nin bu şekilde ikili kompleksler dahilinde tutulması p53'ü MDM2 bağımlı yıkımdan korur. Negatif regülasyonu baskılanan p53'ün yarı ömrü artar ve p53 ifadesi güçlenir.

Sonuç olarak hücre döngüsü baskılanır veya hücre apoptoza gider (Gallagher vd. 2006, Falini vd. 2007b), (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 ARF-NPM aracılı p53 aktivasyonu (Gjerset 2006).

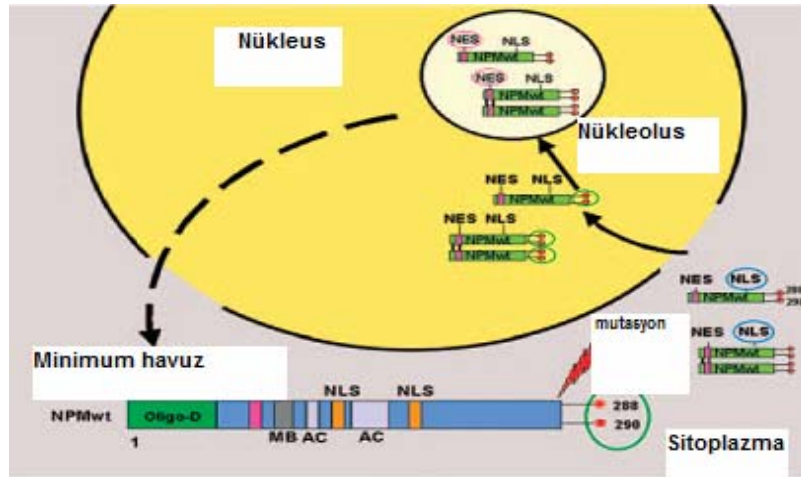
2.7 NPM Ekspresyonu

Nükleofosmin, dokularda yaygın bir şekilde ifade edilen yüksek oranda korunmuş bir proteindir. Proteomiks çalışmaları sonucunda nükleolusda tanımlanmış olan yaklaşık 700 proteinden biri olan NPM, proliferatif hücrelerde, dinlenme halinde olan hücelere oranla daha fazla ifade edilir ve ekspresyon seviyesi mitojenik uyarıya cevaben yükselir. Bu bağlamda NPM seviyesi, proliferatif hücelerde ve tümör hücelerinde artar. Malign hücelerde artan NPM seviyeleri ribozom mekanizmasının güçlenmesine ve sonuç olarak da anormal hücre büyümesine neden olur (Naoe vd. 2006, Falini vd. 2007b).

2.8 Yaban Tip NPM'nin Nükleositoplazmik Trafiği

NPM'nin büyük bir kısmı nükleolusda yerleşik olmasına karşın protein nükleus ve sitoplazma arasında sürekli olarak taşınır. Proteinin fonksiyonları açısından oldukça önemli olan, NPM'nin nükleositoplazmik trafiği, sıkı bir kontrol altındadır. Çünkü

ribozom komponentlerinin sitoplazmaya transportunu ve sentrozom duplikasyonunun regülasyonunu içeren çok sayıda önemli NPM fonksiyonu, NPM'nin hücre içi kompartmanlar arasında taşınımını gerektirir. NPM'nin taşıdığı NLS sinyali, NPM'nin sitoplazmadan, nükleoplazmaya taşınmasını sağlar. Nükleoplazmaya taşınan protein, gerekli durumlarda nükleolar bağlanma domaini aracılığıyla nükleolusa transloke olur. NPM'nin nükleus dışına taşınımı ise evrim sürecinde korunmuş bir molekül olan Crm1 aracılığıyla gerçekleştirilir. Crm1 lösin zengini NES motifleri taşıyan proteinlerin eksport reseptörüdür. NPM iki adet korunmuş NES motifi içerir. Bunlardan bir tanesi 94 ve 102. rezidüler arasında bulunan I-xx-P-xx-L-x-L dizisine sahip olan motiftir. Diğeri ise proteinin N terminal kısmında, 42. ve 61. rezidüler arasında bulunan motiftir ve söz konusu motif 42. ve 44. pozisyonda lösin rezidüleri içerir. Ancak NPM, çekirdek dışına taşınmasını sağlayan, yüksek oranda korunmuş, hidrofobik ve lösin zengini NES motifleri içermesine karşın nükleolusta lokalize olur. Sonuç olarak, fizyolojik şartlarda, yaban tip NPM'nin, nükleer içe alımı, eksportu üzerinde baskındır. Çünkü yaban tip NPM'nin içerdiği NES motifleri, karakteristik NES özelliklerine sahiptir (örn. Crm1 ile zayıf interaksiyon verirler). Bu durum yaban tip NPM'nin büyük çoğunluğunun neden nükleolus da lokalize olduğunu açıklar (Falini vd. 2007a, Şekil 2.6, Falini vd. 2007b).



Şekil 2.6 Yaban tip NPM'nin nükleositolplazmik trafiği (Falini vd. 2007a)

NPMwt: wild (yaban) tip NPM, NLS: nükleer lokalizasyon sinyali, NES: nükleer eksport sinyali, MB: metal bağlama domaini, AC: asidik bölge

Nükleoplazma ve sitoplazmada bulunan NPM miktarı oldukça düşük olmasına rağmen, ribozom biyogenezi ve sentrozom duplikasyonu gibi regülasyonu oldukça kritik olan bazı hücresel süreçlerle ilişkilenen NPM fonksiyonları, NPM'nin nükleoplazmada veya sitoplazmada bulunmasını gerektirir. Sitoplazma veya nükleoplazmadaki NPM seviyeleri hücre içi kompartmanlar arasındaki NPM trafiğine bağlı olarak değişir (Falini vd. 2007a).

2.9 *NPM1* Gen Mutasyonları

2005 yılında Falini ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan *NPM1* gen mutasyonları normal karyotipli AML vakalarında en sık rastlanan genetik bozukluklardır. Söz konusu mutasyonlar NPM'nin anormal sitoplazmik yerleşimi ile sonuçlanır. *NPM1* mutasyonları AML spesifiktir ve bu duruma paralel olarak diğer insan neoplazmları nükleus sınırlı NPM yerleşimi ile ilişkilendirilir. Ancak *NPM1* gen mutasyonları düzensiz aralıklarla kronik myeloproliferatif bozukluklarda da saptanmıştır. Caudill ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada 60 kronik myelomonositik lösemi (KMML) hastasından 3'ünün *NPM1* gen mutasyonlarını taşıdığı fakat her üç hastada bir yıldan daha az bir süre içinde AML geliştiği gözlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada 38 MDS hastasından yalnızca 2'sinde *NPM1* gen mutasyonlarına rastlanmıştır. Ancak bu bulgunun daha ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Zhang vd. 2007). *NPM1* gen mutasyonlarına genellikle de novo AML'li hastalarda rastlanırken; söz konusu mutasyonlar sekonder AML gelişiminde çok nadir görülmektedir (Rau ve Brown 2009).

AML hastalarının yaklaşık 1/3'ünde *NPM1* gen mutasyonlarına rastlanmasına karşın 79 insan miyeloid hücre hattından yalnızca birinde *NPM1* gen mutasyonlarının varlığı tespit edilmiştir. OCI-AML3 adlı hücre hattı Ontario Kanseri Enstitüsü, Ontario, Kanada'da oluşturulmuştur. Söz konusu hücre serisinde *NPM1* mutasyonu (mutasyon A) ve buna bağlı olarak sitoplazmik NPM ekspresyonu görülür ve bu nedenle OCI-AML3 hücre serisinde NPM mutasyonunun ilişkilendiği spesifik özellikleri tanımlamak mümkündür (Falini vd. 2007b).

NPM1 mutasyonları karakteristik olarak heterozigottur ve bu duruma bağılı olarak yaban tip allellerden biri korunmuştur. Mutasyonlar çoğunlukla, ekzon 12 ile sınırlıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda *NPM1* geninin 12. ekzonunda meydana gelen 55 farklı tip mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar 956.- 971. pozisyonlar arasında meydana gelir. En sık rastlanan *NPM1* mutasyonu 956-959. pozisyonda bulunan TCTG tetranukleotidin duplikasyonudur. Vakaların yaklaşık %75-80'inde görülür ve mutasyon A olarak adlandırılır. Mutasyon B ve D olarak adlandırılan mutasyonlar %10 ve %5 oranında görülürken diğer mutasyon tiplerine çok nadir rastlanır. Mutasyon tipinden bağımsız olarak, tüm mutasyon varyantları, 4-5 bazlık bir kazanım ile NPM proteinin C-terminalini kodlayan bölgede bir çerçeve kaymasına neden olur. Bu durum C terminalinde bulunan aromatik triptofan rezidülerinin kaybı ve sonuç olarak da NPM'nin anormal sitoplazmik ekspresyonu ile sonuçlanır (Chen vd. 2006, Falini vd. 2007a, Calvo vd. 2009, Rau ve Brown 2009).

Sitoplazmik NPM'nin söz konusu olduğu hastaların genellikle normal karyotipe sahip oldukları ve tekrarlayan kromozomal anomalilerden yoksun oldukları görülmüştür. Ancak NPM mutasyonunu taşıyan AML vakalarının yaklaşık %14'ünde kromozomal anomalilere rastlanmıştır. Fakat söz konusu kromozomal bozuklukların sekonder olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu anomalilerin tekrarlayan genetik anomaliler taşıyan AML hastalarında görülen sekonder kromozomal bozukluklarla tip ve frekans açısından benzer oldukları görülmüştür. Ayrıca sitoplazmik NPM taşıyan AML hastalarında görülen kromozomal bozuklukları taşıyan lösemik populasyon dahilinde normal karyotipli alt klonların varlığı dikkat çekmektedir ve söz konusu anomaliler normal karyotipli AML vakalarında nüks durumunda ortaya çıkmaktadır (Falini vd. 2007a).

Sitogenetik açıdan normal olan AML vakalarında çeşitli gen mutasyonları tanımlanmıştır. Fms-ilişkili tirozin kinaz 3 (*FLT3*) gen mutasyonları da normal karyotipli AML vakalarında oldukça sık rastlanan değişimlerdir. *NPM1* gen mutasyonlarının görülme sıklığının, *FLT3* mutasyonlarının görülme sıklığı ile ilişkilendirilmesi dikkat çekicidir. *FLT3*-ITD mutasyonları *NPM1* mutasyonunu taşıyan normal karyotipli AML vakalarında *NPM1* mutasyonunu taşımayan normal karyotipli AML vakalarına oranla iki kat daha sık görülür (Schlenk vd. 2008).

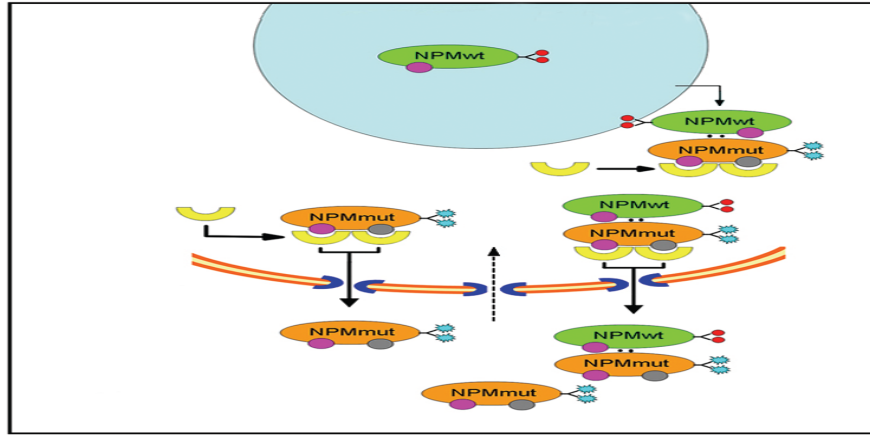
2.10 Mutant Nükleofosminin Nükleositoplazmik Trafığı

NPM1'in 12. ekzonunda meydana gelen mutasyonlar, proteinin C terminalinde dizi değişimlerine yol açar. Söz konusu dizi değişimleri sonucunda meydana gelen iki farklı durum mutant NPM proteinlerinin anormal sitoplazmik lokalizasyonuna neden olur. Bunlardan birincisi, mutasyon sonucunda *NPM1* lösemik mutantlarının Crm1-bağımlı nükleer eksportunu destekleyen ek bir lösin zengini NES motifinin oluşumudur. İkincisi ise 288. ve 290. pozisyonadaki triptofan rezidülerinin kaybıdır (Grummitt vd. 2008)

Spesifik eksportin-1/Crm1-inhibitörlerinin sitoplazmik NPM akümüasyonunu blokladığı görülmüştür. Sözü edilen bu bulgu sitoplazmik mutantların sitoplazmaya çıkışlarının NES aracılığıyla gerçekleştiğinin bir göstergesidir. Bu durum 2 adet NES motifi taşıyan NPM'nin nükleolusdaki yerleşimi ile bağdaşmıyor gibi görünse de NES motiflerinin zayıf aktivitesi göz önünde bulundurulduğunda NPM'nin nükleolar yerleşimi açıklanabilir. Mutant NPM'de oluşan ek NES motifi sitoplazmik birikim için ek bir güç oluşturur. Fakat NES motifleri tek başına nükleer eksport için yetersizdir. Çünkü 288. ve 290. pozisyonda bulunan aromatik aminoasitler NPM'nin nükleolar yerleşimini destekler. NPM lösemik mutantlarının %95'inden fazlası 288 ve 290. pozisyonda bulunan triptofan rezidülerinden yoksunken, geriye kalan yaklaşık %4'lük kısımda yalnızca 290. pozisyonadaki triptofan rezidüsünün kaybı söz konusudur. Ancak buna karşın tüm lösemik mutantlar sitoplazmada yerleşiktir. Anlaşılacağı üzere 288. pozisyonda bulunan triptofanın varlığı nükleolar yerleşim için yetersizdir. Lösemik mutantların C terminalinde oluşan ek NES motifi triptofan rezidülerinden birinin veya her ikisinin kaybedilmesine bağlı olarak farklılık gösterir. Her iki triptofanın kaybıyla sonuçlanan mutasyonlar en sık rastlanan NES motifi ile ilişkilendirirken (L-xxx-V-xx-V-x-L), yalnızca 290. pozisyonadaki triptofanın kaybıyla sonuçlanan mutasyonlar en sık rastlanan NES motifinin varyantlarının oluşumu ile sonuçlanır (örn. ikinci pozisyonadaki valinin lösin, fenilalanin, sistein veya metiyoninle yer değiştirmesi sonucu oluşan NES motifi). Sonuç olarak söz edilen NES varyantlarının mutant proteinin sitoplazmaya taşınmasında daha etkili olduğu düşünülür. Çünkü 288. pozisyonda bulunan triptofana rağmen mutant protein söz konusu NES motifinin güçlü etkisiyle sitoplazmaya taşınır (Falini vd. 2007a, b)

Tüm bu veriler göz önüne alındığında NPM lösemik mutantlarının anormal sitoplazmik yerleşimi açıklanabilir. NPM lösemik mutantlarının nükleolusa bağlanma kapasitesi triptofan rezidülerinden her ikisinin kaybıyla tamamen, yalnızca 290. pozisyonda bulunan triptofanın kaybıyla ise kısmen engellenir. Mutasyon sonrasında oluşan ek C terminal NES motifi mutant proteinleri Crm1 bağlanması için avantajlı hale getirir. Bu şartlar altında NES-Crm1 bağımlı nükleer eksport, nükleer içe alımdan daha etkilidir ve sonuç olarak mutant proteinler sitoplazmada birikir (Falini vd. 2007a, Falini vd. 2007b, Şekil 2.7).

Ayrıca mutant NPM proteinlerinin, yaban tip NPM proteinlerini nükleolusdan nükleoplazmaya oradan da sitoplazmaya taşıdığı bildirilmiştir. NPM mutantları korunmuş N terminal dimerizasyon domaini aracılığıyla wtNPM proteinleri ile heterodimerler oluşturur ve yaban tip proteinleri de beraberinde sitoplazmaya çıkarır. Ayrıca NPM'ye bağlı halde bulunan ARF'de mutasyonlar sonucunda sitoplazmaya çıkar (Falini vd. 2007a, b).



Şekil 2.7 Mutant NPM'nin nükleositoplazmik trafiği (Falini vd. 2007b)
NPMmut: mutant NPM, NPMwt: wild (yaban tip) NPM

2.11 *NPM1* Gen Mutasyonlarının Prognostik Önemi

NPM1 mutasyonlarını taşıyan AML vakaları, yaban tip *NPM1* içeren AML vakalarına göre, daha uzun hastalıksız sağ kalım oranına (event free survival) sahiptir ve uzun bir total yaşam süresine (overall survival) eğilim gösterir (Schnittger vd. 2005). Ayrıca, *NPM1* mutasyonlarını taşıyan AML vakalarında beyaz küre (WBC) sayısı ve kemik iliği blast sayısı yüksektir (Döhner vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Schnittger vd. 2005). Blast sayısı *FLT3*/ITD mutasyonu ve LDH serum seviyelerindeki artış ile birlikte eş zamanlı olarak artar (Döhner vd. 2005). Lenfadenopati ve gingival hiperplaziye kapsayan ekstrameduller tutulum sıklıkla görülür (Döhner vd. 2005). Trombosit sayısı yüksektir (Döhner vd. 2005, Thiede vd. 2006). Çeşitli hücre hatlarının (lenfoid haricinde, miyeloid, monositik, eritroid ve megakaryosit) tutulumu söz konusudur (Pasqualucci vd. 2006). *NPM1* mutasyonlarının söz konusu olduğu AML çoğunlukla bir de novo lösemi olmasına ve “multilineage” tutulumun esasen sekonder lösemilerle ilişkilmesine karşın *NPM1* mutasyonlarını taşıyan AML vakalarında multilineage tutulumun yüksek bir frekansı söz konusudur (Falini vd. 2007a). *NPM1* mutasyonlarını taşıyan vakalar hematopoetik kök hücre yüzey belirteçlerinden (CD34 ve CD133) yoksundur. Fakat CD13 ve CD33 gibi diğer miyeloid antijen belirteçleri mevcuttur (Falini vd. 2005).

Relaps durumunda mutasyonun kaybına çok nadir rastlanır. Mutasyon, stabilitesinden dolayı, *NPM1* mutasyonlarının, minimal rezidüel hastalıkların izlenmesinde ve hastalığın persistansının takibinde moleküler belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Boissel vd. 2005). *NPM1* gen mutasyonlarını taşıyan AML vakalarında *FLT3* gen mutasyonlarının görülme sıklığı oldukça yüksektir. Ancak *NPM1* gen mutasyonları ve *P53*, *N-RAS*, *CEBPA* ve *MLL* gen mutasyonları veya tekrarlayan kromozomal anomaliler arasında önemli bir ilişki saptanmamıştır (Falini vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Suzuki vd. 2005).

NPM1 mutasyonu akut promiyelositik lösemi (FAB-M3) haricindeki tüm AML hastalarında değişen sıklıklarla görülür. *NPM1* mutasyonunun görülme sıklığı olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemide (FAB-M2) düşükken (%20 civarında),

akut miyelomonositik lösemi (FAB-M4, %40-50), akut monoblastik lösemi (FAB-M5a, %40-50) ve özellikle de akut monositik lösemide (FAB-M5b, %90'dan fazla) yüksektir (Falini vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Döhner vd. 2005, Boissel vd. 2005).

Çocuklarda *NPM1* mutasyonlarının görülme sıklığı erişkin AML vakalarına göre düşüktür. 3 yaşından küçük AML vakalarında *NPM1* mutasyonlarına rastlanmazken, 3 yaşından büyük AML'li çocuk hastalarda söz konusu mutasyonların görülme oranı %10 civarındadır (Brown vd. 2007). AML vakalarında *NPM1* mutasyonlarının görülme sıklığı, yaş ile doğru orantılı olarak artar. 21-35 yaş arası bireylerde %15, 35-60 yaş arası bireylerde %40, 60 yaş ve üstü bireylerde ise %50 oranında *NPM1* mutasyonlarına rastlanır (Rau ve Brown 2009). Ayrıca *NPM1* mutasyon tipleri de yaş ile birlikte farklılık gösterir. Mutasyon A dışındaki çok sık rastlanmayan *NPM1* mutasyon tipleri çocuklarda ve gençlerde daha sık görülme eğilimindedir (Thiede vd. 2007).

Yapılan bazı çalışmalar sonucunda *NPM1* gen mutasyonlarının AML'li kadın hastalarda daha yüksek oranda meydana geldiği rapor edilirken (Thiede vd. 2006, Döhner vd. 2005, Schnittger vd. 2005) bazı çalışmalarda ise *NPM1* mutasyon frekanslarının cinsiyete göre farklılık gösterdiğine dair önemli bir bulguya rastlanmamıştır (Falini vd. 2005, Suzuki vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Boissel vd. 2005). Ayrıca *NPM1* mutasyon sıklıkları global anlamda da değişim gösterir. Söz konusu mutasyonların insidansının batı ülkelerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda batı ülkelerinde yapılan çalışmalar sonucunda tüm AML vakalarının yaklaşık %35'inde *NPM1* gen mutasyonlarının söz konusu olduğu ve bu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %60'ından fazlasının normal karyotipe sahip olduğu gözlenmiştir (Falini vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Boissel vd. 2005, Döhner vd. 2005, Thiede vd. 2006). Ancak Asya ülkelerinde *NPM1* mutasyon sıklıklarının batı ülkelerine oranla daha düşük olması dikkat çekmektedir. Çin ve Japon AML hastalarının dahil edildiği çalışmalar sonucunda mutasyon sıklıklarının %14.3-28.2 aralığında değişim gösterdiği rapor edilmiştir. (Zhang vd. 2007, Suzuki vd. 2005, Chou vd. 2006, Yan vd. 2007). Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, etnik köken ve coğrafik dağılıma bağlı olarak değişim gösterebileceği düşünülen (Rau ve Brown

2009) *NPM1* mutasyon sıklıklarının Türk AML hastalarında da farklılık göstermesi olasıdır.

2.12 *NPM1* Mutasyonlarının Klinik Önemi

Mutant *NPM1* taşıyan AML hastaları *NPM1* mutasyonunu taşımayan AML hastalarından klinik özellikler, tedaviye yanıt verme ve prognoz açısından farklıdırlar. Sonuç olarak *NPM1* ile yapılan çalışmalar tanısal sınıflandırma, minimal rezidüel hastalıkların (MRH) saptanması, prognoz ve tedavi açısından önemlidir (Ruan vd. 2009).

Minimal rezidüel hastalıkların takibi AML hastalarında güçlü bir prognostik öneme sahiptir çünkü pozitif çıkan MRH durumu, artan relaps riskiyle ilişkilendirilir (Scholl vd. 2007). Ayrıca AML hastalarında allojenik kök hücre transplantasyonundan (KHT) sonra takip sırasında MRH'nin izlenmesi tedaviye verilen yanıtın saptanması ve terapötik kararlar için oldukça önemlidir. Bu nedenle minimal rezidüel hastalıkların takibi için güvenilir belirteçlere ihtiyaç duyulur. *NPM1* mutasyonlarının stabilite ve yüksek görülme sıklıklarından dolayı minimal rezidüel hastalıkların takibinde belirteç olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir (Bacher vd. 2009).

İndüksiyon tedavisinden sonra, normal karyotip içeren AML vakalarında, *NPM1* mutasyonunu taşıyan hastalar, mutasyonu taşımayan hastalara oranla, daha yüksek tam remisyon oranına sahiptir (Falini vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Suzuki vd. 2005 Thiede vd. 2006). Ancak kemoterapiye yanıt ile ilişkili olarak *NPM1* mutasyon statüleri bağımsız bir prediktör değildir, çünkü indüksiyon tedavisinden sonra remisyon oranı *NPM1* mutasyon statülerinin yanında *FLT3/ITD* mutasyon statüleri ile ilişkili olarak da değişir. En yüksek tam remisyon oranı *NPM1* mutasyonunu taşıdığı halde *FLT3/ITD* mutasyonunu taşımayan hastalarda gözlenirken, her iki mutasyonu da taşıyan AML hastaları tedaviye minimum seviyede yanıt verme özelliğine sahiptirler (Döhner vd. 2005). Ayrıca; *NPM1* mutasyonunu taşıyan AML vakaları, *FLT3/ITD* mutasyonlarının yokluğunda iyi prognozla ilişkilendirilir (Schnittger vd. 2005, Döhner vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Thiede vd. 2006).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Grubu

Bu çalışma kapsamında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D., Hematoloji B.D.'nda tanısı konmuş ve tedavisi devam eden aydınlatılmış onamları alınmış 44 AML hastasına ait genetik materyal (RNA) örnekleri çalışılmıştır (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Karar No: 154-4950; Ek 1) AML hastalarına ait RNA örnekleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji B.D. Erişkin Hematoloji Laboratuvarı'nda anonim olarak saklanmakta olan, örnekler arasından rastgele seçilmiştir. Araştırmaya katılan bireylerin AML dışında tanısı konulmuş herhangi bir hastalık öyküsüne sahip olmaması çalışmaya dahil edilme kriterleri arasında tutulmuştur.

Sağlıklı kontrol grubunu oluşturmak amacıyla ise 12 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Karar No: 154-4950; Ek 1). Araştırmaya katılan bireyler rastgele seçilmiştir. Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan bireylerin herhangi bir hastalık öyküsüne sahip olmaması çalışmaya dahil edilme kriterleri arasında tutulmuştur. Kontrol grubuna dahil edilen her birey çalışmanın amacı ve içeriği hakkında bilgilendirilmiş ve yapılacak çalışma için onayları alınmıştır (Ek 2).

3.2 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

3.2.1 RNA izolasyonu için kullanılan sarf malzemeler

RNA izolasyonu için kullanılan reaktif maddeler çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 RNA izolasyonu için kullanılan reaktif maddeler

Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog No
Trizol	Invitrogen	15596-026
Kloroform	Merck	1024452500
İzopropil alkol	Merck	1096342500
%75'lik etanol (RNaz free H ₂ O ile hazırlanır)	Merck	1009832500
RNaz free H ₂ O (1000 ml deiyonize su içine 1 ml DEPC eklenerek hazırlanır)	-	-

3.2.2 cDNA sentezi için kullanılan sarf malzemeler

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche, katalog no. 05 081 955 001) kullanılmıştır. Kitin içeriği çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kitinin içeriği

1) Transcriptor high fidelity reverz transkriptaz (55 µl) Saklama Tamponu: 200 mM potasyum fosfat, 2 mM dithiothreitol, %0.2 Triton X-100 (v/v) % 50 gliserol (v/v) pH 7.2	6) DTT (1ml [0.1 M])
2) Transcriptor high fidelity reaction buffer [5X] (1ml) 5X konsantrasyon: 250 mM Tris/HCl 150 mM KCl 40 mM MgCl ₂ pH 8.5	7) H ₂ O, PCR grade (1ml)
3) Protector RNaz inhibitör (50 µl [40 U/ µl]) Saklama Tamponu: 20 mM Hepes-KOH 50 mM KCl 8 mM dithiothreitol %50 gliserol (v/v) pH 7.6	8) Kontrol RNA (20 µl [50 ng/µl]) *Ölümsüz bir hücre hattından [K562] purifiye edilen total RNA fraksiyonununundan sağlanmıştır
4) Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımı (200 µl) (10 mM her bir dNTP)	9) Kontrol primer karışımı (40 µl) * 5 µM insan porfobilinojen deaminaz (PBGD) spesifik forward ve reverse primerler
5) Random hexamer primer (100 µl [600 µM])	10) Anchored oligo(dT) ₁₈ Primer (100 µl [50 µM])

3.2.3 Nested polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için kullanılan sarf malzemeler

PCR için kullanılan reaktif maddeler çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 PCR için kullanılan reaktifler

Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog No
- Hot start DNA Taq Polimeraz Saklama Tamponu: 20 mM Tris-HCl 100 mM KCl 0.1 mM EDTA %50 gliserol (v/v) pH 8.7 - DNA Taq polimeraz tampon (10X) 10X konsantrasyon: Tris/HCl (NH ₄) ₂ SO ₄ Detergent - MgCl₂ (25 mM)	Solis Biodyne	01-02-00500
dNTP karışımı	Vivantis	VSNP2406
10 bç DNA marker	Fermentas	SM1313
50 bç DNA marker	Jena Bioscience	M-233
Primerler	Alpha DNA	

3.2.4 Agaroz jel elektroforezi için kullanılan sarf malzemeler

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan kimyasal malzemeler çizelge 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Agaroz jel elektroforezi için kullanılan kimyasal malzemeler

Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog No
Agaroz	Prona	
Tris	Bio Basic Inc	TB0194
Borik Asit	Amresco	0588
EDTA	AppliChem	A2937
NaOH	Sigma-Aldrich	06203
Etidyum Bromür	AppliChem	A1151

3.2.5 Poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan sarf malzemeler

Poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan kimyasal malzemeler çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan kimyasal malzemeler

Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog No
Akrilamid	Merck	110784
Bisakrilamid	AppliChem	A3636
TEMED	Sigma-Aldrich	T9281
Amonyum per sülfat (APS)	Sigma-Aldrich	A9164
Etidyum Bromür	AppliChem	A1151
Tris	Bio Basic Inc	TB0194
Borik Asit	Amresco	0588
EDTA	AppliChem	A2937
NaOH	Sigma-Aldrich	06203

3.2.6 Jel yükleme tamponu için kullanılan sarf malzemeler

PCR ürünlerinin, yoğunluğunun artırılmasıyla, söz konusu ürünlerin agaroz ve poliakrilamid jeldeki kuyucuklara düzgün olarak aktarılabilmesi için jel yükleme tamponu kullanılmıştır. Jel yükleme tamponu için kullanılan kimyasal malzemeler çizelge 3.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 Jel yükleme tamponu için kullanılan kimyasal malzemeler

Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog No
Xylene Cyanol	Amresco	0819
Gliserol	AppliChem	A2926

3.2.7 Yürütme tamponu için kullanılan sarf malzemeler

DNA'nın elektroforetik hareketliliğini sağlayan yürütme tamponunun hazırlanması için kullanılan kimyasal malzemeler çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7 Yürütme tamponunun hazırlanması için kullanılan kimyasal malzemeler

Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog No
Tris	Bio Basic Inc	TB0194
Borik Asit	Amresco	0588
EDTA	AppliChem	A2937
NaOH	Sigma-Aldrich	06203

3.2.8 EDTA solüsyonu için kullanılan sarf malzemeler

EDTA solüsyonu için gerekli olan kimyasal malzemeler çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8 EDTA solüsyonu için gerekli olan kimyasal malzemeler

Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog No
EDTA	AppliChem	A2937
NaOH	Sigma-Aldrich	06203

3.2.9 Etidyum bromür solüsyonu için kullanılan sarf malzemeler

Etidyum bromür solüsyonu için gerekli olan kimyasal malzemeler çizelge 3.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9 Etidyum bromür solüsyonu için gerekli olan kimyasal malzemeler

Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog No
Etidyum Bromür	AppliChem	A1151

3.3 Çalışmada Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

Solüsyonlar genel anlamda konsantre stok solüsyonlar şeklinde hazırlanmış olup, çalışma için gerekli olan konsantrasyonlara ulaşmak için stoklar belli oranlarda seyreltilmiştir. Aşağıdaki formül kullanılarak istenilen konsantrasyonlar hesaplanmıştır.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

M1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V1 = Stoktan alınması gereken miktar (V)

M2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V2 = Hazırlanacak olan çözelti miktarı (V)

3.3.1 10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu (pH 8)

Tris base	81g
Borik Asit	41.5g
EDTA (0.5M)	30 ml

- Tartılan kimyasallar dH₂O içerisinde çözülür, pH 8’e ayarlanır ve dH₂O ile son hacim 750 ml’ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.
- Presipitat oluşmuş ise kullanılmaz.

3.3.2 0.5 M EDTA

EDTA 18.61g

NaOH $\approx$ 2 g

- EDTA dH₂O içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür, dH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- pH NaOH ile 8.0'e ayarlanır.
- EDTA içerisindeki disodyum tuzları pH 8'e gelmeyince çözünmemektedir.

3.3.3 %30'luk akrilamid stoğu (29:1)

Akrilamid 29 g

Bisakrilamid 1 g

- Tartılan kimyasallar dH₂O içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür, dH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- Çözündükten sonra filtre çapı 0.2 μ m olan steril filtreden geçirilir.
- Koyu renkli bir şişede +4°C'de saklanır.

3.3.4 %10 APS

APS 60 mg

dH₂O 600 μ l

- APS, dH₂O içerisinde vortekslenerek çözülür.
- Her defasında taze hazırlanır.

3.3.5 Yükleme tamponu

Xylene Cyanol 25 mg

Gliserol 5 ml

dH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır.

- 14 ml'lik falkon tüpü içerisinde vortekslenerek karıştırılır.
- Alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'de saklanır.

3.3.6 Yürütme tampon

1XTBE

- Konsantre stok (10XTBE) olarak hazırlanmış olan tampondan 10 kat sulandırılarak hazırlanır.

3.3.7 Etidyum bromür (10 mg/ml stok)

Etidyum bromür 10 mg

sdH₂O 1 ml

- Etidyum bromür dH₂O içerisinde vortekslenerek çözülür.
- Işığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak + 4°C’de saklanır.

3.4 Agaroz ve poliakrilamid jelin hazırlanması

Agaroz ve poliakrilamid jel hazırlanması için gerekli olan kimyasalların kullanım miktarları çizelge 3.10’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10 Agaroz ve poliakrilamid jel hazırlanması için gerekli olan kimyasalların kullanım miktarları

	JEL %	Akrilamid stoğu	Agaroz	10XTBE	APS	TEMED	dH₂O	Et-Br
Poliakrilamid Jel (60 ml)	12	24ml	-	6ml	600 µl	40 µl	30ml	-
Agaroz Jel (100 ml)	1	-	1gr	10ml	-	-	90ml	3 µl
Agaroz Jel (100 ml)	2	-	2gr	10ml	-	-	90ml	3 µl

3.4.1 Agaroz jelin hazırlanması (100 ml)

- Jelin konsantrasyonuna bağlı olarak gerekli miktarda agaroz 1XTBE içerisinde mikrodalga fırında ısıtılarak eritilir.
- Jelin sıcaklığı yaklaşık 60°C'ye gelince stok etidyum bromür çözeltisinden (10 mg/ml) 3µl eklenir.
- İyice karıştırıldıktan sonra elektroforez tankına dökülür.

3.4.2 %12'lik Poliakrilamid Jelin Hazırlanması (60 ml)

Akrilamid stoğu	24 ml
10XTBE	6 ml
%10 APS	600 µl
TEMED	40 ml
dH ₂ O	30 ml

Karıştırılır ve dökülür.

3.5 RNA İzolasyonu

Trizol RNA/DNA/Protein ekstraksiyonunda kullanılan kimyasal bir solüsyondur. Doku ve hücrelerden total RNA izolasyonu için kullanıma hazır bir kimyasal olan trizol, fenol ve guanidin izotiyosiyanatın monofazik bir solüsyonudur. Trizol ile RNA izolasyonunun prensibi, doku ya da hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp fenol yardımıyla RNA'nın ekstrakte edilmesine dayanır. Yöntemin orjinal hali, Chomczynski ve Sacchi tarafından 1987'de tanımlanan protokolün geliştirilmiş formudur. RNA izolasyonu için kullanılacak olan örneğin trizol ile homojenizasyonu, hücreyi parçalayıp hücre komponentlerinin dağılmasına neden olurken RNA bütünlüğünün korunmasını sağlar. Trizol ile homojenize edilen örneğe santrifüj aşamasından sonra kloroform eklenmesi akuatik ve organik faz olmak üzere iki fazın oluşumu ile sonuçlanır. RNA üstteki akuatik fazda, DNA ara fazda, protein ise organik fazda bulunur. Akuatik fazda bulunan RNA izopropil alkol ile presipite edilir. Son olarak etil alkol ile yıkanan RNA DEPC'li su içinde çözünür.

Sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örneklerinden, standart Trizol çözeltisi kullanılarak, aşağıda tanımlanan şekilde total RNA elde edilmiştir.

- EDTA (100 µl, 0,5 M)'lı tüpe 1 ml periferik kan alınır.
- EDTA'lı tüpe alınan kandan 1,5ml'lik steril ependorf tüpüne 200µl aktarılır.
- 200 µl kan üzerine 1 ml Trizol eklenir ve kan örneği Trizol içinde homojenize edilir.
- Homojenize edilen örnek 5 dakika boyunca 15-30°C'de inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında Trizol çözeltisinin 1/5'i kadar (0.2 ml) kloroform eklenir.
- Örnek, 15sn süreyle elle güçlü bir şekilde çalkalanır ve 15-30°C'de 2-3 dk inkübe edilir.
- 12000 g'de 4°C'de 15 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrasında en üstte kalan akuatik faz 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılır ve üzerine eklenen Trizol çözeltisinin (1 ml) yarısı kadar (0.5 ml) izopropil alkol eklenir.
- 10 dakika boyunca 15-30°C'de inkübe edilir.
- 12000 g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilerek RNA'nın presipite olması sağlanır.
- Süpernatant atılır ve RNA peleti üzerine yıkama amaçlı olarak 1ml %75'lik etanol ilave edilerek hafifçe vortekslenir.
- 7500 g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır ve RNA kurumaya bırakılır.
- Kurutulan RNA peleti 100µl DEPC'li su ile çözülür.
- RNA -80°C'de saklanır.

İzole edilen RNA örneklerinin, miktarlarını ve saflık oranlarını belirlemek amacı ile NanoDrop'da spektrofotometrik ölçümler alınmıştır. Spektrofotometrik ölçüm aşağıdaki gibi yapılmıştır:

- Çözülmüş RNA örneğinden 2 µl alınır.
- NanoDrop'da spektrofotometrik ölçümler OD₂₆₀ ve OD₂₈₀ değerleri dikkate alınarak yapılır.
- 260 ve 280 nm'deki optik dansite değerlerinin oranı (OD₂₆₀ /OD₂₈₀) hesaplanarak RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlenir.

Elde edilen RNA'lar, %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek RNA bütünlüğü çalışma öncesi değerlendirilmiştir.

3.6 cDNA Sentezi

cDNA sentezi, sağlıklı bireylerden ve AML hastalarından elde edilen RNA örneklerinden, Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için esas alınan protokol aşağıdaki gibidir.

- Herbir örnek için 0,2 ml'lik PCR tüplerine toplam hacim 11,4 µl olacak şekilde;
 - RNA (30 ng total)
 - Random hexamer primer (60µM)
 - H₂O, PCR gradekonularak “template-primer mix” hazırlanır.
- Hazırlanan karışım 65°C'de 10 dakika inkübe edilir.
- Inkübasyon aşamasından sonra template-primer mix hızlıca buza alınır.
- Final konsantrasyonları 1xreaksiyon buffer, 20U protector RNaz inhibitör, 1mM her bir dNTP, 5mM DTT ve 10U revers transkriptaz enzimi içeren reaksiyon karışımı hazırlanır.
- Denatüre edilen template-primer mix üzerine, hazırlanan reaksiyon karışımından toplam hacim 20 µl olacak şekilde eklenir.
- 29°C'de 10 dakika, sonrasında 48°C'de 60 dakika inkübe edilir.
- Daha sonra 85°C'de 5 dakika boyunca revers transkriptaz enzimi inaktive edilir.
- Reaksiyon tüpleri buza alınarak reaksiyon sonlandırılır.
- Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilir.

Çizelge 3.11 cDNA sentezi

Template-Primer Mix		
Komponent	Hacim	Final Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	30 ng
Random Hexamer Primer	2µl	60µM
H ₂ O, PCR-grade	Değişken	Son hacim H ₂ O ile 11.4 µl'ye tamamlanır.
Toplam Hacim 11.4 µl		
65°C'de 10 dk ➡ inkübasyon		
Master Mix		
Komponent	Hacim	Final Konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverz Transkriptaz Reaksiyon Buffer (5X)	4 µl	1X
Protector RNaz İnhibitor (40 U/ µl)	0.5 µl	20 U
Deoksinükleotid Karışımı (10 mM her bir dNTP)	2 µl	1 mM her bir dNTP
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz	1.1 µl	10 U
Toplam Hacim 20 µl		
29°C'de 10 dk ➡ inkübasyon		
48°C'de 60 dk ➡ inkübasyon		
85°C'de 5 dk ➡ revers transkriptaz inaktivasyon		

3.6.1 cDNA kontrol PCR

cDNA eldesi sonrasında, elde edilen cDNA'ların varlığını kontrol etmek amacıyla cDNA'lar kit içerisinde bulunan kontrol primer karışımı varlığında (insan porfobilinojen

deaminaz (PBGD) spesifik forward ve reverse primerler) gerçekleştirilecek olan amplifikasyon için kalıp olarak kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan kontrol RNA (Ölümsüz bir hücre hattından [K562] purifiye edilen total RNA fraksiyonununundan sağlanmıştır) kullanılarak sentezlenen cDNA PCR reaksiyonu için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları ve reaksiyon karışımı çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.12 cDNA kontrol PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve PCR koşulları

Pcr Koşulları	1 tekrar	94 °C	5 dk
	35 tekrar	94 °C	10 sn
		50 °C	1 sn
		72 °C	30 sn
	1 tekrar	72 °C	7 dk
		Toplam Hacim	Final Konsatrasyonu
Reaksiyon Karışımı	Hot Start Taq DNA polimeraz Tampon(-MgCl ₂ ,10X)	5 µl	1X
	MgCl ₂ (25mM)	3 µl	1,5mM
	dNTP(10 mM)	1 µl	0.2mM
	Kontrol Primer Karışımı PBGD (5 µM)	2 µl	0.2 µM
	cDNA	5µl	
	Hot Start Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.4 µl	2U
	dH ₂ O	33,6 µl	
TOPLAM HACİM		50 µl	

PCR reaksiyonu sonrasında ürünün varlığını kontrol etmek amacıyla %2’lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. PCR ürünlerinden 15µl alınarak 2 µl yükleme tamponuyla birlikte jele yüklenmiştir. Agaroz jelde 130 V’da 20 dakika uzunlukları bilinen kontrol markerları eşliğinde yürütüldükten sonra, jel görüntüleme cihazı ile reaksiyon sonuçları değerlendirilmiştir

3.7 Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışma kapsamında *NPM1* geni 12. ekzon mutasyonlarının gerçekleştiği gen bölgesi uygun primerler varlığında nested PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Reaksiyon koşulları, reaksiyon karışımları ve kullanılan primer dizileri çizelge 3.13’de verilmiştir.

Çizelge 3.13 *NPM1* geni 12. ekzon mutasyonlarının gerçekleştiği gen bölgesinin amplifikasyonu için gerekli olan primer dizileri, reaksiyon koşulları ve reaksiyon karışımları

Primer Dizileri (5'→ 3')	1. Aşama PCR		2. Aşama PCR	
	NPM-F: GCG CGG TTG TTC TCT GGA GCA GCG TTC		NPM-F:CTT-CCC-AAA-GTG-GAA-GCC	
	NPM-R: CCT GGA CAA CAT TTA TCA AAC ACG GTA GGG AA		NPM-R: TTA ACA AAT TGT TTA AAC T	
Per Koşulları	95 °C 5 dk		95 °C 5 dk	
	94 °C 45 sn 54 °C 1 dk 72 °C 90 sn		95°C 30 sn 45 °C 30 sn 72 °C 30 sn	
	42 döngü		39 döngü	
	72 °C 5 dk		72 °C 5 dk	
Reaksiyon Karışımı	cDNA (30 ng)	1 µl	1.aşama PCR ürünü	0,2µl
	Primerler(10pmol/µl)	0,5µl	Primerler(10pmol/µl)	0,5µl
	dNTP(2,5mM)	2,5µl	dNTP(2,5mM)	2,5µl
	MgCl ₂ (25mM)	3 µl	MgCl ₂ (25mM)	3 µl
	Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0,2 µl	Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0,2 µl
	Tampon(-MgCl ₂ ,10X)	2,5µl	Tampon(-MgCl ₂ ,10X)	2,5µl
	Toplam Hacim	25 µl	Toplam Hacim	25 µl

Birinci aşama PCR reaksiyonunda hazırlanan cDNA'ların 1 µl'si *NPM1* geninin 12. ekzonunu kapsayan 1092 baz çifti büyüklüğündeki bir fragmente özgü primerler varlığında amplifiye edilmiştir. Birinci aşama PCR reaksiyonu, çizelge 3.12'de belirtilen şekilde toplam hacmi 25µmol olan bir karışım hazırlanarak çizelge 3.12'de belirtilen koşullarda thermocycler'da gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu sonrasında ürünün varlığını kontrol etmek amacıyla %1'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. PCR ürünlerinden 5µl alınarak 2 µl yükleme tamponuyla birlikte jele yüklenmiştir. Agaroz jelde 120 V'da 25 dakika yürütüldükten sonra, jel görüntüleme cihazı ile reaksiyon sonuçları değerlendirilmiştir.

İkinci aşama PCR reaksiyonunda ise, birinci aşama PCR sonucu elde edilen PCR ürünlerinin 0.2 µl'si 130 baz çifti büyüklüğünde bir fragmente özgü primerler varlığında amplifiye edilmiştir. PCR reaksiyonu, çizelge 3.12'de belirtilen şekilde toplam hacmi 25µmol olan bir karışım hazırlanarak çizelge 3.12'de belirtilen koşullarda thermocycler'da gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu sonrasında ürünün varlığını kontrol etmek amacıyla %2'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. PCR ürünlerinden 5µl alınarak 2 µl yükleme tamponuyla birlikte jele yüklenmiştir. Agaroz jelde 130 V'da 20 dakika uzunlukları bilinen kontrol belirteçler eşliğinde yürütüldükten sonra, jel görüntüleme cihazı ile reaksiyon sonuçları değerlendirilmiştir.

Her PCR uygulamasında negatif kontrol olarak komplementer DNA veya PCR ürünü yerine dH₂O içeren tüplerle PCR gerçekleştirilmiştir.

3.8 Poliakrilamid Jel Elektroforezi

NPM1 mutasyon statüleri %12'lik poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemiyle tespit edilmiştir. *NPM1* mutasyon statülerini belirlemek amacıyla ikinci aşama PCR sonunda elde edilen ve varlığı agaroz jel elektroforeziyle tespit edilen PCR ürünlerinden 5µl alınarak 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılmış ve jele yüklenmiştir. Poliakrilamid jelde 300 V'da 3 saat uzunlukları bilinen kontrol belirteçleri eşliğinde yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel, içerisinde 10 µl (10 mg/ml) etidyum bromür bulunan 200 ml 1XTBE solüsyonu içerisinde 10 dakika boyanmış ve

sonrasında dH₂O ile 1 dakika yıkanmıştır. Daha sonra jel görüntüleme cihazı ile reaksiyon sonuçları değerlendirilmiştir

3.9 İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ki-kare testi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak analiz edilmiştir. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortalama±standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) verilmiştir. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya yaşları 13-77 arasında değişen % 38,6'sı kadın (17/44), % 61,4'ü (27/44) erkek olmak üzere 44 hasta ve 12 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan hastaların klinik özellikleri çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çalışmada toplam 8 hastada (% 18,18) *NPM1* gen mutasyonu saptanmıştır. Saptanan tüm mutasyonlar heterozigot karakterdedir ve mutasyonu taşıyan tüm hastalarda yaban tip alellerden biri korunmuştur. Sağlıklı kontrollerde mutasyona rastlanmamıştır. *NPM1* mutasyon çalışmasına ait jel görüntüleri Şekil 4.1- 4.5'de verilmiştir.

Yapılan çalışmada *NPM1* mutasyonlarını taşıyan hastalardan ikisinin normal karyotipe sahip olduğu gözlenmiştir. Mutasyonu taşıyan hastalardan birinde ise t(8;21) translokasyonu saptanmıştır. *NPM1* mutasyonlarının görüldüğü diğer hastalara ait olan sitogenetik verilere ulaşamamıştır. Bu bulgular göz önüne alındığında *NPM1* mutasyonlarının önemli ölçüde normal karyotiple ilişkilendiği gözlenmiş ve bu bulgunun istatistiksel açıdan da anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

NPM1 gen mutasyonları primer AML vakalarında, sekonder AML vakalarına oranla daha sık saptanmıştır. *NPM1* gen mutasyonlarının FAB sınıflandırmasına göre dağılımına bakıldığında; mutasyonu taşıyan 6 hastanın AML-M4 (% 75), 2 hastanın ise AML-M1 (% 25) FAB kategorisine dahil olduğu görülmüştür. *NPM1* mutasyonlarına AML-M2, AML-M3, AML-M5 ve AML-M6 FAB kategorisine dahil olan hastalarda rastlanmamıştır.

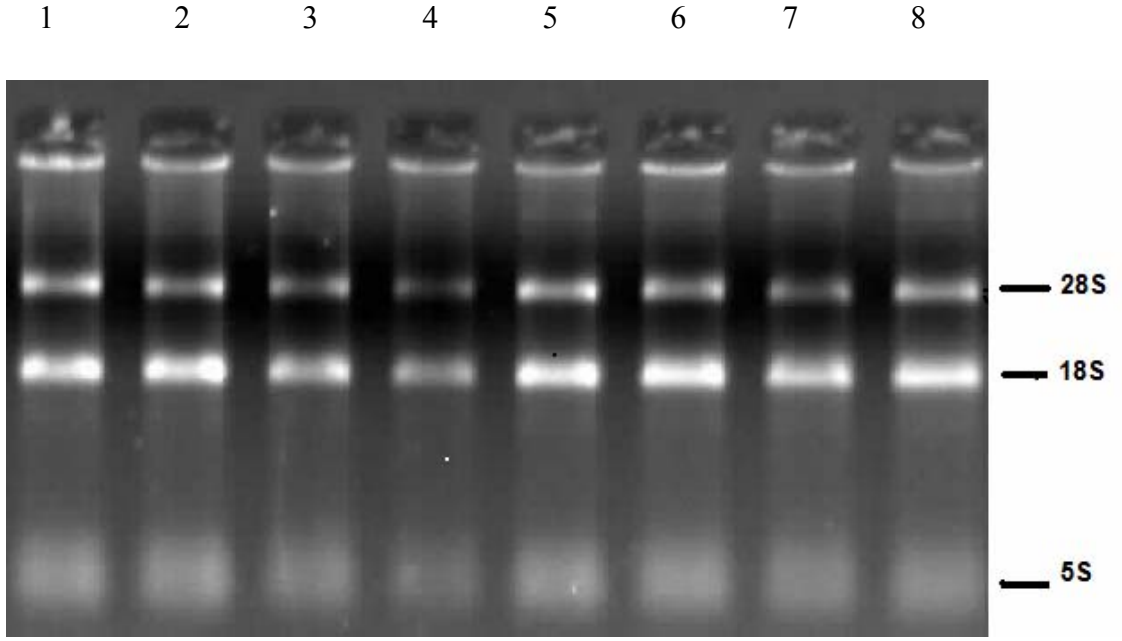
NPM1 gen mutasyonlarını taşıyan hastalardan 2'si (%25) 21-34 yaş aralığında, 5'i (% 62,5) 35-59 yaş aralığında, 1'i (%12,5) 60 yaşın üzerindedir. 21 yaşın altındaki hastalarda *NPM1* mutasyonuna rastlanmamıştır. Bu verilere bağlı olarak mutasyonun 35-60 yaş aralığındaki bireylerde daha sık görüldüğü saptanmıştır. Ancak mutasyon görülme sıklığının yaşa bağlı olarak değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). *NPM1* mutasyon frekanslarının cinsiyete bağlı olarak da anlamlı bir farklılık

göstermediği saptanmıştır ($p=0.451$). Mutasyonu taşıyan hastaların %50'sinin kadın, %50'sinin ise erkek olduğu gözlenmiştir. *NPM1* mutasyonunu taşıyan hastalarda lökosit sayısı ve kemik iliği blast sayısı *NPM1* mutasyonlarını taşımayan hastalara oranla daha yüksektir. Söz konusu mutasyonu taşıyan hastaların %66,7'sinde CD34 pozitifliği gözlenmemiştir. Ancak elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

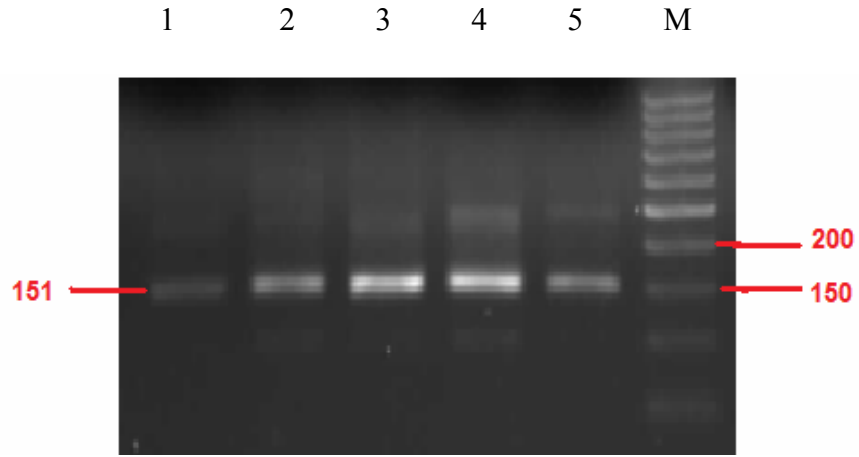
İndüksiyon tedavisine verilen yanıt bakımından *NPM1* mutasyonunu taşıyan ve taşımayan AML vakaları karşılaştırıldığında iki grup arasında önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir. Mutasyonu taşıyan hastaların % 50'si tedaviye yanıt verirken, mutasyonu taşımayan vakaların %52,8'inde tedavi sonrasında remisyon gözlenmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışmaya katılan hastaların klinik özellikleri

	Toplam (%)	NPM1 m (%)	NPM1 wt (%)
Cinsiyet			
Kadın	17 (38,6)	4(50)	13 (36,1)
Erkek	27(61,4)	4(50)	23 (63,9)
Yaş			
< 20	5 (11,9)		5(14,7)
21-34	12(28,6)	2(25)	10(29,4)
35-59	18(42,9)	5(62,5)	13(38,2)
≥ 60	7(16,7)	1 (12,5)	6(17,6)
Ortanca yaş	42,19	45,88	41,32
Aralık	13-77	28-65	13-77
Lökosit sayısı			
Ortanca, hücre/µl	9000,00	24890,00	9000,00
Aralık, hücre/µl	800-111,000	1750- 82600	800-111,000
FAB alttipi			
M0	4 (10)		4 (12,5)
M1	7 (17,5)	2 (25)	5 (15,6)
M2	6 (15)		6 (18,8)
M3	9 (22,5)		9 (28,1)
M4	11 (27,5)	6 (75)	5 (15,6)
M5	2 (6,3)		2 (6,3)
M6	1 (3,1)		1 (3,1)
AML tipi			
Primer AML	40 (90,9)	7 (87,5)	33(91,7)
Sekonder AML	4 (9,1)	1 (12,5)	3(8,3)
Sitogenetik anomaliler			
t(15;17)	8		8
t(8;21)	6	1	5
inv(16)	3		3
t(9;22)	1		1
NK	3	2	1
Kemik iliği blast yüzdesi	58,800	69,900	54,836
CD34 (-)	12 (37,5)	4 (66,7)	8 (30,8)
CD34 (+)	20 (62,5)	2(33,3)	18 (69,2)
Remisyon indüksiyon tedavisine			
Verilen yanıt			
Remisyon	13 (52)	2(50)	11(52,4)
Yanıtsız	12 (48)	2(50)	10 (47,6)

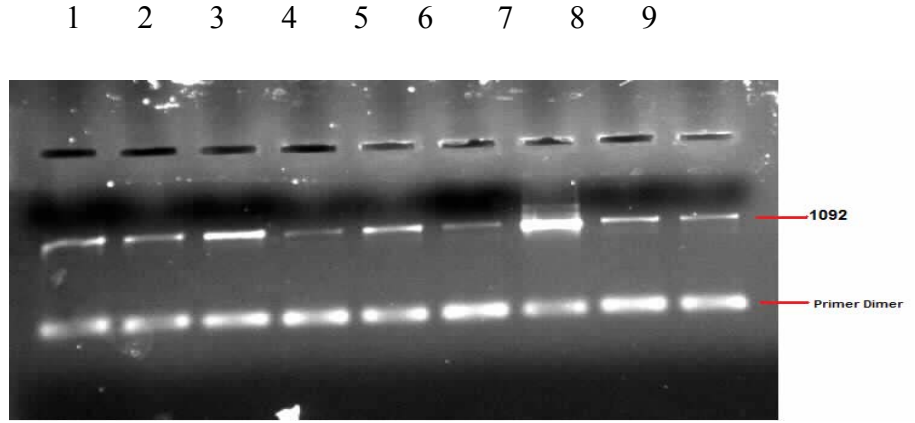


Şekil 4.1. Sağlıklı kontrollerden sağlanan kan veya kemik iliği örneklerinden izole edilen RNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüsü



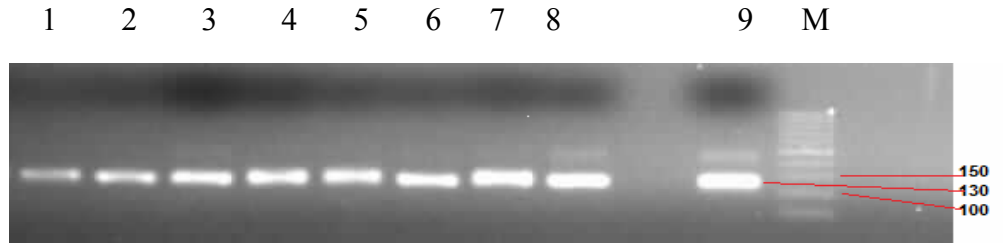
Şekil 4.2 cDNA kontrol PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jel görüntüsü

M: Marker (50 bç) 1:MS (151 bç) 2:RP (151 bç) 3:BŞ (151 bç) 4:MD (151 bç) 5: SS (151 bç)



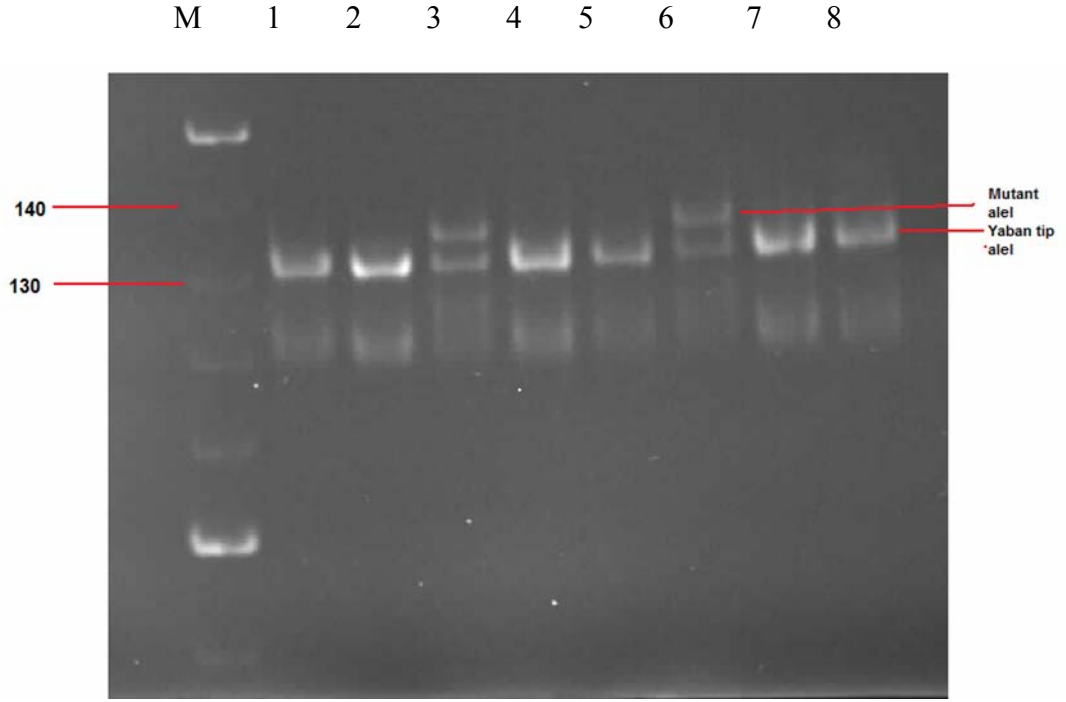
Şekil 4.3 Hastalara ait olan cDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı I. Aşama nested PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jel görüntüsü

1: SK (1092 bç) 2:MS (1092 bç) 3:MD (1092 bç) 4:SS (1092 bç) 5:BŞ (1092 bç) 6:VS (1092 bç) 7:HY (1092 bç) 8:RP (1092 bç) 9:SC (1092 bç)



Şekil 4.4 Hastalara ait olan cDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı II. Aşama PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin % 2'lik agaroz jel görüntüsü.

1: SK (130 bç) 2:MS (130 bç) 3:MD (130 bç) 4:SS (130 bç) 5:BŞ (130 bç) 6:VS (130 bç) 7:HY (130 bç) 8:RP (130 bç) 9:SC (130 bç) M: Marker (50 bç)



Şekil 4.5 Hastalara ait olan cDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı II. Aşama PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin % 12'lik poliakrilamid jel görüntüsü.

M: marker (10 bç) 1: BŞ (130bç) 2: NA(130 bç) 3: MS (130/134-135) 4: MG (130 bç) 5: VS (130 bç) 6: RP (130/134-135) 7: SS (130 bç) 8:SK(130 bç)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

NPM1 mutasyon sıklıklarını Türk toplumunda saptamaya yönelik olan bu çalışma sonrasında araştırmaya dahil edilen 44 AML hastasından 8'inin (%18,18) *NPM1* gen mutasyonlarını taşıdığı gözlenmiştir. Çalışmada tespit edilen *NPM1* mutasyon sıklıklarının, batı ülkelerine oranla daha düşük olduğu görülürken, mutasyon görülme sıklığının Asya ülkeleriyle uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Son yıllarda batı ülkelerinde yapılan çalışmalarda tüm AML vakalarının yaklaşık %35'inde *NPM1* gen mutasyonlarının söz konusu olduğu ve bu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %60'ından fazlasının normal karyotipe sahip olduğu rapor edilmiştir (Falini vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Boissel vd. 2005, Döhner vd. 2005, Thiede vd. 2006). Ancak Çin ve Japon AML hastalarının dahil edildiği çalışmalar sonrasında mutasyon sıklıklarının %14.3-28.2 aralığında değişim gösterdiği ve Batı toplumlarına oranla daha düşük olduğu bildirilmiştir (Suzuki vd. 2005, Chou vd. 2006, Zhang vd. 2006, Yan vd. 2007). Bu çalışma sonrasında elde edilen veriler de Tayvanlı bir grup tarafından yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir. Söz konusu çalışmada saptanan *NPM1* mutasyon sıklığı %19,1'dir (Çizelge 5.1) (Chou vd. 2006).

Çizelge 5.1 Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilen *NPM1* mutasyon sıklıkları

Ülke	Çalışmaya katılan AML'li hasta sayısı	<i>NPM1</i> mutasyonlarının insidansı	Yıl	Referans
İtalya	591	208 (35,2)	2005	Falini vd.
Hollanda	275	95(34,5)	2005	Verhaak vd.
Almanya	300	145 (48)	2005	Döhner vd.
İtalya	401	212(52,9)	2005	Schnittger vd.
Fransa	106	50 (47)	2005	Boissel vd.
Japonya	257	64 (24,9)	2005	Suzuki vd.
Tayvan	173	33 (19,1)	2006	Chou vd.
Almanya	1485	408 (27,5)	2006	Thiede vd.
Çin	156	44 (28,2)	2007	Yan vd.
Türkiye	44	8 (18,8)	2011	Bu çalışma

NPM1 mutasyonlarını taşıyan hastaların genellikle normal karyotipe sahip oldukları ve tekrarlayan kromozomal anomalilerden yoksun oldukları Falini ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan çalışma sonucunda rapor edilmiş ve bu bulgu söz konusu çalışma sonrasında yapılan birçok araştırma sonucunda da doğrulanmıştır. (Döhner vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Suzuki vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Boissel vd. 2005, Thiede vd. 2006). *NPM1* mutasyonunu taşıyan AML vakalarının yaklaşık %14'ünde kromozomal anomalilere rastlanmıştır. Fakat söz konusu kromozomal bozuklukların sekonder olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu anomalilerin tekrarlayan genetik bozukluklar taşıyan AML hastalarında görülen sekonder kromozomal bozukluklarla tip ve frekans açısından benzer oldukları görülmüştür (Falini vd. 2005). Yapılan bu tez çalışması sırasında *NPM1* mutasyonlarını taşıyan 8 hastadan 3'ünün sitogenetik sonuçlarına ulaşılabilmiştir. Söz konusu hastalardan ikisinin normal karyotipe sahip olduğu görülürken, bir hastada t(8;21) translokasyonuna rastlanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda *NPM1* mutasyonlarının normal

karyotiple ilişkisi istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmuştur. Bu bağlamda elde ettiğimiz sonuçlar diğer çalışmaları destekler niteliktedir.

NPM1 gen mutasyonlarına genellikle de novo AML’li hastalarda rastlanırken; söz konusu mutasyonlar sekonder AML gelişiminde çok nadir görülmektedir (Falini vd. 2005, Thiede vd. 2006) Bu çalışma sonrasında da *NPM1* mutasyonunu taşıyan 8 hastadan 7’sinin de novo AML hastası 1’inin ise sekonder AML vakası olduğu görülmüştür. Ancak çalışma grubuna dahil olan hastaların yalnızca 3’ü sekonder AML hastası olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

NPM1 gen mutasyon sıklıklarının cinsiyete bağlı olarak değişim gösterdiğine dair bulgular mevcut olmasına karşın bu durumun aksini gösteren veriler de söz konusudur. AML’li kadın hastalarda *NPM1* gen mutasyonuna daha sık rastlandığı bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Thiede vd. 2006, Döhner vd. 2005, Schnittger vd. 2005). Ancak bazı çalışmalar sonrasında *NPM1* mutasyon sıklıklarının cinsiyete bağlı olarak değişmediği saptanmıştır (Falini vd. 2005, Suzuki vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Boissel vd. 2005). Bu tez çalışmasına katılan hastalar değerlendirildiğinde, *NPM1* mutasyon frekansının cinsiyete bağlı olarak farklılık göstermediği sonucuna ulaşılmıştır. *NPM1* mutasyonunu taşıyan AML vakalarında yaş ortalamasının yüksek olduğu yapılan çok sayıda çalışmada rapor edilmiştir (Falini vd. 2005, Suzuki vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Boissel vd. 2005, Yan vd. 2007). Verhaak ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında 21-35 yaş arası bireylerde %15, 35-60 yaş arası bireylerde %40, 60 yaş ve üstü bireylerde ise %50 oranında *NPM1* mutasyonlarını saptamışlardır. Bizim çalışma grubumuzda da Verhaak ve çalışma arkadaşlarının bulgularını destekler nitelikte veriler elde edilmiştir. Yaptığımız çalışmada 20 yaşın altındaki hastalarda *NPM1* mutasyonuna rastlanmamıştır. Mutasyonu en sık saptadığımız (%62,5) yaş aralığı 35-59 iken, 60 yaş üzeri hastalarda mutasyon % 12,5 oranında saptanmıştır. 60 yaş üzerinde sık görülmesi beklenen mutasyonların, görülme sıklığının bu çalışmada düşük olmasının çalışılan hasta sayısından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde yeralan çalışmalarda *NPM1* mutasyonlarının FAB alt tipine bağlı olarak dağılımı değerlendirildiğinde M3 haricindeki tüm FAB alt tiplerinde görüldüğü saptanmıştır. (Falini vd. 2005, Suzuki vd. 2005, Chou vd. 2006, Thiede vd. 2006, Yan vd. 2007). Çok sayıda çalışmada AML-M3’de *NPM1* mutasyonlarının görülmediği rapor edilmiş olmasına karşın Verhaak ve arkadaşları 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada AML-M3 tanısı almış bir hastanın *NPM1* mutasyonunu taşıdığını gözlemişlerdir. Bazı çalışma grupları *NPM1* mutasyonlarının görülme sıklığının AML-M4 ve AML-M5 vakalarında yüksek olduğu bildirilmiştir (Alcalay vd. 2005, Falini vd. 2005, Suzuki vd. 2005, Döhner vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Boissel 2005 Thiede vd. 2006). Ancak Yan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mutasyon frekansı AML-M1 vakalarında daha yüksek bulunmuştur (Yan vd. 2007). Bizim hasta grubumuzda ise *NPM1* mutasyonun frekansının M4 alt tipinde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Mutasyonu taşıyan 8 AML vakasından 6’sı AML-M4, 2’si AML-M1 tipindedir. Elde ettiğimiz bu veriler *NPM1* mutasyonlarının AML-M4 ile ilişkili bulan araştırma gruplarının sonuçlarını desteklemektedir.

NPM1 mutasyonlarının yüksek lökosit sayımı (Boissel vd. 2005, Suzuki vd. 2005, Döhner vd. 2005, Verhaak vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Chou vd. 2006, Thiede vd. 2006, Yan vd. 2007) ve tanı anında yüksek blast oranı (Suzuki vd. 2005, Döhner vd. 2005, Chou vd. 2006, Thiede vd. 2006) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *NPM1* mutasyonlarını taşıyan AML vakalarının % 95’inden fazlasının CD34 negatif olduğu rapor edilmiştir (Falini vd. 2005). Bu tez çalışması sonrasında elde edilen veriler yapılan araştırmalar sonrasında gelişen klinik beklentiyi karşılamaktadır. *NPM1* mutasyonunu taşıyan hastalarda lökosit sayısı ve kemik iliği blast yüzdesi mutasyonu taşımayan hastalara oranla daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu veriler yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda anlamlı bulunmamıştır. *NPM1* mutasyonunu taşıyan vakaların %66,7’si hematopoetik kök hücre yüzey belirteci olan CD34 negatiftir. Fakat sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun çalışılan hasta sayısının düşük olmasından kaynaklanıyor olması olasıdır.

İndüksiyon tedavisinden sonra, normal karyotip içeren AML vakalarında, *NPM1* mutasyonunu taşıyan hastaların, mutasyonu taşımayan hastalara oranla, daha yüksek tam remisyon oranına sahip oldukları bildirilmiştir (Falini vd. 2005, Schnittger vd. 2005, Thiede vd. 2006, Suzuki vd. 2005). Ancak bu çalışmada *NPM1* mutasyonlarını taşıyan hastalar, mutasyonu taşımayan hastalarla remisyon indüksiyon tedavisine verilen yanıt bakımından karşılaştırıldıklarında iki grup arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. *NPM1* mutasyonlarını taşıyan hasta grubunda hastaların % 50'sinin tedaviye yanıt verdiği görülürken, mutasyonları taşımayan grupta hastaların % 52,4'ünün indüksiyon tedavisine yanıt verdiği saptanmıştır.

Ayırıcı klinik ve biyolojik özelliklerine rağmen *NPM1* gen mutasyon sıklıklarını Türk toplumunda belirlemeyi amaçlayan herhangi bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Bu bağlamda yapmış olduğumuz çalışma, klonal kromozomal anomalilerden yoksun olan normal karyotipli AML vakalarının prognostik alt gruplara ayrılmasında moleküler belirteç olarak kullanılabileceği düşünülen *NPM1* gen mutasyonlarının, görülme sıklığını ve prognostik önemini Türk AML hastalarında belirlemeyi hedefleyen ilk çalışmadır. Bu nedenle çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

NPM1 mutasyonlarının ayırıcı klinik özelliklerinden dolayı AML hastalarında rutin takibi önerilir. Bu çalışmada kullanmış olduğumuz yöntem daha önce *NPM1* gen mutasyon sıklıklarını belirlemeye yönelik çalışmalarda kullanılmış olan Real time PCR, DHPLC, kapiller elektroforez gibi yöntemlerle karşılaştırıldığında oldukça basit ve ucuzdur ve bu bağlamda söz konusu mutasyonların rutin takibine olanak sağlayacak niteliktedir. Ayrıca söz konusu yöntem daha önce yalnızca 24 AML hastasının dahil edildiği bir çalışmada (Calvo vd. 2009) kullanılmıştır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada 44 hasta ve 12 kontrol olmak üzere 56 kişilik bir çalışma grubunda yöntemin geçerliliği doğrulanmıştır. Bu durumun *NPM1* mutasyonlarının rutin takibi açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak rastgele seçilen 44 AML hastasının dahil edilmiş olduğu bu çalışma sonucunda *NPM1* gen mutasyonlarının görülme sıklığı % 18,18 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada tespit edilen *NPM1* mutasyonlarının görülme sıklığının Batı ülkelerine oranla daha düşük olduğu görülürken Asya ülkeleriyle benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Tespit edilen tüm mutasyonlar heterozigot karakterdedir. Çalışmada *NPM1* gen mutasyonlarının normal karyotiple önemli ölçüde ilişkilendiği gözlenmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte yapılan çalışmada *NPM1* mutasyonları de novo AML, ileri yaş, FAB M4, yüksek lökosit sayısı, CD34 negativitesi ve tanı anında yüksek blast oranı ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu veriler klinik beklentiyi karşılar niteliktedir. Ancak sonuçlar istatistiksel değerlendirme sonucunda anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun çalışılan hasta sayısının düşük olmasından ve hastalara ait olan yeterli klinik bilgiye ulaşılamamasından kaynaklanıyor olması muhtemeldir. Bu tez çalışması *NPM1* gen mutasyon sıklıklarını Türk toplumunda belirlemeyi hedefleyen ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir ve literature katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Hasta sayısının artırılarak çalışmaya devam edilmesi, *NPM1* gen mutasyonlarının normal karyotipli AML vakalarının prognostik alt gruplara ayrılmasına katkı sağlayacağı düşünüldüğünden çalışma dahilinde hastaların karyotip analizlerinin yapılması, FLT3 mutasyonlarının yokluğunda *NPM1* mutasyonlarını taşıyan AML vakalarının indüksiyon tedavisine daha yüksek oranda yanıt verdikleri bildirildiğinden FLT3 gen mutasyonlarıyla birlikte *NPM1* gen mutasyonlarının tedavi üzerindeki etkisinin belirlenmesi planlanmaktadır. Planlanan çalışma sonrasında elde edilecek bulguların AML'li hastaların sınıflandırılmasına ve tedavilerinin yönlendirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alcalay, M., Tiacci, E., Bergomas, R., Bigerna, B., Venturini, E., Minardi, S.P., Meani, N., Diverio, D., Bernard, L., Tizzoni, L., Volorio, S., Luzi, L., Colombo, E., Lo Coco, F., Mecucci, C., Falini, B. and Pelicci, P.G. 2005. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood*, 106(3), 899-902.
- Anonymous. 2011. Web sitesi: <http://www.cancer.org>. Erişim tarihi: 15.01.2011
- Anonymous. 2011. Websitesi: <http://www.leukemia-lymphoma.org>. Erişim tarihi 15.01.2011
- Anonymous. 2011. Web sitesi: <http://www.retrovirology.com> Erişim tarihi: 10.01.2011
- Anonymous. 2011. Web sitesi: <http://www.sagmer.org.tr> Erişim tarihi: 11.01.2011
- Anonymous. 2011. Web sitesi: <http://www.thd.org.tr> Erişim tarihi: 15.01.2011
- Anonymous. 2011. Web sitesi: <http://www.universe-review.ca> Erişim tarihi: 10.01.2011
- Avivi, I. and Rowe, J.M. 2004. Prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*, 12, 62– 67.
- Bacher, U., Badbaran, A., Fehse, B., Zabelina, T., Zander, A.R. and Kröger, N. 2009. Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, 37, 135-142.
- Boissel, N., Renneville, A., Biggio, V., Philippe, N., Thomas, X., Cayuela, J.M., Terre, C., Tigaud, I., Castaigne, S., Raffoux, E., De Botton, S., Fenaux, P., Dombret, H. and Preudhomme, C. 2005. Prevalence, clinical profile and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*, 106, 3618–3620
- Brown, P., McIntyre, E., Rau, R., Meshinchi, S., Lacayo, N., Dahl, G., Alonzo, T.A., Chang, M., Arceci, R.J. and Small, D. 2007. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood*, 110, 979-985
- Budhu, A.S. and Wang, X.W. 2005. Loading and unloading : Orchestrating centrosome duplication and spindle assembly by Ran/Crm. *Cell cycle*, 4(11), 1510-1514.

- Calvo, K.L., Ojeda, M.J., Ammatuna, E., Lavorgna, S., Ottone, T., Targovnik H.M., Lo-Coco, F. and Noguera, N.I. 2009. Detection of the nucleophosmin gene mutations in acute myelogenous leukemia through RT-PCR and polyacrylamide gel electrophoresis. *European Journal of Haematology*, 82, 69-72.
- Caudill, J.S., Sternberg, A.J., Li, C.Y., Tefferi, A., Lasho, T.L. and Steensma, D.P. 2006 C terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. *British Journal of Haematology*, 133, 638-641.
- Chen, W., Rassidakis, G.Z. and Medeiros, L.J. 2006. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 130(11), 1687-1692.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA Isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Chou, W.C., Tang, J.L., Lin, L.I., Yao, M., Tsay, W., Chen, C.Y., Wu, S.J., Huang, C.F., Chiou, R.J., Tseng, M.H., Lin, D.T., Lin, K.H., Chen, Y.C. and Tien, H.F. 2006. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Research*, 66, 3310–3316.
- Cooper, G.M. ve Hausman, R.E. 2006. Hücre: Moleküler Yaklaşım (çeviri: M. Sakızlı ve N. Atabey), 3. Baskı., İzmir Tıp Kitabevi, 714 s., İzmir.
- Döhner, K., Schlenk, R.F., Habdank, M., Scholl, C., Rücker, F.G., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Fröhling, S. and Döhner, H. 2005. Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *The American Society of Hematology*, 106(12), 3740-3746.
- Döhner, K. and Döhner, H. 2008. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematologica*, 93(7), 976-982.
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, S., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettrossi, N., Saglio, G., Mandelli, F., Lo-Coco, F., Pelicci, P.G. and Martelli, M.F. 2005. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *The New England Journal of Medicine*, 352, 254-266.

- Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M.P. and Mecucci, C. 2007a. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+AML): biological and clinical features. *The American Society of Hematology*, 109, 874-885.
- Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M.P., Liso, A., Gorello, P., Mandelli, F., Mecucci, C. and Martelli, M.F. 2007b. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (*NPM1*) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*, 92(4), 519-532.
- Ferrara, F., Salvatore, P. and Leoni, F. 2008. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Oncology Hematology*, 66, 181-193.
- Fröhling, S., Claudia, S., Gary, G. and Ross, L.L. 2005. Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 6285-6295.
- Gallagher, S.J., Kefford, R.F. and Rizos, H. 2006. The ARF tumour suppressor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 38(10), 1637-1641.
- Gjerset, R.A. 2006. DNA damage, p14ARF, Nucleophosmin (NPM/B23) and cancer. *Journal of Molecular Histology*, 37, 239-251.
- Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. and Pandolfi, P.P. 2006. Nucleophosmin and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 493-505.
- Grummitt, C.G., Townsley, F.M., Johnson, C.M., Warren, A.J. and Bycroft, M. 2008. Structural Consequences Of Nucleophosmin Mutations In Acute Myeloid Leukemia. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 283(34), 23326-23332.
- Herrera, J.E., Savkur, R. and Olson, M.O. 1995. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Research*, 23, 3974-3979.
- Hinchcliffe, E.H. and Sluder, G. 2001. Centrosome duplication: Three kinases come up a winner!. *Elsevier*, 4, 698-701.
- Hingorani, K., Szebeni, A. and Olson M.O.J. 2000. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 24451-24457.
- Kern, W.F. 2004. PDQ Hematoloji (çeviri: B. Ferhanoglu), 1. Baskı, İstanbul Medikal Yayıncılık Ltd. Şti., 440 s., İstanbul.
- Lim, M.J. and Wang, X.W. 2006. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detection and Prevention*, 30(6), 481-490.

- Lindström, M.S. and Zhang, Y. 2008. Ribosomal protein S9 is a novel B23/NPM-binding protein required for normal cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*, 283(23), 15568-15576.
- Lindström, M.S. 2011. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochemistry research international*, 2011, 195209.
- Naoe, T., Suzuki, T., Kiyoi, H. and Urano T. 2006. Nucleophosmin: A versatile molecule associated with hematological malignancies. *Japanese Cancer Association*, 97(10), 963-969.
- Okuda, M. 2002. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene*, 21, 6170 – 6174.
- Okuwaki, M. 2007. The Structure and Functions of *NPM1* /Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidik Protein. *The Japanese Biochemical Society*, 143, 441-448.
- Özbek, U. 2006. Lösemilerde moleküler genetik ve prognoz. <http://www.thd.org.tr>. Erişim tarihi: 06.10.2009.
- Pasqualucci, L., Liso, A., Martelli, M.P., Bolli, N., Pacini, R., Tabarrini, A., Carini, M., Bigerna, B., Pucciarini, A., Mannucci, R., Nicoletti, I., Tiacci, E., Meloni, G., Specchia, G., Cantore, N., Di Raimondo, F., Pileri, S., Mecucci, C., Mandelli, F., Martelli, M.F. and Falini, B. 2006. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: impact on WHO classification. *Blood*, 108, 4146-4155.
- Pekçelen, Y., Dinçol, G., Atamer, T., Sargın, D., Nalçacı, M., Aktan, M. ve Beşışık, S. 2003. *Klinik Hematoloji.. Nobel Tıp Kitabevi*, 413 s, İstanbul.
- Rau, R. and Brown, P. 2009. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematological Oncology*, 27(4), 171-181.
- Ruan, G.R., Li, J.L., Qin, Y.Z., Li, L.D., Xie, M., Chang, Y., Zhang, Y., Liu, Y.R., Jiang, B., Chen, S.S. and Huang, X.J. 2009. Nucleophosmin mutations in Chinese adults with acute myelogenous leukemia. *Annals of Hematology*, 88,159-166.
- Savkur, R.S. and Olson, M.O. 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Research*, 26, 4508-4515.

- Schlenk, R.F., Döhner, K., Krauter, J., Fröhling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Spath, D., Morgan, M., Benner, A., Schlegelberger, B., Heil, G., Ganser, A. and Döhner, H. 2008. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 358, 909-1918.
- Scholl, S., Mügge, L.O., Landt, O., Loncarevic, I.F., Kunert, C., Clement, J.H. and Höffken, K. 2007. Rapid Screening and sensitive detection of NPM1 (nucleophosmin) exon 12 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 31, 1205-1211.
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M.F., Haferlach, T., Hiddemann, W. and Falini, B. 2005. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 106, 3733-3739.
- Shipley, J.L. and Butera, J.N. 2009. Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*, 37(6), 649–658.
- Suzuki, T., Kiyoi, H., Ozeki, K., Tomita, A., Yamaji, S., Suzuki, R., Koda, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., Akiyama, H., Nishimura, M., Motoji, T., Shinagawa, K., Takeshita, A., Ueda, R., Kinoshita, T., Emi, N. and Naoe, T. 2005. Clinical characteristics and prognostic implications of *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 106, 2854–2861.
- Swaminathan, V., Kishore, A.H., Febitha, K.K., and Kundu, T.K. 2005. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 7534–7545.
- Szebeni, A. and Olson, M.O. 1999. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Science*, 8, 905–912.
- Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M. and Ehninger, G. 2006. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 107(10), 4011-4020.
- Thiede, C., Creutzig, E., Reinhardt, D., Ehninger, G. and Creutzig, U. 2007. Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12. *Leukemia*, 21, 366-367.
- Tsou, M.F. and Stearns, T. 2006. Controlling centrosome number: licenses and blocks. *Current opinion in cell biology*, 18(1), 74-78.

- Verhaak, R.G.W., Goudswaard, C.S., van Putten, W., Bijl, M.A., Sanders, M.A., Hagens, W., Uitterlinden A.G., Erpelinck, C.A.J., Delwel, R., Löwenberg, B. and Valk P.J.M. 2005. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*, 106(12), 3747-3754.
- Welch, W.J. and Feramisco, J.R. 1984. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000dalton heat shock protein in heat shocked mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 259, 4501–4513.
- Yan, L., Chen, S., Liang, J., Feng, Y., Cen, J., He, J., Chang, W., Zhu, Z., Pan, J. and Wu, Y. 2007. Analysis of NPM1 gene mutations in Chinese adults with acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology*, 86, 143–146.
- Yu, Y., Maggi, L.B. Jr, Brady, S.N., Apicelli, A.J., Dai, M.S., Lu, H. and Weber, J.D. 2006. Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export. *Molecular and Cellular Biology*, 26(10), 3798-3809.
- Zhang, Y., Zhang, M., Yang, L. and Xiao, Z. 2007. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leukemia Research*, 31, 109-111.

EKLER

EK 1 Etik Kurul Onayı

EK 2 Sağlıklı Birey Bilgilendirme ve Onam Formu

EK 1 Etik kurul onayı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY ANKARA-TÜRKİYE ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI				
BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU			
	PROTOKOL ADI	Akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında NPM1 gen mutasyon sıklıkları ve prognostik önemi		
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç.Dr.Nesrin Özsoy		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü		
	DESTEKLEYİCİ FİRMA			
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili	
	PROTOKOL			
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU			
	OLGU RAPOR FORMU			
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KILAVUZU			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 154-4950	Tarih: 29 Haziran 2009		
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde laboratuvar çalışmasının yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.			
ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoglu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Hasan T. M. Tıp Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanı		 ASLI GİBİDİR 16 Temmuz 2009		

Prof. Dr. Handan Onur Üye	Tıbbi Onkoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	Handan Onur
Prof. Dr. Ajlan Tükün Üye	Tıbbi Genetik	Ankara Tıp Fakültesi	K	Ajlan Tükün
Prof. Dr. Esra Erden Üye	Patoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Esra Erden
Prof. Dr. Aydan İkinciogulları Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	Aydan İkinciogulları
Prof. Dr. Ethem Geçim Üye	Genel Cerrahi	Ankara Tıp Fakültesi	E	Ethem Geçim
Prof. Dr. Erdal Onar Üye	Hukuk	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E	Erdal Onar
Prof. Dr. Yasemin Oğuz Üye	Deontoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Yasemin Oğuz
Prof. Dr. Bülent Gümüşel Üye	Farmakoloji-Eczacı	Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi	E	Bülent Gümüşel
Doç. Dr. Aslıhan Avcı Üye	Biyokimya	Ankara Tıp Fakültesi	K	Aslıhan Avcı
Gülsüm Aslan	Sağlık Mesleği Dışı	Emekli	K	Gülsüm Aslan



ASLI GÖRÜLÜR

16 Temmuz 2009

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

EK 2 Sağlıklı birey bilgilendirme ve onam formu

Sağlıklı Birey Bilgilendirme ve Onam Formu

“Türk Akut Myeloid Lösemi (AML) hastalarında *NPM1* gen mutasyon sıklıkları ve prognostik önemi” isimli bilimsel bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma araştırma amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını ve çalışmanın neler içerdiğini, bilmeniz önemlidir. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın amacını anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Lütfen size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni AML ile ilgili olarak gerçekleştirilecek bir çalışmada karşılaştırma yapabilmek amacıyla sağlıklı bireylerden oluşan control grubunu oluşturabilmektir. Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak ve yeni tedavi yöntemleri geliştirebilecek bir araştırma gerçekleştirilecektir. Katılımınız araştırmanın başarısı için oldukça önemlidir.

Araştırmanın Amacı: Akut Myeloid Lösemi, löseminin alt tiplerinden biridir. Kan kanseri olarak da bilinen lösemi, çoğunlukla, damarlarda dolaşan kanın esas yapım yeri olan kemik iliğinde bulunan ana hücrelerde meydana gelen genetik değişimler (mutasyonlar) sonucunda ortaya çıkar. Söz konusu değişimler (mutasyonlar) sonucunda blast adı verilen olgunlaşmamış ve bu nedenle görevini yapamayacak durumda olan kan hücrelerinin sayısında artış meydana gelmektedir.. Olgun olmayan bu

hücreler hızla yayılarak kemik iliğini, lenf bezlerini, dalağı karaciğeri, beyin ve merkezi sinir sistemini istila eder.

NPM1 adı verilen gende meydana gelen değişimlerin (mutasyonların) AML hastalarında çok sık rastlanan genetik bozukluklar olduğu yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konulmuştur. Türk Akut Myeloid Lösemi (AML) hastalarında *NPM1* gen mutasyon sıklıklarını ve prognostik önemini belirlemek amacıyla bir çalışma planlanmıştır. Buradan yola çıkarak, bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalından, AML tanısı almış 50 hasta ve 20 sağlıklı bireyden oluşan bir kontrol grubu kullanılacaktır.

Çalışmanın Protokolü: Bu çalışmada kemik iliği veya kan örnekleri kullanılacaktır. Kemik iliği örnekleri talep edilecek olan kişilerden, örnekler Gazi Üniversitesi Hematoloji Bilim dalında daha önce tanı amacıyla vermiş oldukları kemik iliği örneklerinden temin edilecektir. Bunun haricinde ilave kemik iliği alınmayacaktır. Zaten alınan örnekten ihtiyaç fazlası olan miktar bu çalışmada kullanılacağı için onayınıza başvurulmaktadır.

Kan örneklerine ihtiyaç duyulduğunda ise sizden bir defaya mahsus, kol damarınızdan yaklaşık 5 cc (4 çay kaşığı) kan örneği istenmektedir. Kan alımı kolunuzdan, size incitmeden gerçekleştirilecektir. Ancak kullanılan enjektör nedeniyle hafif derecede bir ağrı hissedebilirsiniz ve kolunuzda enjektörün temas ettiği bölgede bölgesel bir morarma görülebilir. Kan alınırken sağlık ekibi oluşabilecek sorunlara müdahale için yanınızda bulunacaktır.

Bir miktar kemik iliği veya kan örneği alındıktan sonra bu hücrelerden izole edilen RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilecektir. Elde edilen cDNA lar polimeraz zincir reaksiyonu denilen test sürecine tabi tutularak test sonucu elde

edilecektir. Test sonucu elde edilen ürünler poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenecek ve *NPM1* gen mutasyonunun olup olmadığı tespit edilecektir.

Bu çalışma kapsamında size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir. Çalışmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılmayı red etme hakkına sahipsiniz. Çalışma sırasında elde edilen kemik iliği ve kan örnekleri anonim olarak saklanacak ve hastaların isimleri saklı kalmak koşulu ile diğer bilimsel çalışmalarda da kullanılabilir. Bu çalışma size veya sosyal güvencenizi sağlayan kuruma ekonomik açıdan bir yük getirmeyecektir ve size herhangi bir maddi destekte bulunulmayacaktır. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar size bildirilmeyecek ve tedaviniz bu sonuçlara bağlı olmayacaktır. Çalışmadan istediğiniz zaman çıkabilirsiniz. Ayrıca teknik nedenlerden dolayı araştırmacı tarafından çalışmadan çıkarılabilirsiniz.

Bu çalışma Doç. Dr. Nesrin Özsoy tarafından yürütülecektir. Çalışma süresince herhangi soru veya sorunuz olduğunda Doç. Dr. Nesrin Özsoy’a 310 30 10/388 numaralı telefondan veya Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Kat:2’den ve/veya doktorumuz Doç. Dr. Münici Yağcı’ya 310 33 33/7099 numaralı telefondan veya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalından ulaşabilirsiniz. Bu yazının bir kopyası size verilecektir.

Yardımlarınız için çok teşekkür ederiz.

Ben.....;bu çalışma ile ilgili yeterli bilgiye sahibim.

Konu ile ilgili sorularımı sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım.

Bu bilgiler ışığında elde edilen kemik iliğimin veya kan örneğimin,

☐ Başka amaçla kullanılmaması

☐ Kimliğimin gizli tutularak bilimsel amaçlı diğer çalışmalarda da kullanılabilmesi koşulu ile kullanılmasına izin veriyorum.

Hastanın adı-soyadı:

Sorumlu Araştırmacı:

Adresi:

İmza:

Tel:

İmza:

Kurum Yetkilisi:

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gülşah ÖZTÜRK

Doğum Yeri: Bolu

Doğum Tarihi: 25.03.1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Ankara Atatürk Lisesi (1999-2002)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2003-2007)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Şubat 2008-Şubat 2011)