ÖZGE ÖZGEN

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

YÜKSEK LİSANS

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2012

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

AML' DE APAF-1 PROMOTÖR METİLASYONU, KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ, KROMOZOMAL ANOMALİLER İLE KLİNİK VE LABORATUVAR PARAMETRELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

ÖZGE ÖZGEN

DANIŞMAN
PROF. DR. KIVANÇ ÇEFLE

GENETİK ANABİLİM DALI

GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Genetik Programında Özge ÖZGEN tarafından hazırlanan "APAF-I Promotör Metilasyonu, Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozomal Anomaliler İle Klinik ve Laboratuvar Parametreleri Arasındaki İlişki" başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

26 / 09 / 2012

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)		İmzası
1.Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE	İTF. İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Genetik BD.	
2.Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ	İTF. İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Genetik BD.	
3.Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK	İTF. İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Genetik BD.	
4.Prof. Dr. Uğur ÖZBEK	DETAE Genetik Anabilim Dalı	
5.Prof. Dr. Meliha NALÇACI	İ.T.F İç Hastalıkları A.B.D Hemotoloji B.D.	

BEYAN

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

ÖZGE ÖZGEN (İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile çalışmalarıma katkıda bulunan çok değerli Tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Kıvanç Çefle**'ye sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam sırasında Dahiliye Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında bana çalışma imkanını sunan değerli hocalarım **Prof. Dr. Şükrü Palanduz**, **Prof. Dr. Şükrü Öztürk**' e yardımlarından dolayı ve bu birimde çalışan sitogenetik alanında bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen aynı zamanda manevi desteklerini esirgemeyen **Dr. Ayşegül Bayrak, Dr. Ali Uçur, Dr. Gülçin Bağatır Karabudak, Bio. Murat Kaya, Bio. Merve Erbağcı, Bio. Burak Dön, Bio. Özkan Gümüş, Tıbbi Bio. Ayla Özvarnalı, Yeşim Adıgüzel** ve **Ali Gülmez**'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalında gerekli laboratuar imkanlarının sunulmasını sağlayan ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. Uğur Özbek**' e, tez çalışmama katkıda bulunan **Dr. Özden Hatırnaz' a** ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen **Uzm. Bio. Suzin Çatal' a** teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve sevgisini benimle paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen Sayın **Dr. Fatmahan Atalar**'a, samimi destek ve yardımlarını esirgemeyen **Uzm. Bio. Gökçe Akan' a** ve bu tezi bitirebilmem için bana güç veren sevgili arkadaşlarım **Uzm. Bio. Özlem Dağdeviren, Uzm. Bio. Melda Sarıman** ve **Salih Bildiren' e** teşekkür ederim.

Sevgi ve emekleri sayesinde bugüne geldiğim sevgili annem **Uzm. Dr. Lale Durupınar**, sevgili babam **Uzm. Dr. Semih Özgen** ve sevgili kardeşim **Öykü Özgen**' e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 14442

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. KANSER 4
2.1.1. Hematopoez ve Kök hücre Modeli 6
2.2. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ 8
2.2.1. Akut Miyeloid Lösemi İnsidans 8
2.2.2. Akut Miyeloid Lösemi Etiyoloji 8
2.2.3. Akut Miyeloid Lösemide Prognoz 10
2.2.4. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ SINIFLANDIRMASI 11
2.2.5. AML İLE İLİŞKİLİ SIK GÖRÜLEN SİTOGENETİK ANOMALİLER 13
2.3. APOPTOZ 18
2.3.1. Apoptoz Mekanizmaları 18
2.3.1.1. Kaspaz Kaskadının Aktivasyonu 20
2.3.1.2. Dış Ölüm Yolağı 21
2.3.1.3. İç Ölüm yolağı 22
2.3.2. Kanser ve Apoptoz 23
2.3.3. APAF-1 Geni 23
2.4. EPİGENETİK 25
2.4.1. DNA METİLASYONU 26
2.4.1.1. DNA Metilasyon Mekanizması 26

2.5. KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 32
3.1. GEREÇLER 32
3.1.1. Hasta Grubunun Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri 32
3.1.2. Kontrol Grubu Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri 32
3.1.3. Kimyasallar, Enzimler, Çözeltiler, Kitler ve Cihazlar 32
3.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar 32
3.1.3.2. Kullanılan Enzimler 33
3.1.3.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler 34
3.1.3.4. Kullanılan Kitler 36
3.1.3.5. Kullanılan Cihazlar 36
3.2. YÖNTEMLER 37
3.2.1. Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemi 37
3.2.2. SCE Bantlama Yöntemi 39
3.2.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu 40
3.2.3.1. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi 40
3.2.4. DNA Metilasyonu ve Bisülfit Modifikasyonu 41
3.2.5. Metilasyon Spesifik –Polimeraz Zincir Reaksiyonu(MS- PZR) 42
3.2.5.1. Kullanılan Primerler, PZR Reaksiyon İçeriği ve Döngü Koşulları 42
3.2.6. Agaroz Jel Elekroforezi 46
3.2.6.1. Agaroz Jelin Hazırlanması 46
3.2.6.2. Agaroz Jelin Yüklenmesi- Elektroforez- Görüntüleme 46
3.2.7. İstatiksel Analiz 46
4. BULGULAR 47
4.1. AML Olgularının Klinik Laboratuar Değerleri 48
4.2. AML Olgularının Sınıflandırılması 50
4.3. KKD Değerlerinin Hesaplanması 50
4.4. Metilasyon Spesifik PZR Sonuçları ve Jel Görüntüleri 53
5. TARTIŞMA 54
6. KAYNAKLAR 62
FORMLAR 72
ETİK KURUL KARARI 74
ÖZGEÇMİŞ 76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 : Akut Miyeloid Lösemi İle İlişkili Risk Faktörleri. 9
Tablo 2-2 : FAB Sınıflandırması, AML Alt Grupları 12
Tablo 2-3 : WHO Sınıflandırması , AML Alt Grupları 12
Tablo 2-4 :AML' de Saptanan Bazı Sitogenetik Anomalilerin Prognostik Önemleri.. 17
Tablo 3-1 : APAF-1 Primerler..... 42
Tablo 4-1 : AML Hasta Grubu Olgu Sayısı Ve Cinsiyet Yüzdeleri İle Kontrol Grubu Olgu Sayısı Ve Cinsiyet Yüzdeleri. 47
Tablo 4-2 : AML Hasta Gurubu Laboratuvar Verileri. 48
Tablo 4-3 : AML Grubu Konvansiyonel Sitogentik Bulguları. 49
Tablo 4-4 : Çalışma Grubu ve Kontrol Grubu KKD, FAB ve Evre Tablosu ..... .51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Hematopoetik Gelişim 7
Şekil 2-2 : C.elegans ve İnsan Hücrelerinde Apoptoz Yolağı 19
Şekil 2-3 : Aktif ve İnaktif Apoptozom 24
Şekil 2-4 : DNA Metilasyon Mekanizması. 27
Şekil 2-5: Kanserli Ve Normal Hücre Geninde Metilasyon 28
Şekil 2-6 : Kromozomlarda Oluşabilecek KKD'lerin Şematik Gösterimi 30
Şekil 2-7 : AML Hastasında Kardeş Kromatid Değişimi Gösterimi 31
Şekil 3-1 : Primer Bölgesi GC Oran ve Dizi Lokasyon diyagramı 42
Şekil 4-1 : AML Hasta Grubu Grafiği 47
Şekil 4-2 : AML Olguları FAB Sınıflaması Grafiği 50
Şekil 4-3: KKD Analiz Sonuçları Grafiği……..51
Şekil 4-4: KKD Analizi İçin AML hastası Metafaz Plağı……..…....52
Şekil 4-5: APAF-1 Geni Promotör Bölgesi AML Grubu Metilasyon Analizi……..….53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AF9: Kromozom 9 Proteini ile ALL1-Füzyon Geni

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi, (Mixed Lineage Leukemia)

AML 1 (RUNX1): Runt-Related Transcripsiyon Faktörü 1

AML: Akut Miyeloid Lösemi

APAF-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör

Asp: Aspartik Asit

ATP: Adenozin Trifosfat

ATPaz: Adenozin Trifosfataz

ATRA: All-Trans Retinoik Asit

Bak: Bcl-2 İlişkili Proapoptotik Protein

Bax: Bcl-2 İlişkili X Protein

Bcl-2: B-Hücresi KLL / Lenfoma 2

Bid:Bcl-2 İle Etkileşen Protein

bp: Baz Çifti

CARD: Kaspaz Bağlayıcı Bölge

CBFβ: Core Binding Faktör Beta Alt Ünitesi

CD34: Hücre Yüzey Belirteci

Ced-3: *Caenorhabditis elegans* Geni 3

Ced-4: *Caenorhabditis elegans* Geni 4

Ced-9: *Caenorhabditis elegans* Geni 9

CFU : Koloni Oluşturan Birim

CFU-GEMM : Granülosit, Eritrosit, Megakaryosit, Makrofaj Yapan Ünite

CFU-L: Lenfoid Koloni Yapan Ünite

CpG: Sitozin Fosfo Guanin

dATP: Deoksiadenozin Trifosfat

DD:Ölüm Bölgesi

Del: Delesyon

DISC: Ölüm Tetikleyici Sinyal Kompleksi

DNMTs : DNA Metiltransferaz Ailesi

DR3: Ölüm Reseptörü 3

DR6: Ölüm Reseptörü 6

ETO (RUNX1T1): Runt-Related Transcripsiyon Faktörü 1; Translocated To, 1 (Siklin D- Bağlantılı)

FAB: Fransız, Amerikan, İngiliz Sınıflandırma Sistemi

FADD: Fas-Bağlantılı Ölüm Bölgesi

Fas: TNF Reseptör Süper Ailesi, Üye 6

GM-CSF: Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör

Hct: Hematokrit

Hgb :Hemoglobin

HOX: Homeobox Geni

HOXA9: Homeobox A9

IAP : Apoptoz Proteinleri İnhibitörü

IL-3: İnterlökin-3

İnv: İnversiyon

KKD: Kardeş Kromatid Değişimi

mar: Marker

M-CSF: Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör

MDR1: Multidrug Resistance 1 Geni

MDS: Miyelodisplastik Sendrom

MLL: Miyeloid / Lenfoid veya Kompleks Serili Lösemi

MYH1-1: Miyozin, Ağır Zincir 1

NPM: Nükleolar Fosfoprotein B23, Numatrin

NUP98: Nükleoporin 98kDa

OGG1: 8-Oxoguanin DNA Glikozilaz

PLT: Trombosit miktarı

PLZF: Promyiyolositik Lösemi Zinc Finger

PML: Promiyelositik Lösemi Geni

PS: Fosfotidilserin

RAR-α: Retinoik Asit Reseptör Alfa Geni

ROS : Reaktif Oksijen Türevleri

SAM: S- Adenozil Metionin

Smac/DIABLO : IAPs-Antogonisti-Apoptoz Protein İnhibitörleri

SMMHC: Düz Kas Miyozin Ağır Zincir Geni

T: Translokasyon

TNFR:Tümör Nekrozis Faktör Reseptör

TNF-R1: Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 1

TRAIL: TNF Bağlantılı Apoptoz Teşvik Edici Ligand

TRAIL-R1: Ölüm Reseptörü 4

TRAIL-R2: Ölüm Reseptörü 5

WBC : Beyaz kan hücresi, lökosit

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

5aza2dc : 5-aza-2-Deoksisitidin (desitabin)

ÖZET

ÖZGEN, Genetik A.B. (2012). **AML' de APAF-1 Promotör Metilasyonu, Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozomal Anomaliler ile Klinik ve Laboratuvar Parametreleri Arasındaki İlişki**. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Genetik Programı,Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2012.

Lösemi patogenezinde, apoptoz mekanizması bozuklukları ve genomik instabilitenin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Çeşitli kanser türlerinde, apoptotik yolakta yer alan APAF-1 geni promotör bölgesinin metilasyona uğradığı belirtilmektedir. Ayrıca, bu genin genomik stabilite açısından da önemli olduğunu düşündüren deneysel çalışmalar vardır. Çalışmamızda yeni tanı, remisyon ve nüks evrelerindeki AML' li yetişkin 21 olgunun kemik iliği ve periferik kan örneklerinden konvansiyonel sitogenetik tetkik yapılmış, ayrıca kardeş kromatid değişimi (KKD) sıklığı sağlıklı kontollerle karşılaştırılmıştır. APAF-1 geninin promotör bölgesinin metilasyon durumu da incelenmiştir. AML'li hastaların 12' si (%57,1) remisyon, 7' si (%33,3) yeni tanı, 2' si (%9,5) nüks olguydu. 21 olgudan 17' sinin anormal karyotipe sahip olduğu saptandı. KKD sıklığı AML hasta grubunda (7.704 ± 2.1866) kontrol grubundan (4.255 ± 0.7438) anlamlı olarak yüksekti (p=0.000). Remisyon ve yeni tanılı AML olguları arasında KKD sıklığı açısından farklılık yoktu (sırasıyla 7,75 ± 1.88 ve 7,94 ± 2,5; p=0.8). Çalışmamızda AML hastalarının ve kontrollerin hiçbirisinde APAF-1 geni promotör bölgesinde metilasyon saptanmadı. Hasta grubundaki yüksek KKD sıklığı AML gelişiminde genomik instabilitenin rol oynayabileceğini göstermektedir. Diğer yandan, APAF-1 gen promotöründe metilasyon saptanmamasının; bu genin ifadesinin post-transkripsiyonel mekanizmalardan da etkilenmesi olasılığı nedeniyle, AML patogenezi ile ilişkisinin dışlanamayacağı düşünülmektedir. AML' de APAF-1 aktivitesi ve bunun genomik instabilite ile muhtemel ilişkisinin daha ileri yöntemlerle araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler :Yetişkin, AML, Konvansiyonel Sitogenetik, KKD, APAF-1

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 14442

ABSTRACT

OZGEN, Department of Genetics, **Comparison of APAF-1 Promoter Methylation, Sister Chromatid Exchanges, Chromosome Abnormalities, Clinical and Laboratory Parameters in AML patients,** Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Programme, Master Thesis. Istanbul. 2012.

Defects in the apoptotic mechanism and genomic instability have been implicated in the pathogenesis of leukemias. Also, there is experimental evidence that APAF-1 gene (a component of the apoptosis pathway) plays a role in genomic instability. In the present study, we performed cytogenetic analysis in patients with acute myelocytic leukemia (AML). We also evaluated sister chromatid exchange frequency (SCE) in the patient group in comparison with healthy controls. In addition, we determined the methylation status of the promoter of the APAF-1 gene. Of the 21 patients with AML, 12 individuals were in remission (57,1%), 7 were newly diagnosed (33,3%) patients and 2 were in relapse (9,5%). Seventeen patients were found to have an abnormal karyotype. The mean SCE frequency was significantly higher in the patient group compared to controls (4.255 ± 0.7438 vs 7.704 ± 2.1866; p=0.000). SCE frequency was not different between newly diagnosed patients and patients in remission (7,94 ± 2,5 and 7,75 ± 1.88, respectively; p=0.8). In none of the individuals in the patient and control groups the promotor of the APAF-1 gene was methylated. The increased SCE frequency in the patient group suggests that genomic instability plays a role in the pathogenesis of AML. However, the lack of methylation in the APAF-1 gene promotor does not exclude a possible role of the gene in AML pathogenesis because post-transcriptional mechanisms may also be impaired. We propose that the involvement of APAF-1 gene and its possible relation to genomic instability should be evaluated by more sophisticated method.

Key Words: Adult, AML, Conventional Cytogenetics, KKD, APAF-1.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 14442

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lösemiler, hemopoietik progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu gelişmektedir. Normal kan hücrelerinin yapılamamasının yanı sıra, farklılaşma ve olgunlaşma kusuru gösteren lösemik hücrelerin kemik iliğini, periferik kanı ve diğer dokuları istila etmesi ile karakterize malign kemik iliği hastalıklarının genel adıdır (Ali R., 2006.).

Akut lösemili hastaların sağkalımı, etkin kemoterapi yöntemlerinin bulunmasından önce birkaç hafta veya ayla sınırlıydı. Geliştirilen etkin kemoterapiler ve destek tedavi uygulamaları sayesinde günümüzde lösemilerin prognozunda ciddi ölçüde düzelme olmuştur. Herşeye rağmen, özellikle ileri yaştaki erişkinlerde, mevcut tedavi imkanları ile tam şifa sağlanamamaktadır.

Akut miyeloid lösemi (diğer adlarıyla akut miyeloblastik lösemi veya akut nonlenfoblastik lösemi, AML), CFU-GEMM (granülosit-eritrosit-megakaryosit-makrofaj koloni oluşturan ünite)' den köken almaktadır. Akut lösemi tipleri ile ilişkili tekrarlayan kromozomal bozukluklar (özellikle resiprokal translokasyonlar) bilinmektedir. Bu transkolasyonların pek çogunda yer alan genler tanımlanmıştır. Belli bazı kromozomal bozukluklarının belirli akut lösemi tipleri ile ilişkili olduğu ve sitogenetik anomalilerin hastalığın prognozu üzerinde ciddi etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan sitogenetik ve moleküler bulguların artmasıyla her geçen gün tedavi protokolleri şekil almaktadır (Kern, W F.(Ed.), PDQ Hematology, 2005).

Kardeş kromatid değişimi (KKD) homolog kromozomal bölgelerde meydana gelen parça değiş tokuşuyla tanımlanmaktadır. KKD sonucu DNA' da kırılmalar ve yeniden düzenlenmeler olmakta, bunun yanında kromozom morfolojisinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemektedir. KKD bölünmekte olan hücrelerde daha çok spontan olarak meydana gelir (Latt, A. S. ve Schreck, R. R., 1980).

Genotoksik ajanlara maruziyet sonucu DNA' da meydana gelen, replikasyon esnasında onarılamayan hatalar, KKD'nin meydana gelmesine ya da artışına yol açmaktadır. DNA hasarına neden olan pek çok ajanın KKD sıklığını arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle fiziksel ya da kimyasal çeşitli etmenlerin mutajenik ya da karsinojenik etkilerini ortaya çıkarmakta duyarlı bir parametre olarak kabul edilmektedir (Banerjee A. ve Benedict F. W., 1979) .

Kanser oluşumuna neden olan değişimlerden biri de apoptotik yolakta meydana gelen düzensizliklerdir. Karsinogeneze yol açan apoptotik yolak bozulmalarının, apoptoziste önemi olan APAF-1 geninde meydana gelebilecek epigenetik degişimlerden de kaynaklanabilecegi düşünülmektedir (Furukawa Y. ve ark., 2005).

DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile ilişkili, geri dönüştürülebilir, kalıtılabilir özellik taşıyan olaylar 'epigenetik değişiklikler' olarak adlandırılmaktadır. Epigenetik değişimlerden biri olan DNA metilasyonunun AML progresyonu ve kemoterapi direncini etkileyen önemli bir faktör olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Kroeger H. ve ark 2008).

APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1), diğer adıyla KIAA0413, 12q23 lokalizasyonunda yer alan 27 ekzonlu bir gendir. Tümör baskılayıcı rolü olan APAF-1 geninin DNA hasarında apoptozise yol açan yolakta rol almasından dolayı karsinogenez sonrası uygulanan tedavi direncinde önemli bir rol oynaması söz konusudur. (Anonim-1, Apaf-1 2011).

APAF-1 gen promotörünün, bu genin diğer kanser türlerindeki önemi nedeniyle, AML gelişimi sırasında metilasyona uğrayabileceği akla gelmektedir. Promotör metilasyonu farklı lösemi çeşitlerinde gösterilmesine rağmen APAF-1' in lösemiler ve lenfomalardaki rolüne dair yapılan çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Son zamanlarda, APAF-1 ekspresyonundaki değişikliklerin kromozomal instabiliteye de yol açabileceği bildirilmiştir (Mouhamad S. ve ark., 2007).

Çalışmamız, yeni tanı, remisyon ve nüks evrelerindeki yetişkin AML hastalarında kardeş kromatid degişimi sıklıkları, APAF-1 gen metilasyon durumu ve konvansiyonel sitogenetik bulgularının değerlendirilmesi ile bunların hem prognostik önemlerinin ortaya konması, hem de patogenezdeki muhtemel rollerinin incelenmesi amacını taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu ile karakterize edilen bir hastalık olmakla birlikte patolojik olarak farklı alt tiplere ayrılmaktadır.

Karsinom: Epitelyal hücreden köken almaktadır. Meme, deri ve iç organlardan köken alan kanserlerin bir çoğu bu gruptadır. Tüm kanserlerin %85-90' ını oluşturmaktadır.

Sarkom: Bağ dokusu kökenli kanserlerdir. Kemik, kas, yağ dokusu, kıkırdak, kan damarı gibi bağ dokularından köken almaktadır.

Lösemi: Lenfoid organ ya da kemik iliğinden köken alan lökositlerin kontrolsüz proliferasyonu ile karakterize gruptur.

Lenfoma: Özellikle dalak ve lenf düğümü gibi lenfoid organların kanseri olmaktadır (Alberts B. ve ark. Molecular Biology of The Cell 2008).

Normal hücrelerde çoğalma, büyüme, farklılaşma, ölüm ve genom bütünlüğünün sağlanması belirli bir dengede yürütülür. Kanserli hücrelerde ise hücre adhezyonu, kontakt inhibisyon, hücre siklusunun denetimi, DNA tamir mekanizması ve apoptoziste rol oynayan onkogen ve tümör süpresör genlerde meydana gelen kromozomal yeniden düzenlenmeler, delesyonlar, mutasyonlar vb. mutasyonel mekanizmalar gözlenir (Nussbaum L. R. ve ark. 2005).

Kanser genleri iki sınıfa ayrılır: Onkogenler ve tümör süpresör genler. Onkogenler hücre bölünmesini aktive ederken, tümör süpresör genler kontrolsüz hücre bölünmesini baskılayarak ters yönlü etki göstermektedirler (Nussbaum L.R. ve ark. 2005).

Genetik mekanizmalarda meydana gelen bozuklukların saptanması kanser gelişimindeki tüm soruları yanıtlayamamaktadır. Bu nedenle, son yıllarda epigenetik çalışmalar önem kazanmıştır (C. Plass, 2002).

Yapılan çalışmalar, karsinogenez sırasında genomda meydana gelen bozuklukların genetik olduğu kadar epigenetik temelleri de ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (C. Plass, 2002).

Epigenetik mekanizmalardan biri olan metilasyon, tümör süpresör genler gibi kritik büyüme regülatör elemanlarının transkripsiyonel susturumunda temel role sahiptir. DNA hipermetilasyon ve hipometilasyonu gen ifadesinde değişikliklere yol açarak karsinogenez oluşumunda etkili olabilmektedir. Metilasyon 5-mC bölgelerde meydana gelir ve bu bölgeler tüm genom dizisinde yer alabildiği gibi CpG adacıları denen bölgelerde daha yoğun bulunmaktadır (Baylin B. S., 2005).

Sitogenetik ve moleküler analizler ile belirlenebilen hücresel mekanizma bozuklukları hastalık patogenezini belirlemekte ve tedaviye yön vermektedir (Mrozek K. ve ark., 2004).

LÖSEMİ NEDİR?

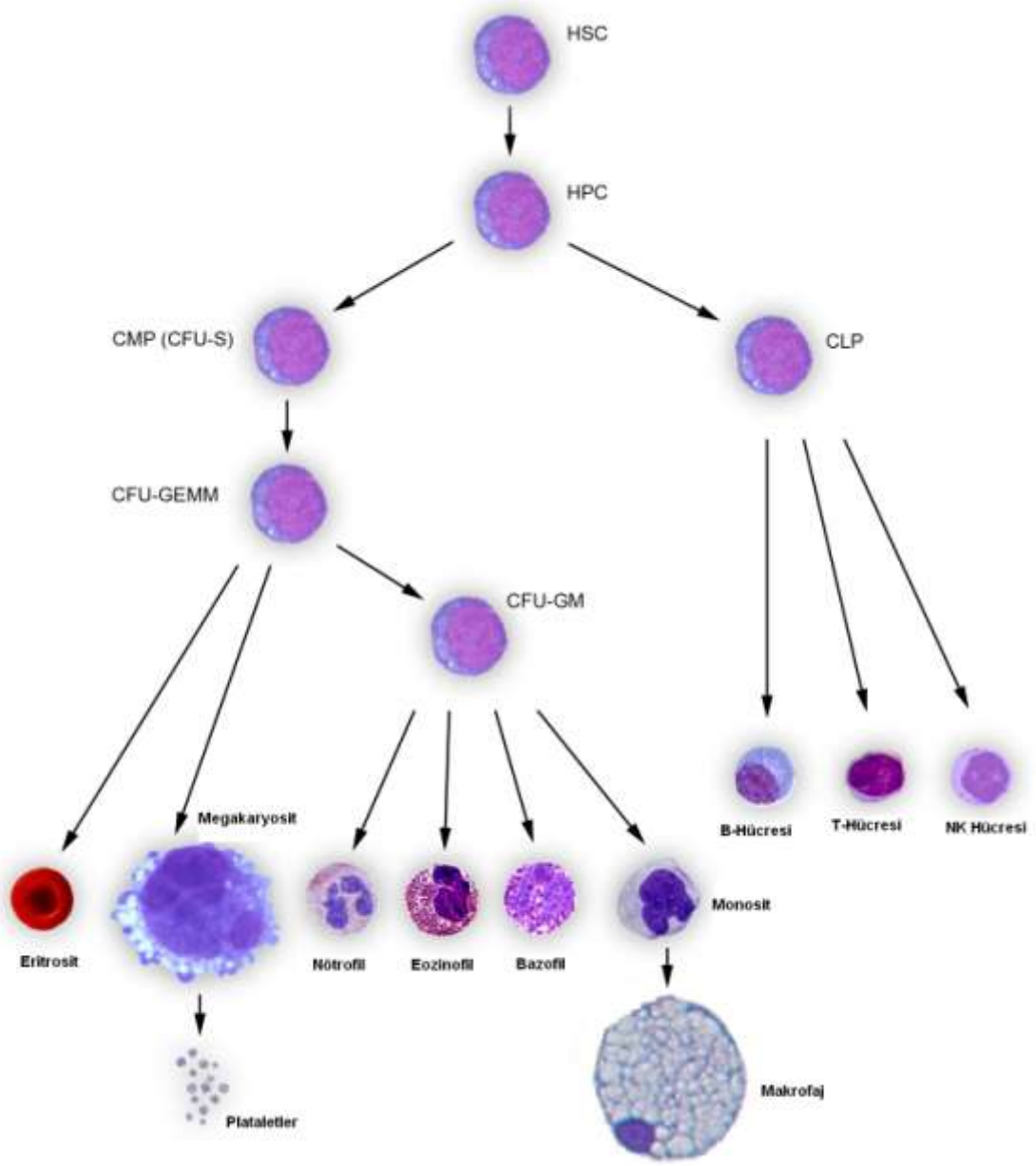
Lösemi, lenfoid organ ya da kemik iliğinden köken alan lökositlerin kontrolsüz proliferasyonu ile karakterize hastalık grubudur. Hematolojik maligniteler sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine dikkat edildiğinde başlıca akut ve kronik olarak iki sınıfa ayrılmaktadırlar. Akut lösemiler; olgunlaşmamış hücrelerin, blastların öne çıktığı, tedavi edilmediğinde sağkalım süresinin birkaç ay veya haftalarla sınırlandırıldığı hastalık alt grubudur. Kronik lösemiler ise; olgun hücrelerin öne çıkması ve sağkalımın yıllarca sürebilmesiyle karakterizedir. Akut lösemiler, lenfoid ve miyeloid olmak üzere hematopoietik kök hücrenin farklılaşmaya başladığı ilk basamak temel alınarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Kök hücreler CFU-L(Lenfoid koloni yapan ünite)' ye farklılaşırsa lenfoid; CFU-GEMM (Granülosit, eritrosit, megakaryosit, makrofaj yapan ünite)' ye ayrılırsa miyeloid olarak adlandırılır (Kern W F.(Ed.), PDQ Hematology, 2005).

2.1.1. Hematopoez ve Kök hücre Modeli

Kök hücre modeline göre tüm kan hücreleri pluripotent hematopoetik kök hücrelerden köken almaktadır. Hematopoietik kök hücreleri kendini yenileyebilme ve farklılaşma özelliğine sahiptirler. Kemik iliğinde az sayıda bulunmaktadır ve morfolojik olarak ayırt edilmeleri mümkün değildir. Pluripotent kök hücrelerin büyük çoğunluğu hücre döngüsünün G_0 evresindedir. Toplam hücre sayısının yaklaşık %1' i bir immatür hücre belirteci olan CD34 ekspresyonu olan pluripotent kök hücrelerden oluşmaktadır. Kök hücre içeren bir kemik iliği süspansiyonu elde etmek için CD34 belirteçli hücrelerin ayrıştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Kern W F.(Ed.), PDQ Hematology, 2005).

Çevresel kanda az da olsa ''çevresel kan progenitör hücreleri'' olarak adlandırılan hematopoetik kök hücreler bulunmaktadır. Kandaki progenitör hücre oranını arttırmak için yüksek dozlarda hematopoietik büyüme faktörü uygulaması veya sitotoksik tedavi uygulaması kullanılmaktadır (Kern W F.(Ed.), PDQ Hematology, 2005).

Pluripotent hematopoetik kök hücrelerden, yönlenmiş progenitör hücreler oluşmaktadır. Tüm olgun kan hücreleri progenitör hücre serilerinin farklılaşması sonucu oluşmaktadır. Yönlenmiş progenitör hücreler CFU (colony forming unit=koloni oluşturan birim), BFU (Burst-forming unit) gibi çeşitli isimler almaktadır. İlk farklılaşma CFU-GEMM (Granülosit, eritrosit, monosit/makrofaj ve megakaryosit) veya CFU-L (Lenfoid) serisine doğru gerçekleşmektedir. Hematopoetik büyüme faktörlerinin de etkisiyle binlerce olgun kan hücresi oluşmaktadır (Kern W F.(Ed.), PDQ Hematology, 2005). Şekil 2.1' de hematopoetik gelişim tablosu yer almaktadır.



Şekil 2-1 : Hematopoetik Gelişim

HSC: Hematopoetik Kök Hücre, **HPC:** Hematopoetik Progenitör Hücre, **CMP:** Common Myeloid Progenitörler **CLP:** Common Lenfoid Progenitör **CFU:** Koloni Oluşturan Ünite **NK:** Natural Killer- Doğal Öldürücü (**http://daley.med.harvard.edu./assets/Willy/willy.htm**)

2.2. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ

Akut miyeloid lösemi çocukluk çağında da görülmekle birlikte ileri erişkin yaş grubunda en sık gözlenen lösemi tipidir (T.H.D., 2006). Blastlar ve yeterince diferansiye olmamış öncül hücreler kontrolsüz çoğalma ile kemik iliğini istila ederek normal hematopoezi baskılamaktadır. Etkin kemoterapi yöntemlerinin bulunmasından önce birkaç hafta ya da ayla sınırlı olan sağkalım süresine sahip özellikle çocukluk çağındaki hastaların lösemi prognozunda ciddi düzelmeler sağlamıştır. Ancak birçok ileri yaştaki erişkin hasta grubunda mevcut tedavi olanaklarıyla iyileşmede tam olarak başarı sağlanamamaktadır.

2.2.1. Akut Miyeloid Lösemi İnsidans

Amerikan Kanser Derneği verilerine göre lösemi tanısı konulan her 31500 bireyden 21500' ü hastalık nedeniyle hayatını kaybetme tehlikesiyle karşı karşıyadır. Akut lösemi tüm kanser türlerinin % 3' ünden azını oluşturmakla birlikte çocukluk çağı ve 39 yaş altı yetişkinlerde kansere bağlı ölümlerde önde gelmektedir. Batıda tüm lösemilerin arasında AML oranı yaklaşık olarak % 25' dir. Dünyada AML sıklığı ABD, Avustralya ve Batı Avupa' da en yüksek düzeyde gözlenmektedir. 1975-2003 yılları arasında ABD' de yılda yaşa bağlı AML insidans oranı 3,4 / 100.000' dir (Deschler B. ve Lübbert M., 2006).

AML insidansı yaşla birlikte artış göstermektedir. 65 yaş altında insidans yüz bin bireyde 1,3 iken, 65 yaş üstü bireylerde yüz binde 12,2 olarak saptanmıştır. Akut miyeloid lösemilerin insidansı son yıllarda yaklaşık olarak aynı düzeyde seyretmektedir (Dinçol, G. ve ark., 2003).

2.2.2. Akut Miyeloid Lösemi Etiyoloji

AML' nin etiyolojisi AML hastalarının çoğunda tam olarak açıklığa kavuşturulamamakla birlikte, her geçen gün lökomogenik ajanlar hakkında daha fazla bilgi sahibi olunmaktadır.

AML gelişimi birçok risk faktörü ile ilişkili olmakla birlikte, bilinen riskler belirlenen vakaların sadece küçük bir kısmını açıklamaktadır. Bu riskler yaş, hematolojik hastalıklar, kimyasalların, virüslerin ve radyasyonun yol açtığı genetik bozukluklar, kemoterapi veya sağlığı etkileyecek meslek sahibi olmak vb. olarak sayılabilmektedir. Risk faktörleri ile ilgili bilgiler Tablo 2.1' de yer almaktadır (Deschler B. ve Lübbert M.,2006).

Tablo 2-1 : Akut Miyeloid Lösemi İle İlişkili Risk Faktörleri.

(Deschler B. ve Lübbert M.,2006)

Genetik hastalıklar	Down sendromu Klinefelter sendromu Patau sendromu Ataksia telenjiektazi Shwachman sendromu Kostman sendromu Neurofibromatozis Fanconi anemisi Li-Fraumeni sendromu
Fiziksel yada kimyasal etkenler	Benzen Pipobroman gibi ilaçlar Pestisitler Sigara kullanımı Formaldehit vb. kimyasallar Herbisitler
Radyasyona maruziyet	Terapi yada terapi ile ilişkili olmayan radyasyon

Kemoterapi	Alkali ajanlar Topoizomeraz-II inhibitörleri Antrasiklinler Taksanlar

2.2.3. Akut Miyeloid Lösemide Prognoz

AML' de tedaviye yanıtı çeşitli klinik ve biyolojik özellikler belirlemektedir. 60 yaşın üzerinde olmak, tedavi öncesi performans durumunun kötü olması, AML' nin daha önceki bir kemoterapi ya da MDS gibi bir hematolojik hastalık sonucu ortaya çıkması (Sekonder AML) ve yüksek lökosit sayısı(>20.000/mm3) veya yüksek laktat dehidrogenaz düzeyi olumsuz prognostik faktörlerdir. Bunların yanısıra, ‘‘multidrug rezistans MDR1 protein’’ ve immunofenotipleme incelemeleri prognostik bilgiler sağladığı gibi lösemik hücrelerin sitogenetik analiziyle prognoz göstergesi olan önemli bilgiler elde edilmektedir. Sitogenetik anomaliler kimi FAB alt-tipleri ile korelasyon gösterdiği gibi [örneğin; M3' te t(15;17)] önemli prognostik faktörler olarak da kabul edilmektedir (Dinçol, G. ve ark., Klinik Hematoloji, 2003).

Klinik ve laboratuvar verilerinin kombinasyonu ile AML' de üç prognostik alt-grup tanımlanmıştır. Bunlardan olumlu prognostik alt-grup, 60 yaş ve daha genç hastaların yaklaşık %20' sini oluşturmaktadır (Dinçol, G. ve ark., 2003 Klinik Hematoloji). Lösemik blastlarda t(15;17), t(8;21), inv(16) veya t(16;16) ve normal sitogenetikli olgularda FLT3 yokluğunda NPM1 mutasyonu veya CEBPA mutasyonu olan olgular iyi risk grubunda yer almaktadır. Orta risk grubunda normal sitogenetik, +8, t(9;11) ve tanımlanamayan anomaliler ile inv(16) veya t(16:16), t(8;21) olup c-KIT mutasyonu taşıyan olgular yer almaktadır. Kötü risk grubunda ise normal sitogenetik olup NPM1 yokluğunda FLT3-ITD mutasyonu olması, kompleks (3 veya 3' den fazla anormal klon) karyotip, -5, 5q-,-7, 7q-, 11q23, non t(9;11), inv(3), t(3;3), t(6;9), t(9;22) anomalilerine sahip olgular yer almaktadır (T.H.D., 2011).

Yaşları 60’ ın üstünde olan vakalarda genellikle prognoz kötüdür ve bunlarda 5 yıllık yaşam süresi %10’ dan azdır (Dinçol, G. ve ark., Klinik Hematoloji, 2003).

2.2.4. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ SINIFLANDIRMASI

Akut lösemiler çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma biçimlerinden 1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından oluşturulan French-American-British (FAB) sınıflamasında akut lösemiler, hücrelerin morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır (Bennett M. J., ve ark.,1989; J. Vardiman W. J. ve ark., 2002). FAB sınıflandırmasına göre AML alt grupları Tablo 2.2’ de yer almaktadır.

Akut lösemilerin prognozunda immunolojik ve sitogenetik bulguların öneminin ortaya çıkmasıyla hücre yüzey antijenleri ve sitogenetik bulguların da eklendiği MIC ve EGIL sınıflandırmaları oluşturulmuştur. “EGIL Sınıflaması’’ (European Group for the Immunological Classification of Leukemias), adı verilen sistemde AML’ ler 2 veya daha fazla miyeloid marker (MPO, CD13, CD33, CDw65, Cd117) ekspresyonu ile tanımlanmış ve akut lenfoblastik lösemiler de B-I pro-B hücreli, B-II common-B hücreli ve B-III pre-B hücreli olarak 3 alt gruba ayrılmaktadır (Ali R., 2006.; G. Abdul-Hamid, 2011; J. Vardiman W. J. ve ark. 2002).

Akut lösemilerin prognozunda sitogenetik ve moleküler genetik markerların öneminin öne çıkması ile 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından hematopoietik ve lenfoid neoplazmaları kapsayan WHO sınıflaması oluşturulmuştur. WHO sınıflamasında; morfoloji, immünfenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmıştır. Akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30’ dan %20’ ye indirilmiş ve nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir (Ali R., 2006; G. Abdul-Hamid, 2011; Vardiman W. J. ve ark. 2002).

WHO sınıflamasında akut lösemiler; miyeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. WHO sınıflandırmasına göre AML alt grupları, Tablo 2.3’ de yer almaktadır. Akut miyeloid lösemiler ise 4 alt gruba bölünmüştür.

FAB sınıflaması AML alt grup sınıflandırmalarında, temel sınıflandırma kriterlerini içermektedir. (Bennett M. J. ve ark,1985). Bu nedenle günümüzde AML sınıflandırmasında hala FAB sınıflandırmasından yaralanılmaya devam edilmektedir. FAB sınıflandırmasına göre AML alt-grupları Tablo 2-2' de gösterilmektedir.

Tablo 2-2 : FAB Sınıflandırması, AML Alt Grupları
(Ali R., 2006; J. Vardiman W. J. ve ark. 2002)

M0	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M3	Akut promiyelositer lösemi
M3V	Akut varyant promiyelositer lösemi (mikrogranüler)
M4	Akut miyelomonositer lösemi
M4Eo	Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi
M5a	Akut monoblastik lösemi
M5b	Akut monositer lösemi
M6	Akut eritrolösemi
M7	Akut megakaryoblastik lösemi

WHO sınıflandırmasına göre AML alt-grupları Tablo 2-3' de yer almaktadır.

Tablo 2-3 : WHO Sınıflandırması , AML Alt Grupları
(Ali R., 2006; J. Vardiman W. J. ve ark. 2002)

1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML
•t(8;21)(q22;q22), (AML 1/ETO) ile AML •inv(16)(p13q229 veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH1-1)ile AML •Akut promiyelositer lösemi (t(15;17)(q22;q22), (PML/RARα) ile AML) •11q23 (MLL) anomalisi ile AML
2. Çoğul Seri Displazisi ile Seyreden AML
•Önceden miyelodisplastik sendromlu •Önceden miyelodisplatik sendrom olmadan

3. Tedaviye İkincil AML ve MDS
•Alkilleyici ajanlarla ilişkili •Topoisomeraz II inhibitör ile ilişkili
4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML

2.2.5. AML İLE İLİŞKİLİ SIK GÖRÜLEN SİTOGENETİK ANOMALİLER

Akut miyeloid lösemi malign klonun oluşumunda edinsel somatik mutasyonların büyük önemi vardır. Lösemilerin çoğunda bu mutasyonlar, dengeli resiprokal bir translokasyon sonucu ortaya çıkmakta ve AML' de hematopoetik progenitör hücrelerin proliferasyon üstünlüğü ile sonuçlanmaktadır. Kromozomal translokasyon kırılma noktalarının klonlanması ile AML patogenezinden sorumlu bazı genler saptanmıştır. Bunların patogenetik mekanizma ve prognoz açısından önemlileri aşağıda yer almaktadır (Dinçol, G. ve ark., Klinik Hematoloji, 2003). Tablo 2.4' de ise AML' de karşılaşılan sitogenetik anomalilerden bazılarının prognostik önemleri gösterilmiştir.

1- Core binding factor (CBF) ile ilgili translokasyonlar:

CBF hemotopoetik gelişimde önemli rol oynayan genlerin aktivasyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerinden biridir. Aktivasyonunu gerçekleştirdiği genlerden bazıları IL-3, Miyeloperoksidaz, GM-CSF, M-CSF reseptörü ve T-Hücresi reseptör enhancer' dır. Heterodimerik yapıya sahip CBF, CBF-alfa (AML1) ve CBF-beta olmak üzere iki komponentden oluşur ve bunlarda t(8;21) ve inv(16) da yer alan translokasyonlardır ve tek başına olumlu prognostik özellik göstermektedirler (Dinçol, G. ve ark., Klinik Hematoloji, 2003). CBF ilişkili her iki translokasyonda hematopoezi bozsalarda tek başlarına AML başlatmak için yeterli değillerdir (Özbek, U., 2006).

2- t(8;21)(q22;q22)

t(8;21) AML hastalarında saptanan ilk sitogenetik anomalidir. En sık gözlenen translokasyonlardan olan t(8;21) erişkin AML vakalarının %15' inde saptanmaktadır (Dinçol, G. ve ark., 2003 Klinik Hematoloji). Translokasyon sonucu 21. kromozomda yer alan AML1 geni (RUNX1 geni) ile 8. kromozomda yer alan ETO geni (RUNXITI geni) füzyon geni oluşturmaktadır. t(8;21) translokasyonu ile birlikte del(9) ve cinsiyet

kromozom (–X veya –Y) kaybının da gözlendiği durumlar bulunmaktadır (Reikvam H. ve ark. 2011; Peniket A. ve ark. 2005). t(8;21), genellikle FAB M2 tipinde saptanır ve kemoterapiye iyi yanıt, yüksek remisyon oranı ve uzun süreli hastalıksız yaşam belirleyicisidir (Dinçol, G. ve ark., Klinik Hematoloji, 2003).

3- t(15;17) (q22;q21)

Tüm yetişkin AML hastalarının %10' unda t(15;17) translokasyonu saptanmaktadır. AML M3 tipine özgü translokasyondur ve FAB M3 alt-tipi AML hastalarının yaklaşık %95' inde saptanmaktadır. 15. kromozomda yer alan 'promyelositik lösemi' (PML) geninin 17. kromozomda bulunan ''retinoik asit reseptör alfa'' (RARalfa) geni ile füzyon protein oluşturması sonucu hematolojik farklılaşma durmaktadır (Özbek U., 2006 ; Gillard EF, Solomon E, 1993). t(15;17) pozitif AML all-trans retinoik asit (ATRA) tedavisine iyi yanıt vermektedir. ATRA, PML/RARalfa' nın dominant negatif inhibisyonunu yenerek lösemi hücrelerinin diferasyonunu sağlamaktadır. (Dinçol, G. ve ark., Klinik Hematoloji, 2003).

4- inv (16)

Kromozom 16q22' deki ''core binding factor beta'' (CBF-β) ile kromozom 16p13' teki düz kas miyozin ağır zincir (SMMHC) geninin füzyonundan oluşmaktadır. İnv(16) FAB M4Eo' da rastlanan ve iyi prognoz gösteren kormozom anomalilerinden biridir (Dinçol, G. ve ark.,Klinik Hematoloji, 2003; Liu, P.P., ve ark. 1995).

5- Kromozom 11q23 translokasyonları:

Kromozom 11q23' te MLL (mixed-lineage leukemia) geni bulunmaktadır. Bu genin translokasyonlarına karma dizi lösemilerinde ve topoizomeraz II inhibitörleri ile tedaviyi izleyen sekonder lösemilerde rastlanır. Lösemilerde bu kromozomdaki MLL genini içeren translokasyonlar çok sık olup ALL, AML ve hatta lenfoma vakalarında tanımlanmıştır. MLL içeren translokasyonlardan en sık rastlananı t(9;11)' dir. Erişkin AML FAB M5' de saptanmaktadır MLL-AF9 füzyon geninin oluşmasına yol açan bu translokasyonun farelerde lösemi yaptığı gösterilmiştir. Lökomogenezin terminal

miyeloid diferansiyasyon ve apoptozun engellenmesi sonucu geliştiği düşünülmektedir. AML' de diğer sık rastlanan MLL içeren translokasyonlar t(6;11), t(10;11), t(11;17), t(11;19) ve 11+' tir. MLL translokasyonları kötü prognoz göstergesi olması açışından klinikte önem taşımaktadır (Dinçol, G. ve ark., Klinik Hematoloji, 2003).

6- t(11;17)(q23;q25)

Bu translokasyon, AML hastalarında FAB alt-tipi M4 ile daha sık ilişkilendirilmekle birlikte FAB M1, FAB M2 ve FAB M5 ile de ilişkilendirilmektedir. t(11;17), 11. kromozomda yer alan PLZF geninin 17. kromozomda yer alan RARA geni ile füzyon gen oluşturması sonucu meydana gelmektedir. Füzyon geninin kodladığı kimerik protein retinoik asit tarafından sağlanan transaktivasyonu dominant negatif olarak inhibe etmektedir. Bu durum sonucu hematopoetik gelişim promyelositik safhada durmaktadır (Özbek U., 2006).

7- t(7;11)(p15;p15)

AML bulgularında t(7;11) translokasyonu sonucu NUP98-HOXA9 füzyon gen ürünü oluşmaktadır (Chou WC. ve ark, 2009). AML' de FAB alt tipi M2 ve M4 ile ilişkilendirilmiştir (Özbek U., 2011 ; Borrow J. ve ark., 1996). HOX gen ailesinin hematopoetik regülasyonda önemli rolü bulunmaktadır (Özbek U., 2006).

8- Translokasyonlar Dışındaki Bazı Kromozom Anomalileri

Yeni tanı konan AML vakalarının %70' inde anormal karyotipler saptanmaktadır. AML' de +8, del(5q), -7, ve –Y' de sık rastlanan anomalilerdir. Bunların patogenezle ilişkisi bilinmemekle birlikte MDS' yi ve alkilleyici ajanlarla tedaviyi takiben gelişen sekonder lösemilerde kompleks kromozom anomalileri ile beraber 5 ve 7 anomalilerine sıklıkla rastlanmaktadır (Dinçol, G. ve ark., 2003 Klinik Hematoloji).

9- del(9q)

Tek başına da saptanabilen del(9q) anomalileri, t(8;21) ya da t(15;17) anomalileri ile birlikte de görülebilmektedir (Peniket A. ve ark. 2005). Yapılan araştırmalar t(8;21) anomalisi taşıyan AML hastalarının 15% – 35%' inin kromozom 9 delesyonu taşıdığını göstermektedir. (Reikvam H. ve ark. 2011)

10- del (7)

Kemoterapi ve benzen gibi karsinojenlere maruz kalma sonucu oluşan lökomogenezde 7. kromozom delesyonları sıklıkla gözlenmektedir (Zhang L. ve ark., 1998).

11- Trizomi 8

AML tanısı alan hastalarda %10-15 oranında görülmektedir (Zhang L. ve ark., 1998). Tek başına gözlendiğinde iyi prognostik özellik gösterirken, aynı karyotipte 3 ve daha fazla birbiri ile ilişkili olmayan kromozomal anomalinin varlığı yani kompleks karyotip ile beraber kötü prognostik özellik sergilemektedir (Kozan S. ve ark. 2010).

12- Trizomi 21

AML tanısında en sık görülen ikinci trizomidir. Ayrıca akut lenfoblastik lösemi de ve AML M0 ve M7' de de rapor edilmiştir (Kozan S. ve ark. 2010).

13- Trizomi 9

AML'de trizomi 8 ve trizomi 21 kadar sık tanımlanan bir sitogenetik anomali değildir. Ancak az da olsa özellikle AML M2, M4 ve M5 alt-tiplerinde tanımlanmaktadır (Kozan S. ve ark. 2010).

14- Hiperdiploidi

Hiperdiploidi hücrenin normal şartlarda taşıdığı 46 kromozomun üzerinde kromozom sayısına sahip olmasıdır. Hiperdiploidili olgularda prognoz

değerlendirmesinde karyotip anomalilerinin çeşit ve sayısı önem taşımaktadır (Fıratlı T., 2004).

15- Kromozom Anomalisi Olmayan Olgular

AML' li olguların yaklaşık yarısında klonal kromozom anomalisi saptanmamaktadır. Bu olgular orta prognozlu gurubu oluşturmakla beraber, bunların sadece % 40' ının uzun dönem sağ kalımı mümkün olabilmektedir. (Özbek U., 2006; Reikvam H. ve ark. 2011)

Tablo 2-4: AML' de Saptanan Bazı Sitogenetik Anomalilerin Prognostik Önemleri.

SİTOGENETİK ANOMALİ	İYİ PROGNOZ	KÖTÜ PROGNOZ
t(8;21)	+	-
t(15;17), t(11;17)	+	-
İnv(16)	+	-
11q23 anomalileri	-	±
t(7;11) t(11;17)	-	+
Normal karyotip	+	-
t(4;11)	-	+
t(9;22)	-	+
t(6;9)	-	+
Hiperdiploidi	±	±

+= özelliğe sahip, - = özelliğe sahip değil, ± = iyi ve kötü özellikte

2.3. APOPTOZ

Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Wyllie, Kerr ve Currie tarafından kullanılarak kompleks organizmaları meydana getiren toplam hücre sayısını kontrol altında tutan programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Corazza N.,ve ark., 2009; Zhivotovsky, B. ve Orrenius, S., 2009). Apoptoz yani "apo-ptosis" eski Yunan kökenli bir kelime olup 'yaprak dökümü' anlamına sahiptir. Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü ve hücre intiharı, apoptoz ile aynı anlamı taşımaktadır (Yılmaz, İ., 2005).

Apoptoz embriyonik gelişimde, doku homeostazisinin sağlanmasında, hasarlı ve enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında etkindir. Bunlar;

- Fonksiyon kaybına uğrayan yaşlı hücrelerin ortadan kaldırılması,
- Timusta otoreaktif T hücrelerin ortadan kaldırılması, sitokin deplesyonunun ardından B ve T lenfositlerinin hücre ölümü gibi olayları içeren immün hücrelerin seçimi,
- Embriyonik gelişim esnasında meydana gelen kuyruk, parmak arası perdeler gibi dokuların ortadan kaldırılmasında
- Sitotoksik kemoterapi, radyasyon, ısı, radyoterapi gibi çeşitli etkenler ile meydana gelen DNA hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında,
- İmmün sistem yetersizliğine neden olan virüs, Adenovirüs infeksiyonu vb. viral hastalıklarda meydana gelen hücre ölümleri gibi olayları kapsamaktadır.

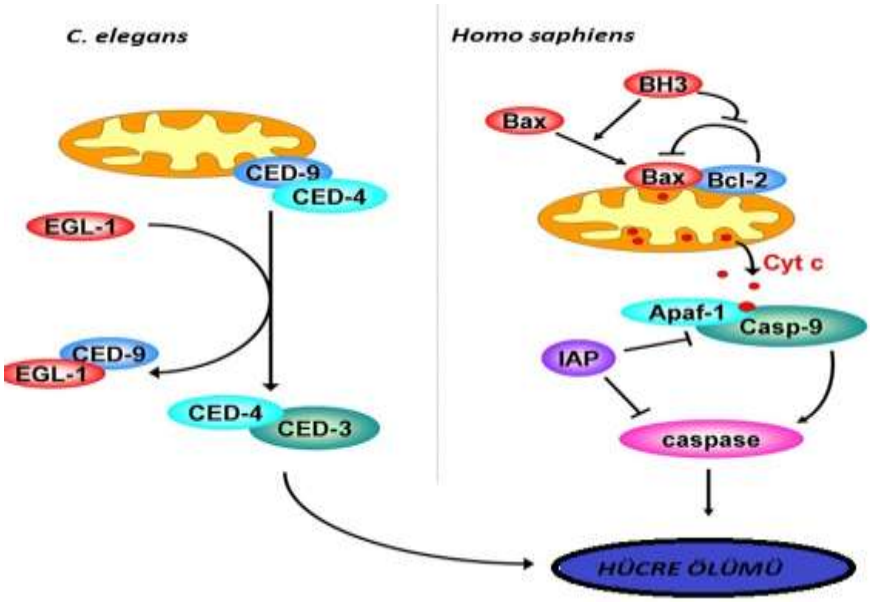
Vücut hücreleri homeostazisi için apoptoza ihtiyaç duymaktadır. Örneğin, kemik iliğindeki sürekli üretimi dengede tutabilmek için insanda hergün yaklaşık $5x\,10^{11}$ hücre apoptoza gitmektedir (Cooper, G. M. ve Hausman, R. E. 2006).

2.3.1. Apoptoz Mekanizmaları

Bir nematod olan *C. elegans* üzerinde apoptoz hakkındaki yapılan çalışmalar apoptozda anahtar rol oynayan üç gen olduğunu göstermiştir. *C. elegans* normal gelişimi sırasında toplam vücut hücreleri sayısı 1090 olup bunların 131' i apoptoz ile

ortadan kaldırılmaktadır. Apoptozun oluşması için iki gen, ced-3 ve ced-4, gerekli olup herhangi birinin inaktive olması durumunda apoptozun gerçekleşmediği yapılan çalışmalarca gösterilmiştir. Bunun yanında üçüncü gen ced-9' un negatif yönde etki ettiği yüksek derecede ekspresyonunun normal apoptoz oluşumunu bozduğu gösterilmiştir.

Memelilerde ced-3, ced-4 ve ced-9 ile ilişkili genler tanımlanmış olup apoptozda efektör ve regülatör proteinleri kodladıkları saptanmıştır. Ced-3, bir düzineden fazla proteazı içeren, aktif bölgelerinde sistein (C) içerdikleri ve susbstratı olan proteinleri aspartik asitten (Asp) sonra kestikleri için ''kaspazlar'' olarak adlandırılan ailenin ilk tanımlanan üyesidir. Kaspazların regülasyonu hücre sağkalımının belirlenmesi için yaşamsaldır. Ced-4' ün memelilerdeki homoloğu APAF-1, kaspazlara bağlanarak onların aktivasyonunu uyarmaktadır. Memelilerde Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri ise Ced-9 ile ilişkilendirilmiştir ve anti-apoptotik etki yaratmaktadırlar. Şekil 2.2' de *C.elegans* ve insan hücrelerinde apoptoz yolağı gösterilmektedir (Cooper, G. M. ve Hausman, R. E., 2006).



Şekil 2.2 : C.elegans ve İnsan Hücrelerinde Apoptoz Yolağı

Apoptoza giden hücrelerde kromatinde yoğunlaşma ve nükleik asitlerde yıkılma meydana gelmektedir. DNA, endonükleazların aktivasyonu ile internükleozomal bölgelerden 180-200 baz çifti büyüklüğünde parçalara ayrılmaktadır. Hücre büzülmeye başlamakta, su kaybı gerçekleşmekte ve sitoplazmik tomurcuklar oluşarak apoptotik

cisimlere parçalanmaktadır. Hücre organellerinde de yıkım meydana gelmektedir (Mitchell, R.N. ve Cotran, R.S., 2003; Ma, H. ve ark., 2005).Hücre iç zarının içinde yer alan PS (fosfotidilserin)' nin dış yüzeye çıkması apoptotik hücrenin tanınması ve fagosite edilmesi için sinyal niteliği taşır (Collazo, C. ve ark., 2006; Ricci M.S. ve ark., 2007).

Hücre iç mekanizmasına bakacak olursak, apoptoz mekanizmalarını iç ölüm yolağı ve dış ölüm yolağı oluşturur ve hücre için gerekli temel yaşam sinyallerinin alınamaması, engellenmesi ya da bu yolakların doğrudan aktivasyonu ile hücre ölümünü başlatır. Bu yolaklarda rol oynayan başlatıcı ve efektör kaspazlar apoptoza yön vermektedirler (Tang D.G. ve Kehrer J.G., 2007).

Kaspazlar inaktif pro-enzimler olarak sentezlenmektedirler. Kaspaz alt üniteleri bazı durumlarda birbirlerine bağlanarak kaspaz aktivasyonunu düzenlemektedir (Cohen, G.M., 1997; Chang, H.Y. ve Yang, X., 2000). Kaspazlar genellikle kaskad formunda fonksiyon göstermekte olup kaspaz adaptörleri kaskadın en üst basamağındaki kaspazları uyarmaktadır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler tarafından regüle edilen bu durumda aktive olan kaspazlar diğer kaspazları aktive ederek spesifik hücresel proteinleri yıkıma uğratarak apoptoza sebep olmaktadırlar (Chang, H.Y. ve Yang, X., 2000).

2.3.1.1. Kaspaz Kaskadının Aktivasyonu

Apoptotik sinyallere cevap kaspazların aktivasyonu ile başlamaktadır (Kuan, C. ve Kuida, K., 2003).

Ölüm reseptörleri olarak bilinen TNFR(Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü) ailesinin üyeleri (Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6) apoptoziste önemli role sahiptirler. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölgede kalan kısımları ölüm bölgesi (DD) olarak adlandırılan bir aminoasit dizisi içermektedirler (Igney F.H., ve Krammer, P.H., 2002; Tomatır, A.G., 2003). TNFR ailesi üyelerinden transmembran tip-2 protein olan Fas reseptörünün trimerizasyonunun ardından ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC) meydana gelmektedir. DISC merkez öğesi olan apoptotik adaptör

molekül FADD, DD aracılığıyla protein-protein etkileşimleri boyunca Fas molekülüne katılmaktadır. Daha sonra bu kompleks FADD prokaspaz-8 veya prokaspaz-10 gibi başlatıcı kaspazlara bağlanmaktadır. Proteaz aktivasyonu ile otokataliz sonucu aktif prokaspaz-8 ve/veya prokaspaz-10 oluşmaktadır. Bu da kaspaz-3,-6,-7 gibi efektör kaspazları aktif hale getirerek kaspaz kaskadının başlamasına neden olur. Bu mekanizma DD'leri içeren TNFR' nin diğer üyeleri tarafından da kullanılmaktadır (Kuan, C. ve Kuida, K., 2003).

Kaspaz kaskad aktivasyonunu tetikleyen bir diğer yolda sitokrom-c önemli rol oynamaktadır. Apoptoz erken safhalarında mitokondri zarları arasındaki alandan sitozole sitokrom-c salınmaktadır. Bu süreçte bcl-2 ailesi üyeleri önemli rol oynamaktadır. Sitokrom-c' nin salınımını takiben hücre içi apoptozom kompleksi oluşumu sağlanmaktadır. Bu kompleksi sitokrom-c ile birlikte APAF-1, ATP ve inaktif başlatıcı kaspaz olan prokaspaz-9 oluşturmaktadır. Apoptozom oluşumuyla aktive olan prokaspaz-9 , kaspaz 9' a dönüşürken kaspaz-3, -6 ve -7 gibi efektör kaspazları aktive etmektedir. Bu kaspazlar, kaspaz aktivasyonunun kaskad tarzında proteolitik çoğalmasını başlatmaktadır (Evan, G.I. ve Vousden, K.H., 2001; Igney F.H. ve Krammer, P.H., 2002; Kuan, C. ve Kuida, K., 2003).

2.3.1.2. Dış Ölüm Yolağı

TNFR gen ailesine ait hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri apoptozun dış ölüm yolağını başlatmaktadır.(Longley ve Johnston, 2007) TNFR gen ailesi, hücre ölümüne öncülük eden kaspazların aktivasyonunun sağlanması için başlatıcı kaspazlar ile etkileşmektedir. Bu süreçte önce reseptörler ligandlara bağlanmaktadır. Fas, FasL, TNF-R1, DR3, DR4 ve DR5 en iyi tanımlanmış ölüm reseptörleri ve ligandlarıdır. TNF reseptör bağlantılı apoptoz uyarıcı ligand (TRAIL) ve FasL üçlü bir yapı oluşturmaktadır**.** Bu üçlü yapı ölüm reseptörlerini tanıyarak onlara bağlanmaktadır. FasL ve TRAIL bağlanmasından sonra DR4, DR5 ve Fas, DISC eklenmesiyle değişime uğramaktadırlar. DISC ilk olarak Fas-FasL apoptotik sinyalde tanımlanmıştır. DR4, DR5 ve Fas, DD vasıtasıyla Fas-bağlantılı ölüm bölgesini (FADD) çalıştırmaktadır. FADD, ölüm tetikleyici bölgelerle (DED) etkileşime girerek inaktif olan kaspaz-8' in aktivasyonunu sağlamaktadır. Bunun sonucunda aktif enzimden 2 alt ünite

ayrılmaktadır. Hücrelerde kaspaz-8 kesilmekte ve kaspaz-3,-6,-7 aktive edilmektedir. Diğer bazı hücrelerde ise, kaspaz-8 aracılığı ile pro-apoptotik Bcl-2 homoloğu olan Bid' in kesimi yapılmaktadır. Bid' in kesimiyle mitokondriden sitokrom-c içeren faktörlerin salınması için Bax ve Bak uyarılmaktadır. Böylece mitokondrial apoptoz yolağı tetiklenmektedir (Ricci M.S. ve El-Deiry, W.S., 2007;Corazza N. ve ark., 2009).

2.3.1.3. İç Ölüm yolağı

Mitokondri aracılığıyla meydana gelen yolaktır. Reaktif oksijen türevlerininin (ROS) üretiminde artış olması, pro-apoptotik moleküllerin salınması ve ATP üretiminde azalma meydana gelmesi iç ölüm yolağında etkin üç ayrı faktör olarak yer almaktadır.

Mitokondrial zar potansiyelinde kayıp meydana gelmesi sonucu ATP sentezinin bloke olmasıyla apoptoz oluşumunda katkısı olan ROS birikimi başlamaktadır.

Bcl-2 ve Bax gen ailesinin ürünlerinin de apoptozun regülasyonunda önemi bulunmaktadır. Bcl-2 ailesinin üyeleri ve Bcl-xL ve Bcl-2 antiapoptotik etki gösterirken, öncü ölüm üyeleri Bax ve Bak içerirler. Ölüm reseptör sinyalleri birçok hücrede, Bid' in tBid' e bölünmesini katalize eden kaspaz 8' in proteaz aktivitesi sonucu oluşur. Daha sonra Bax ve Bak sitozolden dış mitokondriyal membrana doğru yer değiştirirler bu sayede membran sitokrom-c ve Smac/DIABLO (IAPs-apoptoz protein inhibitörlerinin antogonisti) gibi proapoptotik moleküllere geçirgen hale gelir. Smac/Diablo kaspaz inhibitörleri olan IAP (Apoptoz proteinleri inhibitörü)' larin aktivitesini engelleyerek hücre ölümünü uyarır (Chandar, N. ve Viselli, S., 2012).

Apoptozu uyaran çoğu ölüm sinyali, mitokondri hasarı sonucu zarlar arası boşlukta yer alan apoptotik aracıların (örneğin sitokrom-c) salınımı APAF-1, pro-kaspaz-9 ve ATP içeren ''Apoptozom'' adlı yapının oluşumunu sağlamaktadır. Kaspaz-9'un aktive olması apoptozom oluşumuyla meydana gelmektedir. Kaspaz-9, aktivasyonu sonrası kaspaz-3 gibi ''aşağıda'' (down-stream) yer alan efektör kaspazlara bağlanmaktadır (Tang, D.G. ve Kehrer, J.P., 2007). Kaspaz-9 proteolitik kesim ile kaspaz-3 gibi diğer kaspazları aktive etmektedir ve hücreyi ölüme sürüklemektedir. (Cooper, G. M. ve Hausman, R. E., 2006)

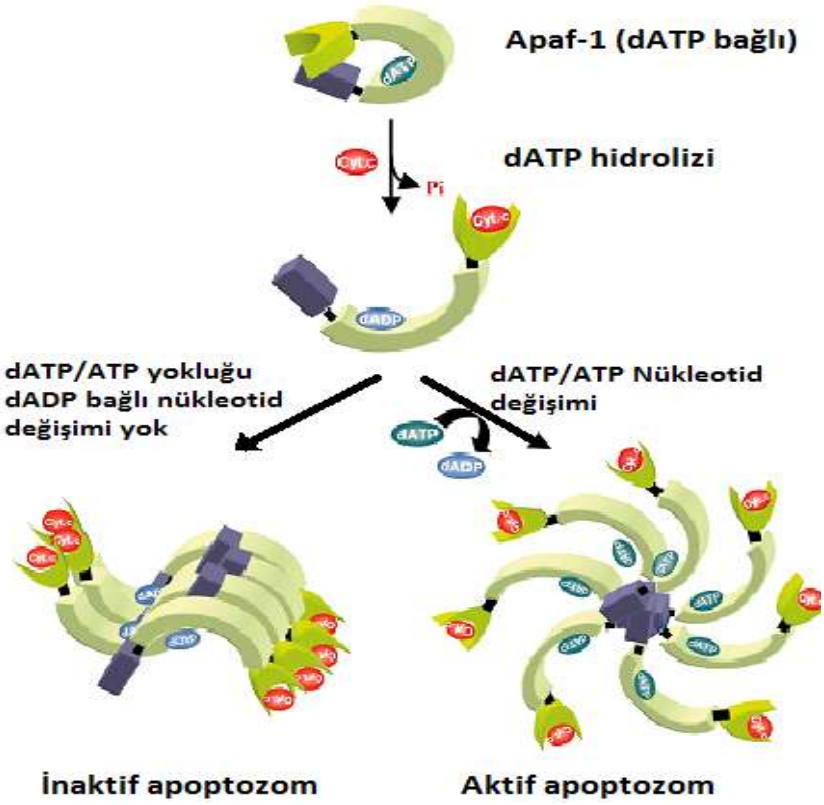
2.3.2. Kanser ve Apoptoz

Apoptoz mekanizmalarında meydana gelen bozukluklar kanser hücrelerinde yaygın olarak gözlenmektedir. Kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz gözlenmediğinden bu hücrelerin sağkalım süresi normal hücrelere kıyasla daha uzun olmaktadır. Normal hücrelerin sağkalımı büyüme faktörleri ve hücre dışından gelen sinyallere bağlıdır; buna karşılık tümör hücreleri normal hücrelerin gereksinim duyduğu faktörlerin yokluğunda bile kolayca hayatta kalabilmektedir. Bu hücrelerin apoptoza gitmeyip hayatta kalmaları sadece primer tümör oluşturmakla kalmamakta vücudun başka bölgelerinde metastatik hücrelerin canlılığını korumalarını ve çoğalmalarını sağlamaktadır (Cooper, G. M. ve Hausman, R. E., 2006).

Apoptozis inhibisyonu lösemi etyopatogenezini etkileyen, tedavi ve sağkalımı olumsuz yönde etkileyebilen kemoterapi direncinden de sorumludur. Lösemi hücrelerinin apoptoza uğrayamaması, DNA hasarına yol açarak etki eden kemoterapötik ilaçlara karşı direnç göstermelerine yol açmaktadır (Jia, L. ve ark. 2001).

2.3.3. APAF-1 Geni

Apoptotik proteaz aktive edici faktör olarak adlandırılan APAF-1 geni 12q23.1 lokalizasyonunda yer almaktadır. APAF-1 geni apoptozda rol oynayan sitoplazmik bir proteini kodlamaktadır. APAF-1 geninin kodladığı protein; WD-40 bölgesi, kaspaz bağlayıcı bölge (CARD) ve bir ATPaz bölgesinin(NB-ARC) çoklu kopyalarını içerir. Bu genin kodladığı proteinin üzerine kaspaz ve ATP' nin bağlanmasının ardından Apoptozom adı verilen oligomer oluşur. Apoptozom kaspaz-9 öncül haline bağlanarak onun parçalanıp aktive olmuş formuna dönüşmesini sağlamaktadır. Aktive olmuş kaspaz-9 kaspaz kaskadını başlatarak hücreyi apoptoza sürüklemektedir (Anonim 2, 2011). Şekil 2.3' de APAF-1' in aktif ve inaktif formları gösterilmektedir.



Şekil 2-3 : Aktif ve İnaktif Apoptozom

Son 10 yılda yapılan çalışmalara bakıldığında APAF-1 ve kaspaz-9 seviyesinin hücrelerin antikanser ilaçlara karşı duyarlılık saptamasında rol oynayabileceğini gösterilmektedir (Svingen, P.A. ve ark., 2000). APAF-1 gen ürünü olan proteinin apoptoz iç yolağında merkezi rol oynayan apoptozom oluşumuna katılmasından dolayı, seviyesinde meydana gelen değişikliklerin karsinogeneze katkısı olabileceği düşünülmekte ve araştırmalarda hedef olarak dikkat çekmektedir.

APAF-1 knock-out farelerdeki hücrelerin çeşitli apoptotik uyaranlara karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. APAF-1' de meydana gelen delesyonların ras ve myc transformasyonuna uğramış murin hücrelerinde tümörigenik efektleri arttırabildiği ortaya konmuştur (Jia, L.ve ark. 2001). İnsan HL-60 lösemi hücrelerinde APAF-1 aşırı ekspresyonunun mitotik inhibitör etki gösteren paclitaxel ve etoposide adlı ilaçlara hassasiyeti arttırdığı gösterilmiştir. (Svingen, P.A. ve ark., 2000).

İnsan lösemi hücrelerinde yapılan bir çalışmada, UV ışık ile apoptozu tetiklenen hücre serilerinde APAF-1 protein seviyesi daha düşük olan hücrelerin, daha yüksek olan hücrelere oranla apoptoza daha dirençli olduğunu ortaya koyulmaktadır (Jia, L.ve ark. 2001).

Yapılan bir çalışmada insan lösemi blast hücrelerinin, APAF-1' de demetilasyon sağlamak için 5-aza-2-Deoksisitidin ile muamelesinden sonra APAF-1 protein seviyesi ile APAF-1 mRNA seviyesinde herhangi bir bağlantı görülmemiştir. Bazı lösemi hücreleri yüksek seviyede APAF-1 mRNA eksprese ederken APAF-1 protein seviyesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında APAF-1 DNA promotör metilasyonunun APAF-1 ekspresyonunun bloke olmasına yol açabileceği ve protein seviyesinin post-transkripsiyonel seviyede düzenlenebileceği belirtilmiştir (Fu, W.N. ve ark. 2003).

Literatürde yer alan başka bir çalışmada ise nüks eden akut lösemi hastaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, APAF-1 ve prokaspazların seviyesinde sistematik olarak değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuçlar başlatıcı kaspazların seviyesindeki çeşitliliğin lösemi türlerindeki varyasyonuna işaret etmektedir. Ayrıca apoptotik yolakta rol oynayan elemanların ekspresyon seviyelerindeki farklılık nedeniyle, akut lösemi hastalarında karşılaşılan ilaç direnci farklılıklarının asıl sorumlusunun APAF-1 geninde meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Svingen, P.A. ve ark 2000).

2.4. EPİGENETİK

''Epigenetik'' terimi DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile ilişkili, geri dönüştürülebilir, kalıtılabilir özellik taşıyan olaylar dizisini tanımlamaktadır.

Epigenetiğin kanser gelişiminde olduğu kadar somatik gen tedavisi, klonlama, transgenik teknolojisi, mobil elementlerin aktivitesi, genomik imprinting ve gelişim anomalilerinde de önemi bulunmaktadır (Ekmekçi, C.G., 2005).

Epigenetik değişimler transkripsiyonel seviyede 2 alt gruba ayrılmaktadır.

- DNA metilasyonu
- Histon Modifikasyonu

Biyolojik yolaklarda rol alan elemanlar post-transkripsiyonel seviyede RNAi' lar tarafından da değişikliğe uğratılabilmektedir (Bora, G. ve Yurter, H.E., 2007).

Hücresel mekanizmaların herhangi birinde epigenetik mekanizmalarla meydana gelen aksaklıklar tümör supressor genleri yada onkogenlerin anlatımını etkileyerek kanser oluşumuna sebebiyet verebilmektedir.

Epigenetik değişiklikler geri dönüştürülebilmekte, oysa genetik bozukluklarda geri dönüş sağlanamamaktadır. Hematolojik malignitelerde kullanılan decitabine, 5-aza-2′-deoksisitidin gibi ilaçlar epigenetik mekanizmayı geri dönüştürme fonksiyonu ile işlev görmektedir (Plass, C. 2002).

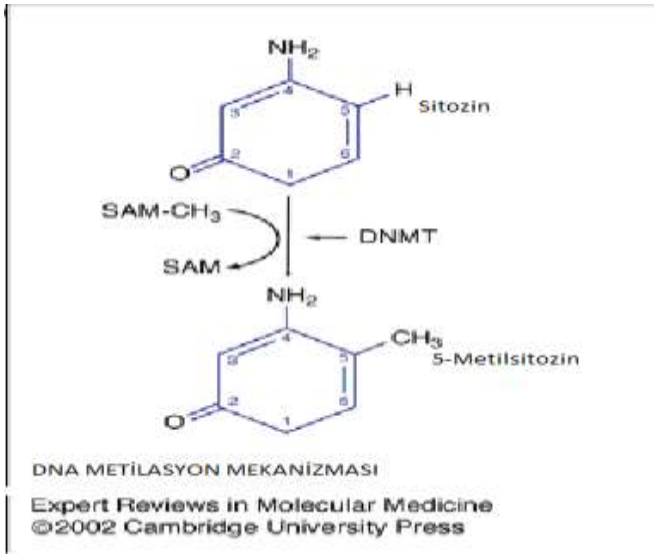
2.4.1. DNA METİLASYONU

Kimyasal bir modifikasyon olan DNA metilasyonu kalıtılabilir epigenetik bir değişikliktir. Araştırmacılar tarafından üzerinde bir çok çalışma yapılan, normal memeli gelişiminde gen ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalardır. Bununla birlikte kanserde genlerin promotör bölge hipermetilasyonları, tümör süpresör genler gibi kritik büyüme regülatör elemanlarının transkripsiyonel susturumunda temel role sahiptir. DNA hipermetilasyonu ve DNA hipometilasyonu gen ifadesinde değişikliklere yol açarak karsinogenez oluşumunda etkili olabilmektedir (Şekil 2.5) (Baylin, S. B., 2005; Jones, P. A. ve Baylin, S.B., 2002).

2.4.1.1. DNA Metilasyon Mekanizması

DNA metilasyonu çoğunlukla genlerin CpG dinükleotid bölgesinde, sitozinin C-5 pozisyonuna, metil grubunun (–CH3) kovalent bağ yapması ile gerçekleşmektedir. Bu kimyasal reaksiyon DNA metiltransferaz ailesi (DNMT) tarafından katalize edilmektedir (Şekil2.4). DNA metiltransferazların rol oynadığı memeli hücrelerinde meydana gelen epigenetik bir modifikasyon olan DNA metilasyonunda, DNMT1 adı verilen DNA metil transferaz ailesi üyesi enzim, var olan metillenmiş bölge ya da yarı

metilenmiş bölgeden öncelikle sorumlu iken, DNMT3a ve DNMT3b yeni oluşan metilasyonu yürüten transferaz enzimlerdir. Metil grubu vericisi olarak S-adenozil metionin (SAM) kullanılır (Amatori, S. ve ark. 2010).



Şekil 2-4 : DNA Metilasyon Mekanizması.

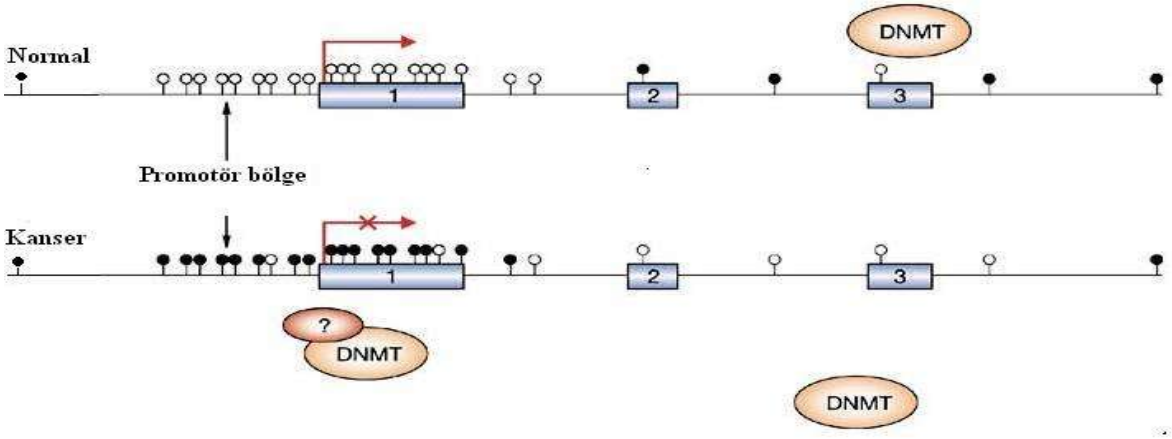
(Expert Reviews in Molecular Medicine 2002 Cambridge University Press)

CpG dinükleotidleri bölgeler halinde sıralanmıştır ve CpG adacıkları olarak adlandırılmaktadır. Bu adacıklar genellikle tüm gen promotör bölgelerinin yaklaşık %60' lık bölümünü kapsamakta ve genomun %1 kadarını oluşturmaktadırlar. DNMT aktivitesi promotör CpG adacıkları ve yakınındaki regülatör dizilerin gen ekspresyonunu hipermetilasyon yoluyla düzenlemekte ve genin sessizleşmesine sebebiyet vermektedir. DNA metilasyon paterni kanserde değişim göstermektedir. Genel gen hipometilasyonu gösteren tümör hücreleri ve DNMT1 artışı aynı anda gerçekleşmektedir. Aynı zamanda DNA hipo- ve hipermetilasyonlarının tümü spesifik gen bölgelerinde meydana gelmekte ve protoonkogenlerin aşırı-ekspresyonu ve tümör supresör genlerin susturumuyla sonuçlanabilmektedir. Bu gözlemler DNA metilasyonunun karsinogenezde rolü olduğunu ortaya koymaktadır.

Genomda tüm sitozinlerin %3-4' ü metile halde bulunmaktadır. Transkripsiyon faktorleri metile olan bu bölgelere bağlanamadıklarından, DNA metilasyonu doğrudan mRNA transkripsiyonun baskılanmasına neden olur.

Kanserde DNA metilasyon değişiklikleri normal şartlarda hücrelerin metile durumdaki dizilerinin metilasyon kaybına uğraması yani metillenmemiş olması

hipometilasyon; normal şartlarda metillenmemiş olan dizilerin metilasyona uğraması da hipermetilasyon olarak adlandırılmaktadır (Plass, C. 2002).



Beyaz yuvarlaklar CpG adacıkları, siyah yuvarlaklar hipermetile bölgeler, 1,2,3 ilgili genin exonları, DNMT; DNA metil-transferaz

Copyright © (2003) Massachusetts Medical Society

Şekil 2.5 : Kanserli Ve Normal Hücre Geninde Metilasyon

2.5. KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ

Kardeş kromatid değişimi (KKD) homolog kromozomal bölgelerde meydana gelen karşılıklı parça değiş tokuşuyla tanımlanmaktadır. KKD sonucu DNA' da kırılmalar ve yeniden düzenlenmeler olmakta fakat kromozom morfolojisinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemektedir. KKD bölünmekte olan hücrelerde spontan olarak meydana gelir (Latt, A. S. ve Schreck, R.R., 1980).

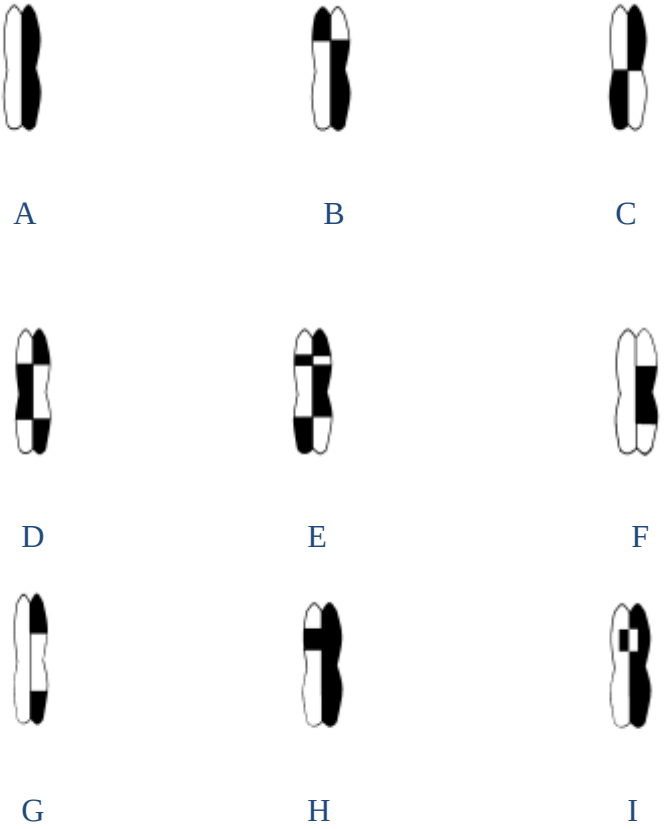
İlk defa 1957 yılında J.H. Taylor otoradyoaktif yöntemin ardından non-radyoaktif ortamda kromozomların kardeş kromatidleri arasındaki değişimi inceleyerek kardeş kromatid değişimini (KKD) tarif etmiştir. Yöntemin çok fazla zaman alması ve radyoaktivite içermesi nedeniyle farklı alternatif yöntemler geliştirilmiştir (Barch, M.J., 1984). 1972 yılında Zacharov ve Egolina timidin analoğu olan 5-Bromodeoksiüridin(BrdU)' i Timidin H3 yerine kullanarak kardeş kromatidleri

gözlemlemişlerdir. Bu yöntemde kullanılan BrdU replikasyon esnasında yeni yapılan DNA molekülünün yapısına girmekte ve ardında Giemsa ile boyama da kardeş kromatidler farklı boyanmaktaydı. Kullanılan yöntemde BrdU' lu DNA, Hoechst 33258 boyasına diğer kromatidden daha sıkı bağlanıp UV ışığa maruziyetinde boyayı bırakmamaktaydı. Daha sonra Giemsa ile boyanan BrdU' lu DNA diğer kromatide göre daha açık renkte boyanmakta ve kardeş kromatid değişimini gözlemlemek için imkan vermekteydi (Neto, J. M. de P. ve Ferrari, İ., 1981; Barch, M.J., 1984).

Genotoksik ajanlara maruziyet sonucu DNA' da meydana gelen, replikasyon esnasında onarılamayan hatalar KKD' nin oluşumunu ya da artmasını sağlamaktadır. DNA hasarına neden olan pek çok ajanın KKD sıklığını arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle fiziksel yada kimyasal çeşitli etmenlerin mutajenik yada karsinojenik etkilerini ortaya çıkarmakta duyarlı bir parametre olarak kabul edilmektedir (Banerjee, A. ve Benedict, F. W., 1979).

Kanser oluşumunda DNA düzeyindeki mutasyonların ve kromozomal anomalilerin önemi bilinmektedir. Genomik instabilitenin ortaya çıkmasıyla bu tür olayların ortaya çıkma sıklığı artmakta, malign klonun evolüsyonu hızlanmakatdır. Dolayısıyla genomik instabilite göstergelerinden biri olan KKD sıklığının kanser hücrelerinde araştırılması önem taşımaktadır. (Kram J.D. ve ark., 1993; Nejad, K. S.ve ark. 2009)

KKD analizinde kardeş kromatid değişim sayısının hesaplaması Şekil 2.6 temel alınarak yapılmaktadır (Yücel, N.K.,2006). KKD analiz fotoğraf örneği Şekil 2.7' de yer almaktadır.



Şekil 2-6 : Kromozomlarda Oluşabilecek KKD' lerin Şematik Gösterimi

A) KKD oluşumu yok. BrdU iki tam döngü veya iki tam döngünün ilkinde DNA sentezine girmiştir.

B) Tek KKD oluşumu

C) KKD oluşumu yok. Sentromerde oluşan KKD.

D) İki KKD oluşumu

E) Üç KKD oluşumu

F-G) DNA sentezi sırasında BrdU'nun iki replikasyon döngüsünden fazla DNA' ya girmesi, KKD olarak değerlendirilmez.

H) Boya kalıntısı veya BrdU' nun DNA ile tam birleşmemesi KKD olarak sayılmaz.

I) Bir kromatin genişliğinden daha dar olan boyanma KKD olarak değerlendirilebilir.



Şekil 2-7 : AML Hastasında Kardeş Kromatid Değişimi Gösterimi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Hasta Grubunun Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Çalışmamızda 2009-2011 yılları arasında İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı ve Genel Dahiliye Bilim Dalı Poliklinik ve servislerine başvuran, takip ve tedavisi yapılan yeni tanı, remisyon ve nüks döneminde bulunan yetişkin (yaş ≥18) AML olgularının periferik kan ve kemik iliği materyali gereç olarak kullanılmıştır.

Çalışma grubunda toplam 21 AML' li olgu vardır. Olguların yaş ortalaması 37,24 yaş aralığı 20-65'dir. Örneklerin %47,6' sı kadın %52,4' ü erkek AML' li olgulardan oluşmaktadır. Olgular FAB (French-American-British) sınıflama sistemine göre sınıflandırılmıştır.

3.1.2. Kontrol Grubu Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Herhangi bir sistemik hastalığı olmayan yaşları 18' den büyük sağlıklı bireyler gönülü bilgilendirme formunu dikkatlice okuduktan ve araştırmaya dahil olduklarını kabul ettiklerine dair imza attıktan sonra araştırmaya alındılar.

3.1.3. Kimyasallar, Enzimler, Çözeltiler, Kitler ve Cihazlar

3.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar

Distile Su (dH2O)

Asetik Asit

Metanol

Etil Alkol

İsopropanol

Sodyum Klorür

Potasyum Klorür

BrdU_5 bromo 2’ deoksiürüdine

Florodeoksiürüdin

Timidin

Phytohemoglobunin

Mineral Yağ (Sigma)

Etidyum Bromid

Agaroz

EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)

$Na_3C_6H_5O_7$

NH_4Cl

$KHCO_3$

KH_2PO_4

Na_2HPO_4

3.1.3.2. Kullanılan Enzimler

Proteinaz K

Taq DNA polimeraz(HotStart Taq, Fermentas)

CpG Metilaz (M.SssI, Zymo)

Tripsin

3.1.3.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Kültür Medyumu

Kemik İliği için; RPMI 1640

%20 Fetal Calf Serum

%1-1,5 Penisilin streptomycin

%2 L-Glutamin

Periferik Kan İçin; RPMI 1640

Fetal Calf Serum

Penisilin streptomycin

Phytohemoglobulin

Hoechst 33258 Solüsyonu

Stok Hoechst 33258 Solüsyonu ; 0,05 Hoechst 33258 tartılıp 10ml PBS eklenir.

Hoechst 33258 Çalışma Solüsyonu :0,1 ml stok Hoechst 33258 solüsyonu 99,9 ml PBS ile dilüe edildi.

2XSSC Solüsyonu

17,5 gr NaCL, 8,82 gr $Na_3C_6H_5O_7 . 2H_2O$ tartılıp 1000ml distile suda çözüldü.

KCL Solüsyonu

250ml distile suya 1,398 gr KCL konuldu ve eriyinceye kadar karıştırıldı.

Gurr Buffer Solüsyonu

1000ml distile suya 1 tablet konarak çözünmesi için iyice çalkalandı.

Gey's Buffer Solüsyonu

8,291gr NH_4Cl

1,001gr $KHCO_3$

1lt Distile dH_2O ile tamamlanıp otoklavlandı.

PBS Solüsyonu

1000ml distile suya sırasıyla;

8,00gr/lt NaCL

0,2 gr/lt KCL

0,92 gr/lt Na_2HPO_4

0,2 gr/lt KH_2PO_4 eklendi.

Eklenen her maddeden sonra çözünme için iyice karıştırıldı ve ardından sterilize edildi.

TAE(50X)

2M Tris –base

Glasial asetik asit %5,71

EDTA (pH 8.0) 0.05 M

1000ml çözelti için;

Tris-base 242 gr tartılır, çözündükten sonra aşağıdaki kimyasallar eklendi.

Glasial asetik asit 57.1ml

0,5M EDTA 100ml (pH:8,0)

Leishman Boya

200mg Leischman

100ml Methanol ; ile karıştırıldı.

3.1.3.4. Kullanılan Kitler

High Pure Pcr Template Preperation Kit

Ez-DNA Methylation Gold Kit

3.1.3.5. Kullanılan Cihazlar

1-Işık Mikroskobu _ Olympus Routine microscope CX41

2-Santrifüj_ Beckman Allegra X- 22 Coulter Centrifuge, Eppendorf centrifuge 5810R, Mikrosantrifüj _ Mıcro 120 Hettich

3- Spektrofotometre(quantifikasyon) _ Nanodrop nd-1000

4- Pipet takımı(microlitre) 05-10, 10-100, 100-1000 mikrolitrelik _ eppendorf, thermo)

5- UV Görüntüleme Cihazı_Bio-Rad

6- Buzdolabı

a-) +4 buzdolabı _Uğur

b) -20 buzdolabı_Indesit

c) -80 buzdolabı_Ilshin/Sanyo/Thermo

7- Çeker ocak

8- Yatay Elektroforez tankı_E-C Mıdıcell/Thermo Electron Corporation

9- Güç Kaynağı_EC -105

10-PCR cihazı _ Techne 512

11-Su Banyosu _ Memment

12-Shaker_Labnet(Orbit 1900).

13- Hybridizasyon Fırını _ Techne Hybrigene

14-Vortex

15-Mikrodalga Fırın

16-Distile su cihazı

17-Manyetik Shaker

18-Isıtmalı Shaker_Techne DB-2D

19-Tartı

20-Etüv

21- Pasteur Fırın

22-UV lamba

23-Otoklav

24-Analiz Uygulama Programı _ İkarus

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemi

Kemik İliği ve Periferik Kan Hücre Kültürü

Kemik iliği hücre kültürü için RPMI 1640 medium içine FKS(fetal calf serum), L-glutamin ve Penisilin eklenerek kültür ekim için hazırlandı. Periferik kan kültürü için RPMI 1640 medium içine FKS(fetal calf serum), L-glutamin ve Penisilin ve Phytohemoglobunin eklenerek ekime hazır hale getirildi. Kemik iliği için 24 ve 48 saatlik hücre kültürü uygulanırken, periferik kan kültürü için 72 saatlik hücre kültürü uygulandı.

Hastadan alınan kemik iliği materyali 24 ve 48 saatlik olmak üzere iki ayrı kültür tüpüne doldurulmuş medyuma alındı. 37 derecelik etüvde daha önceden 30-45 dk

uygun sıcaklığa getirilmiş 9 ml kültür medyumu doldurulan 15ml' lik tüplere hastanın lökosit yoğunluguna göre ekim yapıldı.

24 saatlik ekim yapılan kültürlere tüp başına 2 damla olmak üzere florodeoksiürüdin yani A solüsyonu eklendi. A solüsyonu eklenmesinin ardından 17 saat sonra, 24 saatlik kültürlere Timidin yani B solüsyonu eklendi. 5 saat etüvde bekledikten sonra kültür medyumuna 50 mikrolitre kolşisin eklendi. 37 derecelik etüvde 20 dakika bekledikten sonra 3000 rpm de 5 dk santrifüj edilip, daha önce 37 °C' ye ısıtılmış KCL solüsyonu eklenerek ters yüz edildi, 2 dk ardından harvest işlemine geçirildi.

48 saatlik kültürlere ertesi gün, birim tüp başına 50 mikrolitre kolsemit uygulandı. Ardından 30 dakika 37 °C' lik etüvde bekletildi. Etüvden çıkarılan kültür medyumu 3000 rpm de 5 dk santrifüj edilip, daha önce 37 °C' ye ısıtılmış KCL solüsyonu eklenerek ters yüz edildi ve 2 dk sonra harvest işlemine geçildi.

Ekim Yapma

10ml hazırlanan kültür falkon tüpe alındı. Kemik iliği ve periferik kan hücreleri hazırlanan kültüre lökosit yoğunluğuna göre ekim yapıldı.

Harvest Yöntemi

Kolşisinden sonra etüvden alınan tüpler 5 dk 3000 rpm' de santrifüj edildi. Tüpte yer alan süpernatant atıldı. 37 °C sıcaklığa getirilmiş olan KCL 10-13 ml tüpe eklendi. Kemik iliği için 2 dk, kan için 8 dk beklenildi. 5 dk 3000 rpm' de santrifüj edildi. Çıkarılıp süpernatant atıldı. 3:1 metil alkol-asetik asit karışımı hazırlandı (fiksatif), vortekste karıştırırken fiksatif damla damla eklendi (yaklaşık 8-10 ml). 5 dk 3000 rpm' de santrifüjlendi. 2 kere fiksatif ile yıkama yapıldı.

Yayma

Temiz lamlara hasta isimleri, çalışılan tarih ve çalışan kişi ve yöntem ismi adı yazıldı. Tüpteki pellet yoğunluğuna göre fiksatif eklendi. Dikkatli şekilde pipet ile

hüceler alındı ve lam üzerine yayıldı. Kuruduktan sonra yaşlandırılmak üzere etüve kaldırıldı.

Yaşlandırma

Lamlar kuruduktan sonra hemen yaşlandırmaya geçildi. 2 saat 90 °C' de Pasteur fırınında yaşlandırıldı.

G Bantlama

40 ml Gurr Buffer: 10 ml Leishman boya karışımı hazırlandı. 50 ml PBS içine 50 mg Tripsin eklenerek hazırlanan karışım 37 °C' de ısıtıldı ve ısısının degişmemesine dikkat edildi. 50ml PBS ve 50ml distile su iki ayrı mezüre konuldu. Her bir preperat örneği kan için 30-40 saniye , kemik iliği için 15-25 saniye tripsin içinde bekletildi. PBS ile yıkandı. Ardından ortalama 2-3 dk boya içinde bekletildi ve daha sonra su ile yıkanıp dik konumda kurutuldu.

3.2.2. SCE Bantlama Yöntemi

Stok Hoechst 33258 solüsyonu: 0,05 g Hoechst 33258 tartılıp 10 ml PBS' de eritildi. 2XSSC solüsyonu 17,5 g NaCl, 8,82 g $Na_3C_6H_5O_7,2H_2O$ tartılıp 1000ml distile suda çözüldü. BrdU ilave edilen kültürlerden elde edilen preperatlar 5 dk PBS' de tutuldu. Ardından 10 dk Hoechst 33258 çalışma solüsyonunda bekletildi. Çıkarılan preperatların üzerine 3-4 damla Hoechst 33258-PBS konup üzeri 24x50 mm lamelle kapatıldı. 30dk siyah ışığa (GE Black Light ,F20 T12-BLB) maruz bırakıldı. Preperatlar distile suda iyice yıkandı. 60-65 °C' deki 2XSSC' de 30dk tutuldu. Distile suda iyice yıkandı. Leishman çalışma solüsyonunda 3-5 dk boyandı. Distile suda yıkanıp kurutulan preperatlar, immersiyon yağı ile muamele edilerek mikroskop yardımıyla incelendi.

3.2.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Edtalı tüple gelen kanı 50' lik falkona alarak üzerine gelen kan miktarının 2 katı kadar Gey's Buffer ilave edildi. 15 dk 4 °C' de bekletildi. 1500 rpm' de 10°C 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek pellet homojenize edildi. Üzerine hücre yoğunluğuna bağlı olarak PBS eklendi. 990 mikrolitre PBS ve 10 mikrolitre PBS ile sulandırdıgımız solüsyon 100 kat sulandırıldı. Toma kamerasında hücreler sayıldı. 5 milyon hücre olacak şekilde 3 ayrı tüpe ayrıldı ve geriye kalan hücre lökosit olarak saklanmak üzere ayrıldı.

'High Pure Pcr Template Preperation Kit' protokolünde belirtildiği üzere; Başlangıç materyali 250 mikrolitre PBS ile sulandırılmış lökositler mikrosantrifüj tüpüne 200 mikrolitre Binding Buffer 40 mikrolitre proteinaz K ile birlikte karıştırılarak 70 °C' de 10 dk bekletildi. Daha sonra 100 mikrolitre Isopropanol alkol ekleyip iyice karıştırıldı.High Pure filtre tüpüne karışım alınarak 8000xg' de 1 dk santrifüjlendi. Filtre tüpünün altında kalan sıvı atılarak önce 500 mikrolitre Inhibitor Removal Buffer ile 8000xg' de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra iki kez Washing Buffer ile 8000xg 1 dakika santrifüj uygulandı. En son daha önce 70 °C' ye çıkarılmış 200 mikrolitre Elution Buffer fitre tüpüne eklendi. 8000xg' de santrifüjlendi ve mikrotüpün içinde çözünmüş DNA elde edildi. İzole edilen DNA yı uzun süre saklamak için –15 °C ile –25 °C arasında bekletildi. Kısa süreli kullanım için 4 °C ile 8 °C arası saklandı.

3.2.3.1. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi

İzole edilen DNA konsantrasyon ve saflıkları ölçüldü. Stok DNA örneğinden 1 mikrolitre örnek Nanodrop-nd 1000' e konuldu. Spektrofotometre de 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbsiyon değerleri ölçüldü.

Konsantrasyon= 20(sulandırma oranı)x 50 sabit x OD 260 = ng/mikrolitre DNA

DNA' nın saflığı;

OD 260/280 >1.8 RNA

OD 260/280 <1.8 Protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

3.2.4. DNA Metilasyonu ve Bisülfit Modifikasyonu

Hastaların periferik kanlarından elde edilen DNA' lar 'Ez DNA Methylation Gold Kit' ile metilasyon ve bisülfit modifikasyonuna tabi tutuldu. Ez DNA Methylation Gold Kit protokolünde belirtildiği üzere 20 mikrolitre CT-Conversion Reagent PZR tüpüne yerleştirildi. 98 °C' de 10 dk, 64 °C' de 2,5 saat bekletildi. Ardından PZR tüp içeriğinin sıcaklığı 4 °C' ye düşürüldü. 600 mikrolitre M-Binding Buffer, Collection tüpe yerleştirilmiş Zymo-Spin IC Column' a koyuldu. Ters-yüz edilerek iyice karıştırıldı ve karıştırılan solüsyona PZR tüpündeki içerik eklendi. 10.000xg' de 30 sn santrifüjlendi ve altta kalan sıvı atıldı. 100mikrolitre Wash Buffer tüpe eklendi ve 10.000xg max hızda 30 sn santrifüjlendi. Tüpün üzerine 200mikrolitre M-Desulphonation Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 15-20 dk bekletildi. Ardından tekrar 10.000xg' de 30 sn santrifüjlendi. Altta kalan sıvı uzaklaştırıldı. 2 defa; 200 mikrolitre Wash Buffer tüpe eklendi ve 30 sn 10.000xg' de çevrildi. Column 1,5 ml' lik santrifüj tüpüne yerleştirildi ve 10 mikrolitre M-Elution Buffer eklendi. 30 sn 10.000xg' de santrifüjlendi ve DNA elde edildi. Metilasyon sonrası DNA örneklerinin OD' leri tekrar hesaplandı.

Metilasyonda Kullanılan Pozitif Kontrollerin Hazırlanması (IVM)

In Vitro Metilasyon (IVM) ile pozitif kontrol oluşturulmasında;

- 10X CpG Reaction Buffer 2 mikrolitre
- 20X SAM (S-Adenosylmethionine), 12nM 1 mikrolitre
-CpG Methylase(4units/mikrolitre) 1 mikrolitre
-DNA 4 mikrolitre
- Distile steril su 12 mikrolitre

CpG Methylase (MsssI) protokolünde belirtildiği üzere, 30 °C' de gece boyu inkübe edildi. Sonra 65 °C' de 20 dk inaktivasyon için bekletildi.

Daha sonra içerik 'Ez-DNA Methylation Gold Kit' protokolünde belirtildiği üzere metilasyon aşamasına sokuldu.

3.2.5. Metilasyon Spesifik –Polimeraz Zincir Reaksiyonu(MS- PZR)

Modifiye edilmiş DNA, değiştirilmiş dizi için spesifik olan bir primer seti kullanılarak PZR ile amplifiye edildi. Bu amplifikasyonda tüm Urasil' ler (değiştirilmiş Sitozin' ler) Timin olarak amplifiye olurken, yalnizca 5-MC' ler Sitozin olarak kaldı. Amplifiye olmuş fragmentler analiz için elektroforez işlemine tabi tutuldu.

3.2.5.1. Kullanılan Primerler, PZR Reaksiyon İçeriği ve Döngü Koşulları

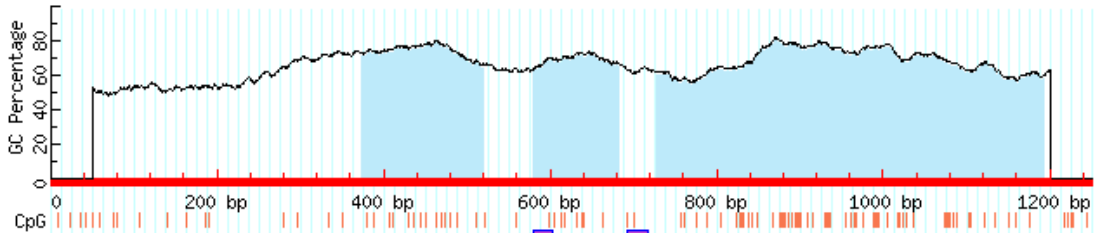
Kullanılan Primerler ve Yerleşim Bölgeleri

APAF-1 promotör bölgesi metilasyon durumunu saptamak için kullanılan primerler Tablo 3-1' de yer almaktadır. Promotör bölge GC oranı ise Şekil 3-1' de gösterilmektedir.

Tablo 3-1: APAF-1 Primerler

APAF1-UR	5'-CCA CTC ACT ACC TCT TCT TCT CC - 3'
APAF1-UF	5'-GAG GTT TAG TTA TGT TTT GTT TGT GG -3'
APAF1- MF	5'- AGG TT T AGT TAC GTT TCG TTC G - 3'
APAF1- MR	5'- CGT CCA CTC GCT ACC TCT TC -3'

Primer Lokasyonları: AB070829 1250 bp linear DNA



Şekil 3-1 : Primer Bölgesi GC Oran ve Dizi Lokasyon diyagramı

X ekseni: GC yüzdesi, Y ekseni baz çifti dizilim bölgesini göstermektedir.

APAF1 METİLE PRİMER: Ürün boyu 217 bp
APAF1-MF: AGGTTTAGTTACGTTTCGTTCG - 22mer
APAF1-MR: CGTCCACTCGCTACCTCTTC - 20mer

TGGGGTATAGCGGATAGGAAGTAACGGTTTATAATAACGTGAACGTTTTTG
ACGTGTAGCGGGAGTTTTAGAAAGCGTGGTCGAATTTGTAGTTTTTAATAAA
TGGTTCGTTTTTAAATTTTAGTTTTAATTTTTTTTGAGCGATAGGGGTATGTT
ATTAGTACGGGGGGAAATGAGATATAAGAAACGTTCGAAAGGGAAAAATA
AGGTTGGGTTGTTTTTTTTTTTTGGGGTTAAGATAGAGGTATAGAAGGTTTA
GGTTTGGGAGGTTGGATTATTTTCGGTTGGATGTTGAGTCGGGTGGGAGTTT
AAATAGTAGGGGGTTTATAGGAGGTCGGTTTAGGTAGTTTCGCGTTTATTTA
TTAGGTTAGGTTTAGGTACGTTTTTAGCGATAGTAGGTTTAGGTACGTTCGG
GGGTTTGTTTAGTTTTCGTTTTCGTTGTTTCGGGTTACGGGGGTTTTTTCGTTT
TCGTTTCGTTTTTCGGGTTTCGTAGTAGGGGTTTTTTTGGGTTTCGATTTTTTT
CGGTTTTTTATTTTAGATATGTTTGGAGATTTTAGGACGATAAGTTTAGGGT
AGTTTTTTTATTAGGGGGAGTAGGACGTGGTCGTTTTGGCGTTCGTGGGAAT
TTTGGGCGGTGATCGCGTTTTTTTATAGATTTGGTATCGTTTAGAGTTTAGTT
TTTTTTTTTTTTTCGGTATTTTCGTTGTTTTATTGAGTTTTTTAGTTGTTAGTTT
TATAGTTTTTTTAGGAGAGGTGGGCGGCGATTTTAATTTATAGCGTTTTTTAT
TGCGATATTGTTTTAAATTCGAGGAAATTTAAATTTTCGGGCGCGCGTAGGT
CGACGGGATTCGAGGAGGAGGGGTAGGACGAAGGGGTCGCGCGCGTTACG
TCGGGCGCGTCGTCGTTGTTCGAGTTCGGTATTGGTGGGAACGCGGCGCGTT
TTTGAGGTTTAGTTACGTTTCGTTCGCGGGGTAGGCGGGTATTTTTACGCGC
GCGGGTATGAGTCGTGGTAGGAGTGCGCGGCGGTAGCGGTGGTCGTTTTTT
GGGGTTTGGGGTGTGTTTATTTGTATAAGCGGGCGCGCGTCGTTCGGGTTGG
GTGGATTCGGCGGGATTTGATTGTTTCGTTGTTTAGAGGCGGAGAAGAAGA
GGTAGCGAGTGGACGTGATTGTTTTATTTCGGGTAAAAGGGATAGAATTAG
AGGTGGGGAGTTTGGGTAGTCGGCGATTCGCGAAGATTTGAGGTGTCGTAG
T

APAF1 UNMETİLE PRİMER: Ürün boyu 215bp
APAF1-UF: GAGGTTTAGTTATGTTTTGTTTGTGG
APAF1-UR: CCACTCACTACCTCTTCTTCTCC

TGGGGTATAGCGGATAGGAAGTAACGGTTTATAATAACGTGAACGTTTTTG
ACGTGTAGCGGGAGTTTTAGAAAGCGTGGTCGAATTTGTAGTTTTTAATAAA
TGGTTCGTTTTTAAATTTTAGTTTTAATTTTTTTTGAGCGATAGGGGTATGTT
ATTAGTACGGGGGGAAATGAGATATAAGAAACGTTCGAAAGGGAAAAATA
AGGTTGGGTTGTTTTTTTTTTTTGGGGTTAAGATAGAGGTATAGAAGGTTTA
GGTTTGGGAGGTTGGATTATTTTCGGTTGGATGTTGAGTCGGGTGGGAGTTT
AAATAGTAGGGGGTTTATAGGAGGTCGGTTTAGGTAGTTTCGCGTTTATTTA
TTAGGTTAGGTTTAGGTACGTTTTTAGCGATAGTAGGTTTAGGTACGTTCGG
GGGTTTGTTTAGTTTTCGTTTTCGTTGTTTCGGGTTACGGGGGTTTTTTCGTTT
TCGTTTCGTTTTTCGGGTTTCGTAGTAGGGGTTTTTTTGGGTTTCGATTTTTTT
CGGTTTTTTATTTTAGATATGTTTGGAGATTTTAGGACGATAAGTTTAGGGT

AGTTTTTTTATTAGGGGGAGTAGGACGTGGTCGTTTTGGCGTTCGTGGGAAT
TTTGGGCGGTGATCGCGTTTTTTTATAGATTTGGTATCGTTTAGAGTTTAGTT
TTTTTTTTTTTTTCGGTATTTTCGTTGTTTTATTGAGTTTTTTAGTTGTTAGTTT
TATAGTTTTTTTAGGAGAGGTGGGCGGCGATTTTAATTTATAGCGTTTTTTAT
TGCGATATTGTTTTAAATTCGAGGAAATTTAAATTTTCGGGCGCGCGTAGGT
CGACGGGATTCGAGGAGGAGGGGTAGGACGAAGGGGTCGCGCGCGTTACG
TCGGGCGCGTCGTCGTTGTTCGAGTTCGGTATTGGTGGGAACGCGGCGCGTT
TTTGAGGTTTAGTTACGTTTCGTTCGCGGGGTAGGCGGGTATTTTTACGCGC
GCGGGTATGAGTCGTGGTAGGAGTGCGCGGCGGTAGCGGTGGTCGTTTTTT
GGGGTTTGGGGTGTGTTTATTTGTATAAGCGGGCGCGCGTCGTTCGGGTTGG
GTGGATTCGGCGGGATTTGATTGTTTCGTTGTTTAGAGGCGGAGAAGAAGA
GGTAGCGAGTGGACGTGATTGTTTTATTTCGGGTAAAAGGGATAGAATTAG
AGGTGGGGAGTTTGGGTAGTCGGCGATTCGCGAAGATTTGAGGTGTCGTAG
T

APAF-1 Geni Amplifikasyonu İçin PZR Reaksiyon İçeriği

Metile Olan Dizi İçin PZR İçeriği;

ddH_20	:	16,3 mikrolitre
10xBuffer	:	5 mikrolitre
$MgCl_2$ (25mM)	:	2 mikrolitre
Primer APAF-1 M-F (10 mikroM)	:	1 mikrolitre
Primer APAF-1 M-R (10 mikroM)	:	1 mikrolitre
dNTP (2nM)	:	0,5 mikrolitre
Taq DNA Polimeraz (5U/mikrolitre)	:	0,1 mikrolitre

Unmetile Olan Dizi İçin PZR İçeriği;

ddH_20	:	16,3 mikrolitre
10xBuffer	:	5 mikrolitre
$MgCl_2$ (25mM)	:	2 mikrolitre
Primer APAF-1 U-F (10 mikroM)	:	1 mikrolitre
Primer APAF-1 U-R (10 mikroM)	:	1 mikrolitre
dNTP (4x 25mikro mol)	:	0,5 mikrolitre
Taq DNA Polimeraz (5U/mikrolitre)	:	0,2 mikrolitre

Apaf-1 Geni Metilasyon Spesifik –Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MS- PZR), PZR Koşulları

Metile Dizi İçin PZR Koşulları;

Ön Denaturasyon;	94 °C 10dk
35 Siklus;	94 °C 30 sn Denatürasyon
	54 °C 45 sn Primer Bağlanma
	72 °C 45 sn Uzama
Uzama;	72 °C 5 dk
Son Sıcaklık	10 °C

Unmetile Dizi İçin PZR Koşulları

Ön Denaturasyon;	94 °C 10dk
35 Siklus;	94 °C 30 sn Denatürasyon
	54 °C 45 sn Primer Bağlanma
	72 °C 45 sn Uzama
Uzama;	72 °C 5 dk
Son Sıcaklık	10 °C

3.2.6. Agaroz Jel Elekroforezi

PZR ürünleri %3' lük agaroz jele yüklenerek amplifikasyon kontrolü yapılmak üzere elektriksel olarak ayrıldı. Promega 100bp DNA ladder marker olarak kullanıldı.

3.2.6.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

%3' lük jel hazırlamak için 3 gr agaroz tartıldı ve 100 ml TAE tamponu ile karıştırıldı. Karışım mikrodalga fırında jel kıvamına getirildi. Çeker ocak içerisinde her 1g agaroza karşılık 1,2 mikrolitre etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Karışım, jel kabına örnek sayısına uygun taraklar yerleştirilerek döküldü ve çeker ocakta donması için bekletildi.

3.2.6.2. Agaroz Jelin Yüklenmesi- Elektroforez- Görüntüleme

Hazırlanan %3' lik agaroz jel, içerisinde yürütme tamponu olarak bulunan TAE' li jel tankına yerleştirildi. 5 mikrolitre Loading Buffer ile karıştırılan 4 mikrolitre PZR ürünleri kuyulara dikkatlice yüklendi. Tüm örnekler ve marker yüklemesinin ardından düzenek yaklaşık 120 V altında 30 dk yürütüldü. İşlem sonunda UV ışık altında kamera ile görüntüleme yapıldı.

3.2.7. İstatiksel Analiz

Olgulara ve kontrol grubuna ait bulguların istatiksel analizi ''SPSS 10'' programı kullanılarak T-testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

2010-2012 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Hematoloji ve Genel Dahiliye Bilim Dalları'na yeni tanı, remisyon ya da nüks bulgusuyla gelen Akut Miyeloid Lösemili (AML) olgulara ait kan ve kemik iliği örnekleri, metod kısmında belirtilen konvasiyonel sitogenetik, KKD, metilasyon PZR' ı yöntemlerinde kullanıldı.

AML hastalarının 12'si (%57,1) remisyon, 7'si %33.3 yeni tanı, 2'si (%9.5) nüks idi (Şekil 4-1). 21 olgudan 17' sinin anormal karyotipe sahip olduğu saptandı (Tablo 4-3). Olgulara ait diğer laboratuar verileri hasta dosyalarından elde edildi. Toplam AML' li hasta sayısı 21, kontrol grubu sayısı 20 idi. 10 Kadın 11 Erkek AML hastasından oluşan çalışma grubunda ortalama yaş kadınlarda 36.5 erkeklerde 37.9, yaş aralığı 20-65' di. Tablo 4-1'de AML grubu ve kontrol grubu cinsiyet ve sayı yüzdeleri gösterilmektedir.



Şekil4-1: AML Hasta Grubu Grafiği.

Tablo 4-1 : AML Hasta Grubu Olgu Sayısı Ve Cinsiyet Yüzdeleri İle Kontrol Grubu Olgu Sayısı Ve Cinsiyet Yüzdeleri.

Çalışma Grupları	Kadın	Erkek	Toplam
AML grubu	10 47,6%	11 52,4%	21 100%
Kontrol grubu	14 70%	6 30%	20 100%

4.1. AML Olgularının Klinik Laboratuvar Değerleri

Olgulara ait laboratuvar verileri (WBC, Hgb, Hct, PLT) Tablo 4-2' de gösterilmiştir. AML olgularına ait konvansiyonel sitogenetik bulguları ise Tablo 4-3' de yer almaktadır.

Tablo 4-2: AML Hasta Gurubu Laboratuvar Verileri.

(– işaretli olguların değerleri bilinmemektedir.)

HASTA GRUBU	WBC (n/mm3)	Hgb (g/dL)	Hct (%)	Plt (n/mm3)
Olgu 1	4000	9,4	-	20000
Olgu 2	10910	8,62	28,14	22000
Olgu 3	-	-	-	-
Olgu 4	36200	8,7	25,7	28000
Olgu 5	4600	14,7	43,4	169000
Olgu 6	5500	11,4	33,3	154000
Olgu 7	-	-	-	-
Olgu 8	5100	11,8	36,1	172000
Olgu 9	7600	9,6	29,1	26000
Olgu 10	2720	5,8	16,3	30000
Olgu 11	1600	7,6	21,7	34000
Olgu 12	18420	6,72	18,89	-
Olgu 13	5690	7,42	22,43	-
Olgu 14	7700	6,9	24,9	-
Olgu 15	137000	13,7	-	-
Olgu 16	3860	13,97	41,31	121000
Olgu 17	49200	13,88	39,09	8000
Olgu 18	800	6	18	60000
Olgu 19	3950	9,78	29,6	75600
Olgu 20	15400	8	23	64000
Olgu 21	-	-	-	-

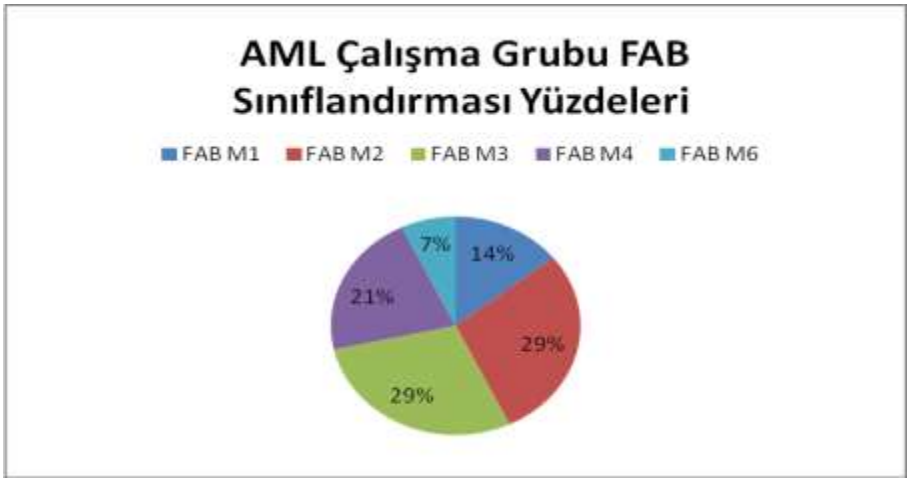
Tablo 4-3 : AML Grubu Konvansiyonel Sitogenetik Bulguları.

(t: translokasyon, del: delesyon, kt: kemoterapi, mar: marker kromozom)

HASTA GRUBU	Cinsiyet	Yaş	**KARYOTİP BULGULARI**
Olgu 1	K	44	t(15;17)
Olgu 2	E	31	Tanımsız
Olgu 3	E	40	Tanımsız
Olgu 4	K	20	t(15,17) (q22;q21.1)
Olgu 5	E	45	46,XY (%40) /46,XY, t(8,21)(q22;q22) (%60)
Olgu 6	E	65	Tanımsız
Olgu 7	E	48	Tanımsız
Olgu 8	K	33	Tanımsız
Olgu 9	K	45	t(15;17)
Olgu 10	E	21	46,XY, t(8,21) (q22;q22)
Olgu 11	K	42	kt öncesi 46XX ,t(7,11)(p15;15) kt sonrası:// 46,XY
Olgu 12	E	32	46,XY, t(15,17)(q22;q21), der(20), t(13;20)(q14?;q13,3?)(15adet)/46,XY (5Adet)
Olgu 13	K	28	46,X, -X, t(8,21)(q22;q22), del (9)(q21;q22), +mar(15 adet)/ 46,XX (5 Adet)
Olgu 14	K	40	46,XY
Olgu 15	E	40	46,XY
Olgu 16	E	22	46,XY (9 Adet) 45,X, -Y, t(8;21)(q22)q22), t(9;22)(q34;q11) 6 adet
Olgu 17	E	30	Tanımsız
Olgu 18	K	30	Tanımsız
Olgu 19	K	35	46,XX
Olgu 20	E	43	46,XY
Olgu 21	K	48	55, XXX, +4, +6, +8, t(11;17)(q23;q25), +12, +19, +21, +22, +mar hiperdiploidi

4.2. AML Olgularının Sınıflandırılması

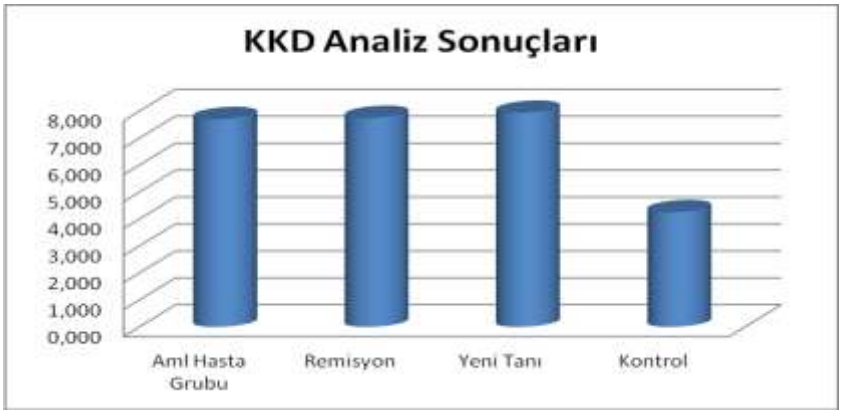
Olgular FAB (French-American-British) sınıflandırması göz önüne alınarak alt gruplara ayrıldı. 21 AML' li olgunun 13' ünün (%62) FAB alttipi tanımlı idi. Tanımlı hasta sayısı ile karşılaştırıldığında 2 (%14,3) olgu FAB M1, 4 (%28,6) olgu FAB M2, 4 (%28,6) olgu FAB M3, 3 (%21,4) olgu FAB M4, 1(%7,1) olgu FAB M6 alt-tipine sahipti (Şekil 4-2).



Şekil4-2 : AML olguları FAB sınıflaması grafiği.

4.3. KKD Değerlerinin Hesaplanması

KKD değerlerinin hesaplanması, her örnek başına 25 metafaz saptanarak, bu metafazlardaki KKD sayısının ortalaması alınarak yapıldı. KKD (Kardeş Kromatid Değişimi) AML hasta grubunda metafaz başına ortalama 7.704 ± 2.1866 olarak saptandı. Kontrol grubunun KKD verilerinin ortalamasına bakıldığında ise metafaz başına 4.255 ± 0.7438 olarak bulundu. Buna göre hasta grubundaki ortalama KKD sıklığı anlamlı olarak yüksekti. (p=0.000). Remisyon ve yeni tanılı AML olguları arasında ise KKD sıklığı açısından farklılık yoktu (sırasıyla 7,75 ± 1.88 ve 7,94 ± 2,5; p=0.8).Şekil 4-3' te KKD analiz sonuçları grafiği, Tablo 4-4' de KKD hasta ve kontrol verileri ve hasta evreleri yer almaktadır.



Şekil 4-3: KKD analiz sonuçları grafiği.

Tablo 4-4 : Çalışma Grubu ve Kontrol Grubu KKD, FAB ve Evre Tablosu.

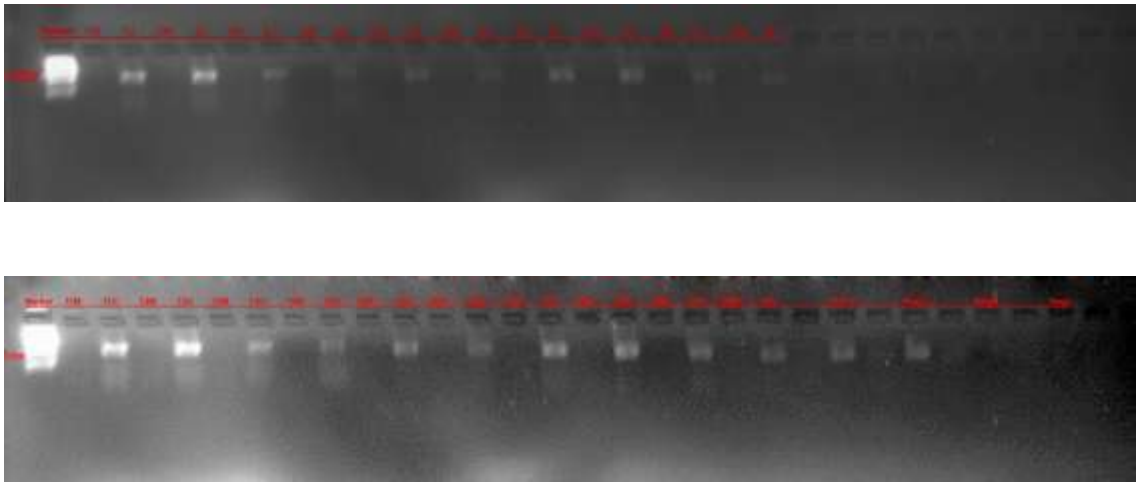
AML Hasta Grubu	Cinsiyet	Yaş	KKD	FAB	Evre	Kontrol Grubu	Cinsiyet	Yaş	KKD
Olgu 1	K	44	Tanımsız	AML M3	REMİSYON	Kontrol 1	E	28	5,8
Olgu 2	E	31	Tanımsız	M6	REMİSYON	Kontrol 2	E	32	4,04
Olgu 3	E	40	7,53	AML	REMİSYON	Kontrol 3	E	45	4,61
Olgu 4	K	20	7	AML M3	REMİSYON	Kontrol 4	K	27	3,72
Olgu 5	E	45	9,2	AML M1	REMİSYON	Kontrol 5	K	29	4
Olgu 6	E	65	12,93	AML M4	REMİSYON	Kontrol 6	K	35	3,73
Olgu 7	E	48	Tanımsız	AML M1	REMİSYON	Kontrol 7	K	21	3,61
Olgu 8	K	33	5	AML	REMİSYON	Kontrol 8	K	46	3,58
Olgu 9	K	45	Tanımsız	AML M3	YENİ TANI	Kontrol 9	K	28	5,1
Olgu 10	E	21	7,2	AML M2	YENİ TANI	Kontrol 10	E	65	4,6
Olgu 11	K	42	5,5	AML	REMİSYON	Kontrol 11	K	32	4,05
Olgu 12	E	32	4,45	AML M3	YENİ TANI	Kontrol 12	K	21	3,3
Olgu 13	K	28	Tanımsız	AML M2	NÜKS	Kontrol 13	K	34	6,2
Olgu 14	K	40	7,35	AML M2	REMİSYON	Kontrol 14	E	29	3,94
Olgu 15	E	40	8,7	AML	YENİ TANI	Kontrol 15	K	52	3,5
Olgu 16	E	22	9,06	AML M2	REMİSYON	Kontrol 16	E	55	4,3
Olgu 17	E	30	9,3	AML	YENİ TANI	Kontrol 17	K	28	4,47
Olgu 18	K	30	7,31	AML	YENİ TANI	Kontrol 18	K	32	4
Olgu 19	K	35	9,53	AML M4	YENİ TANI	Kontrol 19	K	23	4,5
Olgu 20	E	43	Tanımsız	AMLM4	REMİSYON	Kontrol 20	K	22	4,05
Olgu 21	K	48	5,5	AML	NÜKS				



Şekil 4-4 : KKD Analizi İçin AML Hastası Metafaz Plağı

4.4. Metilasyon Spesifik PZR Sonuçları ve Jel Görüntüleri

Hasta ve kontrollere ait periferik kandan izole edilmiş DNA örnekleri metilasyon PZR' ı için kullanıldı. % 3' lük agaroz jele yüklenen PZR ürünleri analizi sonucu AML hasta grubunun ve kontrol grubunun %100' ünün APAF-1 gen promotör bölgesinin metillenmemiş olduğu gözlemlendi. AML hasta grubu ya da sağlıklı kontrol grubundaki hiçbir bireyde promotör metilasyonu saptanmadı.



Şekil 4-5 : APAF-1 Geni Promotör Bölgesi AML Grubu Metilasyon Analizi

AML hasta grubu 3%' lük agaroz jel görüntüleri. M= Metile primer, U= Metillenmemiş primer, PozM= Metile primer ile amplifiye olmuş pozitif kontrol, PozU= Metillenmemiş primer ile amplifiye olmuş pozitif kontrol Neg= Negatif kontrol (steril distile su ve PZR karışımı)

5. TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin düzensiz gelişim göstermesi ve kontrolsüz çoğalmaları ile karakterize malign hastalık grubudur. Günümüzde kanser gelişimi ‘‘karsinogenez’’ ya da ‘‘onkogenez’’ olarak adlandırılmakla birlikte, hangi mekanizmalar, yolaklar ve olaylar sonucu oluştuğu tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bunun yanında kanser alanında yapılan çalışmalar karsinogeneze kısmen de olsa açıklama getirmektedir.

Genetik ve epigenetik süreçler karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Kanser oluşumu çok basamaklı mutasyon ve hücresel mekanizma bozuklukları ile ortaya çıkmaktadır. Karsinogenezin tek basamaklı bir süreç olmadığını ortaya koyan çalışmalara en güzel örnek kolon kanseri üzerine yapılan çalışmalardır (Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B., 1996).

Genom boyunca mutasyon oluşma eğiliminin artması ‘‘genomik instabilite’’ olarak adlandırılmaktadır. Kanser patogenezinde genomik instabilitenin neden olduğu mutasyonların ve kromozomal yeniden düzenlenmelerin büyük önemi olduğu bilinmektedir. Örneğin DNA tamirinin kalıtsal bozukluklarında (Fanconi Anemisi, Ataksi Telanjiyektazi, Bloom Sendromu vb.) genomik instabilite, gerek moleküler gerekse kromozomal düzeyde izlenebilmektedir. Bu hastalıkların en önemli ortak yönü artmış kanser eğilimidir (Swift, M. ve ark., 1991; Kuhn, E.M. ve Therman, E., 1986; D. Alan ve D'Andrea M.D., 2010).

Genomik instabilite proto-onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör süpresör genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanabilmekle birlikte, hücresel mekanizmaların işleyişinin bozulmasına da yol açmaktadır. Aşırı gen ekspresyonu, nokta mutasyonları, kromozomal yeniden düzenlenmeler (dengeli translokasyonlar, inversiyonlar, insersiyonlar, delesyonlar ve sayı anomalileri vb.) diğer kanser türlerinde olduğu gibi lösemilerde de sık karşılaşılan oluşumlardır. Özellikle kromozomal anomalilerden bazıları tanısal ve/veya prognostik açıdan değer taşımaktadır (Çefle, K., 2009).

Genomik instabilite tayin yöntemlerinlerinden biri olan KKD analizi, homolog kromozomlarda meydana gelen parça değişimi oranını tayin etmek için kullanılan yöntemlerden biridir. Hücrelerde spontan olarak meydana gelen KKD sıklığı;

karsinojenik maddeler ve iyonize radyasyona maruziyet gibi dış etkenlerle, ya da Bloom sendromunda olduğu gibi kalıtsal DNA tamir bozukluklarında artabilmektedir. KKD sıklığındaki artışın ise kanser gelişiminde rol oynayabilecek genomik instabiliteyi yansıttığı düşünülmektedir (Latt, A. S. ve Schreck, R.R., 1980; Kram J.D. ve ark., 1993; Nejad, K. S.ve ark., 2009).

Genomik instabilitenin bir diğer konvansiyonel göstergesi kromozomal aberasyonlardır. Bir önceki paragrafta sözü geçen kalıtsal DNA tamir hastalıklarınında kromozom kırıklarının daha çok oluştuğu görülmektedir. Örneğin Fanconi anemisinde klastojenik ajanlara duyarlılık artmıştır. Diğer yandan, gerek solid tümörlerde, gerekse hematolojik malignitelerde sayısal ve yapısal kromozom anomalilerine sıklıkla rastlanmaktadır. Bunların bazılarının hastalığın oluşumunda esas rolü oynadığı (Kronik miyelösiter lösemideki Filadelfiya kromozomu gibi) bilinmekle birlikte, bir çoğunun ise genomik instabilitenin bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Alan ve D'Andrea M.D., 2012; Kuru, D., ve ark., 2010; Bogliolo, M., ve ark., 2002).

Kanser alanında yapılan araştırmalar karsinogenez sürecinin sadece DNA dizisinde meydana gelen değişikliklerden değil aynı zamanda DNA dizisi değişmeksizin gen ifadesinde meydana gelen değişikliklerle de ilişkili olduğunu göstermektedir. Epigenetik değişimler olarak adlandırılan bu değişimler normal şartlarda hücre gelişimine ve düzenine hizmet ederken, epigenetik mekanizmada meydana gelen bozukluklar hücreyi hatta organizmayı doğrudan etkileyerek kansere yol açabilmektedir (Martin, C. ve Zhang Y., 2007).

Epigenetik değişimlerden biri olan DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu düzenleyen kimyasal bir modifikasyondur. Genlerin promotör bölgelerinde daha sık bulunan CpG adalarında metilasyon daha sık meydana gelmektedir. Genin aktif hale gelebilmesi için promotör bölgelerin metillenmemiş durumda bulunması gerekmektedir. Genin inaktive olması gereken durumlarda ise promotör bölgeleri metile durumdadır. CpG adalarından bazıları doku farklılaşmalarında ve gelişim sırasında metillenmemiş olmasına karşın genomda sıklıkla metiledir. Uzun süreli transkripsiyonel susturumla sonuçlanan, X kromozomu inaktivasyonu ve imprint genlerdeki doğal metilasyon, gelişim sırasında oluşan metilasyona başlıca örnekler arasında yer almaktadır.

Bunun yanında insan genomunda dağınık halde bulunan tekrarlayan diziler, kodlanmayan DNA bölgeleri ve transposable DNA elementleri, hücreleri kromozomal instabiliteden korumak için metiledir (Sharma, S., ve ark., 2009; Baylin, S.B., 2005).

Tümör süpresör genleri susturan bölgeye özel hipermetilasyonun tümörogeneze katkısı bulunmaktadır. Rb (retinoblastomayla ilişkili tümör süpresör gen), p16, MLH1, BRCA1 ve APAF-1 gibi DNA tamiri, hücre döngüsü, adhezyon, apoptoz ve anjiyogenezle ilişkili tümör süpresör genler üzerinde yapılan çalışmalar, bu genlerde meydana gelen anormal hipermetilasyonun kanser gelişimi ve yayılımına katkısı bulunabileceğini göstermektedir. (Jones, P. A. ve Baylin, S.B., 2002). Bu genlerin nasıl olup da hipermetilasyona hedef haline geldiği hala açıklığa kavuşturulamamıştır (Sharma, S. ve ark., 2009).

Akut miyeloid lösemi (AML) miyeloid seri elemanlarının neoplastik transformasyonu sonucu gelişen, düzensiz gelişim ve proliferasyon ile karakterize, ilerleyen safhalarda çevre dokulara metastaz gösteren kemik iliğinin malign hastalıklarından biridir.

AML' nin etiyolojisi birçok AML hastası için tam olarak açıklığa kavuşturulamamakla birlikte, her geçen gün lökomogenik ajanlar hakkında daha fazla bilgi sahibi olunmaktadır. AML gelişimi birçok risk faktörü ile ilişkilidir. Bilinen riskler belirlenen vakaların sadece küçük bir kısmını açıklayabilmektedir. Bu riskler yaş, hematolojik hastalıklar, kimyasalların, virüslerin ve radyasyonun yol açtığı genetik bozukluklar, kemoterapi veya sağlığı etkileyecek meslek sahibi olmak vb. olarak sayılabilmektedir (Deschler B. ve Lübbert M., 2006).

Akut Miyeloid Lösemi (AML)' de elliden fazla tekrarlayan yapısal kromozom anomalisi tanımlanmıştır. AML de erişkin hastaların % 50-75' inde klonal kromozomal yeniden düzenlenmeler gözlenmektedir (Durak, B., 2006).

AML hastalarının %40-50' sinde ise normal karyotip saptanmaktadır. Normal karyotipe sahip AML hastaları orta prognoz grubunda sınıflandırılmasına rağmen olguların tedaviye verdiği cevaplar birbirinden farklı olabilmektedir. Normal karyotipe sahip AML hastaları araştırmaya açık bir grup olup, bu alanda yapılan çalışmalar çeşitli genlerde meydana gelen ekspresyon değişikliklerinin tedavi sürecini etkilediğini ortaya koymuştur (Örn; FLT3-ITD, CEBPA, BAALC = Beyin ve akut lösemi ilişkili, sitoplazmik) (Bienz, M. ve ark. 2005).

Hematopoietik dokularda homeostazisi sağlayan en önemli olaylardan biri de apoptoz mekanizmasıdır. AML' de düzensiz gelişim gösteren miyeloid seri elemanları apoptoza uğramayarak aşırı proliferasyon göstermektedirler. Bu durum AML gelişiminde apoptoz yolaklarında rol oynayan elemanlarda meydana gelen bozuklukların hastalığın başlaması ve gelişimine katkısı bulunduğunu düşündürmektedir. Apoptoz süreçlerinden biri olan iç ölüm yolağında sitokrom-c salınmasını takiben apoptozom oluşum süreci başlamaktadır. APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör) apoptozom oluşumunda merkezi rol oynayan elemanlardan biridir. APAF-1 gibi apoptozom proteinlerinde meydana gelen defektler AML gibi birçok malign hastalığın gelişimine sebep olur (Testa, U. ve Riccioni, R., 2007). Bununla birlikte APAF-1 protein seviyelerinin farklı kanser türlerinde kemorezistansa yol açtığına dair çalışmalar da vardır (Campioni M. ve ark.,2005; Svingen, P.A. ve ark., 2000).

APAF-1' in tümör süpresör rolünün yanında apoptoz ile ilişkili olmayan başka fonksiyonlara da sahip olabileceği öne sürülmektedir. Farelerde knock out APAF-1, insan hücrelerinde knockdown APAF-1 ve ced-4 (C. elegans da bulunan APAF-1 insan ortolog geni)' de fonksiyon kaybı mutasyonlar üzerine yapılan çalışmalarda bu genin apoptoz meydana gelmeksizin, DNA hasarı sonucu DNA sentezinin durdurulmasına aracılık ettiği belirtilmektedir. Sonuç olarak APAF-1' in apoptoz iç ölüm yolağı apoptozom oluşumunda merkezi rol oynamasının yanısıra DNA hasarına bağlı hücre döngüsü kontrolünde yer alarak kromozomal stabiliteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Mouhamad, S., ve ark., 2007).

Bu bilgiler ışığında, AML' deki muhtemel bir apoptotik defekt ve bunun genomik instabilite ile ilişkisini incelemeyi amaçladık. Bu amaca yönelik olarak, APAF-1' in apoptozisteki önemini de dikkate alarak, AML' li hastalarda bu genin promotör bölgesinin metilasyon durumunu inceledik. Ayrıca, metilasyon durumunun genomik instabilite göstergeleri olan KKD sıklığı ve kromozomal aberasyonlarla ilişkisini araştırmayı da hedefledik. Çalışmamızda yer alan AML hastalarının 12' si (%57,1) remisyon, 7' si (%33,3) yeni tanı, 2' si (%9,5) nüks olmakla birlikte olgular FAB (French -American -British) sınıflandırması göz önüne alınarak alt gruplara ayrılmıştır. 21 AML' li olgunun 13' ünün (%62) FAB alttipi tanımlıdır. Tanımlı hasta grubu içinde karşılaştırıldığında 2 olgu (%14,3) FAB M1, 4 olgu (%28,6) FAB M2, 4

olgu (%28,6) FAB M3, 3 olgu (%21,4) M4, 1 olgu (%7,1) M6 alt-tipinde yer alıyordu. 4 olgu normal karyotipe sahip iken 10 olguda çeşitli kromozomal anomaliler bulunmaktaydı.

Araştırmamızda yer alan AML hasta grubunda KKD (Kardeş Kromatid Değişimi) analiz sonuçları ortalama 7.704 ± 2.1866 olarak saptanmıştır. Kontrol grubunun KKD verilerinin ortalamasına bakıldığında ise 4.255 ± 0.7438 olarak bulunmaktadır. AML grubunda KKD sıklığı sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (p=0.000). AML hasta grubu yeni tanı ve remisyondaki hasta KKD analizleri değerlendirildiğinde ise yeni tanı alan hastalarda ortalama 7,75 ± 1.88, remisyondaki hastalarda ise 7,94 ± 2,5 olarak saptanmıştır. Yeni tanı ve remisyondaki hastalar arasında KKD değerleri bakımından anlamlı bir farka ulaşılamamıştır (p=0,8).

Literatürde yeni tanı ve remisyondaki lösemi hastaları üzerine yapılan KKD ile ilişkili araştırmalar bulunmaktadır. 13 AML, 1 ALL ve 1 Hodgkin hastasını kapsayan bir araştırmada, tedavi öncesi ve tedavi sonrasında KKD analizi yapılmıştır. Tedavi öncesinde sağlıklı kontroller ile karşılaştırılan hasta grubunun KKD sıklığının anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.Tedavi öncesi hasta grubu, tedavi sonrası hasta grubuyla karşılaştırıldığında, tedavi sonrası KKD sıklığının artış gösterdiği saptanmıştır (Tuna, M. ve ark., 1985).

Çocukluk çağı ilaç tedavisi gören ALL hastalarındaki KKD sıklığı üzerine Mertens, R. ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada ilaç tedavisi sonrası yapılan KKD analiz sonuçları sağlıklı kontrollere oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002). Çalışmanın sonucunda KKD oranındaki artışın DNA instabilitesini yansıtabileceği, DNA tamir sisteminde bozukluğa yol açabileceği düşünülmüştür (Mertens, R. ve ark. 1995).

Çalışmamızda yer alan AML grubu olgularında APAF-1 promotör metilasyon analizi yapılmıştır. AML grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında APAF-1 metilasyon analiz sonuçlarına bakıldığında iki grup arasında fark yoktur.Çalışılan tüm olgularda APAF-1 promotör bölgesinin metile olmadığı saptanmıştır.

Tümörogeneze yol açan promotör metilasyonu ile ilişkili APAF-1 ekspresyon kaybı, kolorektal kanser, seviks kanseri ve melanoma gibi malign hastalıklarda olumsuz prognostik değere sahiptir APAF-1 ekspresyonunun melanoma, serviks ve kolorektal

karsinoma gibi bazı malign tümörlerde delesyon gibi çeşitli sebeplerle baskılanabileceğini gösteren çalışmalar vardır (Mouhamad, S., ve ark. 2007).

Kolon kanseri SW620 hücre soyunda Huerta, S. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada APAF-1 protein seviyesinin kemoterapide direnç yol açtığı ortaya konulmuştur (Heinzerling, J.H ve ark. 2007).

Kuzey Hindistan populasyonunda APAF-1 geninin de dahil olduğu 3 ayrı gende promotör metilasyonunun renal hücreli karsinomlu bireylerde bağımsız muhtemel prognostik faktör olarak rol oynayabileceği düşünülerek, 196 renal hücreli karsinoma sahip birey üzerinde araştırma yapılmıştır. Farklı tümör evreleri ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında APAF-1 promotör bölge metilasyonu frekansındaki artışın ileri tümör evresi ile direk olarak ilişkili olduğu belirtilmiştir (Ahmad, S.T. ve ark., 2011).

Sitokrom-c ye bağımlı apoptotik yolakta merkezi rol oynayan Apaf-1' in larinks skuamöz hücreli karsinoma oluşumundaki rolünü tayin etmek için larinks skuamöz hücreli karsinom (LSCC) örnekleri ile para-neoplastik larinks dokuları (PNT) APAF-1 ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış. LSCC örneklerinin %40' ının PNT dokularına göre daha az APAF-1 ekspresyonuna sahip olduğu ortaya çıkmıştır. APAF-1 promotör bölgesi metile 11 LSCC örneği ekspresyon seviyelerine bakıldığında 1 örnek hariç APAF-1 ekspresyon seviyesinin down-regüle olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak APAF-1 ekspresyon seviyesindeki düşüşün sadece APAF-1 genindeki delesyondan değil, genin promotör bölgesinde meydana gelen metilasyondan da kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Huang, D.F. ve ark., 2004).

Gastrik karsinoma sahip 27 olguda ve 25 sağlıklı kontrolde, APAF-1' inde içinde olduğu 8 farklı geni kapsayan promotör bölgesi metilasyon analizlerinde APAF-1' in hem hastalarda hemde kontrol grubunda metillenmemiş olduğu saptanmıştır (Poplawski,T. ve ark., 2008).

Literatürde farklı kanser türleri ile ilişkili APAF-1 üzerine yapılan araştırmalar dışında lösemi ile ilişkili araştırmalar da bulunmaktadır. Örneğin, ultraviyole ışıkla apoptozu tetiklenmiş lösemi hücre serilerinde yapılan bir çalışmada lösemi hücrelerinin düşük seviyede APAF-1 proteini eksprese ettikleri saptanmıştır (Jia, L., ve ark., 2001).

Furukawa, Y. ve ark.yaptığı bir çalışmada ise çalışmada yer alan insan lösemi hücre serilerinin %25' i ve AML hücre blastlarının %42' sinin APAF-1 metilasyon susturumuna bağlı olarak düşük seviyede APAF-1 mRNA' sı eksprese ettiğini göstermektedir (Sutheesophon, K., ve ark., 2005).

Lösemi hücrelerinde APAF-1 ekspresyonunun deregülasyonu oldukça karmaşıktır. İnsan lösemi hücreleri ile yapılan başka bir araştırma APAF-1 mRNA seviyesinin APAF-1 protein seviyesi ile aynı seviyede olmadığını göstermektedir (Fu, W.N. ve ark., 2003).

Karsinogenezde apoptoz disregülasyonunun önemli rol oynadığı belirtilen ve 5 lösemi hücre serisinin metilasyon değerlerinin araştırıldığı başka bir araştırmada Raji, HL60, U937, Jurkat ve NB4 lösemi hücre serileri metilasyon durumu saptanmış ve Apaf-1' in tüm hücre serilerinde metillenmemiş olduğu gözlemlenmiştir. Bu araştırmada 32 AML M3 ve 50 farklı akut miyeloid lösemi alt tiplerini içeren olgu kullanılmış, ayrıca 25 akut lenfoblastik lösemi hücresi çalışılmıştır (Chim, C.S. ve ark 2008).

APAF-1' in lökomogenezdeki rolünü açıklığa kavuşturmak için Frukawa Y. ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada yer alan örneklerin APAF-1' in yer aldığı kromozom bölgesinde delesyon, translokasyon, duplikasyon, inversiyon gibi yapısal anomaliler bulunmamakta ve APAF-1 mRNA seviyeleri, 20 insan lösemi hücre serisinin 5' inde ve 12 akut miyeloblastik lösemi hücrelerinin 5' inde normalin altında veya çok düşük olarak saptanmıştır. APAF-1 transkripsiyonunu düzenleyen faktörler (p53, E2F-1 ve Sp-1) APAF-1 pozitif ve negatif hücreler incelendiğinde herhangi bir farklılık saptanmamıştır. APAF-1 geni defektli hücre soylarında +87 ve +128 bölgelerinde metilasyon oluşumu daha sık gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin 5-aza-2 deoxycytidine ile tedavisinden sonra (DNA metilasyon inhibitörü) APAF-1 ekspresyonu düzelmiştir. Çalışmada +87 ve +128 bölgelerinin metilasyon ilişkili metile DNA Bağlanma Bölgesi 2 ve Histon Deasetilaz 1'i düzenleyen represör element gibi rol oynayabileceği gösterilmiştir (Frukawa Y. ve ark., 2005).

Araştırmamızın sonuçlarına göre, hasta grubundaki ortalama KKD sıklığının anlamlı olarak yüksek olması (p=0.000) akut miyeloid lösemili olguların sağlıklı olgulara kıyasla DNA replikasyonu ve onarımı esnasında meydana gelen aksaklıklara daha yatkın olduğunu ve genotoksik ajanlara daha çok maruz kaldığını ya da daha

duyarlı olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuç AML' li olgularda genomik instabilitenin hastalık patogenezinde rol oynadığını desteklemektedir. APAF-1 metilasyon sonuçlarına bakıldığında ise APAF' in bilinen fonksiyonları olan genomik stabiliteyi sağlama ve tümor süpresör etki göstermesinin hatalı metilasyon ile engellenmediği düşünülebilir. Sonuçlar değerlendirildiğinde AML patogenezi APAF-1 promotör bölge metilasyonu ile doğrudan ilişkili görünmemektedir. Özellikle, hasta grubunda yüksek oranda artmış KKD sıklığının APAF-1 metilasyonu ile ilişkisi bulunmamıştır. Bu, AML' li hastalardaki genomik instabilitede APAF-1 işlev yitiminin rol oynamadığını düşündürebilir. Ancak, APAF-1 regülasyonu transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalarla da düzenlenmektedir. APAF-1 in ekspresyonunun multistep regülasyon göstermesi nedeniyle protein düzeyinin mRNA düzeyiyle korelasyon göstermediği de dikkate alınmalıdır. Bu durum APAF-1 ile ilişkili post-transkripsiyonel mekanizmalarında meydana gelebilecek modifikasyonların değerlendirilmesi gerekliliğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma, genomik instabilite artışının AML gelişiminde rolü olduğunu, diğer yandan APAF-1 gen promotör bölge metilasyonu ile KKD artışının ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Ancak, özellikle APAF-1 işlevinin daha değişik mekanizmalarla düzenlenebileceği ya da bozulabileceği dikkate alınarak, farklı yöntemlerle genin işlevinin incelenmesi gerekmektedir. Bu şekilde hastalık patogenezine getirilen açıklamalar ile tedavi ve sağkalım sürelerinde önemli gelişmeler sağlanabilir.

6. KAYNAKLAR

Ahmad, S.T., Arjumand, W., Seth, A., Saini, A.K., Sultana, S., (2011). Methylation of the APAF-1 and DAPK-1 promoter region correlates with progression of renal cell carcinoma in North Indian population. Tumour Biology Journal. 33(2):395-402.

Alan, D. ve D'Andrea M.D., (2010). The Fanconi Anemia and Breast Cancer Susceptibility Pathways. New England Journal of Medicine. 362(20): 1909–1919.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2008). Molecular Biology of The Cell. New York, USA, Fifth Edition, Garland Science Inc. ISBN:0-8153-4106-7 pp:1206.

Ali, R. (2006). Akut Lösemiler WHO Sınıflandırması ve Nadir Akut Lösemi Tipleri, Akut Lösemi Kurs Kitabı. Türk Hematoloji Derneği.

Amatori, S., Bagaloni, I., Donati, B. ve Fanelli, M., (2010). DNA Demethylating Antineoplastic Strategies: A Comparative Point of View . Genes & Cancer. Vol :1 No 3 pp: 197–209.

Anonim-1, APAF-1 Geni, Erişim tarihi: (Temmuz 2011). Erişim site adı: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/APAF1ID422.html.

Anonim 2: APAF1 apoptotic peptidase activating factor 1 (*Homo Saphiens)* Erişim tarihi: 2011. Erişim site adı: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=317.

Banerjee, A. ve Benedict, F. W., (1979). Production of Sister Chromatid Exchanges by Various Cancer Chemotherapeutic Agents. Canser Research. 39, 797-799.

Barch, M.J., M.S., CLSp(CG), (1984). The ACT Cytogenetics Laboratory Manual (2nd ed.) The Association of Cytogenetics Technologists. Houston, Texas. Raven Press. New York.

Baylin, S. B., (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. Nature Clinical Practice Oncology. 2, S4-S11.

Bienz, M., Ludwig, M., Mueller, B.U., Leibundgut, E.O., Ratschiller, D., Solenthaler, M., (2005). Risk Assessment in Patients with Acute Myeloid Leukemia and a Normal Karyotype. Clinical Cancer Research;11:1416-1424.

Bennett M. J., Catovsky D., Daniel T. M., Flandrin G., Galton G. A. D., Gralnick K. R. H., ve ark., (1985). Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Report of the French-American-British Cooperative Group (1985). Annals of Internal Medicine; 103(4):620-625.

Bennett M. J., Catovsky D., Daniel T. M., Flandrin G., Galton G. A. D., Gralnick K. R. H., ve ark,(1989). Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. Journal of Clinic Pathology;42:567-584

Bogliolo, M., Cabre, O., Calle´n, E., Castillo, V., Creus, A., Marcos, R.ve ark., (2002). The Fanconi anaemia genome stability and tumour suppressor network. Mutagenesis 17 (6): 529-538.

Bora, G., Yurter, H.E., (2007). Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. Hacettepe Tıp Dergisi; 38:48-54.

Borrow, J., Shearman, M. A., Stanton, Jr. P. V., Becher, R., Collins, T., Williams, J. A. ve ark., (1996). The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP96 and class I homeoprotein HOXA9. Nature Genetics 12, 159 – 167.

Campioni M, Santini D, Tonini G, Murace R, Dragonetti E, Spugnini EP, Baldi A., (2005). Role of Apaf-1, a key regulator of apoptosis, in melanoma progression and chemoresistance. Expremental Dermatology. 14(11):811-8.

Chandar, N. ve Viselli, S., Yanık, B.(Ed.), (2012). Hücre ve Moleküler Biyoloji Lippincott's IIIusurated Rewievs Serisinden. Nobel Tıp Yayınları

Chang, H.Y., Yang, X., (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. Microbiology and molecular biology reviews. 64 (4), 821-826.

Chim, C.S., Chan, W.W., Kwong, Y.L., (2008). Epigenetic dysregulation of the DAP kinase, p14, HDM2, p53, Apaf-1 apoptosis pathway in acute leukaemias. Journal of Clinical Pathology. 61(7):844-7.

Chou, W.C., Chen, C.Y., Hou, H.A., Lin, L.I., Tang, J.L., Yao, M. ve ark., (2009). Acute myeloid leukemia bearing t(7;11)(p15;p15) is a distinct cytogenetic entity with poor outcome and a distinct mutation profile: comparative analysis of 493 adult patients. Leukemia. 23(7):1303-10.

Cohen, G.M., (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. Biochemical Journal. 326, 1-16.

Collazo, C., Chacon, O., Borras, O., (2006). Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals. Biotecnologia Aplicada. 23 (1), 1-10.

Cooper, G. M. ve Hausman, R. E. (2006) Hücre Moleküler Yaklaşım. (3th ed.) İzmir Tıp Kitabevi ISBN: 9944-5148-0-2 pp:580-584

Corazza, N., Kassahn, D., Jakob, S., Badmann, A., Brunner, T., (2009). TRAIL-Induced Apoptosis Between Tumor Therapy and Immunopathology. Marc Diederich, Natural compounds and their role in apoptotic cell signaling pathways. Annals of the New York Akademi of Sciences. New York. pp: 50-58.

Çefle, K. (2009). Kanser Genetiği. Klinik Gelişim. Klinik Fizyopatoloji. Cilt:22/No:3

Deschler, B. ve Lübbert, M., (2006). Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. Cancer. Volume 107, Number 9.

Dinçol, G., Pekçelen, Y., Atamer, T., Sargın, D., Nalçacı, M., Aktan, M., ve ark., (2003). Klinik Hematoloji. İ.Ü. İst. Tıp. Fak. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları. Nobel Tıp Kitabevi. ISBN 975-420277-X

Durak, B., (2006). Akut Lösemilerde FISH Paneli ve Prognoz Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Bilim Dalı. THD 2006 Akut Lösemiler Kurs Kitabı.

Ekmekçi, C.G., (2005). Kolo-Rektal Kanserli Olgularda, Genetik ve Epigenetik Değişikliklerin Araştırılması. Doktora Tezi.

Evan, G.I., ve Vousden K.H., (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 411, 342-347.

Fıratlı, T., (2004). Akut Lösemi Etyopatogenezi: Demek Sitogenetik Önemli!. THD. Erişim site adı: http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/akut_losemi.pdf.

Fu, W.N., Bertoni, F., Kelsey, S. M., McElwaine, S. M., Cotter, F.E., Newland, A.C. ve ark. (2003). Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. Oncogene 22, 451–455.

Furukawa, Y., Sutheesophon, K., Wada, T., Nishimura, M., Saito, Y., Ishii, H., ve ark.(2005). Methylation Silencing of the Apaf-1 Gene in Acute Leukemia. Molecular Cancer Research ;3(6):325–34.

G. Abdul-Hamid, (2011). Classification of Acute Leukemia. Acute Leukemia – The Scientist's Perspective and Challenge

Gillard EF, Solomon E, (1993). Acute promyelocytic leukaemia and the t(15;17) translocation. Seminars in Cancer Biology. 4(6):359-67.

Heinzerling, J.H., Anquiano-Hernandez, Y.M., Huerta-Yepez, S., Lin J., Chen, D. ve ark., (2007). Modification of Gene Products Involved in Resistance to Apoptosis in Metastatic Colon Cancer Cells: Roles of Fas, Apaf-1, NFκB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF. Journal of Surgical Research**.** Volume 142, Issue 1 , pp: 184-194.

Huang DF, Fu WN, Shang C, Xu ZM, Li ZG, Sun KL. (2004).Expression and promoter methylation of Apaf-1 gene in laryngeal squamous cell carcinoma. Yi Chuan Xue Bao. 31(12):1327-31.

Huret, J.L., t(11;17)(q23;q25). (2000). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Erişim Adresi: http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t1117ID1133.html Erişim tarihi: Ocak 2012

Igney, F.H., ve Kranner, P.H., (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nature Reviews. 2, 277-288.

Jacobson-Kram, D., Albertini, R.J., Branda R.F., Falta, M.T., Iype, P.T., Kolodner, K. ve ark., (1993). Measurement of Chromosomal Aberrations, Sister Chromatid Exchange, hprt Mutations, and DNA Adducts in Peripheral Lymphocytes of Human Populations at Increased Risk for Cancer. Environmental Health Perspectives Supplements. Vol. 101 (Suppl. 3): 121-125.

Jia, L., Srinivasula, S., Liu, F.T., Newland, A.C., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., ve ark., (2001). Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome-c dependent apoptosis in human leukemic cells. Blood. 98:414-21.

Jones, P.A. ve Baylin, S.B., (2002). The Fundamental Role Of Epigenetic Events In Cancer. Nature Reviews Genetics. Vol:3 pp:415-428.

Karagöl, S. B. ve Karagöl, A., (2011). Down Sendromu ve Trombositopeni Derleme Çocuk Dergisi. 11(3):97-101.

Kern, W. F. (Ed.), (2005). PDQ Hematology. London, BC Decker Inc. İstanbul Medikal Yayıncılık ISBN:975-6395230.

Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (1996). Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. Cell. Copyright by Cell Press. Vol.87,159-170.

Kozan, S., Öztürk, E., Torun, D., Bahçe, M., Kaya, H., Beyan, C., (2010). Akut miyeloblastik lösemili olguda trizomi 8, trizomi 9 ve trizomi 21 sitogenetik bulgularının birlikteliği. Olgu Sunumu. Gülhane Tıp Dergisi. 52: 287-289.

Kram, J.D., Albertini, R.J., Branda, R.F., Falta, M.T., Iype, P.T., Kolodner, K. ve ark. (1993). Measurement of Chromosomal Aberrations, Sister Chromatid Exchange, hprt Mutations, and DNA Adducts in Peripheral Lymphocytes of Human Populations at Increased Risk for Cancer. Environmental Health Perspectives Supplements Vol. 101 (Suppl. 3): 121-125.

Kroeger, H., Jelinek, J., Estecio, H. R. M., He, R., Kondo, K., Chung, W. ve ark., (2008). Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. Copyright (2011) by The American Society of Hematology. DOI 10.1182/blood-2007-11-126227.

Kuan, C., Kuida, K., (2003). Apoptosis in action, Yin, X.M., Dong, Z., Essential of apoptosis: a guide for basic and clinical research. Humana Press Inc., Totowa. New Jersey. pp:163-175.

Kuhn, E.M. ve Therman, E., (1986). Cytogenetics of Bloom's Syndrome. Cancer Genetics and Cytogenetics. Vol: 22 Issue:1 pp:1-18.

Kuru, D., Argüden, Y.T., Ar, M.C., Çırakoğlu, A.,Öngören, Ş., Yılmaz, Ş. ve ark., (2010). Variant Philadelphia translocations with different breakpoints in six chronic myeloid leukemia patients. Turkish Journal of Hematology. 28: 186-92.

Latt, A. S. ve Schreck, R.R., (1980). Sister Chromatid Exchange Analysis. The American Journal of Human Genetics. 32:297-3 13.

Liu, P.P., Hajra, A.,Wijmenga, C. ve Collins, F.S., (1995). Molecular Pathogenesis of the Chromosome 16 Inversion in the M4Eo Subtype of Acute Myeloid Leukemia. Blood Vol:85, No:9

Ma, H., Shieh, K.J. ve Chen, G., (2005). Apoptosis. Nature and Science. 3 (2), 1-4.

Martin, C. ve Zhang, Y., (2007). Mechanisms of Epigenetic İnheritance. Current Opinion In Cell Biology. Vol:19 Issue:3 pp: 266-272.

Mertens, R., Rubbert, F., Büssing, A., (1995). Childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): sister chromatid exchange (SCE)frequency and lymphocyte subpopulations during therapy. Leukemia. 9(3):501-5.

Mitchell, R.N., Cotran, R.S., (2003). Hücre Zedelenmesi, Adaptasyonu ve Ölümü Çevikbaş, U., Robbins Temel Patoloji. Nobel Tıp Kıtabevleri. İstanbul, 3-31.

Mouhamad, S., Galluzzi, L., Zermati, Y., Castedo, M., Kroemer, G., (2007). Apaf-1 Deficiency Causes Chromosomal Instability. Cell Cycle. 6:24, 3103-3107.

Mrozek, K., Heerema, A. N. ve Bloomfield, D. C., (2004). Cytogenetics İn Acute Leukemia. Blood Reviews. 18, 115–136.

Nejad, K.S. ve Mahdieh, N., (2009). Sister chromatid exchange in peripheral blood lymphocytes as a possible breast cancer risk biomarker: A study of Iranian patients with breast cancer. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics. Vol. 10, No. 1.

Neto, J. M. de P. ve Ferrari, İ., (1981). Frequency and Distribution of Sister Chromatid Exchanges in Normal Individuals. Brasil Journal of Genetics. IV, 1, 65-73.

Nussbaum, L. R., Mclnnes, R. R., Willard, F.H., (2005). Thompson and Thompson Tıbbi Genetik. Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Saunders. ISBN:975-277-031-2 pp:311-313

Özbek U., (2006)., Akut lösemilerde moleküler genetik ve prognoz. İstanbul Üniversitesi Erişim Site Adı: www.thd.org.tr/doc/.../08_04_2006_ugur_ozbek_10-55_11-20.pdf Erişim tarihi: 2011

Peniket A. , Wainscoat J., Side L., Daly S., Kusec R., Buck G. ve ark., (2005). Del (9q) AML: clinical and cytological characteristics and prognostic implications. British Journal of Haematology. 129, 210–220 .

Plass, C. (2002). Cancer epigenomiks. Human Molecular Genetics. Vol. 11, No. 20 2479–2488.

Poplawski,T., Tomaszewska, K., Galicki, M., Morawiec, Z., Blasiak, J., (2008). Promoter Methylation Of Cancer –Related Genes in Gastric Carcinoma. Expremental Oncology. 30, 2, 112-116.

Reikvam, H., Hatfield, J.K., Kittang, O.A., Hovland, R. ve Bruserud, Q., (2011). AcuteMyeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation:Clinical Consequences and Biological Implications. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2011, Article ID 104631

Ricci, M.S., El-Deiry, W.S., (2007). Apoptosis and alternative modes of cell death. Gewirtz, D.A., Holt, S.E., Grant, S., Apoptosis, senescence, and cancer. Humana Press Inc., Totowa. New Jersey. pp: 31-54.

Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A. (2009). Epigenetics in cancer. Oxford Journals Life Sciences and Medicine. Carcinogenesis. Vol:31, Issue 1, pp:27-36.

Shiraishi, Y., Taguchi, T., Ozawa, M., ve Bamezai, R., (1989). Different mutations responsible for the elevated sister-chromatid exchange frequencies in Bloom syndrome and X-irradiated B-lymphoblastoid cell lines originating from acute leukemia. Mutation Research.;211(2):273-8.

Swift, M., Morrell, D., Massey, R.B. ve Chase, C.L., (1991). Incidence of Cancer in 161 Families Affected by Ataxia Telangiectasia. The New England Journal Of Medicine. Vol. 325 no:26.

Sutheesophon, K., Wada, T., Nishimura, M., Saito, Y., Hishii, H., ve ark., (2005). Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukaemia. Molecular Cancer Researches. 3: 325.

Svingen, P.A., Karp, J. E., Krajewski, S., Mesner Jr, P. W., Gore, S. D., Burke, P. J. , ve ark. (2000). Evaluation of Apaf-1 and procaspases-2, -3, -7, -8, and -9 as potential prognostic markers in acute leukemia. Blood 96: 3922-3931.

Tang, D.G, Kehrer, J.P., (2007). Malignant Transformation and Metastasis, Srivastava, R., Apoptosis, cell signaling, and human diseases. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp: 97-117.

Testa, U. ve Riccioni, R. (2007). Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. Haematologica / The Hematology Journal; 92(01).

Türk Hematoloji Derneği, (2006). Akut Lösemiler Kurs Kitabı. Erişim Site Adı: www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/2006akutlosemi.pdf Erişim Tarihi: Ekim 2011.

Türk Hematoloji Derneği, (2011). Akut Lösemiler Tanı ve Tedavi Klavuzu. Efil Yayınevi. 2. Basım. Erişim adresi: http://www.thd.org.tr/pdf/A.pdf Erişim Tarihi: Mart 2012.

Tomatır, A.G., (2003). Apoptoz: programlı hücre ölümü, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 23, 499-508.

Tuna, M., Artan, S., Gezer, S., Sayli, BS., Başaran, N., (1995). Sister chromatid exchange analysis in acute leukemia patients. Cancer Genetics and Cytogenetics Journal. 79(1):86-8.-34.

Vardiman, W.J., Harris, L.N. ve Brunning, D.R., (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood-2002-04-1199, 1 _ Vol: 100, No: 7.

Yanık, B., (Çev.Ed.). (2012). Hücre ve Moleküler Biyoloji Lippincott's IIIusurated Rewievs Seisinden: Nobel Tıp Kitabevleri ISBN:978-975-420-861-0

Yılmaz, İ., (2005). Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptosis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptosisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği.

Yücel, N.K., (2006). Kantaron Otundan (*Hypericum perforatum L.)* Elde Edilen Hyperisin Maddesinin İnsan Lenfosit Kültürlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi

Zhang, L., Rothman, N., Wang, Y., Hayes, B.R., Li, G., Dosemeci, M., ve ark., (1998). Increased aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 lymphocytes of Chines workers exposed to benzene. Carcinogenesis. Vol. 19 no 11 pp: 1955-1961.

Zhivotovsky, B., Orrenıus, S., (2009). Clinical perspectives of cell death: Where We Are And Where To Go. Springer Science. 14,333-335.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU VE OLUR (RIZA) BELGESİ

Hasta Adı/Soyadı:
Protokol No:
Tarih:

Sayın Hastamız,
Bildiğiniz üzere sizde akut miyeloid lösemi denen bir kan hastalığı mevcuttur. Farkında olduğunuz üzere hastalığınızın takibi için çeşitli tetkikler yapılmakta ve buna göre size en uygun tedavi tatbik edilmektedir.
Hastalığınızın oluş mekanizmasını anlayabilmek için dünyada yeni araştırmalar yapılmaktadır.Bu araştırmalardan birkaçı da kromozom ve DNA ile yapılan araştırmalardır. DNA her insanın, her hücresinde bulunan ve kalıtsal bilginin saklı oldugu moleküldür. Birçok lösemi tipinde DNA molekülünde ve kromozomlarda değişiklikler ortaya çıktıgı yapılan araştırmalar sayesinde bilinmektedir.
Sizden 15ml kan almak suretiyle bizde hastanemizde akut miyeloid lösemi üzerine bu tip bir araştırma yapmak istiyoruz. Bu araştırma için en az 20 hasta seçeceğiz Bildiğiniz üzere kan almanın neredeyse hiçbir yan etkisi yoktur. Olası yan etkileri arasında baş dönmesi, tansiyon, düşmesine bağlı hafif baygınlık hissi sayılabilir. Böyle bir durumda kişi ferah ve düz bir ortamda birkaç dakika uzanarak, gerekirse ayakları havaya kaldırılarak bu hali atlatabilir. Alınan kanda yukarıda bahsedilen DNA tetkiki fakültemiz DETAE Laboratuarında ve sitogenetik tetkik (kardeş kromatid degişim sıklığı) İç Hastalıkları Tıbbi Genetik Laboratuarında yapılacaktır. Araştırmamız sonucunda elde edeceğimiz bilgilerle hastalığınızın oluş mekanizması hakkında bilgi edinmeyi umuyoruz. Bu araştırma için hiçbir şekilde normal tedavinizin dışına çıkmanız gerekmemektedir. Bu çalışmanın sizin için hiçbir masrafı yoktur. Kimliğiniz ile ilgili bilgiler gizli tutulacaktır. Verdiğiniz kan örneği bağış olup, kanı verenin ve çalışmayı yapanın ticari bir kazanç beklentisi yoktur. Bu çalışmaya katılmayı kabul etmeseniz bile , klinikte yürütülen tedavinizde herhangi bir aksama olmayacaktır. Ayrıca size ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, başka merkezlere yollanması ve işlenmesi konusunda bu çalışmayı yapan kişilere yetki veriyorsunuz. Yürütmekte olduğumuz bu çalışmanın sonuçları hakkında Bio. Özge Özgen'den bilgi alabilirsiniz.
Tel: (0212) 414 2000-31371
Yukarıdaki metni dikkatlice okudum. Çalışma hakkında bana sözlü bilgi de verildi. Bu durumda , söz konusu çalışmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum ve bu formun bir kopyasını alıyorum.

	AD/SOYAD	**İMZA**	**TEL. NO**
Gönüllü veya yasal Temsilci			
Olur alan Kişi			
Tanık			

Kopyası verilecekler:
Hasta Araştırıcı Hastane Kayıtları

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Tıbbi Genetik Bilim Dalı

KEMİK İLİĞİ KROMOZOM TETKİKİ İSTEK FORMU:

Tarih : ...../...../200.....

HASTANIN	
Adı, Soyadı :	Gönderilen Materyal : .....
Yaşı : ..... Cinsiyeti : ♂ □ ♀ □	.....
Mesleği : ..... Tel. No. :	Ön tanı : .....
Adres :	.....
.....	Gönderen Dr. : .....

ANAMNEZ :

a) Özgeçmiş :

b)Soygeçmiş :

LABORATUVAR BULGULARI :

Lökosit : Eritrosit : Trombosit : Hct :

MCV : MCH : MCHC : Hb :

KOAGÜLASYON TESTLERİ :

PERİFERİK FORMÜL :

KEMİK İLİĞİ BULGULARI :

KEMOTERAPİ ÖNCESİ :

KEMOTERAPİ SONRASI :
(Kullandığı ilaçlar, en son kemoterapi tarihi)
Kromozom Analiz sonucu:

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 276 Tarih : 07.02.2011

Konu : Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE hk.

Sayın Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgi : 30.12.2010 tarihli 5533 sayılı yazınız

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Yük. Lis. Öğr. Özge OZGEN'in yürüteceği 2011/47-421 dosya numaralı "AML'de APAF-1 Promotör Metilasyonu, Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozomal Anomaliler ile Klinik ve Laboratuvar Parametreleri Arasındaki İlişki" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 21.01.2011 tarihli 02 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	X	
	SİGORTA		
	HASTA KARTI/GÖNLÜKLERİ		
	İLAN		
	YILLIK BİLDİRİM		
	SONUÇ RAPORU		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		
	DİĞER		Anket, Araştırma Geri Bildirimleri, Dil Yeterlik ve Akademik Kurul Kararı, Literatür, Kaynağı, Sonuçlarda Paylaşım Belgesi, Diğer Resmi Form, İlgili Elemanların Bilgilendirilmiş Onay Belgesi, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 02	Tarih: 21.01.2011
	Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE ve Yük. Lis. Öğr. Özge ÖZGEN'in koordinatörlüğü ve sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen bir projesi başvuru dosyası ve araştırma ile ilgili belgeler gözden geçirilmiş; amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, görüşülüp değerlendirilmesinde etik sakıncası bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	İstanbul Üniversitesi İnsan Denekleri Üzerinde Yürütülecek Bilimsel Araştırmalar ve Etik Değerlendirme Kurulları Yönergesi

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		İlgi *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E X	K	E	H X	E X	H	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E	K X	E	H X	E X	H	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E X	K	E	H X	E X	H	
Prof. Dr. Rüveyda EKİM ORBAN-OĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İstanbul Tıp Fakültesi	E	K X	E	H X	E X	H	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E X	K	E	H X	E	H X	T. Kalkmalı
Prof. Dr. Pınar SARP	Onkoloji	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü	E	K X	E	H X	E X	H	
Uzm. Dr. Ahmet Rıza URAS	Biyokimya	Haydarpaşa Numune Eğt. ve Arş. Hast. Biyokimya	E X	K	E	H X	E	H X	T. Kalkmalı
Doç. Dr. H. Hamzadeh DOĞAN	Dermatoloji	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	K X	E	H X	E	H X	T. Kalkmalı
Prof. Dr. Aygen BUDU	Halk Sağlığı	Emekli	E	K X	E	H X	E X	H	
Doç. Dr. Tufan TÜRÜK	İç Hastalıkları	Dr.Lütfi Kırdar Eğt. ve Arş. Hast. İç Hast. Y. Uzmanı Kimliği	E X	K	E	H X	E	H X	T. Kalkmalı
Prof. Dr. Ural KUZGUN	Dermatoloji	Şişli Etfal E. Ve Arş. Hst.	E X	K	E	H X	E X	H	
Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN	Eczacılık	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	E X	K	E	H X	E	H	
Av. Dilek TEMİZ ÖZREK	Hukukçu	İstanbul Üniversitesi	E	K X	E	H X	E X	H	
Prof. Dr. Sevtap TAYFUN	Biyoloji	Emekli	E X	K	E	H X	E X	H	
Mt. Kerim ARMAN	Dil Yeterlik Sorumlu	Özel Elemanlar	E X	K	E	H X	E	H X	T. Kalkmalı

* : Araştırma ile İlgili
** : Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Özge	**Soyadı**	Özgen
Doğ.Yeri	Antalya	**Doğ.Tar.**	13.11.1984
Uyruğu	T.C.	**TC Kimlik No**	37888074038
Email	gercekozge@hotmail.com	**Tel**	05447245939

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İst. Tıp Fak. Sağlık Bilimleri Enst. Tıbbi Genetik	
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	
Lise	Yeşilköy 50.Yıl Anadolu Lisesi	

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Asisstant Scientist	Orphanet Avrupa Kom. Destekli projesi İstanbul Üniversitesi	2008-2009
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	75	

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Poster Sunumu:

8. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi_Akut Miyeloid Lösemi'de Leptin Reseptör Geni İsoformlarının Ekspresyonu ve GLN223ARG Polimorfizmi_06-09 Mayıs 2008

European Society of Human Genetics (ESHG)_Altered Expression Of Peroxysome Proliferatör- Activated Receptör g2 and Serum Leptin Levels In Schizophrenia_ 2011

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Fotoğrafçılık, Yüzme