T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA *BAP1* VE *ANAPC7* GEN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Muharrem Eren KORKMAZER

Danışman
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Yüksek Lisans Tezi

Kasım 2014
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA *BAP1* VE *ANAPC7* GEN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Muharrem Eren KORKMAZER

Danışman
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleleri Birimi tarafından TYL-2013-4294 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Kasım 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı: Muharrem Eren KORKMAZER

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

''Akut Myeloid Lösemi Hastalarında *BAP1* ve *ANAPC7* Gen Ekspresyonlarının Araştırılması'' adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Muharrem Eren KORKMAZER

İmza

Danışman

Prof. Dr. Munis DÜNDAR

İmza

Tıbbi Genetik ABD Başkanı

Prof. Dr. Munis DÜNDAR

İmza

Prof. Dr. Munis DÜNDAR danışmanlığında Muharrem Eren KORKMAZER tarafından hazırlanan **"Akut Myeloid Lösemi Hastalarında *BAP1* ve *ANAPC7* Gen Ekspresyonlarının Araştırılması"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

25 / 11 / 2014

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Munis DÜNDAR
(Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Mehmet Akif ÖZDEMİR
(Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR
(Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……..… tarih ve ……..…… sayılı kararı ile onaylanmıştır.

…… /……../……

……

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgisini ve desteğini, hiçbir şekilde esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve sonuçlanmasında yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a,

Çalışma grubunu oluşturma konusunda sağladıkları destekten dolayı Üniversitemizin Eczacılık Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Yagut Yusif AKBAROVA'ya, Tıbbi Genetik Anabilim Dalından Uzm. Moleküler Biyolog Hilal AKALIN'a, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Akif ÖZDEMİR ve Uzm. Dr. Özlem Gül KIRKAŞ'a,

Tez çalışması süresince, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen bölüm asistanları Dr. Oğuzhan BAHADIR, Dr. Muhammed Ensar DOĞAN, Uzm. Kimyager Nazife TAŞÇI, Moleküler Biyolog Yasin ADA, Nuriye COŞKUN, Keziban KORKMAZ'a,

İstatistik analizlerinde yardımlarını esirgemeyen ERÜ Biyoistatistik Anabilim Dalı asistanı Arş. Gör. Gökmen ZARARSIZ'a,

Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında görev yapan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma, manevi desteğini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ailesine,

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Manevi destekleri eksik etmeyen ev arkadaşlarıma ve Huriye AKSU'ya,

Varlıklarından minnet duyduğum ve bana her zaman destek olan Aileme;

TEŞEKKÜR EDERİM.

Muharrem Eren KORKMAZER

Kayseri, Kasım 2014

AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA *BAP1* VE *ANAPC7* GEN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Muharrem Eren KORKMAZER

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2014

Danışman: Prof. Dr. Munis Dündar

ÖZET

Epigenetik faktörler ve post translasyonel modifikasyonlar farklı hücresel süreçlerin yanı sıra kanser biyolojisinde de kritik rol alırlar. Kanserin genomla bağlantısını anlama çabalarında epigenetik faktörlerin ve post-translasyonel modifikasyonların rollerini saptama çalışmaları artarak devam etmektedir.

Geçmişte BRCA-1 geninin tümör süpressör özelliğini artırıcı domain olarak bilinen BAP1, tümör süpressör özelliğinden başka deubikitinasyonda görev alan, histon modifikasyonu, kromatin remodelling fonksiyonları bulunan gendir. Hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptozis, hücre farklılaşması, DNA tamiri ve gen ekspresyonunda görev alır. BAP1 geninin mutasyonları birçok kanser türünde tanımlanmıştır.

APC/C ubikitin ligaz aktivitesini barındıran, mitotik süreci kontrolünde görev alan temel proteindir. 14 farklı proteinden oluşur. APC/C, ANAPC7 (APC7 olarak da bilinir) alt ünitesi yoluyla CBP/p300 gibi epigenetik faktörlerle etkileşerek aktive edebilir ve bazı genlerin aşırı eksperese olmasına yol açarak kanser oluşumuna neden olabilir.

Çalışmamızda, yeni tanı veya takipteki Akut Myeloid Lösemi hastalarından elde edilen kemik iliği veya periferik kan örneklerinde BAP1 ve APC7 gen ekspresyonları analiz edildi. BAP1 ve APC7 ekspresyonlarının bazı hasta gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken bazı hasta gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bulundu ve aşırı eksprese olduğu gözlendi. Sonuçlarımız, özellikle t(15;17) ve NPM1-A mutasyonu ile bağlantılı AML patogenezinde BAP1 ve APC7 ekspresyonlarının ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: BAP1, ANAPC7, Akut Myeloid Lösemi

INVESTIGATION OF BAP1 and ANAPC7 GENES EXPRESSIONS IN PATIENT WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Muharrem Eren KORKMAZER

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Medical Genetic

Master's Thesis, November 2014

Supervisior: Prof. Munis DUNDAR

ABSTRACT

Epigenetic factors and post-translational modifications have a critical role in cancer biology as well as different cellular process. Effort to understand the connection of the cancer with the genome and the studies to determine the role of epigenetic factors and post-translational modifications continues to increase.

BAP1 gene have functions other than the tumor supressor feature like ubiquitination, histon modification, chromatin remodelling and was known as enhanced domain of tumor supressor feature of BRCA1 gene in the past. BAP1 gene is involved in regulating of cell cycle, apoptosis, cell differentiation, DNA repair and gene expression. BAP1 gene mutations are identified in many cancer types.

APC/C is an essential protein that have ubiquitin ligase activity and controls mitotic process. APC/C comprise of 14 different protein. APC/C can activated with the interaction of epigenetic factors such as CBP/p300 via subunit ANAPC7 (also known APC7) and can cause the initiation of cancer by leading to overexpression of several gene.

In our study, we analyzed BAP1 and APC7 genes expressions in bone marrow or peripheral blood samples obtained from the newly diagnosed and followed up patients of Acute Myeloid Leukemia. BAP1 and APC7 gene expressions were observed statistically not positive in some patient groups as compared to control group but were observed statistically positive in some patients group and were found to be overexpressed. Our results especially in AML pathogenesis that has a connection with NPM1-A and t(15;17) mutations suggest that it can be related to BAP1 and APC7 genes expressions.

Key words: BAP1, ANAPC7, Acute Myeloid Leukemia

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR iv
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ xi
TABLOLAR LİSTESİ xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ xvi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. LÖSEMİ 4
2.1.1. Hematopoetik Kök Hücre Biyolojisi 4
2.1.2. Tanım 6
2.1.3. Löseminin Sınıflandırılması 7
2.1.4. Tarihçe 7
2.1.5. İnsidansı 8
2.2. Akut Myeloid Lösemi (AML) 9
2.2.1. AML'nin Sınıflandırılması 9
2.2.2. AML Etiyolojisi 13
2.2.3. AML'de Klinik Belirti ve Bulgular 14
2.2.4. AML İnsidansı 15
2.2.5. AML'de Moleküler Genetik ve Prognoz 16

2.3. *BAP1* GEN YAPISI 23
2.3.1. UBİKİTİN-PROTEOZOM SİSTEMLERİ (UPS) 23
2.3.2. *BRCA-1* GEN FONKSİYONU 23
2.3.3. DUBS SİSTEMLERİ 26
2.3.4. *BAP1* GEN TANIMLAMASI 27
2.3.5 BAP1-BARD1 ETKİLEŞİMİ 31
2.3.6. BAP1-HCFC-1 ETKİLEŞİMİ 32
2.3.7. BAP1-ASXL-1 ETKİLEŞİMİ 36
2.3.8. BAP1-OGT ETKİLEŞİMİ 37
2.3.9. *BAP1* GENİNİN KANSERDE MUTASYON VE EKSPRESYONLARI 40
2.3.10. *BAP1* GENİ VE LÖSEMİ 63
2.4. ANAPC7 (APC7) 72
2.4.1 *APC* FONKSİYONU 72
2.4.2. APC, CHD1 VE CDC20 İLİŞKİSİ 74
2.4.3. APC -SİKLİN B1 İLİŞKİSİ 74
2.4.4. APC, CBP ve p300 İLİŞKİSİ 75
2.4.5. ANAPC7 (APC7) 78
2.5. REAL-TİME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON (RT-PCR) 82
3. GEREÇ – YÖNTEM 87
3.1. Araştırmanın tipi 87
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı 87
3.3. Araştırmada kullanılan Materyal 87
3.3.1. Hasta grubu 87
3.3.2. Kontrol Grubu 87
3.4. Veri Toplama Araçları 87
3.4.1. Demirbaş Malzemeler 87

3.4.2. Sarf Malzemeler 87
3.4.2.1. Ekspresyon analizi için gerekli sarf malzemeler 87
3.5. YÖNTEMLER 88
3.5.1.Uygulama Prosedürleri 88
3.5.1.1. Kan Örneklerinden Lökosit İzolasyonu 88
3.5.1.2. Lökositten Total RNA İzolasyonu 88
3.5.1.3. cDNA Sentezi 89
3.5.1.4. Ekspresyon analizi 91
3.4. İstatiksel Analiz 92
4. BULGULAR 94
5. SONUÇ VE TARTIŞMA 99
KAYNAKLAR 115
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AML/ANLL	Akut Myeloid/Lenfoid olmayan Lösemi
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
APC	Anafaz Hızlandırıcı Kompleks
APC/C	Anafaz Hızlandırıcı Kompleks/siklozom
APL	Akut Promiyelositer Lösemi
AST	Atipik Spitz Tümörü
ASXL1	Additional sex comb-like: Ek olarak cinsiyet proteinlerine benzeyen transkripsiyon düzenleyici-1
BAP1	BRCA1 İlişkili Protein 1.
BARD1	BRCA1 ile ilişkili RING domain 1.
BCC	Basal Hücreli Karsinom
Bmi1	Polycomb baskılayıcı kompleks 1(PRC1)'in bileşeni.
BRCA	Göğüs Kanseri Gen.
BRCC36	BRCA1-BRCA2 içeren kompleks altünite 3.
CBP (CREBBP)	cAMP'ye Cevap Elemente Bağlanan Protein.
CCA	Kolanjiyokarsinom
ccRCC	Clear cell renal hücreli karsinoma
CDC20	Hücre Bölünme Döngüsü 20
CDH1	Cadherin Tip 1
Cdk1	Siklin Bağımlı Kinaz 1
CGH	Array-karşılaştırmalı genomik analiz
CM	Cutaneous Melanoma
CMML	Kronik Myelomonosit Lösemi
COX7C	Sitokrom C oksidaz 7
CP	Karşılaşma noktası
Cq	Kantitasyon döngüsü
Ct	Eşik değeri döngüsü
DCIS	Tabii Vaziyette Göğüs Ucu Karsinom
DP1	E2F Dimerizasyon partneri

DUB	Deubikitinasyon enzimi
E1A	Adenoviral onkogen
E2A	Transkripsiyonel Faktör 3 (TCF3)
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
HCC	Hepatosellüler Karsinom.
HCFC-1	Konakçı hücre faktörü C1.
HBM	HCF Bağlanma Motifi
HKH	Hematopoetik Kök Hücreler
IR	İyonize Radyasyon
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
KML	Kronik Myeloid Lösemi
KO	Knock out
LOH	Heterozigosite kaybı
MART-1	T hücrelerince tanınan melanoma antijeni
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
MM	Metastazik melanoma
MPM	Malignant Plevral Mezotelyum
nApc7	1-147 residülerdeki N ucu parçası
NEMMPs	Atipik Nevoid Melanoma Benzeri Melanosit
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NTC	Negatif kontrol
OGT	O-bağlı N-asetilglukozamin transferaz
OM	Oküler melanoma
PcG	Polycomb Grup Proteinleri(Polycomb Baskılayıcı deubikitinaz kompleksi)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR2	Polycomb Baskılama Kompleksi 2
PKA	Protein Kinaz A
PR-DUB	Polykomb baskılayıcı Deubikitinasyon kompleksi.
P300 (EP300)	E1A'ya Bağlanma Proteini.
RCC	Renal Hücreli Karsinoma
RING	Gerçekten ilginç Gen (Really Interesting Gene)
RIP	Reseptör etkileşim proteini

RNAi	RNA interferans
RT- PCR	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TOP	Sıçrama noktası
TPR	Tetratrico peptid tekrarları
UM	Uveal melanoma
UPS	Ubikitin proteozom sistemi
WT	Wild-type
YKH	Yetişkin Kök Hücreler

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. AML'nin FAB Sınıflaması 11
Tablo 2.2. AML'nin WHO Sınıflaması 12
Tablo 2.3. AML'de karyotip özelliklerine göre prognostik faktörler 21
Tablo 2.4. AML'de morfolojik alt tipler ve genetik değişimler arasındaki ilişki 22
Tablo 2.5. Çocuklarda AML'de prognostik kriterler 22
Tablo 2.6. DUBs C-terminal altsınıf üyelerinin karşılaştırılması 27
Tablo 2.7. BAP1'in rol aldığı fonksiyonlar 29
Tablo 2.8. HCF-1 fonksiyonu, BAP1 ve HCF-1 arasındaki ilişki. 35
Tablo 2.9. ASXL-1 ve OGT'nin fonksiyonları 38
Tablo 2.10. 2013 yılına kadar raporlanan *BAP1* germline mutasyon vakaları ile ilgili Cheung et al. tarafından hazırlanan tablo. 53
Tablo 2.11. 128 sporadik ccRCC hastasındaki *BAP1, SETD2, KDM6A, PBRM1* mutasyon dağılımı. 57
Tablo 2.12. 2014 yılına kadar raporlanan *BAP1* somatik mutasyon vakaları ile ilgili Battaglia tarafından hazırlanan tablo. 61
Tablo 2.13. 2014 yılına kadar raporlanan *BAP1* germline mutasyon vakaları ile ilgili Battaglia tarafından hazırlanan tablo. 62
Tablo 2.14. 2014 yılına kadar raporlanan BAP1 kanser sendromları ile ilgili Battaglia tarafından hazırlanan tablo.....63
Tablo 2.15. *BAP1* mutasyonunun tespit edildiği kanser türleri. 68
Tablo 2.16. *BAP1*'in kanser türlerinde somatik mutasyon dağılımı. 69
Tablo 2.17. *BAP1*'in bazı kanser türlerinde somatik mutasyon bölgeleri.....70
Tablo 2.18. *BAP1*'in bazı kanser türlerinde germline mutasyon bölgeleri. 71
Tablo 2.19. APC'nin rol aldığı fonksiyonlar 74
Tablo 2.20. Siklin B1, CBP, p300 Fonksiyonları ve APC ile ilişkisi 78
Tablo 2. 21. APC7'nin rol aldığı fonksiyonlar 82
Tablo 3.1.cDNA reaksiyonu için 1. karışım 91
Tablo 3.2.cDNA reaksiyonu için 2. karışım 91
Tablo 3.3. cDNA sentezi için gerekli sıcaklık döngüsü.....92
Tablo 3.4. Ekpresyon analizi için reaksiyon karışımı 93
Tablo 3.5. Lightcycler 480 II software programına ayarlanan sıcaklık ve süreler 93
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda cinsiyet, yaş, numune, mutasyon dağılımı 98

Tablo 4.2. *BAP1* ve *APC7* gen ekspresyonları p değerleri. 99
Tablo 4.3. Tablo 4.2 *BAP1* ve *APC7* ekspresyonlarının gruplara göre istatistiksel analizi 100
Tablo 4.4. *BAP1* ve *APC7* ekspresyonlarının korelasyon analizi 100

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Hematopoetik Kök Hücre Farklılaşması.....5
Şekil 2.2. AML'de myelobastlar.....15
Şekil 2.3. BRCA1 Protein Yapısı ve Domainleri.....25
Şekil 2.4. Hücre Döngüsü Sürecinde BRCA-1 etkileşime girdiği moleküller.....25
Şekil 2.5. BAP1 geni kromozom lokalizasyonu 27
Şekil 2.6. BAP1 gen yapısı. 30
Şekil 2.7. BAP1 protein yapısı.....30
Şekil 2.8. BAP1-BARD1-BRCA1 etkileşimi 32
Şekil 2.9. BAP1 proteininde HCF-1, YY1 ile bağlantılı domainler. 35
Şekil 2.10. BAP1/HCF-1/YY1 etkileşimi.....36
Şekil 2.11. BAP1-ASXL1-OGT'nin gen ekspresyonu düzenlemesi 38
Şekil 2.12. Transkripsiyon düzenlenmesinde BAP1-HCFC1-ASXL1-OGT-FOXK kompleksi 39
Şekil 2.13. BAP1-HCFC1-FOXK2 Kromatin Remodelling Kompleksi İçin Potansiyel Model.....39
Şekil 2.14. Asbeste maruz bırakılan mezotelyum için fare modelinin genotiplemesi. 41
Şekil 2.15. Asbeste maruz bırakılan fare modellerinde RT-PCR ekspresyon analizi…….....41
Şekil 2.16. *BAP1* geninin Oküler ve cilt melanomadaki germline ve somatik mutasyonları. 45
Şekil 2.17. A. Şekil 2.17 UM hastasında Sanger sekanslamasıyla(A) belirlenen mutasyonlar ve mutasyonların yerleşimi(B) 47
Şekil 2.18. FUM036 kodlu ailenin pedigrisi.....49
Şekil 2.19. UM hastasındaki RT-PCR'da anormal *BAP*1 splays transkriptleri. 50
Şekil 2.20. UM hastasında *BAP1*'in splays alanında oluşan truncat mutasyon. 50
Şekil 2.21. *BAP1*'in uveal melanoma, cilt melanoma, atipik melanosit, mezotelyum ve olası diğer kanserlerdeki germline mutasyon dağılımı. .52
Şekil 2.22. 2013 yılına kadar belirlenen *BAP1*'in germline mutasyon dağılımı.....53
Şekil 2.23. *BAP1*'in gen yapısı ve iki ailedeki kanserden etkilenmiş üyelerde gözlenen germline mutasyonlar. 54

Şekil 2.24. Melanosit lezyona sahip hastada *BAP1*'in çerçeve kayması mutasyonu. 54
Şekil 2.25. İntrahepatik Kolanjiyokarsinomadaki inaktive edilen mutasyonlu genler. 59
Şekil 2.26. Kolanjiyokarsinom vakalarındaki hücre proliferasyonunda *BAP1*'in fonksiyon inhibisyonu ve somatik mutasyon dağılımı. 60
Şekil 2.27. Yeni nesil sekanslamayla HCC'de belirlenen *BAP1* mutasyonları. 61
Şekil 2.28. Fare Beyin ve Dalağındaki BAP1 ile ilişkili proteinler 67
Şekil 2.29. Apc7 dimerleri için varsayılan tam boyut model.....80
Şekil 2.30. İnsanda bulunan Apc7'nin tam boyut modeli. 81
Şekil 2.31. RT-PCR amplifikasyon eğrisindeki fazlar. 85
Şekil 2.32. RT-PCR'de baseline ve Ct noktası. 85
Şekil 4.1. 1.grup-12 hastanın 3 gende amplifikasyon eğrileri.....99
Şekil 5.1. RARA sinyal yolağı 110
Şekil 5.2. Oral skuamöz hücre karsinomlarında p300/NPM1 ilişkisi 111

Grafik 2.1. Yaşanılan Bölgeye Göre Alt grup Dağılımı 13
Grafik 2.2. Kadın ve Erkek Olgularda Yaş Dağılımı.....16

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanserde temel sorun, hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır; çoğalma ya da büyümenin gen kontrolü altında gerçekleşmesi, çeşitli kanser türlerinde gen anomaliliklerinin primer veya sekonder faktör pozisyonunu alması ve tüm kanser türlerinin (belirgin bir kalıtsal komponent bulunmasa bile) somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluşması, mutasyonlarında bir seri genin ekspresyonunu etkilemesiyle genetik faktörlerde tüm kanser türlerinde etkilidir şeklinde bir genelleme yapılabilir (1).

Lösemiler hematopoetik hücrelerin malign transformasyonu sonucu oluşan heterojen neoplastik hastalıklar grubudur. Lenfoid kök hücrelerden köken alırsa lenfoid, myeloid kök hücrelerden köken alırsa myeloid; sağkalım ve oluşum sürelerine göre de akut ve kronik olarak sınıflandırılırlar (2).

Akut lösemiler olgunlaşmamış hematopoetik hücrelerin kan, kemik iliği ve diğer dokulara yayılımı ile meydana gelen hastalıktır. Akut lösemili hastaların başlangıç değerlendirmelerinde uzun dönemli prognoz ve tedavi planlamasında moleküler, sitogenetik ve immünolojik çalışmalar katkıda bulunur (2).

Akut Myeloid Lösemi (AML), olgunlaşmamış kan hücrelerinin hızlı şekilde büyümesiyle karakterize bir hastalıktır ve tedavi edilmezse birkaç haftada ölüme sebep olabilir. AML hastalığında neoplastik hücreler kemik iliğinde akümüle olur, sonuçta hematopoez bloke edilir ve normal kemik hücrelerinin yerini lösemi hücreleri alır. Alyuvar, akyuvar hücrelerinde ve normal trombosit hücre sayısında artışa neden olur. Bu lösemi tipi kromozomal kırıklarında translokasyon ve inversiyonun çeşitli tiplerinden kaynaklanır (3).

Kromozomdaki çeşitli anomaliliklerinin oluşumuyla, füzyon proteinleri olarak adlandırılan anormal fonksiyonlu proteinler kodlanır. Genellikle füzyon proteinlerinin yapısı, bir transkripsiyon faktörü ve apoptozis, hücre yaşama ile ilişkili bir proteinden oluşur. Füzyon proteinlerinde bulunan transkripsiyon faktörleri myeloid farklılaşma ve AML'nin bilinen tiplerindeki hematopoezi etkiler. AML'de yaygın olarak tekrar düzenlenen genler t(15;17) PML-RARα; t(8;21) AML1-ETO; 11q23 MLL, inv(16), CBFβ-MYH11'dir (3).

Protein substratlarından ubikitin uzaklaştırma özelliği olan Deubikitinasyon enzimleri (DUBs) sayısız biyolojik işlemlerde yer alır. DUBs 'ın ubikitin C-terminal hidrolaz alt grubu dört üyeden oluşur: UCH-L1,UCH-L3, UCH37 ve BAP1 (29).

BRCA1-ilişkili protein 1(BAP1), BRCA1-aracılı hücre büyüme baskılanmasını hızlandıran ve BRCA1'in RING finger domaini ile etkileşen protein olarak mayalarda ikili-hibrit tekniğiyle tanımlanmış, deubikitinasyon enzimlerinin (DUB) altsınıfından çekirdekte yerleşmiş ubikitin karboksil-terminal hidrolazdır (25). *BAP1* geni insanda 3. kromozom (3p21.3) bölgesinde lokalizedir ve tümör süpressör olarak kabul edilir (27, 29).

BAP1 geninin sporadik veya germline mutasyonları mezotelyoma(46, 54), cilt (46, 56) ve oküler melanoma (56), melanosit (32, 64), atipik melanosit proliferasyonu (56), atipik Spitz tümör (58), uveal melanoma (41, 42, 44), akciğer (27, 44), göğüs (27), renal hücreli karsinom (27), clear cell renal hücreli karsinom (39,70), kolanjiyokarsinom (52, 74), hepatosellüler karsinom (76, 77), miyelodispastik sendromda (MDS) (35, 50) tespit edilmiştir.

Anafaz ilerletici kompleks veya siklozom(APC/C), mitotik çıkış ve anafazı başlatan; mitozda önemli geçişleri kontrol eden bir E3 ubikitin ligaz ve temel proteindir (80, 81, 82). 1998 yılında Yu et al. APC altünitesinin APC1, APC2, APC3, APC4, APC5, APC6, APC7 ve APC8 olmak üzere sekiz proteinden oluştuğunu belirtti (88). 2003 yılında Vodermaier et al. APC'nin altünite sayısını en az 11, 2008 yılında Han et al. alt ünite sayısının en az 13 olduğunu yayınladılar (81,82). 2013 yılında Zhang et al. göre insan APC yapısı en az 19 altüniteyi birleştiren 14 farklı proteinden oluşmaktadır (87).

APC/C, sinyal yolaklarında rolleri olan asetiltransferaz CBP ve p300 ile direk olarak etkileşir. Bu etkileşim APC5 ve APC7 altüniteleri yoluyla gerçekleşir. Bu etkileşimin

fonksiyonel önemleri hücre döngüsü süreçlerinde, transkripsiyonel düzenlemede, hücre büyümesinde tanımlanmıştır (84, 89).

APC7, omurgalılarda TPR (Tetratrico peptid tekrarları) motifleri içeren tek alt birimdir. TPR motifleri protein-protein etkileşimde rol alır. APC7, çok sayıda TPR kopyası barındırır. APC7'nin kromozom ayrımında ve anafazın gecikmesinde rolü vardır (82, 85, 88, 89).

Literatür taramalarımızda AML hastalarında *BAP1* ve *ANAPC7* genleri ile ilgili ekspresyon düzeyinde bir çalışmayla karşılaşmadık. Çalışmamızda, Akut Myeloid Lösemi vakalarında *BAP1* ve *ANAPC7* gen ekspresyonlarının araştırılması ile bu hastalık grubunda iki genin ekspresyonlarının karşılaştırılması ve ekspresyon farklılıklarını belirleyerek hastalığın fizyopatolojisindeki olası rolünü tanımlamak; ileriki dönemlerde hastaların genetik tarama programlarına, tedavilerine katkıda bulunmak ve bunun yanı sıra bir sonraki kuşaklar için verilecek genetik danışmanlık hizmetine katkıda bulunabilmeyi amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LÖSEMİ

2.1.1. Hematopoetik Kök Hücre Biyolojisi

Kök hücreler (Stem cell), kendine benzeyen hücreler oluşturabilen, farklı seride hücreler oluşturabilen hiç değişime uğramamış veya çok az farklılaşmış ana hücrelerdir. Kök hücreler yeteneklerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere üçe gruba ayrılırlar. Totipotent hücreler en fazla farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir. Bu hücrelerden tüm hücre tipleri elde edilebildiği gibi yeni bir birey de oluşabilir. En iyi tutipotent kök hücre zigottur. Totipotent hücreye göre farklılaşma kapasitesi daha az hücreler pluripotent hücrelerdir. Yeni bir birey oluşturulamaz. Pluripotent kök hücreden uygun koşullarda yine de insan organizmasındaki birçok hücre elde edilebilir. Multipotent kök hücreler erişkinde bulunur ve sadece belirli hücre tiplerini oluşturmak üzere özelleşirler (4).

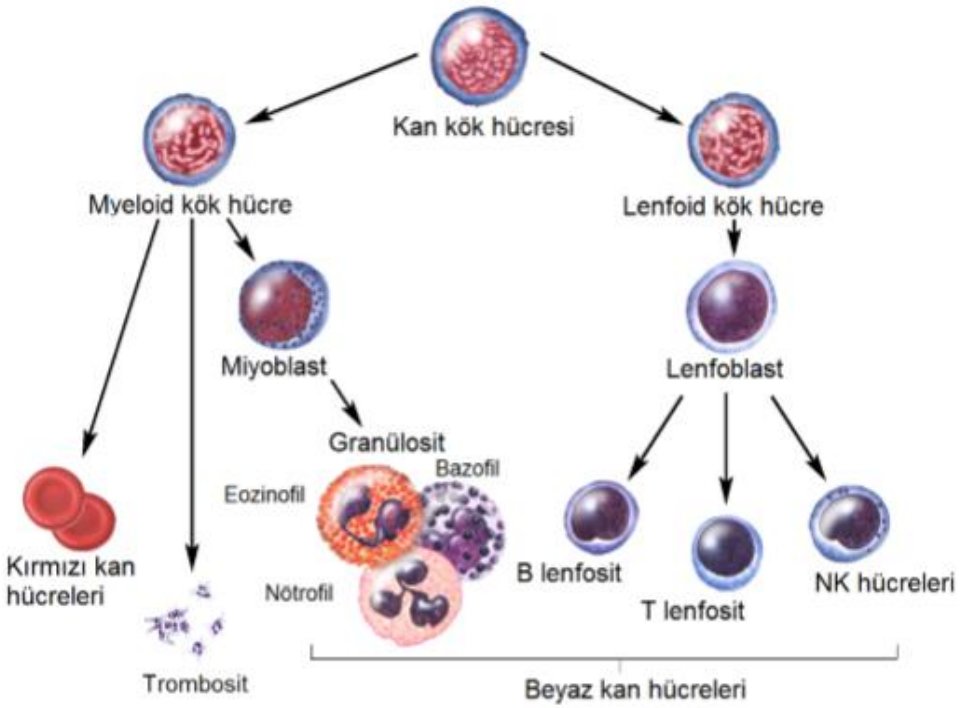
Embriyogenez aşamasında kök hücreler de kendi içerisinde gelişir, değişir ve blastosist evresinde iç hücre kütlesini (inner cell mass) oluştururlar. Bu aşamadan sonra artık kök hücreler totipotent yeteneklerini kaybetmiş, pluripotent yeteneğine sahip kök hücreler şekline dönmüşlerdir (embriyonal kök hücre). Pluripotent kök hücre embriyogenez dönemi sonunda multipotent kök hücreye döner (4).

Multipotent kök hücre grubunda yer alan yetişkin kök hücreler (YKH) embriyonal dönem kök hücrelerine göre farklılaşmış olsalar da kendi kendini yenileme (self-renewal) özelliklerini halen taşıdıkları için kendi özelliklerine benzer hücreler yapabilme yeteneğine sahiptirler. Kemik iliğinde yer alan Hematopoetik Kök Hücre (HKH)'ler (Hematopoietic Stem Cell) uygun koşullar ve uyaranlar altında kanda yer alan lenfositer, miyelositer ve trombositer hücre tiplerini oluştururlar (4).

HKH'lerin bir kısmı öncelikle hücre çoğalmasında görev alan progenitör hücre tipine dönerler ve sonra kanın gereksinimine göre hızla bölünerek hemostazı sağlarlar. HKH'lerin olgun kan hücrelerine farklılaşma aşaması çok sıkı kontrol edilen bir süreçtir. Metabolik nedenler veya çevresel faktörlerle hücre çoğalması, farklılaşmasını kontrol eden genler ve gen kontrol mekanizmalarında ortaya çıkan her mutasyon kanser nedeni olabilir (4).

Hematopoetik hücreler ortak bir multipotent ana hücreden köken alırlar. Eritrositler, granülositler, monositler ve trombositler gibi perifer kandaki olgun hücreler, kemik iliğindeki progenitör hücrelerden tek bir hat üzerinde olgunlaşarak meydana gelmektedir (5).

Lenfoid kök hücre; lenfositleri, myeloid kök hücre ise nötrofilleri, bazofilleri, eozinofilleri, monositleri, eritrositleri ve trombositleri oluşturmak üzere özelleşirler. Her farklılaşma aşamasında farklı hematopoetik büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir (5).



Şekil 2.1. Hematopoetik Kök Hücre Farklılaşması (5,111).

2.1.2. Tanım

Lösemiler, lenfopoetik veya hematopoetik kök hücrelerden veya öncül hücrelerden köken alan malign tümörler olup neoplastik hücrelerin yaygın kemik iliği tutulumu ile karakterizedirler. Löseminin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber, tedavi edilmediğinde ölümle sonuçlanabilmektedir (6,7). Sıklıkla ilk olarak Kemik iliğinde birikip ve normal hematopoeze karışarak, kan ve diğer dokulara (merkezi sinir sistemi ve akciğer) yayılabildikleri gibi; nadiren ilk birikim ilik dışı yerlerde de olabilir (Myeloid Sarcoma) (8).

Hematopoetik hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonelliği kontrolünde görevli sitokin ve hormonlar, doğrudan hücre içi gen transkripsiyonu ya da indirekt olarak sitoplazmik sinyal sistemlerinin aktivasyonu ile etki göstermektedirler. Sinyal iletiminde, ekstraselüler sinyali, intraselüler sinyal sistemine ileten/yansıtan membran reseptörleri oldukça önemli rol oynamaktadır. Bu reseptörler enzimatik aktiviteyle veya katalitik proteinlerin domainler yoluyla hücre içi sinyal yolaklarını aktive etmektedirler. Bu aktivasyon ve hemen ardından gelen inhibisyon sürecinde en önemli olay fosforilasyon ve defosforilasyondur (9).

Normal hematopoez, sıkı bir şekilde kontrol edilen, sitokinlerin ve reseptörlerinin önemli rol oynadığı bir dizi sinyal yolağına sahiptir. Bu yolakların normal çalışması, normal hematopoezin devamı için oldukça önemlidir. Bu yolaklarda ortaya çıkabilecek anormallikler, normal myeloid ya da lenfoid hematopoezin spesifik bir kademesindeki duraklama, farklılaşmanın inhibisyonu, proliferasyonla apoptozis arasındaki dengesizliğin artışı, kök hücrelerin yayılım özelliği kazanması, genomik değişimler (diğer mutasyonlar) normal bir kök hücre veya grubun lösemik kök hücresine dönüşümde önemli rol oynar (7-9).

Lösemilerin moleküler genetiği tekrarlayıcı kromozom anomalilerinin bu hastalıkta tanımlanmaları ile başlamıştır. Translokasyonlar sonucu fonksiyonu değişen/bozulan genlerin yeni bir onkogenik özellikli füzyon genin oluşmasına, genin fonksiyonunun artarak onkogenik özellik kazanmasına ya da bir protoonkogenin onkogen haline dönüşmesi veya aşırı ekspresyon yapması olabileceği gibi, bir tümör baskılayıcı genin fonksiyonunu kaybederek onkogenleri baskılayamaması ve hücreyi lökomogenez sürecine sokacak kazanımlara karşı engelleyememesine neden olabilir. Bazen bir

translokasyon sonucu normalde vücutta bulunmayan yeni bir kimerik protein ortaya çıkabilir (10,11).

Lösemi hastalık olarak kök hücre ve kök hücreden oluşan progenitör hücrelerde ortaya çıkan mutasyonlar ile oluşmaktadır (4). Hematolojik hastalardaki tümör baskılayıcı gen kaynaklı oluşan mutasyonlar, genellikle delesyonlar veya bir kromozomun monozomisi şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Onkogenler etkilerini dominant biçimde, tümör baskılayıcı genler nedeniyle oluşan hastalıklar resesif etki mekanizmasıyla ortaya çıkmaktadır (11).

2.1.3. Löseminin Sınıflandırılması

Lösemiler, hücre tipine, farklılaşma aşamasına, immünofenotipik özellik ile morfolojik ve sitokimyasal karakteristiklere göre çok çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. En basit şekilde lösemiler akut ve kronik form olarak iki ayrı sınıfta incelenmektir (6).

Akut lösemiler, kemik iliğinin ileri derecede farklılaşmamış blastik hücrelerin infiltrasyonuyla karakterize olup, köken aldığı hücre tipine göre akut myeloid lösemi(AML) ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (6).

Kronik lösemiler ise olgunlaşmış (blastik) kemik iliği elemanlarının artışıyla meydana gelir; çoğalan hücreler lenfoid öncü hücreler ise “kronik lenfositik (lenfoid) lösemi”, myeloid öncü hücreler ise “kronik myelositik (myeloid) lösemi” olarak tanımlanmaktadır (5).

Lösemiler beş ana tip olarak tanımlanmaktadır: Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Akut Myeloid/Lenfoid olmayan Lösemi (AML/ANLL), Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), Kronik Myeloid Lösemi (KML) ve Yetişkin T hücresi Lösemi (5).

2.1.4. Tarihçe

Löseminin tanımlanması ilk kez 1845’te ileri evrede kronik lösemili ve yüksek lökositozu olan bir hastada Wirchow tarafından yapılmış, 1870’de Neuman, kemik iliğini tutan bir hastalık olarak tanımlamış ve akut lösemi 1889’da Ebstein tarafından ilk kez kullanılmış, Ehrlich 1891’de yeni boyama yöntemleri kullanmıştır. Lenfatik lösemileri akut ve kronik olarak 1903 yılında Turk tarafından ayrımı yapılmış, Naegeli 1905 yılında miyeloblastı tariflemiş, 1913 yılında bir Türk hematoloğu olan Hasan

Reşad Sığındı ile birlikte Schilling-Torgau ilk monositer lösemiyi tanımlamış, 1914 yılında löseminin başka alt tipleri tarif edilmeye başlanmıştır (7,11,13).

Kemoterapiden önce ortalama yaşam süresi 2-3 ay iken folik asit antagonisti olan aminopterinin Farber, Diamond ve arkadaşları tarafından ilk kez 1948 yılında tedavide kullanılmasıyla lösemilerde ölüm geciktirilebilmiştir (11).

1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından orijinal akut lösemi FAB (Fransız, Amerika ve İngiliz) sınıflaması oluşturulmuştur. Akut lösemilerin morfolojik ve sitokimyasal boyanma özellikleri temel alınarak sınıflandırılma yapılır. İmmünfenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemleri göz önünde tutulmaz (13).

Akut lösemide; hücre yüzey antijenlerinin, sitogenetiğin öneminin fark edilmesi ve FAB sınıflamasının yeterli olmadığının gözlenmesi, akut lösemi immünolojik sınıflamalarını (EGIL) gündeme getirmiştir. "EGIL Sınıflaması'nda" (European Group for the Immunological Classification of Leukemias), AML'ler iki veya daha fazla myeloid marker (MPO, CD13, CD33, CDw65, Cd117) ekspresyonu ile tanımlanmıştır (13).

Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin prognostik önem arz etmesi nedeni ile 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) akut lösemiler de dahil olmak üzere hematopoetik ve lenfoid neoplasmaları içeren yeni bir sınıflama yapılmıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immünfenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmış, akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30'dan %20'ye indirilmiş ve nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir (13).

2.1.5. İnsidansı

Akut lösemiler tüm kanserlerin yaklaşık olarak %3'ünü oluşturur. ABD verilerine göre 35 yaş altında kanser nedeniyle ölümlerde ilk sırada yer alır. AML insidansı, 100000'de 2.4**,** ALL insidansı ise 100000'de 1.3'dür. Bu hastalık ABD'nde bir yılda yaklaşık olarak 9000 kişiyi etkilemektedir. ALL' de bu sayı 4000'dir. Bu oran son 30 yılda değişmeden kalmıştır. Bazı hastalarda genç yaşta olmaları nedeni ile lösemilerin etkisi belirginleşir. Örneğin, ALL, 15 yaşın altındaki çocuklarda en sık kanser ve ikinci ölüm

sebebidir. AML insidansı erken dönemde sivrilme yapmadan yaşla yavaşça artar. AML olgularının yaklaşık yarısı 50 yaşın altında görülür (14).

2.2. Akut Myeloid Lösemi (AML)

Akut myeloid lösemi (AML) myeloid progenitör hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin bozulması ve kontrolsüz çoğalması ile oluşan klonal, heterojen, neoplastik bir hastalıktır (15). Habis karakterli bu hücreler genellikle blastlar ya da ona yakın düzeyde (promiyelosit, promonosit gibi) hücrelerdir. Bu hücreler kemik iliğini tamamen infiltre ederek hematopoezin yetersizliğine yol açarlar. Diğer taraftan çoğalan lösemi hücreleri kanda da artma gösterirler ve seyrek de olsa ekstramedüller dokuları ve merkezi sinir sistemini infiltre edebilirler. Vücuttaki toplam sayısı artmış olan bu lösemi hücre kitlesi ayrıca metabolik yönden olumsuz etkilere de neden olabilir. Akut lösemili hastalarda kemik iliğindeki monoklonal lösemik hücre kitlesinin yanı sıra azalmış sayıda normal hematopoetik kök hücre kitlesi de vardır (16). AML, hem fenotipik hem de genotipik olarak heterojenite gösteren kompleks bir hastalıktır (10).

AML, granülositik, eritroid, megakaryositer veya monositer serilerin herhangi birinden kaynaklanabileceği gibi karma farklılaşma da (hem granülositik hem de monositik) gösterebilir. AML'de kritik ayrım de novo ile sekonder AML arasındadır. De novo (primer) AML daha önce hematolojik hastalığı olmayan hastalarda görülür. Bu hastalar daha gençtir, tedaviye yanıt ve sağkalım oranları daha iyidir. Karakteristik olarak resiprokal translokasyonlar görülür. Sekonder AML ise daha önceden myelodisplastik sendrom veya kronik myeloproliferatif hastalık gibi hematolojik hastalığı olanlarda veya bir başka malignite için kemoterapi almış kişilerde görülür. Sekonder AML genelde bir ileri yaş hastalığıdır. Tedaviye yanıt ve prognoz kötüdür (17).

2.2.1. AML'nin Sınıflandırılması

1976 yılında FAB grubu morfolojik ve sitokimyasal özelliklere dayanan bir sınıflama yaptı. AML'nin lösemik kök hücrenin farklılaşmasındaki baskın hat ve olgunlaşma derecesine göre sekiz kategoriye ayrılmaktadır. M6 ve M7 dışında tanı için istenen, kemik iliğinde > %30 blast olmasıdır (18, 19). (Tablo 2.1.)

Bazı çalışmalarda kan ya da kemik iliğinde blast oranının %20 – 29 arasında ya da %30 üzerinde olmasının tedaviye cevap ve yaşam süresi açısından anlamlı bir fark yapmadığı görülmüştür. Bu nedenle FAB sınıflamasındaki akut lösemi tanımındaki %30'luk blast

sınırı bu yeni sınıflamada %20'ye düşürülmüştür. WHO sınıflamasında morfolojik yapı yanında genetik, immunfenotipik, biyolojik ve klinik özellikler de göz önünde bulundurulmuştur (20).

WHO sınıflandırmasına göre AML üç ana alt grupta toplanmıştır; Tekrarlayan sitogenetik translokasyonlu AML'ler, çoklu displazi gösteren AML'ler, ilaca bağlı AML ve myelodisplastik sendromlar. Bu üç alt gruba sokulamayan ve genetik veri saptanmayan hastalar diğer tipler adı altında 4. alt grupta incelenir (Tablo 2.2.) (20).

Tablo 2.1. AML'nin FAB Sınıflaması (17)

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

(MPO: miyeloperoksidaz, SB: Sudan Black, Kİ: kemik iliği [MPO ve SB blastik hücrelerin birbirinden ayrılmasında kullanılan sitokimyasal boyalardır]) (17)

Tablo 2.2. AML'nin WHO Sınıflaması (20)

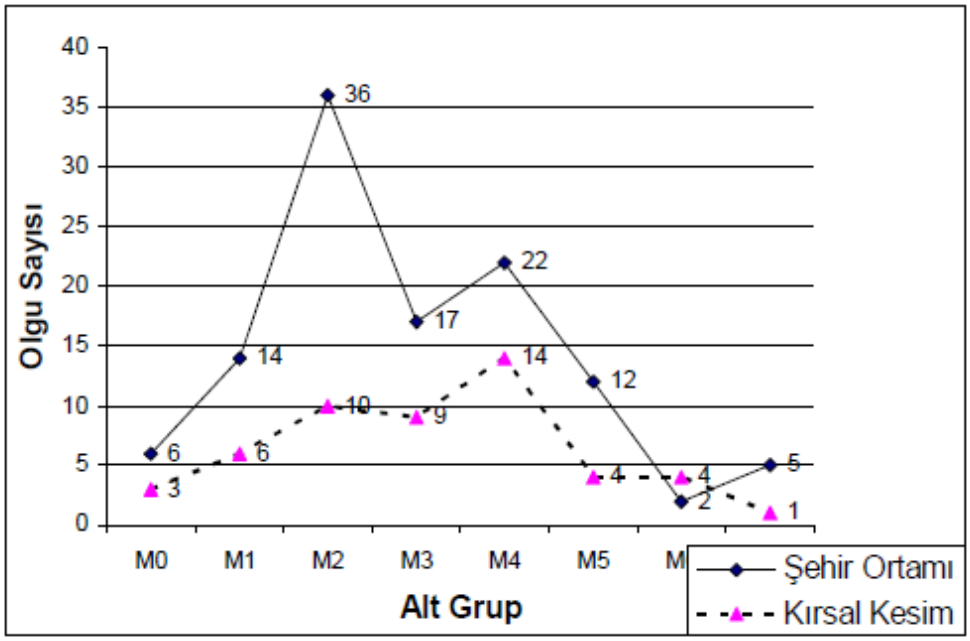
Tekrarlayan sitogenetik translokasyonlu AML	• t(8;21) AML1(CBFα)-ETO iliskili AML. iyi progozlu • APL [t(15;17) ilişkili AML ve varyantları; PML/RARα]. İyi prognozlu • İlikte anormal eozinofillerle karakterize AML [inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q11);CBFβ/MYH11X]. İyi prognozlu • 11q23 (MLL) anomalileriyle ilişkili AML. Kötü prognozlu
Çoklu dizi displazisi gösteren AML	• Genellikle kötü prognozludur. • Öncesinde MDS olan AML • Öncesinde MDS olmayan AML
İlaca bağlı AML ve myelodisplastik sendromlar	Genellikle kötü prognozludur • Alkilleyici ajanlarla ilişkili • Epipodofillotoksin ilişkili (bazıları lenfoid olabilir)
Diğer tipler	• Baska türlü kategorize edilemeyen AML • Minimal farklılaşma gösteren AML • Olgunlaşma göstermeyen AML • Olgulaşma gösteren AML • Akut myelomonositik lösemi • Akut monositik lösemi • Akut eritroid lösemi • Akut megakaryositik lösemi • Akut bazofilik lösemi • Myelofibrozla giden akut panmyeloz

2.2.2. AML Etiyolojisi

Çevresel ve genetik etkenler AML etiyolojisinde önemli faktördürler. Çevresel etkenler de fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Kimyasal ajanların en önemlileri benzen, sigara, kemoterapötik ilaçlar (alkilleyici ajanlar ve topoizomeraz II inhibitörleri), kloramfenikol ve fenilbutazondur. Fiziksel ajanlar olarak ise iyonize ve non-iyonize radyasyon örnek gösterilebilir. Özellikle iyonize radyasyon hücrede öncül nükleotidlerin yapısında değişiklik kromozomlarda kırılmalara, halka kromozom, disentrik kromozom ve sayısal anomalilere neden olarak AML insidansını artışında etki gösterir. Ayrıca bazı virüslerin de AML oluşmasında rol oynayabileceği yönünde düşünceler mevcuttur (7).

Gelişmiş ve endüstrileşmiş ülkelerde AML insidansı artmış oranda saptanırken, bazı toplumlarda ise AML artmış veya azalmış oran da belirlenmektedir (Grafik 2.1.) (21).

AML patogenezinde bazı hastalıkların veya konjenital sendromların (aplastik anemi, Down sendromu, Bloom sendromu, nörofibromatosis, ataksia telanjiektasia ve konjenital diğer sendromlar) rol oynadığı bilinmektedir (21).



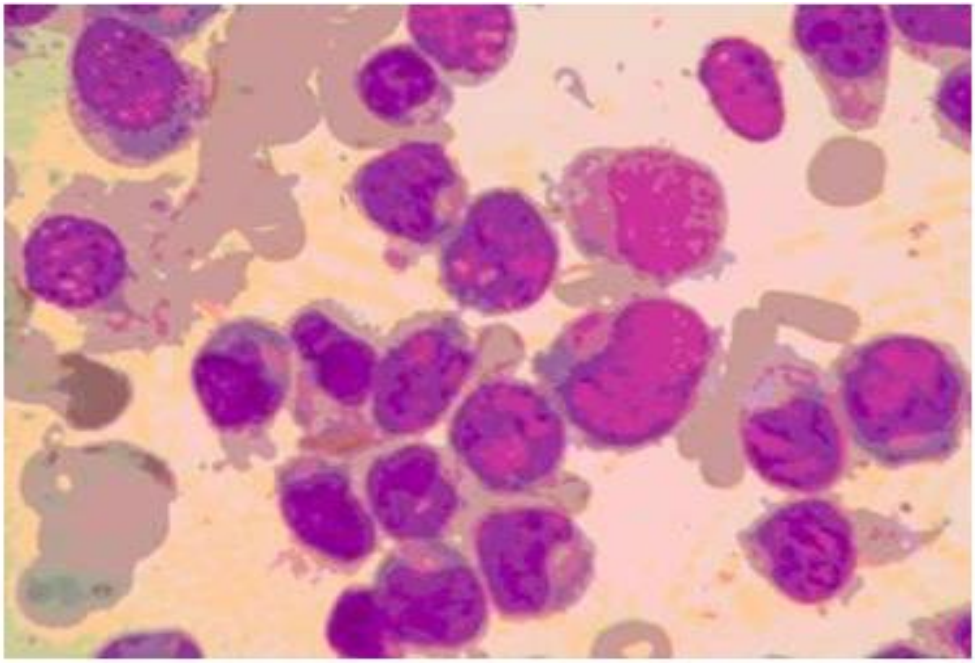
Grafik 2.1. Yaşanılan Bölgeye Göre Alt grup Dağılımı (21)

2.2.3. AML'de Klinik Belirti ve Bulgular

AML'de lökosit sayısı değişkenlik göstermekle beraber olguların dörtte birinde 100.000 /mm3'ü geçer. M4-M5 tiplerinde yüksek lökosit, M3 tipinde ise düşük lökosit söz konusudur. Nötrofil sayısı genellikle 1000/mm3'ün altındadır. Nötrofil sayısının 200/mm3'ün altına indiği durumlarda ise akciğer, sinüs, gingiva, diş ve ciltde bakteriyel enfeksiyonlar meydana gelir (7).

AML'de kesin tanı kriteri, kemik iliği aspirasyonu ve biopsisinde blast sayısının % 30'un üstüne çıkmasıdır. Bu nedenle tanı için kemik iliği aspirasyonu / biyopsisi kesinlikle gereklidir. Periferik kanda blast görülemeyebileceğinden ve periferik kandaki blastların morfolojisi kemik iliğindekilerden farklı olabileceğinden tanı için kemik iliği örneklemesi altın standarttır. Standart boyalı preparatta mikroskopide tüm alanları kaplayan blastik hücreler ve normal hücrelerin yokluğu tipik görüntüdür (9).

Akut promyelositer lösemide koagülasyon testleri de yapılmalıdır, çünkü bu hastalarda yaygın damar içi pıhtılaşması artmıştır. AML' de peroksidaz ve Sudan-black boyama testi pozitifdir; ALL de ise negatifdir. Monoblastik lösemide nonspesifik esterazlar ile hücre sitoplazması boyanabilir. Folik asid ve vitamin B12 eksikliği ile oluşan megaloblastik kemik iliği değişiklikleri AML ile karışabilir (5).



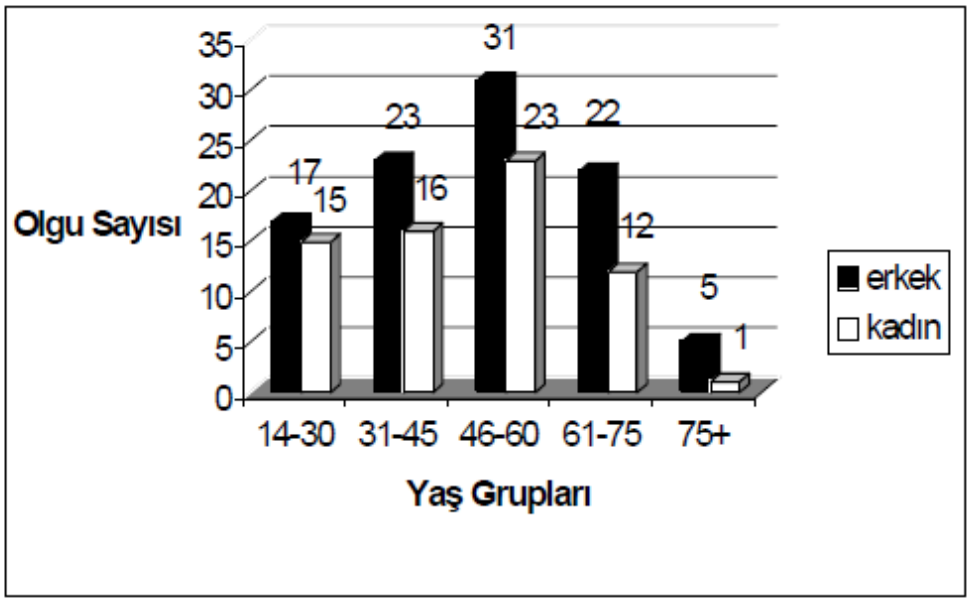
Şekil 2.2. AML'de myelobastlar (110)

2.2.4. AML İnsidansı

AML, herhangi bir yaşta görülebilir. Ancak görülme sıklığı 55 yaşından sonra ve puberte döneminde daha fazladır (22). On yaşın altındaki çocuklarda AML, lösemi olgularının % 12'sini ve 10-15 yaş arasında % 28'ni oluşturmaktadır. Erişkinlerde ise AML, akut lösemi olgularının % 80-90'nını teşkil etmektedir. AML insidansı yaş faktörü ile birlikte artma gösterirken, erkeklerde kadınlara nazaran daha fazla oranda tespit edilmektedir (21).

AML her yıl tanı konan yeni lösemilerin yaklaşık % 20'sini oluşturur. Çocukluk çağında ALL AML'den 4 kez fazladır, ancak yenidoğan döneminde AML çok daha sıktır. Adolesanda AML oranı artmaya başlar ve yeni vakaların % 50'si AML'dir. Bu artış erişkinde de sürer. Gelişmiş ülkelerde AML lösemilerin % 15'ini oluştururken, Türkiye ve diğer gelişmekte olan ülkelerde bu oran 1:1'dir (18).

AML'lerde rastlanma sıklığı cinsiyet ve ırksal özeliklere göre değişmektedir. Sıklığı erkeklerde bayanlara göre biraz daha fazladır (Grafik 2.2.). Irksal özellikler göz önünde bulundurulduğunda 2000 ile 2003 yılları arasında zencilerde 100 000 kişide 3,2 iken; beyazlarda 3,8 idi. Son 20 yılda rastlanma sıklığında önemli bir değişiklik saptanmamıştır (20).



Grafik 2.2. Kadın ve Erkek Olgularda Yaş Dağılımı (21)

2.2.5. AML'de Moleküler Genetik ve Prognoz

AML'nin tanımlaması, sınıflaması, etyopatogenezi, risk sınıflaması ve tedavi stratejilerinde, genetik ve biyoloji alanındaki gelişmeler ile yeniden dizayn edilebilir hale gelmiştir (8).

AML'nin moleküler genetiği ve moleküler biyolojisi ile ilgili olarak yapılan araştırmalar sonucunda 100'den fazla genetik anomalinin ve çeşitli genlerdeki mutasyonların hastalığın patogenezinde rol oynadığı ortaya konmuştur. Ancak AML patogenezinde rol alan genetik değişimlerin her birinin hastalık üzerindeki etkisi tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir. Çünkü AML'nin biyolojisi ve AML hastalarının tedaviye verdikleri yanıt tek bir mutasyon tarafından değil bir kombinasyon tarafından belirlenir. Bu durum AML'nin fenotipik olduğu kadar genotipik olarak da heterojenite gösteren kompleks bir hastalık olduğunun göstergesidir (17).

AML'de klasik sitogenetik, floresan in situ hibridizasyon (FISH), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), kantitatif revers transkriptaz (QRT)- PCR yöntemleri moleküler analiz ve araştırma amaçlı kullanılmaktadır (23).

AML'li yetişkinlerin yaklaşık % 55'inde lösemik blastlarda non random klonal kromozomal anomaliler görülür. Söz konusu değişimler geçmiş yıllarda tam

remisyonun gerçekleşmesi, nüks riskinin belirlenmesi ve ortalama yaşam süresi üzerinde etkili olan en önemli prognostik faktörler olarak tanımlanmıştır (17).

Uzun süreli izlemde çocuk hastalarda sürvi ülkelere göre % 40-60 oranındadır ve tüm lösemi hastalarının % 35'i hastalığa, tedavi toksisitelerine bağlı olarak kaybedilir. Son yıllarda yüksek riskli hastaların belirlenip bu hasta gruplarına daha yoğun tedavi verilmesi ile düşük riskli hastalarda % 90'lara varan olaysız sağkalım, yüksek risk hastalarda da artan bir özelliktedir ve umut vericidir (18).

AML'nin güncel tedavisi ile 60 yaş altı hastaların yaklaşık % 80'inin tam remisyonu sağlanabilmektedir. Ancak yüksek orandaki hasta grubunda ilk 4 yılda ciddi oranda lösemi nüksü görülmekte ve hastalık ölümle sonuçlanmaktadır. Löseminin genetik profili, hastanın yaşı göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde bugün için en önemli tedavi yanıt kriteridir. Örneğin, iyi prognostik genetik profili olan olguların tam remisyona girme şansları % 90 ve sonrasında hastalıksız sağ kalımları % 70 iken, aynı yaş grubunda kötü prognostik genetik profili olan olgular için tam remisyon oranı % 60 ve nüks olasılığı ise % 70'dir. Benzer olarak 60 yaş üstü hastaların tedaviye tam yanıt oranı % 50 ve 4 yıllık sağ kalım olasılıkları ise % 10 civarındadır. Bu nedenle hastanın prognostik genetik profilinin belirlenmesi oldukça önemlidir ve bu bağlamda hastanın genetik profilini belirleyebilecek nitelikte uygun moleküler belirteçlere ihtiyaç vardır (17).

i. Kromozomal Translokasyonlar

Normal kan hücrelerinin oluşumunda ve homeostazisinde görev alan genlerin translokasyonlar sonucunda bir araya gelmesiyle genin fonksiyonu artarak onkogenik özellik kazanır ya da mevcut olan baskılayıcı özelliğini kaybeder. Onkogenik özellikli bir füzyon geninin anormal protein ürünü öncü kan hücrelerinde proliferasyon, farklılaşma veya apoptozis sürecinde probleme neden olduğu ortaya konmuştur (17).
Akut myeloid lösemilerde (AML) kromozomal anomaliteler ile prognoz arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (23). Kazanılmış klonal kromozomal anomaliler ikincil lösemilerde ve ileri yaşlarda daha sık görülür (%50–80) (20).

Sitogenetik anomaliler AML vakalarının yaklaşık %55-60'ında saptanır. Prognoz ve tedaviye cevap açısından yüksek oranda prediktif değerleri vardır. Sitogenetik bulgulara

göre AML olumlu, orta ve olumsuz olmak üzere üç alt grupta incelenir. Orta risk grubundaki vakalar genellikle normal karyotipe sahiptirler (20).

En sık görünen kromozomal anomaliler 5, 7, y ve 9. kromozomlarda delesyon ya da kayıp, t(8;21), t(q22;q22), t(15;17), trizomi 8 ve 21'dir (20). Çok sayıda farklı kromozomal anomaliteler arasında t(8;21), t(15;17), inv(16) ve trizomi 21'in varlığının iyi prognoz göstergesi olduğu kabul edilmektedir. Çoğunlukla genç AML vakalarında görünürler. Diğer kromozomal anomaliteler ise kötü prognostik değer olarak kabul edilmekte ve tedavi planı bunlara göre düzenlenmektedir (20,23).

t(15;17)(q22;q21) *PML-RARα* translokasyonu akut promiyolisitik lösemi(APL), AML-M3 ile uyumludur ve translokasyon pozitif vakaların tedaviye yüksek oranda olumlu yanıt vermesi ile karakterizedir. Bu translokasyonunu içeren 2 genden *PML* geni 15. kromozom üzerinde lokalizedir ve transkripsyon faktörü kodlar, *PML-RARα* denilen retinoik asit reseptör geni ise 17. kromozom üzerindedir. *PML* lokusunde oluşan farklı kırık bölgeleri ve *PML* transkriptlerinin alternatif "splicing" (kırpılma) varlığı APL hastalarının arasında büyük heterojenite gözlenmesine neden olmaktadır. Böylece farklı büyüklüklerde ekstra *PML-RARA* transkriptleri oluşur ve bu farklı transkriptlerin bütün APL hücrelerinin tanısı ve takibinde PCR ile saptanması daha uygun olmaktadır, zira FISH ile füzyonu tespit etmek mümkün ama farklı transkriptleri ayırt etmek mümkün olmamaktadır (24).

inv(16)(p13;q22) *CBFB-MYH11* translokasyonu ile 16. kromozomun perisentrik inversiyonu anormal eozinofil AML-M4E0 ile uyumlu oldugu gösterilmiştir. Kromozom 16 da oluşan oluşan inversiyon sonucunda "core binding factor β subunit" (*CBFB*) geni ile "myozin ağır zincir 11" (*MYH11*) genleri arasında bir füzyon geni oluşur ve meydana gelen kırık noktalarına göre 10 civarında farklı füzyon transkriptleri oluşur. AML lerde yaklaşık % 10 civarında bulunur ve iyi prognozla uyumludur. Sitogenetik olarak tespit edilmesi oldukça güç olup FISH ya da RT-PCR ile tespit edilmesi daha efektif olmaktadır (24).

inv16 ve t(15;17) gibi olumlu genetik defektleri olan lösemilerde çoğunlukla ilaç direnç mekanizmalarından biri olan p glikoprotein eksprese edilmezken; normal karyotip durumlarında %29, olumsuz genetik defektleri olan ya da ikincil AML'de bu oran %63'e kadar çıkmaktadır (20).

11q23 bölgesini içeren translokasyonlar AML yanında ALL'de de görülür. 30'dan fazla partner gen bu bölgede bulunan *MLL* geni ile translokasyon yapar. Bu durum 1 yaş altı infant lösemilerinde en sık görülen genetik değişikliktir. Ayrıca yine tedaviye bağlı sekonder lösemilerde de 11q23 aberasyonlarına sıklıkla rastlanır. *MLL* geninin lösemi gelişimindeki katkısı tam olarak aydınlanmamıştır, bunun bir nedeni de çeşitli translokasyonlarda sabit bir motifinin partner olarak yer almamasıdır. *MLL* partner genlerinin protein-protein etkileşimlerindeki özgünlük, bu genin lösemi yapıcı fonksiyonunun doğasına açıklık getirebilir. Ancak *MLL* ile ilişkili lösemilerin fenotipik benzerlikleri ve özellikle M1-M2 tipi olmaları transformasyona yol açan olayın MLL'nin partnerlerinden çok kendisi olduğunu düşündürmektedir. *MLL* geninin yer aldığı t(4;11) translokasyonunun tüm akut lösemiler için kötü prognostik özellikte olduğu kabul görürken, diğer translokasyonları aynı kategoriye sokabilecek yeterli takip verisi henüz bulunmamaktadır (10).

HOX gen ailesine ait genler omurga gelişimi ve ayrıca normal hematopoezde önemli rol oynarlar. *HOX* genlerinin ekspresyon sırası hematopoezde çok sıkı olarak kontrol edilmektedir. AML'de *HOX* genleri, çeşitli tipleriyle *MLL* geni ile translokasyon yapmaktadır. Burada *HOX* genlerindeki sorun, normal hematopoezi regüle edici fonksiyonunu kaybetmeleri tarzında olmaktadır. Bunun dışında *HOX* genlerini hedefleyen kromozomal translokasyonlar arasında t(7;11) *NUP98- HOXA9* ve t(2;11) *NUP98-HOXD13* sayılabilir. Son çalışmalar bu translokasyonların hematopoetik progenitörün fonksiyonunu kısmen bozduğunu ancak lösemi gelişimi için tek başına yeterli olmadığını göstermiştir (10).

ii. Nokta Mutasyonları

Onkogenik *RAS* mutasyonları AML ve MDS'de görülür. Tipik olarak *N-* ve *K-RAS* genlerinin 12, 13 ya da 61. kodonlarında olur. Bu mutasyonların sıklığı farklı çalışmalarda değişmekler beraber % 25-44 arasındadır. Yapılan çalışmalarda aktive edici mutasyon varlığının kötü prognozla birlikte olduğunu göstermiştir. RAS aktivasyonuna karşı inhibe edici küçük moleküllerin geliştirilmesi yönündeki çalışmalar devam etmektedir (10).

Reseptör Tirozin Kinaz (RTK) ailesinden *FLT3R*'lerin kontrolsüz ve daimi aktivasyonunun akut myeloid lösemiye yol açtığı bildirilmiştir. AML'lerin

%30'undan fazlasında saptanan iki farklı moleküler süreç gayet iyi tanımlanmıştır. *FLT3R* reseptör geninin ekzon 11 ve 12 sinde ortaya çıkan internal tandem duplikasyon(ITD), FLT3 reseptörün jukstamembran domainini etkilemektedir. Son zamanlarda, codon 835 de tanımlanan nokta mutasyonu, *FLT3* reseptörün aktivasyon loopunu etkilemekte ve AML'lerin %7'sinde rapor edilmektedir. Bu anormal aktivasyonun inhibisyonuna yönelik klinik çalışmalar halen devam etmektedir, *FLT3-R* mutasyon varlığı kötü prognostik göstergedir(9). Bunun yanında *p53, Bcl-2* tümör baskılayıcı gen değişiklikleri ve *Evi-1* ve *WT-1* genlerindeki ekspresyon artışları AML'de kötü prognozlu olgularla birliktelik gösteren genetik değişikliklerdir (10).

Normal karyotipli AML'de *FLT3, NPM1, MLL, RAS* gibi genetik mutasyonlar bulunmaktadır. Yapılan çalısmalarda *FLT3* gen mutasyonu olan AML vakalarının daha kötü gidişli, NPM1'li vakaların ise diğer gruplara göre daha iyi gidişli olduğu gösterilmiştir (20).

AML1 geni lösemilerde sıklıkla transloke olmakla birlikte, bazı kalıtsal AML olgularında da genin fonksiyon kaybına neden olan mutasyonları gösterilmiştir. Bunun yanında olguların % 3-5'lik bir bölümünde *AML1* mutasyonları da tespit edilmiştir. Bunlar daha çok *AML1* ve trizomi 21 ile birlikte görülen AML ya da MDS olgularıdır (10).

CEBP alfa geni normal myeloid gelişim için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok translokasyon yanında, yine bu genin de fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar görülmektedir. Bu mutasyonlar daha çok M2 alt tipindeki olgularda bildirilmiştir ve son çalışmalar mutasyonun iyi prognozla birlikteliğini göstermiştir (10).

GATA1 gen mutasyonları akut megakaryoblastik lösemiler (M7) ve özellikle trizomi 21-Down sendromunda gelişen lösemilerde görülmektedir. Bu mutasyonla *GATA1* geninde fonksiyon kaybı olmaktadır (10).

Tablo 2.3. AML'de karyotip özelliklerine göre prognostik faktörler (20)

İyi prognoz	**İntermediate**	**Kötü prognoz**

t(8;21) (q22;q22)
inv(16) (p13;q22)
t (15;17) (q22;21)
	t(9;11) (p22;q23); -Y;
	hiperdiploidi;+11;+13;+21;
	Normal karyotip:
	iyi: NPM1, CEBPA, BAALC low
	kötü:FLT3, BAALC high, MLL-PD
		Komplex karyotip;
		inv(3)/t(3;3);-7;t(6;9);
		t(6;11); t(11;19);
		-5;del(5q)

Tablo 2.4. AML'de morfolojik alt tipler ve genetik değişimler arasındaki ilişki (10)

FAB alt tipi	Sitogenetik değişim	Moleküler değişim
M0, M1 ve ALL	t(10;11)	*CALM-AF10*
M1	Trizomi 11	*MLL* duplikasyonu
M1	t(8;21)	*AML1-ETO*
M3	t(15;17), t(11;17), t(5;17)	*PML-RARA, PLZF-RARA, NPM-RARA*
M4eo	inv(16)	*CBFB-MYH11*
M4 ve eritrofagositoz	t(8;16)	*MOZ-CBP*
M5	11q23 translokasyonları	*MLL* diğer partner genleri ile karşılıklı füzyon gen oluşturur.
M6	t(3;5)	*NPM-MLP1*
M1,M2, M4,MDS	t(6;9)	*DEK-CAN*
M2, M4, KML	t(7;11)	*NUP98-HOXA9*

Tablo 2.5. Çocuklarda AML'de prognostik kriterler (18)

Düşük risk	**Standart risk**	**Yüksek risk**
• inv(16) veya t(16;16) • t(8;21) • t(15;17) • Down sendromu	• Düşük risk özelliklerinin olmaması • Yüksek risk özelliklerinin olmaması	• FLT3-internal Tandem duplikasyonu • M6 ve M7 • t(6;9) • Monosomi 7 • del5q • Tedaviye-bağlı AML • MDS/AML • RAEB-T • Primer indüksiyon başarısızlığı

2.3. *BAP1* GEN YAPISI

2.3.1. UBİKİTİN-PROTEOZOM SİSTEMLERİ (UPS)

Ubikitinasyon, ubikitinin ilk olarak ATP-bağımlı süreçte ubikitinasyon aktive edici enzim (E1) tarafından aktive edilmesi yoluyla çok basamaklı bir süreçtir, ardından ubikitin taşıyıcı protein (E2)'e transfer edilir ve son olarak ubikitin ligaz (E3) üzerinden katalizlenen reaksiyonda substrat proteinin lizine bağlı epsilon-amino grubuna transfer edilir (25).

Poliubikitinleşen proteinler 26S proteozom sistemince hedeftir. 26S proteozom, 20S proteozom core (çekirdek) partikül ve 2 tane 19S cap (regülatör) partikülü olmak üzere üç büyük alt birim kompleksi içerir (26).

Ubikitin-proteozom sistemleri (UPS) DNA tamiri, ekstrasellüler strese cevap, sinyal transdüksiyonu, hücre döngüsü sürecini içeren normal hücresel fonksiyonların tamamlayıcı kısmıdır. UPS bileşenleri ya onkoproteinlerin etkilerini arttırır ya da tümör süpressör miktarını veya fonksiyonunu azaltır (27).

UPS, ökaryotik hücrelerde sayısız kısa ömürlü proteinlerin seçici yıkımında fonksiyon alır. Substrat bir moleküle ubikitinin bağlanması hücrelerde farklı bölgelere değiştirilen proteinleri dağıtarak hedeflenen bir sinyal gibi davranabilir; yarı ömrü veya makromoleküler etkileşimi ubikitin aktivitesini değiştirir. Ubikitin-modifiye proteinlerin düzenlemenin bir yolu deubikitinasyon enzimlerince gerçekleşen Ubikitin modifikasyonunu uzaklaştıran deubikitinasyon yoludur. UPS genlerindeki mutasyonlar kanseri içerdiğinden dolayı, UPS anti-kanser ilaçları için potansiyel hedef olarak ortaya çıkmıştır (27).

2.3.2. *BRCA-1* GEN FONKSİYONU

Göğüs kanserine en fazla duyarlı gen olan *BRCA1*'in keşfi hemen hemen yirmi yıl önce gerçekleşmiştir. *BRCA1* ile birlikte *BRCA2*'nin keşfi insan kanser genetiğinde en önemli keşifler olmuştur. Bu iki tümör süpressör gendeki yüksek sıklıkla karşılaşılan mutasyonların tanımlanması, kadınların ve aileleri için geniş risk durumunu yansıtır. BRCA proteinlerinin klinik açıdan pek çok dikkat çeken fonksiyonları vardır (28).

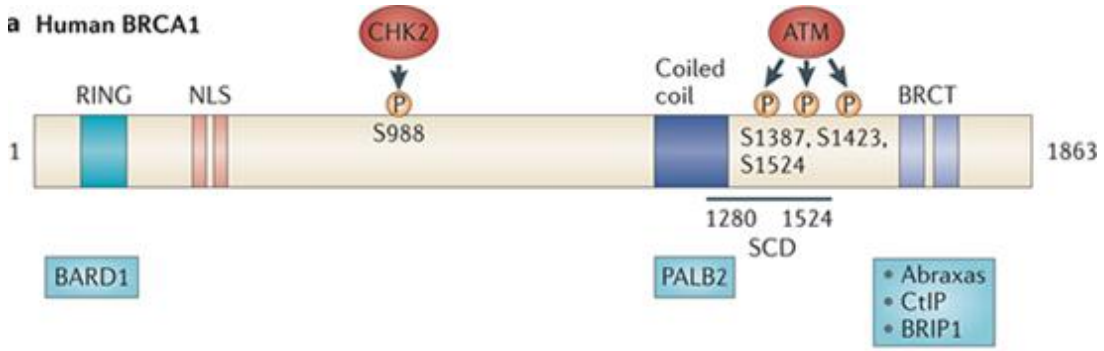
BRCA1 birden fazla farklı transkriptler üreten büyük bir gendir. En fazla dikkat 2843 amino asitten oluşan full-lenght proteini üzerine yoğunlaşmıştır. En kısa protein formu 1399 amino asitten oluşan BRCA1-IRIS proteinin onkogenik aktivitesi

açıklanamamıştır. Çok sayıda bulunan mutasyonlar, populasyon gruplarında genetik testler basitleştirilerek hem *BRCA1* hem de *BRCA2* saptanmıştır. Diğer hastalıklarla ilişkili mutasyonlar gen boyunca yayılmıştır ve genellikle truncat proteinle sonuçlanır. Aynı zamanda istenmeyen missense mutasyonlar oluşmuştur, özellikle *BARD1, BRIP1* ve *PALB2* gibi *BRCA1*-bağlanma proteinleri ile etkileşen domainleri kodlayan ekzonlarda bulunur (28). (Şekil 2.3.)

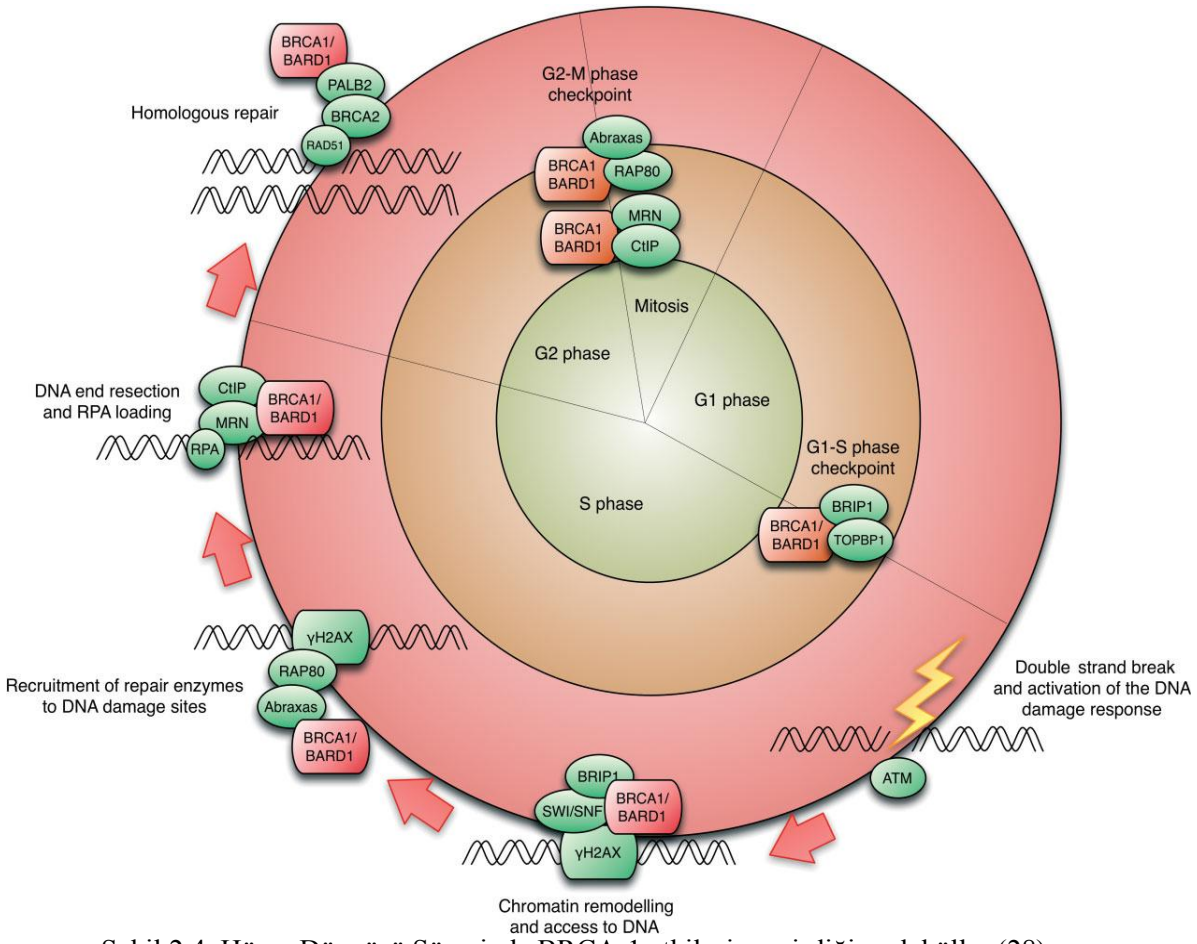
BRCA1'in germline mutasyonu sonucu kadınlarda erken dönemde familyal göğüs ve ovaryum kanserine yatkınlık vardır. Ek olarak, BRCA1 yolunun bozulması muhtemelen göğüs kanserinin başlıca sebebidir. Göğüs kanserinin sınıflandırılması, zayıf prognoz ve belirgin kimyasal hassasiyetle ilişkili olduğu gen ekspresyon profiline göre kategorize edilir, BRCA1 sadece familyal göğüs kanserinde değil aynı zamanda sporadik kanserde de önemli olduğu anlamına gelir. BRCA1, sentromer dublikasyonunun düzenlenmesi, apoptosiz, hücre döngüsünün kontrolü, kromatin-remodelling, transkripsiyon, DNA çift-iplik kırılmalarında homolog rekombinant tamirini de içeren görevleri uygulamak için çeşitli hücresel komplekslere katılan multifonksiyonel bir proteindir. Bu komplekslerin bir çoğunda, BARD1 ile birlikte heterodimer kompleks oluşturan BRCA1, ubikitin E3 ligaz aktivitesi için gereklidir (25).

BARD1, BRCA1 protein stabilizasyonu için gereklidir ve bu nedenle farelerde ki BARD1 eksikliği BRCA1 ile benzer fenotipe neden olur. Bu da BARD1'in memelilerdeki spesifik inaktivasyonu ile oluşan göğüs kanserinin temelini oluşturur. Mutant BARD1 farelerde kanserin ölümcüllüğü ve sıklığı mutant BRCA1 farelerde ve mutant BRCA1/BARD1 farelerde gelişimi ayırt edilemediğinden dolayı her iki genin tümör süpressör aktivitesi muhtemelen BRCA1/BARD1 heterodimer kompleksi aracılık eder. Aslında, dimer etkileşimi ve E3 Ligaz aktivitesinin nasıl düzenlendiği net anlaşılmamıştır. BRCA1/BARD1'in E3 Ligaz aktivitesinin tümör süpressör fonksiyonunu kritik bir role sahip olduğunu düşünülmektedir ve DNA hasar cevabını da içeren çoklu hücresel süreçte bulunabilir (25).

BAP1 tarafından BRCA1/BARD1 oluşumunun engellenmesi BRCA1/BARD1 tarafından NPM1/B23 ubikitinasyonu ve BRCA1 otoubikitinasyonunun inhibisyonunu göstermektedir (25).



Şekil 2.3. BRCA1 Protein Yapısı ve Domainleri (48)



Şekil 2.4. Hücre Döngüsü Sürecinde BRCA-1 etkileşime girdiği moleküller (28)

2.3.3. DUBS SİSTEMLERİ

Deubikitinasyon enzimleri hedef proteinlerin üzerindeki lizin zincirleri ve ubikitin karboksil-terminal glisinin birleştiren isopeptid bağlarını hidrolizi katalizleyen proteazlardır, DUBs'lar ubikitin zincirlerinden tekli ubikitin motifleri uzaklaştırır veya substrat proteinle ubikitin arasındaki isopeptid bağlarını kırar (25).

Protein substratlarından ubikitin uzaklaştırma özelliği olan Deubikitinasyon enzimleri(DUBs) sayısız biyolojik işlemlerde yer alır. DUBs 'ın ubikitin C-terminal hidrolaz alt grubu dört üyeden oluşur: UCH-L1,UCH-L3, UCH37 ve BAP1. UCH-L1 ubikitinden ester, amidleri hidrolizlemeden sorumludur ve monoubikitin stabil edici olarak ubikitin ligaz aktivitesinde işlev görür. UCH-L3, hem deubikitasyon hem de deneddilasyon yapar; dimerizasyon veya ligaz aktivitesi gözlenmemiştir ve UCH-L1'in aksine, yıkımdan korumak ve hidrolaz aktiviteleri bozmak için Lizin-48'e bağlı Ubikitin dimerleri ile etkileşime girebilir. Diğer UCH üyelerinden farklı olan UCH37, 19S proteozom düzenleyici kompleks içindeki Ubikitin isopeptidaz aktivitesinden sorumludur. 26S' lik proteozomlar, 19S' lik düzenleyici parçacıkların bir ya da her iki ucunda proteolitik olarak aktif 20S çekirdek parçacığı başlığını içeren büyük bir protein kompleksidir. 19S 'lik düzenleyici bölüm alt ve üst olmak üzere iki alt komplekse bölünebilir (29). (Tablo 2.6.)

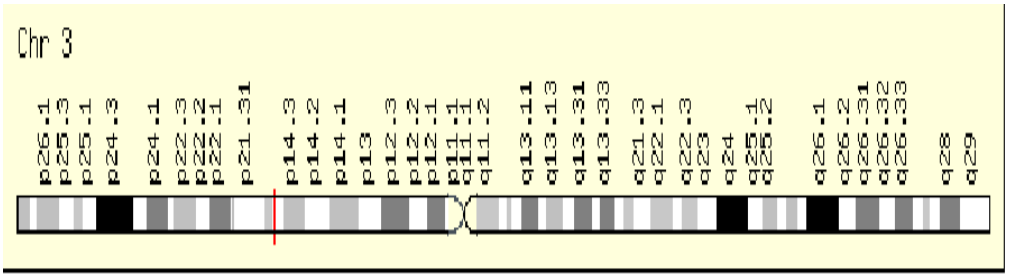
Yakın zamandaki çalışmalar, akümülasyon kanıtları, kanserdeki UCH aktivitesi ve ekspresyonunun anormal olduğunu işaret etmiştir. UCH-L1 seviyesi değişik kanser tiplerinde yüksekti: akut lenfoid lenfoma, non-small cell akciğer kanseri, nöroblastoma, pankreas, prostat, medullar troid, özofagus, bağırsak ve böbrek kanserleri. Kısmi olarak, UCH-L1 aktivitesi servikal karsinomlarda daha düşük olarak bulundu. UCH-L1 ekspresyonu aynı zamanda tümör yayılım ve metastazı daha iyi düzenlediği tespit edildi. Ek olarak, hem UCH-L1 hem de UCH-L3 mRNA seviyesindeki azalma, zayıf prognoz ve invaziv göğüs kanserinin erken tümör nüksetmesi ile ilişkilidir. UCH37 aktivitesi hücre hatlarının yanı sıra servikal karsinoma biyopsilerinde daha iyi düzenlenmiştir (29).

Tablo 2.6. DUBs C-terminal altsınıf üyelerinin karşılaştırılması

UCH-L1	UCH-L3	UCH-37	Referans
Ester ve amidlerin hidrolizi	Dimerizasyon ve Ligaz aktivitesi yok	Ubikitin isopeptidaz	29
Monoubikitin stabilizasyonunda ubikitin ligaz	Deubikitinasyon ve deneddilasyon		29
	Daha büyük ubikitin konjugatlarını hidroliz eder.		25

2.3.4. *BAP1* GEN TANIMLAMASI

BRCA1-ilişkili protein 1(BAP1), BRCA1-aracılı hücre büyüme baskılanmasını hızlandıran ve BRCA1'in RING finger domaini ile etkileşen protein olarak mayalarda ikili-hibrit tekniğiyle tanımlanmış, deubikitinasyon enzimlerinin (DUB) altsınıfından çekirdekte yerleşmiş ubikitin karboksil-terminal hidrolazdır (25). *BAP1* geni insanda, 3. Kromozom(3p21.3) bölgesinde lokalizedir, 17 ekzon içerir; BAP1 proteini 90-kD/729 aminoasitten oluşur (27, 37, 42).



Şekil 2.5. *BAP1* geni kromozom lokalizasyonu (109)

BAP1 tümör süpressör olarak kabul edilir; mutasyonu karaciğer ve göğüs kanserinde bulunmuştur (29). BAP1 azalımı, aynı şartlar altında ya baskılanan ya da aktive edilen genlerle bağlantılı düzenleyici bölgelerde ubikitin seviyesinin artmasına neden olmaktadır (30). BAP1, proteozomal yıkımdan poliubikitinleşen substratları kurtarmada işlev görür. Çekirdekte bulunan tek UCH üyesidir (31).

BAP1, fonksiyonel olarak apaptoz, yaşlılık ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer almaktadır(32). BAP1'in Polycomb baskılayıcı kompleks 1'in monoubikitin aktivasyonuna zıt işlev gören *Drosophila*'daki karşılığı Calypso molekülü kromatin

remodellingde görev alır ve transkripsiyonel sessizleştirmede kritik bir bileşendir (32). Calypso molekülü H2A'nın in vivo ve in vitro ortamda deubikitinasyonunda temel rol alır ve polycomb grup proteini(PcG) hedef genlerinin baskılanması için gerekmektedir (33). *BAP1,* histon proteinleri modifiye eden enzimleri kodlar (34).

Farelerde *Bap1* geninin kaybı embriyogenesis esnasında öldürücüdür. Farelerde Knockout (KO) *Bap1* emriyonik gelişimin gecikmesiyle sonuçlanmıştır ve bu sonuç BAP1'in embriyonik gelişimde temel rol oynadığına işaret etmektedir (35).

BAP1'in de bulunduğu birkaç kanser resesif genleri tarafından kodlanan proteinler kromatin modifikasyon ve remodelling de görev alır ve önemli kanser vakalarda önemli ölçüde mutanttırlar. BAP1 proteini kromatinin yeniden yapılandırılmasında da bulunur (36). *BAP1*'in birçok tümördeki biallel inaktivasyonu ile ilgili bilgiler klasik tümör süpressör gen olarak hareket ettiğini düşündürmektedir (31).

BAP1'in tümör süpressör özelliği çekirdekteki lokazisyonuna ve özellikle sistein reziduelerindeki aktif alanda etkilenen bozulumlara yüksek derecede bağımlıdır. BAP1 içeren bütün DUBs enzimleri gen ekspresyonu, DNA tamir, hücresel farklılıaşma, sinyal transdüksiyonu, protein trafiği ve glikoneojenez gibi farklı hücresel süreçlerde yüksek oranda özelleşmiştir (37, 77).

BAP1'in bağlanma alanında ki motif analizleri, en fazla görülen iki motifin SP1(GGGCGGGG) ve transkripsiyon faktörlerinden Ets (CGGAGG) ailesi olarak bilinen bağlanma bölgelerine daha fazla benzer olduğunu açıklamıştır (35).

BAP1 katalitik aktivitesi ve fosforilasyonu, DNA tamirinin hızlanması ve DNA hasarından hücrenin kurtarılmasında kritiktir. Homolog rekombinasyon yoluyla DNA zincir tamirinde BAP1 rolü önemlidir (38).

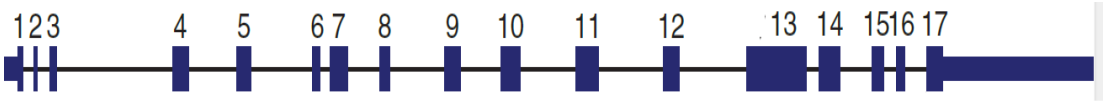
BAP1'in DNA hasar sinyali oluşturduğunu ve tamir enzimi olduğunu vurgulayan güçlü kanıtlar sağlanmıştır. BAP1 kaybı homolog rekombinasyonu artırması beklenmektedir, BAP1 inaktivasyonu sonucu kontrol noktasındaki sinyallerin bozulumuyla DNA hasarı barındıran hücrelerin sağkalımı desteklenebilir (38). BAP1, melanositte hücre farklılaşması, kök hücre ve gelişimsel süreçte genleri regüle eder (40).

BAP1, wild-type BRCA1 RING finger domainine bağlanır fakat mutant olan RING finger veya RING finger ile bağlantılı domainlerine bağlanamaz. BAP1, tahmini olarak

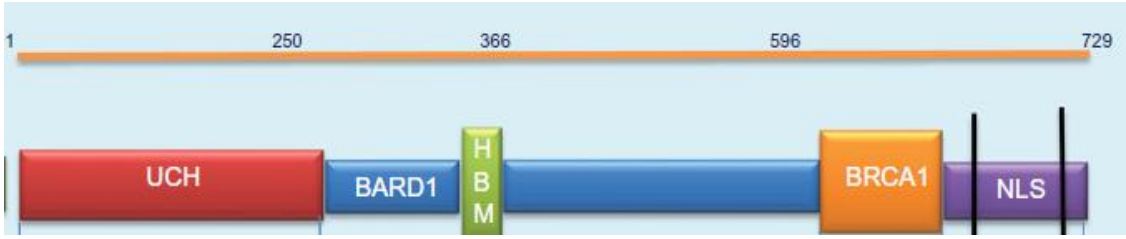
iki nükleer sinyale sahip, N-terminal proteolitik domain ve UCH domaini ile birlikte çekirdekte yer alan deubikitinasyon enzimidir. Aslında, yeni çalışmalarda BAP1'in yalnız bir tane fonksiyonel olarak sınıflandırılmış NLS (nükleer lokalizasyon sinyali)' ye sahip olduğu gösterilmiştir. İnsan BRCA1 proteini ubikitin ligaz olduğundan dolayı, oto-ubikitinleşen BRCA1 'in BAP1 deubikitinasyon aktivitesi için substrat olabildiği hipotezleştirildi. Fakat daha sonradan BAP1'in, BRCA1 deubikitinasyonunda fonksiyonu olmadığı ortaya çıktı. Bu nedenle, BRCA1'in direk olarak biyolojik yönüyle BAP1 için uygun substrat ve BAP1 deubikitinasyon aktivitesinin diğer *in vitro* hedeflerinin tanımlanmasına dair delil yoktur (25, 29).

Tablo 2.7. *BAP1*'in rol aldığı fonksiyonlar

Fonksiyonel İşlem	**Referans**
DUBs enzimi	25
BRCA1/BARD1kompleksi ile koordineli olarak ubikitinasyon düzenlenmesi	25
Tümör Baskılayıcı	29,31
Nükleer Lokalizyon Sinyali	29
Apoptozis	32
Hücre yaşlanması ve döngüsü	32
Histon modifikasyonu	34
Embriyonik gelişim(Farelerde)	35
Epigenetik regülatör stabilasyonu(Farelerde)	35
Kromatin modifikasyon ve remodelling	36
Gen ekspresyonu, DNA Tamir, Sinyal transdüksiyonu	37,38
BRCA1/BARD1 komplesinin düzenleyerek dsDNA tamiri, protein trafiği	37
Hücre farklılaşması, kök hücre ve gelişimsel süreçte	40,77
Transkripsiyonel regülasyon	55
Glikoneojenez	77



Şekil 2.6. *BAP1*'in gen yapısı (32).



Şekil 2.7. BAP1 protein yapısı, etkileşime girdiği alanlar ve fonksiyonel domainler. UCH: Ubikitin C-terminal Hidrolaz, NLS: Nükleer Sinyal Lokalizasyonu, HBM: HCF Bağlanma Motifi (37).

BAP1 kaybı geçici hücre döngüsü inhibisyonuna neden olmaktadır (40). Yayınlanmış germline *BAP1* mutasyonları(nonsense, in/del, splays alan mutasyonları) nonsense yoluyla *BAP1* mRNA'sının bozulması ya da truncat proteine neden olabileceğini öngörmektedir. Germline *BAP1* truncat mutasyonu gendeki dağılımı ile nadir görülen germline *BAP1* missense mutasyonu karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir bağlantı görülmemektedir. *BAP1* germline mutasyonu C ve N uçlarında kısalmaya neden olabilir. Bazı *BAP1* mutasyon taşıyıcıları ve BAP1 kanser sendromlu bireylerin önemli kısmında birden fazla kanser gözlenmiştir, bu durumda *BAP1* ilişkili tümör şüphesinin birden fazla organın dokusunu hedef aldığını düşündürmektedir. Örneğin; bazı *BAP1* mutasyon taşıyıcılarında Uveal melanoma (UM)'dan sonra malignant mezotelyoma, diğer mutasyon taşıyıcılarında multipl bening melanosit tümörleri ile birlikte cilt melanomalarda(CM) gelişmiştir (41).

Hücre hattı çalışmalarındaki Mutant BAP1'de azalma, eksprese olan wild-type BAP1'de anormal şekilde etkisini artırmadı ve bu sonuç mutant BAP1'in dominant-negatif şekilde fonksiyonu olmadığını işaret eder (39). BAP1'in *Drosophila*'da ortologu olan Calypso molekülü *hox* gen ekspresyonunu baskılar fakat farelerde BAP1 KO hücrelerde *Hox* geninin ekspresyonu arttığı görülmemiştir (35).

FOXK2 binlerce genomik lokusta yer alır. FOXK2, Polykomb baskılayıcı Deubikitinasyon kompleksine (PR-DUB) bağlanır; PR-DUB, BAP1'i de içerir. FOXK2, DNA'ya BAP1'i bağlar, böylelikle lokal histon deubikitinasyonu hızlandırılır ve hedef gen aktivitesindeki değişime yol açar. FOXK2 ve/veya BAP1 lokusa spesifik şekilde fonksiyonel olabilir. Ayrıca beklenmedik şekilde FOXK2, BAP1 delesyon mutantlarıyla etkileşim kurmaktadır (30).

2.3.5 BAP1-BARD1 ETKİLEŞİMİ

BAP1'in BARD1'e bağlanarak ve BRCA1/BARD1–aracılı ubikitinasyonun deubikitinasyonuna ilaveten RING heterodimer formunu müdahale ederek BRCA1/BARD1'in E3 ligaz aktivitesini inhibe ettiği raporlanmıştır ve shRNA'lar tarafından hücrelerde BAP1'in down-regülasyonu S-fazının uzaması ve iyonize ışımalara aşırı hassasiyetle sonuçlanmıştır, bu da BRCA1 eksikliğindeki benzer fenotipti, bu sonuçlar BRCA1-aracılı ubikitinasyonun ve BAP1-aracılı ubikitinasyon baskılanmasının bu hücresel süreçte koordineli olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar direk olarak DUBs'un E3 ligaz aktivitesini inhibe ettiğini gösteren ilk örnektir (25).

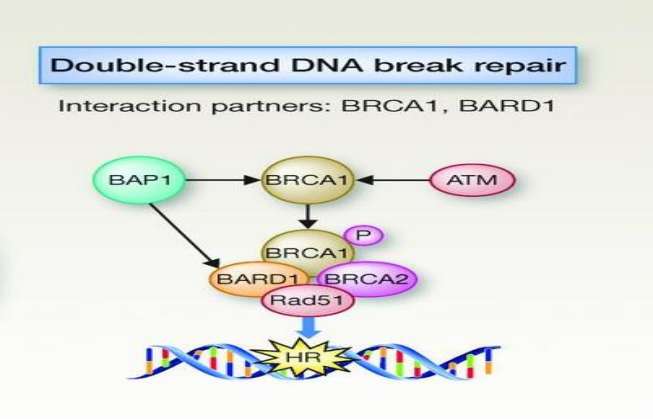
Önce ki çalışmalarda, BAP1 ile BRCA1'in RING finger domaini direk olarak etkileştiği gösterildi. İn vitro şartlarda her bir RING finger domainin rekombinant proteinleri kullanılan bu çalışmada BAP1'in major bağlanma partneri BRCA1'den ziyade BARD1 olması muhtemeldir. Full-lenght proteinler kullanılan in vivo denemelerde BRCA1, BARD1-BAP1 etkileşimini hızlandırır. Bu durum BRCA1 ve BARD1'in hücresel yerleşimi ile kısmen açıklanabilir. BRCA1 ve BARD1 arasındaki bu etkileşim, hem BRCA1 hem de BARD1'in çekirdekten çıkış sinyalini gizler, ki bu da BRCA1-BARD1 kompleksinin çekirdek dışında kalmasına neden olur (25).

BAP1 suni küçük substratlar üzerinde ubikitin hidrolaz akitivitesi göstermesine rağmen, geçmiş çalışmada BAP1'in in vitro ortamda BRCA1/BARD1'in poliubikitinleşmiş şeklini deubikitine etmediği raporlanmıştır. Bu tutarsızlık BAP1'in NH2-terminal yapısından dolayı olabilir. BAP1 ve UCH-L3 tarafından BRCA1/BARD1 deubikitinasyonun bu çalışma ile uyumlu olan UCH-L3'ün güncel biyokimyasal ve yapısal çalışmaları, UCH-L3'ün daha büyük ubikitin konjugatlarının hidrolazlarının aynı zamanda sebebi olduğunu gösterdi. BAP1 aracılığıyla BRCA1/BARD1'in deubikitinasyon özgüllüğü şu ana kadar net olarak açıklanmamıştır (25).

BAP1, BRCA1/BARD1 önceden varolan ubikitin zincirlerini deubikitine ederken ek ubikitinasyona karşı korumak için BRCA1/BARD1'in E3 Ligaz aktivitesi inhibe ettiği yerde, BAP1/BRCA1/BARD1 DUB/E3'ün yeni bir tipi olabilir. BRCA1/BARD1 yönünde BAP1'in çift rolü hücresel yoldaki ubikitinasyonun inhibisyonunu garanti etmek için önemli olabilir. Alternatif olarak, BAP1'in hücresel şartlara veya farklı sinyallere cevap için iki farklı mekanizmayı kullanması olasıdır (25).

Aşırı ekspresyon olduğunda, BRCA1 ve BAP1 hücre büyümesini baskılar. Diğer taraftan, BARD1'deki azalma ile S-fazındaki gecikmeden kaynaklı hücre çoğalması baskılanır. BRCA1/BARD1 fonksiyonun veya ekspresyon seviyesinin kusursuz ayarlamanın hücre proliferasyonunda kritik olduğu ve BAP1'in S fazındaki BRCA1/BARD1'in rolüne katkısını hatırlatmaktadır. S-faz gecikmesinin gözlenmesi bu fazda meydana gelen kendiliğinden DNA hasarına cevapta hücrelerin yetersizliğinden olabilir. Bunun birlikte, bu çalışmada ki sonuçlar BAP1 ve BRCA1/BARD1'in koordineli olarak DNA hasar cevabı ve hücre döngüsü esnasında ubikitinasyonu düzenlediğini düşündürmektedir. Bu gözlemler BRCA1 fonksiyonundaki BAP1'in önemini tekrar onaylamıştır (25).

BAP1'e ilaveten, BRCC36 olarak adlandırılan başka bir BRCA1 ile etkileşebilen farklı bir DUB vardır. İlginç olarak, BRCC36, BRCC45 olarak adlandırılan diğer BRCC proteini ile kompleks oluşturduğunda BRCA1/BARD1'in E3 Ligaz aktivitesini hızlandırmaktadır. Bizim sonuçlarımızla beraber, BAP1 aynı zamanda BRCC36'a karşı olacak biçimde DNA hasarına cevap olarak BRCA1/BARD1'ce indüklenmiş ubikitinasyonda etkili olabilir (25).



Şekil 2.8. BAP1-BARD1-BRCA1 etkileşimi (49)

2.3.6. BAP1-HCFC-1 ETKİLEŞİMİ

BAP1, UCH katalitik domainine ilaveten, BRCA1 ve BARD1 domainlerine bağlanan UCH-37 benzeri (ULD) domain içerir ki bu yapıda tümör süpressör heterodimer yapısını oluşturur ve hücre bölünmesi esnasında histon-modifiye kompleksi ile etkileşebilen HCFC-1'in domainine bağlanıp hücre büyümesinde rol alır (37, 42). HCF-1, transkripsiyon faktörlerinin altsınıfına özel histon modifiye enzimleri bağlayarak

transkripsiyonu hem aktive ederek hem de baskılaması özelliğiyle kromatinle ilişkili protein olduğu düşünülmektedir ve bilinen spesifik bir rolüde S- fazının başlamasında gerekli olan genlerin transkripsiyonu için E2F1 transkripsiyon faktörünü H3K4 histon metiltransferazla bir araya getirerek G1/S sınırında hücre döngüsünü ilerletmesidir (37). HCFC-1 hücre döngüsünde görevli genlerin transkripsiyon kontrolüyle ilişkilidir (43).

BAP1, HCF1 transkripsiyon kofaktörünü ve histonları hedef alan nükleer deubikitinaz enzimi olarak bilinir (43). HCF-1'in BAP1 ile etkileşimi büyümeyi baskılama işlevi bakımından kritiktir (44). Hücre döngüsü düzenleyici olarak görev yapan HCF-1, HCF-1N ve HCF-1C'den oluşur. BAP1'in HCF-1'e bağlanan motifi, HCF-1N ile etkileşime girmeye ihtiyaç duyar ve BAP1 tarafından HCF-1N'nin deubikitinasyonuna aracılık eder (37).

BAP1, birlikte transkripsiyonu aktive ettiği HCF-1'i deubikitine eder ve etkileşir, böylece hücre proliferasyonunu düzenler (47). HCF-1, birden fazla etkisi olan transkripsiyonel düzenleyicidir, böylece BAP1 muhtemelen HCF-1 yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyebilir (35).

BAP1 hücre hatlarında HCF1 deubikitine ettiği ve bağlandığı rapor edilmiş iken, BAP1 ve HCF1'in Malign Plevral Mezoyelyum (MPM) hatlarında beraber immunoçökertmeye girdiğini çalışmalarla onaylanmıştır. Çalışmalar BAP1-HCF1 etkileşiminin HCF1-aracılı büyüme etkisinde önemli olabileceğini göstermiştir (43). Knock-in farelerde yapılan çalışmalar *BAP1* delesyonu HCF-1 seviyesini düşürmüştür, bu durum epigenetik regülatörlerin stabilizasyonunda BAP1'in kritik rolünü işaret etmektedir (35).

HCF-1 en azından RNA splaysını da gerçekleştiren bir kısım genleri regüle ederek, kök hücre sürecinde anahtar rolü vardır. HCF-1, BAP1'in öncelikli bağlanma partneridir ve BAP1 yoluyla regüle edilen genler RNA splays süreci, hücre döngü kontrolünde pozitif etkiye sahiptir (40).

Hangi hedefler BAP1 tümör baskılayıcı işlevi için önemlidir? HCFC-1 ubikitinlenmiş olduğu bilindiğinden önemli bir hedef olma olasılığı artmaktadır. HCFC-1 ile etkileşemeyen BAP1 mutantları in vitro şartlarda hücre büyümesini tamamen baskılamada başarısız olması bu durumla uyumludur (45).

Güncel çalışmaların hiçbirinde BRCA1, BAP1'in önemli bir bağlanma partneri olarak tanımlanmamıştır (43). BAP1, HCF-1'in deubikitinasyonu yoluyla BRCA-1'in büyüme kontrol yolağında ve proliferasyonun düzenlenmesinde tümör süpressör gibi hareket etmektedir (46).

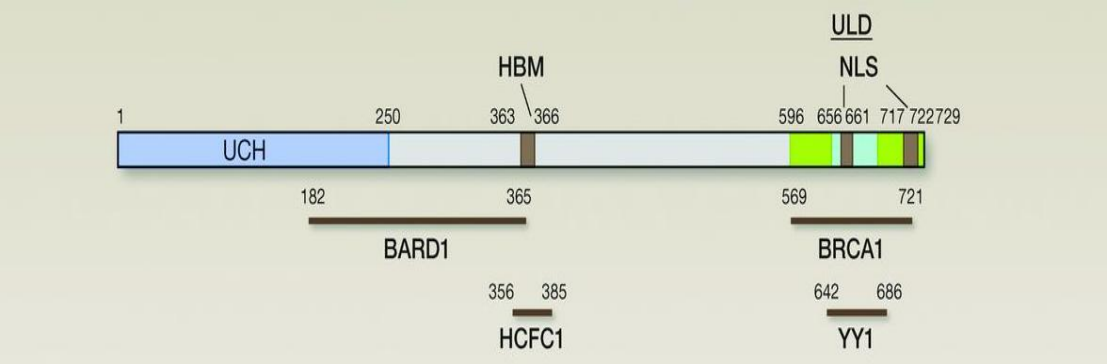
HCF1, E2F-cevap promotorunda transkripsiyon düzenlenmesinde kısmen görev alır. BAP1 kaybı hücre döngüsü sürecinde E2F-cevap genlerinin downstream kısmını down regüle edebilir ve HCF1 post-translasyon inaktivasyonu sonuçlanması olasılığıyla uyumludur (43). Aynı zamanda HCFC-1, E2F transkripsiyon faktörüne bağlanabilmesiyle kromatinde düzenleyici bölgelerde BAP1'in yer almasını sağlayabilir. Aslında BAP1 azalımı, E2F hedef gen ekspresyonunda değişime neden olur (30). BAP1'in, HCF-1/E2F-yöneten promotorların transkripsiyonunu birlikte düzenleyerek G1/S noktasında hücre proliferasyonunu etkilediğini tahmin etmek yerinde olacaktır (37).

FOXK2 ve BAP1'in aynı zamanda MBD5/6 metile bağlanan domain ailesi üyelerini içeren kompleksin bileşeni olduğu gösterilmiştir. FOXK2 proteini HCFC-1, BAP1 ve SIN3A kompleksinin alt ünitesi ya da bu üç molekülün oluşturduğu kompleks ile direk olarak etkileşip etkileşmediği net değildir (30).

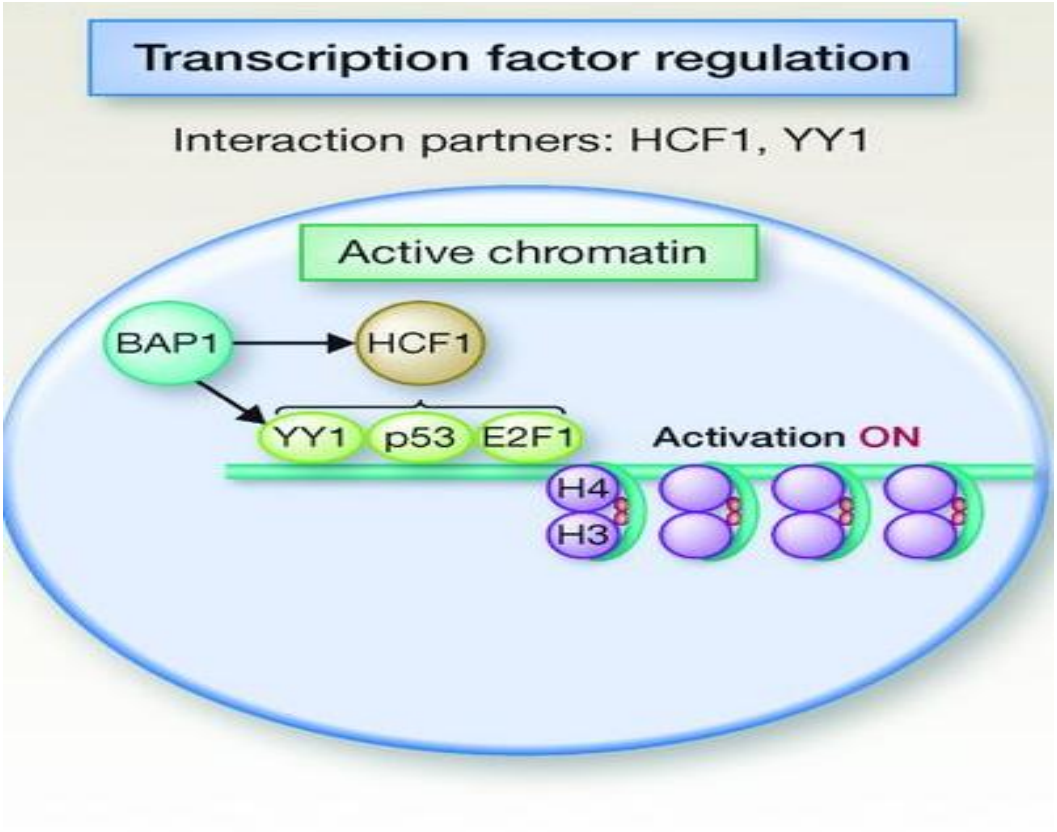
YY1, BAP1 ve HCF-1'e bağlanabilen transkripsiyon faktördür. BAP1 ve HCF-1'in, gen upregüle etmek için çeşitli promotorlara YY1 tarafından katılımı sağlanır (49). Güncel olarakta YY1 molekülünün, *COX7C* (Sitokrom C oksidaz 7) geni ekspresyonunun aktivasyonu için *COX7C* geninin düzenleyici bölgesine BAP1'in katılımını sağladığı gösterilmiştir (30).

Tablo 2.8. HCF-1 fonksiyonu, BAP1 ve HCF-1 arasındaki ilişki.

	Referans
Birden fazla etkisi olan transkripsiyonel düzenleyici	35
BAP1'in öncelikli bağlanma partnerlerinden	40
BAP1'in ULD domaini ile etkileşir.	42
BAP1 tarafından hedeftir ve deubikitine edilir.	43
Hücre döngüsü sürecinde görevli genlerin transkripsiyon kontrolünde görev alır.	43
BAP1, HCFC-1 etkileşimi büyümenin baskılanmasında kritiktir.	44
Bir kısım genleri regüle ederek kök hücre sürecinde rol oynar	40
E2F-cevap promotorunun transkripsiyonel düzenlemede kısmen rol alır.	43



Şekil 2.9 BAP1 proteininde HCF-1, YY1 ile bağlantılı domainler. (49)



Şekil 2.10. BAP1/HCF-1/YY1 etkileşimi (49)

2.3.7. BAP1-ASXL-1 ETKİLEŞİMİ

BAP1 pluripotent kök hücre ve diğer gelişimsel süreçle ilgili olan deubikitinaz kompleksi baskılayıcı polycomb grubunu(PR-DUB) oluşturmak için ASXL1 (Additional sex comb-like: Ek olarak cinsiyet proteinlerine benzeyen transkripsiyon düzenleyici) ile etkileşir (42). BAP1, polycomb baskılayıcı altünite olan ASXL1 ile histonları hedef alan nükleer deubikitinaz enzimi olarak bilinir. BAP1 nükleer deubikitinaz enzimi, ASXL1 ile histonların ubikitinasyon düzenlemesini yeterli seviyede sürdürme ile alakalı gibi görünmektedir (43). ASXL1, Polycomb baskılama kompleksi 2 (PCR2) ile etkileşimi sayesinde histon post-translasyonel modifikasyonuna etki yapar (50).

ASXL1,ASXL2 VE ASXL3, Drosophila Asx geninin insandaki homologudur. *Asx* delesyonu hem polycomb grup hem de Tritoraks grubunun homeotik fenotip karakterizasyonunu ile sonuçlanır ki bu da Asx'in homeotik gen ekspresyonunun sessizleştirme ve aktivasyonunun da çift işleve sahip olduğu hipotezine sebeb olur. Ek

olarak, *Drosophila* da fonksiyonel çalışmalarda, Asx'in PcG proteinlerine benzer kromatin ilişkili bir protein olduğu düşünülmektedir (50).

Drosophila melanogaster'de BAP1-ASXL1 polycomb represif deubikitinaz kompleksi yoluyla H2A'yı deubikitine edildiği düşünülmesine rağmen, H2A lisin 119 ubikitin seviyesi üzerinde ASXL1 kaybının etkisi H3K27me3 ile karşılaştırıldığında minimaldi. Son zamanlarda *D. Melanogaster* ilgili çalışmalarda BAP1 ve ASXL1' in H2AK119'dan monoubikuitinin uzaklaştırmasında görev alan yeni bir karmaşık PcG protein(Polycomb repressive deubiquitinase complex) ile ilişkili olduğunu öne sürülmüştür. Bu ilişki BAP1 enzimatik aktivitesi için önemlidir (50).

BAP1'in en fazla belirlenen fonksiyonu gen ekspresyonunu düzenlemede insanda polikomb benzeri multiprotein kompleksinin çekirdek katalitik bileşeni olarak görev yapmasıdır. Bu kompleks ASXL1/2,YY1 ve O-GlcNAcylation (OGT)'nin dahil olduğu çeşitli proteinler içerir (31).

2.3.8. BAP1-OGT ETKİLEŞİMİ

OGT (O-bağlı N-asetilglukozamin transferaz), proteinlere O-GlcNAc eklenmesini katalizleyen enzimdir. O-GlcNAcylation, besin duyarlı şeker modifikasyonudur ve kromatin yapısı için kullanılabilir besleyici maddelerle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. BAP1 substratı olarak olası diğer molekül Dey ve arkadaşlarının bulduğu OGT'dir. OGT, BAP1 yokluğunda hızlı bir şekilde yıkıma uğrar, BAP1-ASXL1 kompleksi in vitro durumda OGT'den ubikitini uzaklaştırabilir. OGT, HCFC-1'in pozitif regülatörü olarak görev yapmasından dolayı, BAP1-ASXL1 tarafından OGT stabilize edilebilir ve böylece HCFC-1'in aktivitesi korunur (45, 50).

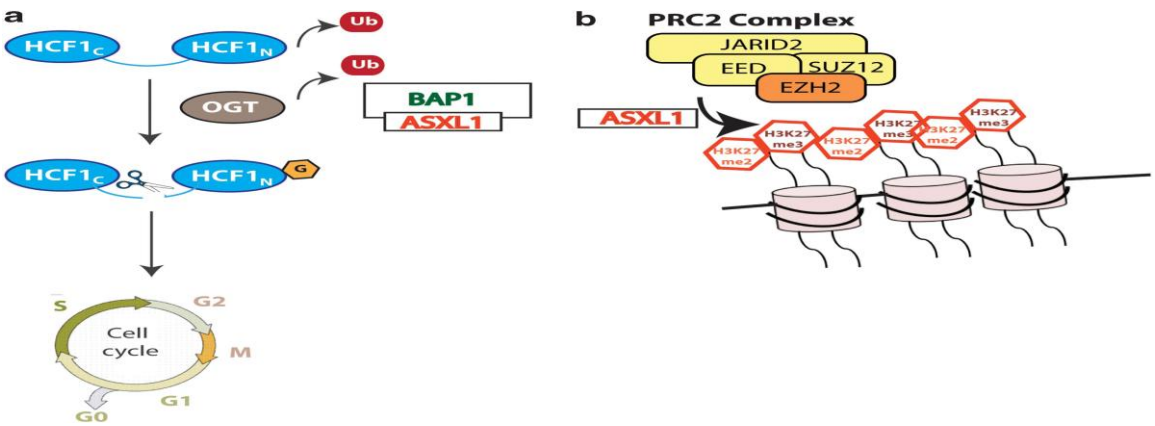
Dey ve arkadaşları tarafından makrofajlardan DNA sekanslama ve kromatin immunopresipitasyon kullanılarak, çoğunluğu HCFC-1 ve OGT ile ilişkilendirilmiş yaklaşık 5700 gen üzerinde BAP1 içeren transkripsiyonel komplese yaklaşık 6000 aday bağlanma alanını tanımlandı. Bunlardan, BAP1 KO hücrelerde 32'si up-regüle, 18'i down-regüle olmuştu (45).

BAP1, HCF-1 ve OGT stabilitesi üzerindeki etkisi aracılığıyla fonksiyon görür(50). Knock-in farelerde yapılan çalışmalar *BAP1* delesyonu OGT ve HCF-1 seviyesini düşürmüştür, bu durum epigenetik regülatörlerin stabilizasyonunda BAP1'in kritik rolünü işaret etmektedir (35).

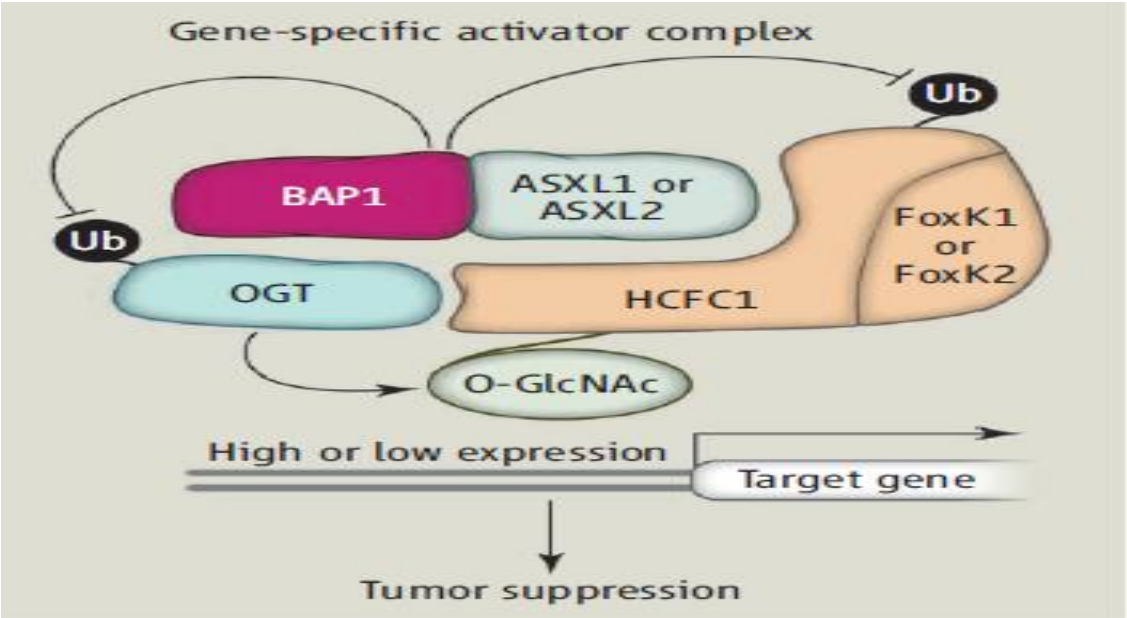
BAP1-ASXL1-HCFC1-OGT kompleksi, belki de DNA bağlanma proteini FOXK1 gibi faktörler aracılığıyla birçok genin promotor bölgesini belirleyebilir ve muhtemelen belirli hücre türlerinde tümör baskılanmasını kontrolü için farklı genler üzerinde ya gene spesifik aktivatör ya da baskılayıcı kompleks gibi işlev görebilir (45).

Tablo 2.9. ASXL-1 ve OGT'nin fonksiyonları

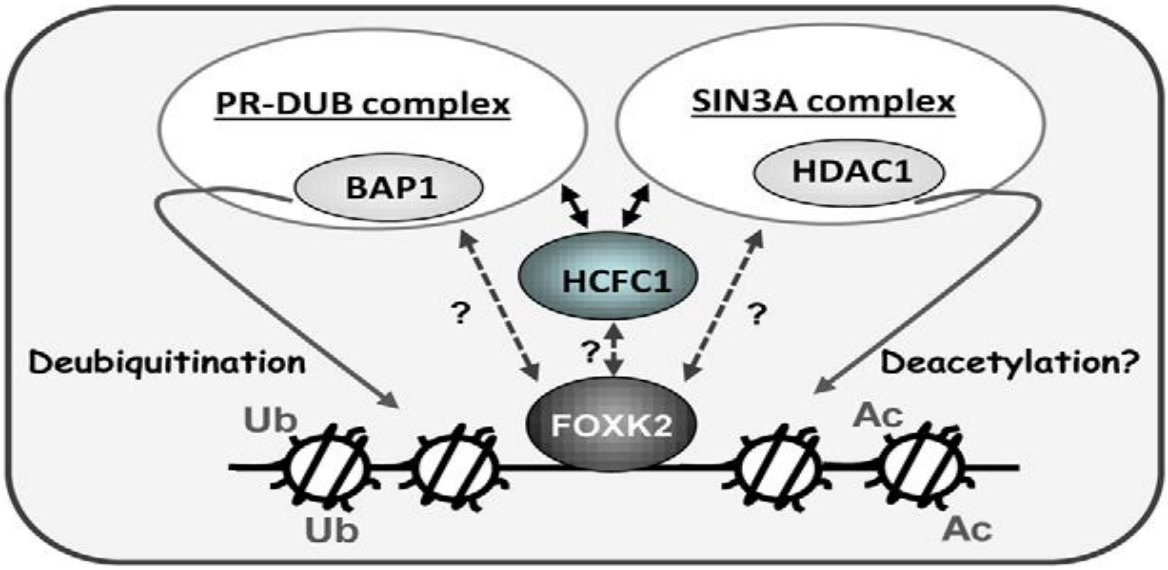
ASXL-1	Ref
Pluripotent kök hücre gelişiminde PR-DUB kompleksi için BAP1 ile etkileşir	30
BAP1 ile ASXL1 ile etkileşerek histonları hedef alan deubikitinaz enzimidir	43
PCR2 kompleksi ile etkileşip histon post-modifikasyonunda etki yapar	50
OGT	
HCFC-1'in pozitif düzenleyicisidir.	45
İn vitro ortamda BAP1-ASXL1 tarafından ubikitini uzaklaştırılır.	45



Şekil 2.11. BAP1-ASXL1-OGT'nin gen ekspresyonu düzenlemesi (50)



Şekil 2.12. Transkripsiyon düzenlenmesinde BAP1-HCFC1-ASXL1-OGT-FOXK kompleksi (45)



Şekil 2.13 BAP1-HCFC1-FOXK2 Kromatin Remodelling Kompleksi İçin Potansiyel Model (30).

2.3.9. *BAP1* GENİNİN KANSERDE MUTASYON VE EKSPRESYONLARI

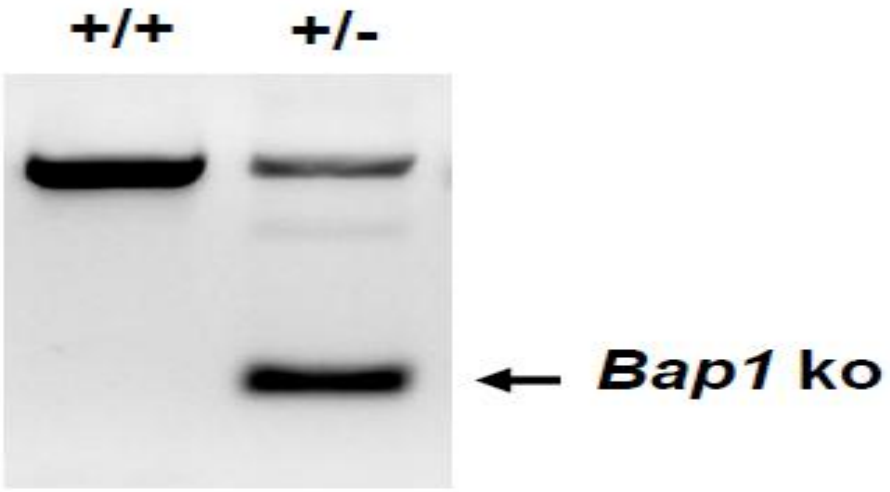
Mezotelyomalı tümörlerin birinde bulunan bir kopyadaki transisyon *BAP1* promotorunun yakınında veya promotorundaydı, diğer tümörde ise *BAP1* 'i de çevreleyen daha büyük delesyon yer almaktaydı. W-III-04T kodlu tümör hem splays alanında mutasyon hem de ekzon 4'de 25 bp delesyon içeriyordu, bu da çerçeve kayması mutasyonu ve BAP1'in premature sonlanmasına neden oldu. Germline DNA'lar ile karşılaştırıldığında somatik orjinli olduğunu işaret etmektedir. 18 mezotelyomalı tümörlerin 4'ünde (%22), DNA sekanslaması ile sporadik truncat mutasyonlar tanımlanmıştır. 12 mezotelyoma hücre hattının 7'sinde BAP1 ekspresyon kayıpları vardı, BAP1'in yetersiz olduğu mezotelyomalı hücrelerde BAP1'in tekrar ekspresyonu ile koloni yeteneği önemli olarak azaldı. Bu sonuçlar hücre yaşamı ve proliferasyonun düzenlenmesinde BAP1'in rolü ile uyumludur (46).

Sporadik mezotelyoma vakalı bireylerden alınan 26 germline DNA'da *BAP1* sekanslaması ile 2 bireyde ekzon 13 (c.1832delC) ve 14 (c.2008-2011delTCAC)'te delesyona sahipti, bu da BAP1'in nükleer lokalizasyon sinyalini kodlayan bölgesindeki upstream stop kodonuna neden olan çerçeve kaymasıyla sonuçlandı (46).

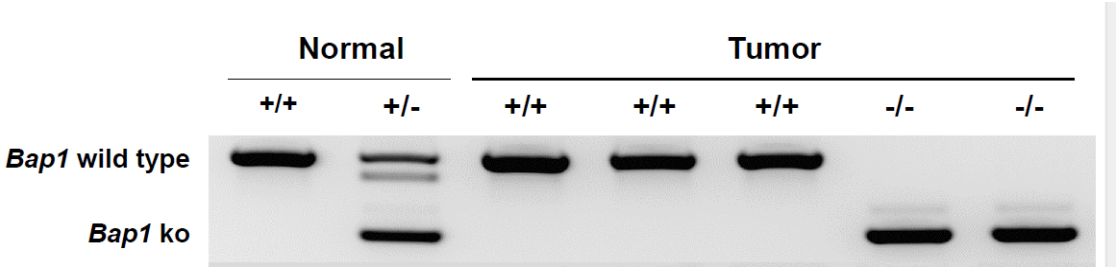
Kanserden etkilenen altı üyenin (4 mezotelyoma, iki göğüs ya da böbrek kanseri) oluşturduğu aileden alınan germline DNA'ların sekanslanması, -2 nükleotid konsensus splays alıcı(acceptor) bölgesinde Adeninden Guanin değişimine sahip bireylerin etkilendiği ailedeki germlime mutasyonu intron 6 ile 7 arasındaki bağda gösterilmiştir. Bir ailede de 7. ekzon kaybı mevcuttu. Ekzon 6'nın splays bölgesindeki mutasyonlarla beraber 6-8 ekzonları memeli hücrelere transfeksiyonu 7.ekzon olmadan anormal splays ürün ile sonuçlandı ve çerçeve kaymasının, nonsense yoluyla mutasyon ve premature stop kodonuna neden olduğu tahmin edilmektedir (46,54). Germline *BAP1* mutasyonuna sahip iki ailede artmış mezotelyoma insidansı tespit edilmiştir ve ailelerdeki bazı *BAP1* mutasyon taşıyıcılarında uveal melanomayı içeren bazı tümör tipleri gelişmiştir (51).

Üç mezotelyoma kanser hastası (ikisi aynı zamanda cilt karsinoma sahip) bireyden alınan germline DNA, ekzon 16'da C/G-T/A transisyonu gözlenmiştir, bu sonuç *BAP1* mutasyon durumu ve linkage analiz sonuçları ile tamamen uyumludur (46). Germline *BAP1* mutasyonuna sahip iki kardeşte de iyi diferansiye papiller mezotelyoma raporlanmıştır (52).

Asbest maruziyetinin mezotelyoma oluşumunda baskın olduğu düşünülmektedir (53). Malignant mezotelyomalarda asbest maruziyeti knockout *Bap1* farelerde, wild type'lara göre daha etkin durumdadır ve malignant mezotelyoma gelişimi knockout farelerde daha agresif olup anlamlı olarak hızlanmaktadır. Ayrıca yaşam süresi knockout farelerde daha kısadır (54). Wiesner ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da, malignant mezotelyomadan etkilenen aynı aileden dört kişide *BAP1* germline mutasyonu tanımlandı ve öykülerinde asbeste maruz kalma söz konusu değildi, bir kişide multipl melanosit tümörler de bulunmaktadır (31).



Şekil 2.14. Asbest ile maruz bırakılan mezotelyoma için fare modelinin genotiplemesi. Normal genotip 634 bp, KO *Bap*1 158 bp. Asbestos maruziyeti mezotelyomada sağkalımı kısaltır (54).



Şekil 2.15. Asbeste maruz bırakılan fare modellerinde RT-PCR ekspresyon analizi.

Wild Type farelerden alınan mezotelyularda *Bap1* aktivitesi görülürken, KO *Bap1* farelerden alınan mezotelyoma hücrelerde görülmemektedir. Normal (+/+): Asbeste

maruz edilmeyen WT fare geni. Normal(+/-): Asbeste maruz edilmeyen KO *Bap1*. Tumor(+/+): Asbest ile muamele edilen WT fare geni. Tumor(+/-):Asbest ile muamelen edilen KO *Bap1* (54).

BAP1'in germline DNA sekanslaması sonucu, Mezotelyoma, abdominal adenokarsinom olan ve ovaryum kanserinden şüphelenilen FUM036 kodlu aileden iki hasta zorunlu *BAP1* mutasyon taşıyıcısıdır (44).

Baskın kanserin Malignant Mezotelyoma olduğu yüksek riskli iki ailede heterozigot germline *BAP1* mutasyonu belirlenmiştir ve bir aileden iki kişi somatik *BAP1* mutasyonu ile bağlantılı UM hastasıydı. Bazı vakalarda *BAP1*'in biallel inaktivasyonu görülmüştür, çevresel maruziyete bakıldığında mezotelyomalı ailelerden hiçbiri mesleki olarak asbeste maruz kalmamıştır, fakat yalnız bu ailelerin evlerinde asbest izleri bulunması sadece genetik faktörlerin bu ailelerde mezotelyoma gelişiminde yeterli olup olmadığı sorusunu düşündürmektedir (31). *BAP1* mutasyon taşıyıcıları, asbeste maruz kalmada tolere edilen seviyede dahi malignant mezotelyoma vakalarında büyük oranda şüpheli olabilirler (54).

BAP1'in hemizigot nonsense mutasyonu (c.G605A) somatik epitelsi mezotelyomada belirlenmiştir Mezotelyomalı tümörün birinde hem *BAP1* hem de *PBRM1* hemizigot somatik mutasyonu, başka bir örnekte ise *BAP1* nonsense hemizigot mutasyonu yer almaktadır. Hücre kültürü çalışmalarıyla malignant mezotelyomada *BAP1* geninin 15. ekzonun yarısı ve 1. ekzonu okunamadığı biallel delesyonu bilinmektedir. Aynı zamanda iki genin mutasyonları birleştirildiğinde malignant mezotelyomada nadir olmadığı görülmektedir (55).

Retinoblastoma(Rb) yolağındaki bozulum, farelerde *Bap1* aracılı malignant mezotelyoma patogenezinde en azından deney modelinde gerekli olabilir. Aslında Rb ekspresyonunun hem normal mezotelyal hücrelerde hem de knockout *Bap1* farelerdeki malignant mezotelyoma hücrelerinde azalması, Rb kaybının knockout *Bap1* farelerde gözlenen tümör hücrelerinde proliferasyon artışı ve mezotelyoma başlangıcını hızlandırmada katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Knockout *Bap1* farelerde heterozigot (tek vuruş) mutasyonu hücresel koridorda Rb'nin ekspresyon değişimi ile ilişkilidir, yani genellikle malignant mezotelyoma patogenezini güçlü olarak içermektedir (54).

BAP1, SWI/SNF, *NF2*'de meydana gelen somatik mutasyonlarda, normal dokulardaki heterozigot germline varyantları mezotelyomalı dokularda hemizigot ya da homozigot varyantlara dönüşmüştür. Genlerdeki varyant/mutasyonlar birleştirildiğinde sonradan büyük transkripsiyonel değişimi tetiklediği, agresif mezotelyomalarla bağlantılı olabilecek transkripsiyonel regülasyonla ilişkilidir. H2A ve H2B'ye spesifik deubikitinaz *BAP1* ve *USP49* genlerindeki birleştirilen mutasyonlar sonucu histon modifiye işlevlerinde dolayı transkripsiyonda bozulmalara meydana gelmiştir. BAP1 mutasyonları gerçekleşmeden H3'ün düşük asetilasyon seviyesi incelendiğinde, malignant mezotelyoma hücrelerin büyümesini inhibe ettiği görülmüş olmasına rağmen histon deasetilasyon inhibitörleri tedavisi kullanıldığında yeterli seviyede onarım gerçekleşmemiştir (55). Malignant mezotelyomalarda *BAP1* inaktivasyonu için *CDKN2A/p16(INK4A)*'nın homozigot kaybına gerek olmadığını göstermektedir (54).

BAP1 mutasyonunun keşfi, mezotelyoma hücrelerinin olası epitelyum-mezenşimal geçişini ve gelişimde epigenetik değişimin önemini güçlü biçimde işaret etmektedir (51). *BAP1* geni ile yeni bulgular mezotelyoma, cilt melanoma(CM) ve olası diğer kanserlere karşı yüksek riskli kişileri erken müdahale için belirlenmesi gerektiğini göstermektedir. *BAP1* mutasyon taşıyıcıları, kanserin erken belirtilerine karşı düzenli olarak takip edilmelidir ve asbest, güneşe maruz kalmaktan kaçınma gibi önleyici tedbirler alınmalıdır (31).

Malignant plevral mezotelyoma(MPM) hücre hatlarında knockdown BAP1'in E2F ve polycomb hedef proteinler üzerine etkisine yönelik çalışmalar, MPM patogenezinde transkripsiyonel deregülasyonu ima etmektedir.53 MPM tümöründe %23 oranında non-sinonim somatik *BAP1* mutasyonu ve %30 oranında 3p21.1 kaybı tanımlandı. Toplamda tümörlerin %42'sinde *BAP1* kaybı, mutasyonu ya da her ikisini barındırmaktaydı. 25 MPM hücre hatlarında %8'si BAP1 mutasyonu bulunmaktaydı (43).

Wild-type BAP1 içeren üç MPM hücre hattında BAP1'in geçici knockdown siRNA'sı uygulandığında hücrelerde proliferasyonun azaldığı gözlendi. Bu veri knockdown BAP1'in S fazı hücrelerinin akümülasyonu ile birlikte proliferasyon hatalarına neden olduğu non-MPM hücre hatlarında yapılan önceki çalışmalarla uyumludur (43).

Knockdown BAP1'in E2F-cevabında büyüme ile ilişkili genleri daha az regüle ettiği ve aynı zamanda büyümenin yavaş görünmesi çelişki gibi görülebilir. Büyüme kinetiği hızlandırılarak tümör oluşumu ivme kazandırılmasından ziyade BAP1 G1/S kontrol nokta geçişine oldukça zayıf olarak hücre döngüsünün geciktirilmesine katkıda bulunur, böylece hücreler yavaş ancak kontrolsüz büyüyebilir (43).

Bulgularımız MPM'deki yaygın BAP1 inaktivasyonu sonucu yüksek düzeyde ölümcül kanser patogenezinde transkripsiyonel deregülasyonunu işaret etmektedir. Bu noktada, MPM'lerde alt histon deasetilaz inhibitörleri için klinik ve hücre hattı yanıtları, BAP1 durumuna ilişkin daha fazla araştırma gerektirebilir (43).

50 oküler melanoma(OM) hastanın 4'ünde germline *BAP1* mutasyonu tespit edildi ve mutasyonlar kontrol grubunda bulunmamıştır. 4 taşıyıcıdan 2'sinin aile hikayesinde cilt melanomada(CM) hastalığı bulunmaktaydı. Takiben yapılan toplamda 200 kalıtsal cilt melanoma analizlerinde cilt melanoma olup oküler melanoma olmayan 193 vakadaki 1 probandda, cilt ve oküler melanoma vakalı ailelerdeki 7 cilt melanomalı probandın 2'sinde mutasyonlar görülmüştür (56).

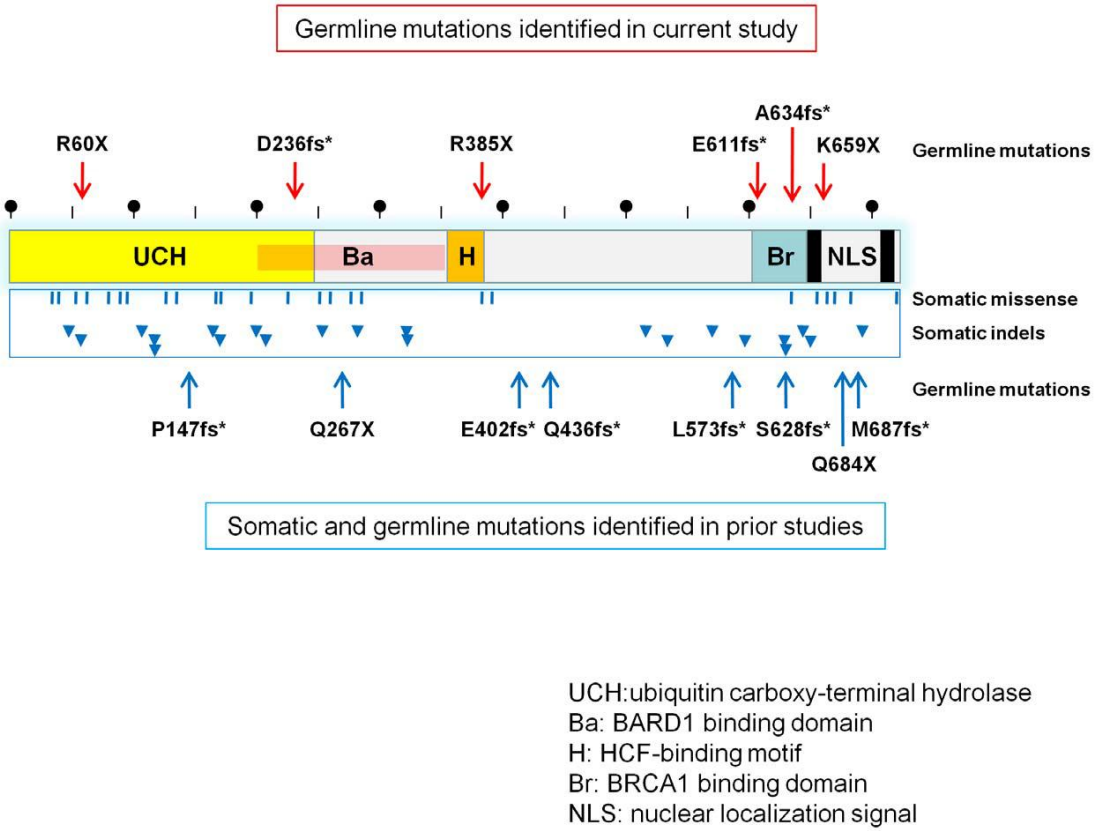
Germline *BAP1* mutasyonu taşıyıcısı bir ailede tek olarak tespit edilen wild-type *BAP1* allelinin 13 cilt tümörünün 9'unda, uveal ve cilt (cutaneous) melanomlarında inaktive olduğu bulunmuştur (32).

CM ve OM'da C-ucundaki birikime alternatif açıklama N-ucundaki BAP1 fonksiyonunun devamı hayatta kalmada temel faktör olmasıdır. İlginç olarak günümüze kadar 14 germline varyantın 7'si Karboksil uçtaki bölgede tanımlanmıştır, bu da BRCA1'e bağlanan domainin kanser yatkınlığında önemli olduğunu akla getirmektedir (56).

Germline *BAP1* mutasyonları cilt/oküler melanomada, atipik melanosit proliferasyonunda ve diğer dahili neoplazmların tekrarlayan fenotipik komplekslerinde ve daha agresif olarak oküler melanomayla bağlantılıdır ve BAP1 inaktivasyonu klinik marker olarak kullanılabilir (56).

Çalışmalarımız Germline *BAP1* mutasyonları metastazik OM ile hem kalıtsal oküler ve kalıtsal cilt melanomalı vakaların küçük ama önemli noktasıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir ve melanomaya yatkınlıkta *BAP1*'in rolü önemli noktadadır. Gelecek

çalışmalar, klinik olarak potansiyel *BAP1* mutasyon taşıyıcılarını tanımlamak için genel özellikler kullanılarak planlanabilir (56).



Şekil 2.16. BAP1 geninin Oküler ve cilt melanomadaki germline ve somatik mutasyonları (56).

İki farklı ailede beklenmeyen sıklıkla bazal hücreli karsinom hastalarda (BCC) *BAP1* germline mutasyonu tespit edilmiştir. Verilerimiz *BAP1* mutasyon taşıyıcıları için dermatolojik takipte dikkatin yanı sıra güneşten korunmanın önemini pekiştirmektedir (57).

Oküler onkoloji merkezleri Uveal melanoma (UM)'lı hastalar için moleküler prognostik testlerini tercih etmektedir. Son tekniklerle, mRNA ekspresyonları baz alınarak UM iki alt sınıfa ayrılır: Sınıf I ve II. Sınıf II UM, *BAP1*'i inaktif eden mutasyon ile güçlü olarak bağlantılıdır ve düşük sağkalımla ilişkilidir (59).

BAP1 kaybı UM'da metastaz yeteneğinin eldesinde ve tümör ilerlemesinde spesifik rol oynadığı görülmektedir. Bu tespitte BAP1 için temel rol, farklılaşan melanosit fenotipi

sürdürmeyi kapsayan transkripsiyonel programı devam ettirdiği ve BAP1 kaybının kök hücre benzeri fenotipe sahip ilkel hücrelerde belirgin bir özellik olarak hücre kimliğinin kaybını tetiklediği düşünülmektedir. (40).

BAP1 proteinin yetersiz olduğu kök hücre benzeri özellik gösteren hücrelerde farklılaşmanın bir regülatörü olarak özellikle uveal melanositte fonksiyonel görünmektedir. Bu durum BAP1 kaybının bu etkisi ile metastazı nasıl tetiklediği ve bu etkisinin terapötik şekilde nasıl geri çevrileceğini değerlendirmede önemli olacaktır (40).

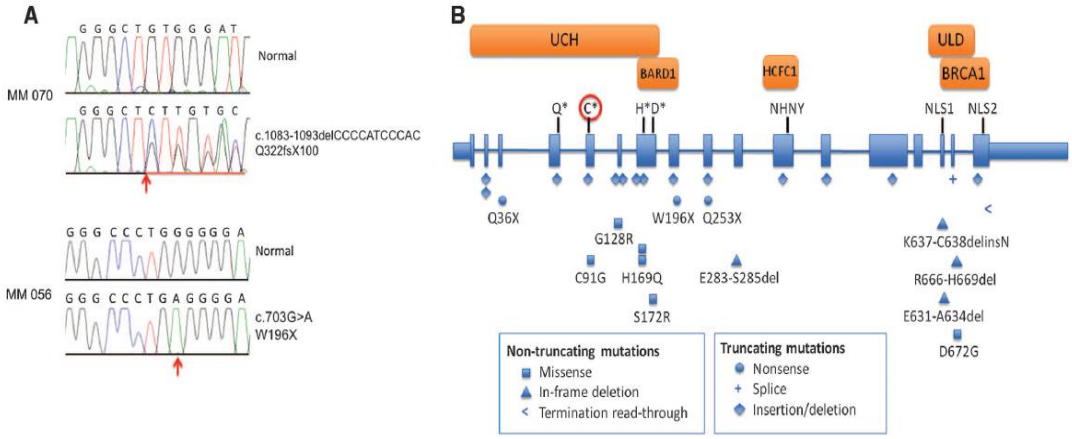
Uveal melanoma ve diğer hücre tiplerinde önceki yapılan çalışmalarla uyumlu olarak geçici BAP1 kaybı hücre proliferasyonunu azaltmaktadır. Bu etkisi, BAP1'in dengeli olarak azaltıldığı hücrelerde devam etmemektedir ve BAP1'in başlangıçtaki büyüme bozukluğunda tümör süpressör olarak kritik rolü olmadığını işaret eder. Farklı siRNA ve shRNA'lar kullanıldığında knockdown BAP1'in değişken seviyesine rağmen, proliferasyon defektlerinin derecesinde ve ekspresyon seviyeleri arasında bağlantı görülmemiştir (40).

Uveal melanoma hücrelerinde BAP1'in azalması kök hücre koşullarında büyüme yeteneğinin gelişmesiyle ve kendi kendine replikasyon kapasitesinin artmasıyla, kök hücre markırlarının ekspresyonunu içeren, kök hücre benzeri özelliklerin kazanılması ve farklılaşmanın kaybıyla sonuçlanmıştır. BAP1 azalımı tümör oluşumu ya da yayılım, migrasyon, proliferasyon artışı ile sonuçlanmamıştır (40).

UM için kullanılan fare modellerinde BAP1 azalışı beklenmeyen sonuçla metastaz yeteneğinin artması veya büyümede avantaj olarak görülmemiştir, fakat bu fare modellerinin BAP1 *in vivo* rolü için değerlendirmede yeterli olmadığını işaret etmektedir (40).

BAP1 ekzonlarının Sanger sekanslamasıyla UM'larda 26 class1 ve 29 class 2 tümörlerinden oluşan çalışmalarda *BAP1* mutasyonları class 2 tümörlerinin 31'inin 26'sında (%84) tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar 13 çerçeve kayması ve olgunlaşmamış protein sonlanması neden olan iki missense mutasyonu dışında, 6 missense mutasyon, 4 çerçeve kayması delesyonu içermektedir ve bir mutasyonun anormal bir şekilde uzamış BAP1 polipeptidi ürettiği tahmin edilmektedir. 6 missense mutasyonunun üçü UCH aktif alanının katalitik residülerini etki etmişti, ikisi UCH domainin başka bir yerinde

oluşmuştu ve bir tanesi de ULD domaini etkiledi. Class 1' deki 26 tümörden yalnız biri *BAP1* mutasyonu içeriyordu (42).



Şekil 2.17. UM hastasında Sanger sekanslamasıyla (A) belirlenen mutasyonlar ve mutasyonların yerleşimi (B) (42).

BAP1, uH2A(Lizin 119 üzerindeki histon H2A) için deubikitinaz olarak tanımlanmıştır, daha öncede tümör süpressör olarak belirtildi. Metastazik uveal melanomalarda %84 oranında gözlenen BAP1 missense nokta mutasyonları BAP1'in katalitik rezidülerinde (C91G ve H169Q) yer almaktaydı, bu da BAP1'in protein-protein etkileşiminden ziyade bu tümörlerde metastazik fenotiple ilişkili olduğu H2A deubikitinaz aktivitesi kaybını akla getirmektedir. Aşırı Bmi1 aktivitesi ve kanser arasındaki bağlantı göz önüne alındığında, H2A deubikitinasyon aktivitesinin BAP1 tarafından tümörü baskılaması için gerekli olduğu bulgusu H2A ubikitin ligaz kompleksi ve terapötik hedef olarak olası izlenebilir moleküler etkileşimini açıklamak için güçlü bir mantık gerektirir (60).

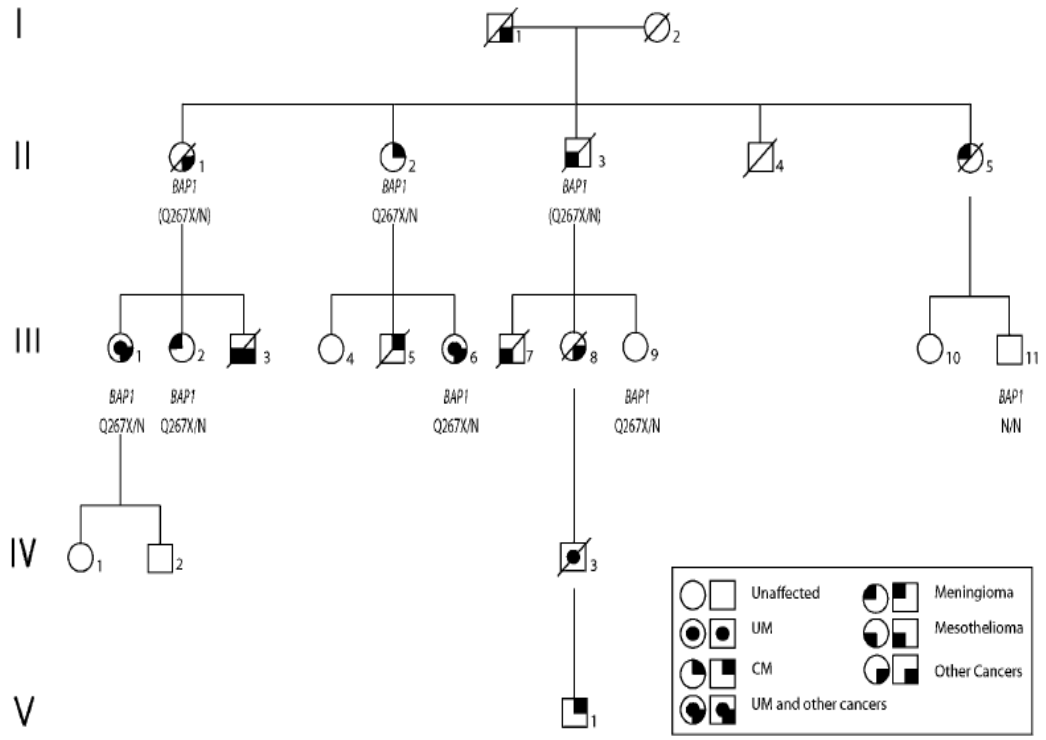
UM'da eksom sekanslama kullanılarak ulaşılan 113 varyantın 51'i yeni keşfedilmiştir ve fonksiyonel olarak önemli olduğu tahmin edilmektedir, bu 51 aday gen varyantların içinde *BAP1* gen varyantının fonksiyonunda düşünülen kayıp en güçlü aday olarak tanımlanmıştır. Mikrosatellit markerları kullanılarak yapılan genotip değerlendirmesi ve tüm eksom sekanslaması *BAP1* gen lokusunda heterozigosite kayıplarını ortaya çıkarmıştır (61, 62).

Sinyal yolaklarının ve birkaç genin bozulması, UM'da yayılımı desteklemektedir. En dikkat çeken gen ise 3p21.31-p21.2 bölgesinde yer alan ekzom sekanslamasıyla tanımlanan *BAP1*'dir (59).

Kromozom 3 için monozomik olan 2 tane class 2 metastazik uveal melanoma(MM) (MM 56 ve MM 70) tümörünü analiz edildi ve periferal kan lenfositlerinden elde edilen normal DNA ile karşılaştırıldı. Her iki tümörde 3p21.1 bölgesine yerleşmiş *BAP1*'in inaktive olmuş mutasyonlarını içermekteydi. MM 56, olgunlaşmamış (premature) sonlanma kodonu (p.W196X) oluşturan C/G 'den T/A geçişi içeriyordu. MM 70, BAP1 olgunlaşmamış protein (p.Q322fsX100) sonlanmasına ve çerçeve kaymasına neden olan ekzon 11 'in 11 baz çiftinin delesyonunu içermekteydi. Normal DNA örnekleriyle karşılaştırmada bu mutasyonlar yoktu, ki bu da mutasyonların muhtemelen somatik orjinli olabildiğini işaret etmektedir. *BAP1*'den başka kromozom 3 üzerindeki hiçbir gen her iki tümörde bulunan zararlı somatik mutasyonları içermemektedir (42).

Harbour ve arkadaşları metastaz UM'da *BAP1* genindeki mutasyon sıklığını belirtmektedir, bu çalışmada ise SP6.5 hücre hatlarında full genom sekanslaması BAP1 gen mutasyonunu içermemektedir. Sonuç olarak melanoma için kritik bir markır olarak yaygın kullanılan T hücrelerince tanınan melanoma antijeni (MART-1) ekspresyonunun sessizleştirilmesiyle BAP1 protein seviyesinde artış gözlenmiştir ve BAP1'in kısa süreli stres durumunda geçici artışıyla bağlantılı olabilirliğini düşündürmektedir (63).

Uveal melanoma (UM) ve diğer kanserlerden etkilenmiş farklı ailelerden seçilerek toplamda 53 akraba olmayan UM hastanın çalışılması sonucu, tek bir hastada germline *BAP1* truncat mutasyonu tanımlanmıştır(c.799 C/T (p.Q267X)). Azalan BAP1 ekspresyonu ve *BAP1*'in biallel inaktivasyonu, germline *BAP1* mutasyonuna sahip üç aile üyesinin etkilendiği UM, akciğer kanseri ve meningioma tümörlerinde saptanmıştır. Muhtemelen non-patojenik ve netleşmeyen öneme sahip germline *BAP1* varyantları iki hastada da görülmüştür (44).

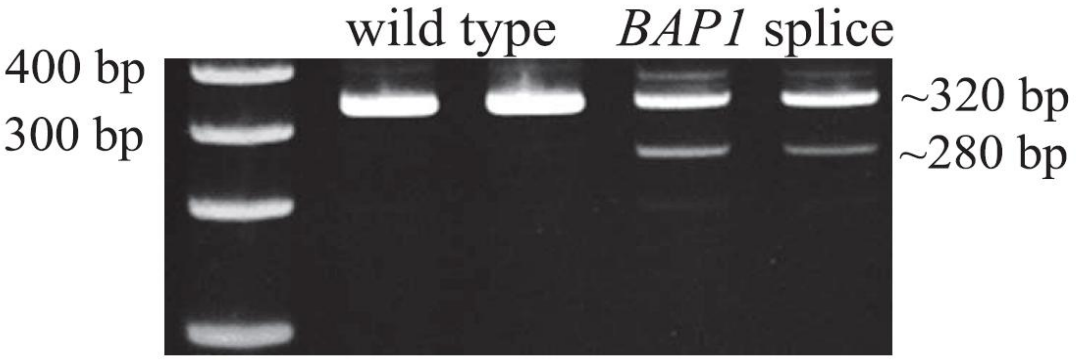


Şekil 2.18. FUM036 kodlu ailenin pedigrisi. II.2, III.1, III.2, III.6, III.9 nolu bireyler heterozigot germline *BAP1* mutasyonlarına sahip(c.799 C/T (p.Q267X). II.1 ve II.3 nolu bireyler zorunlu *BAP1* taşıyıcısı. III. 11 nolu birey mutasyon bulundurmamaktadır (44).

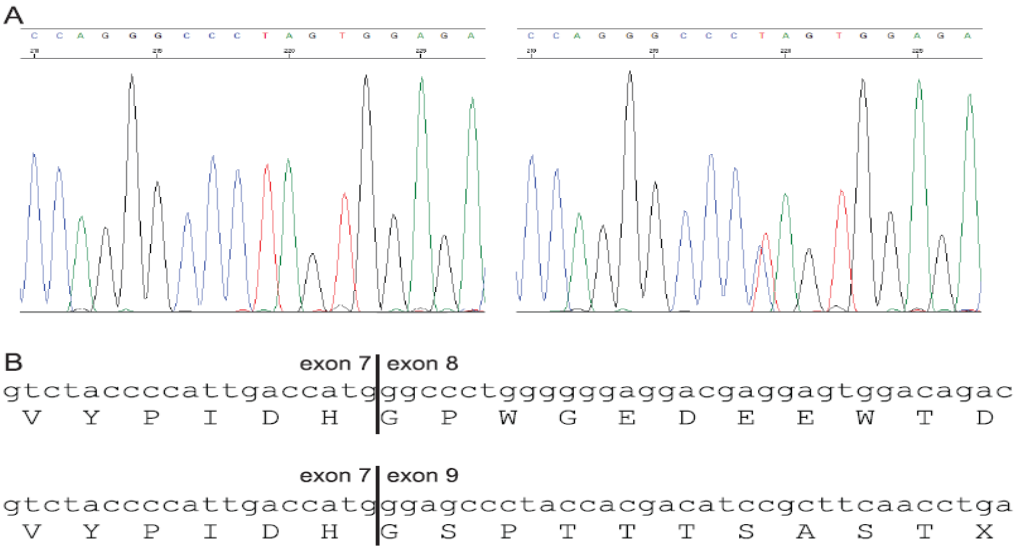
UM hastası probandın ailesinde çeşitli kanser öyküleri bulunmaktadır ve yeni germline *BAP1* nonsense mutasyonu (c.723T>G) tanımlanmıştır (41).

Günümüze kadar muhtemel germline *BAP1* missense mutasyonu(c.1806G>C) bir UM hastasında görülmüştür ve beklenen amino asit (p.E602D) değişimi gerçekleşmemiştir. c.1806G>C mutasyonu, truncat ya da çerçeve kayması ile oluşan proteine neden olabilirliği kriptik splays alanında görülmektedir (41).

Tüm eksom sekanslamasıyla Danimarkalı UM hastası bireyde *BAP1*'in olgunlaşmamış truncat mutasyonuna neden olan c.581-2A>G bölgesinde lokalize *BAP1* splays mutasyonu tanımlanmıştır. Bu hastanın ailesindeki melanoma ve diğer kanserlerden etkilenmiş bireylerde *BAP1* mutasyon taşıyıcısıdır (62).



Şekil 2.19. UM hastasındaki RT-PCR'da anormal *BAP*1 splays transkriptleri. Son iki kuyu c.581-2A>G mutasyonundan kaynaklanan anormal splays ürünlerini göstermektedir (62).



Şekil 2.20. UM hastasında *BAP1*'in splays alanında oluşan truncat mutasyon. A. Sol panel wild type kromotogram, sağ panel splays alanını belirtmektedir. B. Wild type amino asit sekansı ve 8. Ekzonun kaybıyla ortaya çıkan truncat mutasyon panelini belirtmektedir (62).

UM hastası anne ve oğulda *BAP1* germline mutasyonunun (c.299 T>C) ko-segregasyonu bulunmuştur. Çocuk da daha sonra ürotelyal karsinom ve karaciğer metastazı gelişmiştir, anne ise UM ve kolansiyokarsinomdan etkilenmiştir. *BAP1*'in 5. ekzonu üzerindeki missense mutasyon 100. Kodon üzerindeki Prolin ile Lizin arasında değişikliğe neden olmaktadır (64).

55 yaşında koroidal uveal melanoma teşhisi konulan kadın hastadan ve kız kardeşinden alınan DNA örneklerinin germline analizleri *BAP1*'in kodlayan bölgesindeki nükleotid insersiyonunu (c.758_759insA) açığa çıkarmıştır ve bu mutasyon BAP1 proteinde (p.T254Dfs*30) çerçeve kayması ile truncat proteine neden olduğu tahmin edilmektedir (41).

Kromozom 3'ün bir kopyası *BAP1*-mutantlı 17 class 2 tümörlerinin hepsinde kayıptı ve bu durum kromozom 3 kaybının resesif *BAP1* mutasyonunun ortaya çıkarılmasıyla uyumludur. *BAP1* mutantlı class 2 deki 20 hastanın normal DNA'sı mevcuttur ve *BAP1* mutasyonu içermemektedir. Bu durum mutasyonların somatik orjinli olduğunu işaret etmektedir. Fakat tümör MM087' deki hastadan bir tane germline mutasyonu (p.E402fsX2: c.1318-1319insA) belirlendi, bu sonuç *BAP1*'de ki germline bozukluğun uveal melanomaya yatkınlık gösterebileceğini işaret etmektedir (42).

Kromozom 3 üzerinde toplamda 15 mikrosatellit markırları kullanılarak yapılan genotipleme aynı aileden (FUM036) üç üyenin germline *BAP1* mutasyonuna sahipti. Bu ailede UM, akciğer kanseri ve ailesinde kanser hikayesi mevcuttu ve UM ve diğer kanser türlerinde hasta probandda altı tane germline polimorfizm tanımlandı, bunlardan biri *BAP1*'in truncat mutasyonu olarak belirlendi (c. 799 C/T (p.Q267X), diğer varyantlar(c1002 A/T, c.650-26T/A, c.931+70A/G, c.931+117_118delCC, c.1891-30G/C) şeklindedir. Bu mutasyon nükleer lokalizasyon bölgesinde yer almaktadır ve 1000 Genom projesinde raporlanmamıştır (44).

Class 2 UM tümörlerindeki yaklaşık %85 mutasyonları barındıran metilasyonun beklenmedik biçimde BAP1 inaktivasyonunun ana mekanizmasında rol almaktadır. Bir başka açıklama bu tümörlerin sekanslama metodumuz aracılığıyla tespit edilemeyen *BAP1* lokusunun çok büyük delesyonları içermesidir (42).

Tümör dokuları ile yapılan immünohistokimya çalışmaları, BAP1'in UM ve akciğer kanserinde nükleer lokalizasyon bölge kayıpları ve UM, akciğer kanseri ile meningiomada tümörlerinde ekspresyonunun azaldığını göstermektedir (44).

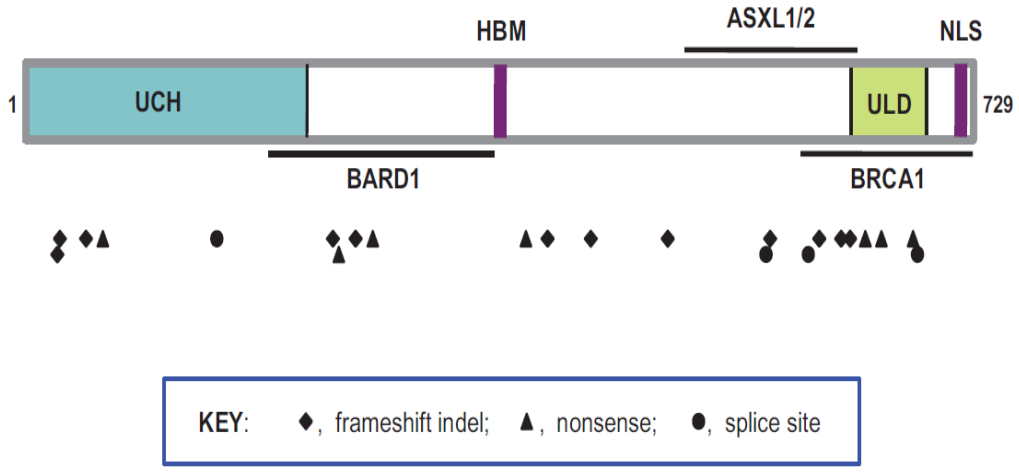
CM'larda *BAP1* biallellik inaktivasyonuna rağmen, *BAP1* germline mutasyonunun penetransı UM'lı hastalarla karşılaştırıldığında CM'lı hastalarda daha düşük seviyededir (58).

BAP1 azalması class 2 UM tümörlerinde down-regule edilen *LMCD1* ve *LTA4H* genlerin mRNA seviyesinin azalmasına ve *CDH1* ve proto-onkogen olan *KIT*'in mRNA seviyelerinin artmasına neden oldu ki bu iki gen class 2 tümörlerinde yüksek seviyede eksprese oldular (42).

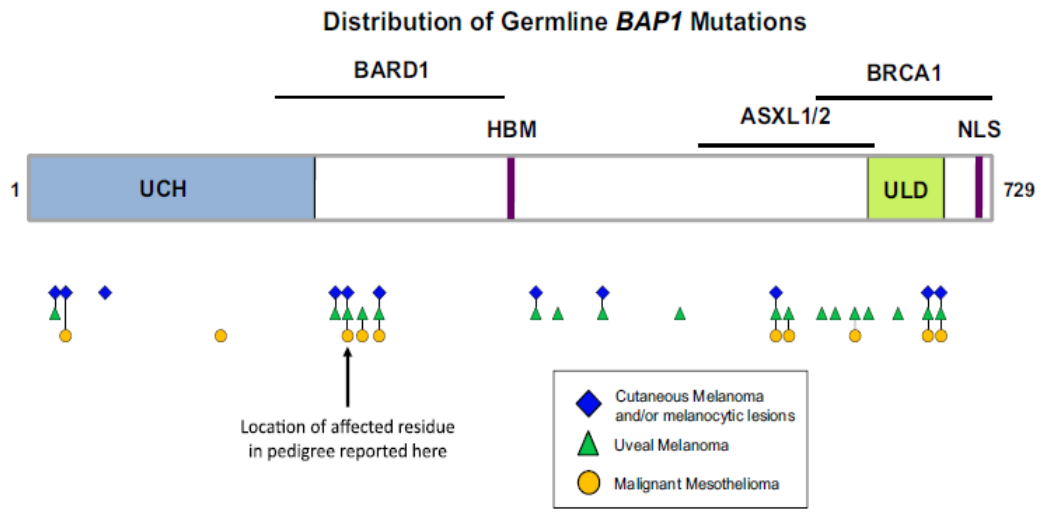
Güncel çalışmalar, uveal melanomalarda *GNAQ* ve *GNA11* mutasyon taşıyıcısı olup, *BRAF* mutasyon taşıyıcısı olmayan bireylerde *BAP1*'in biallel kaybını göz önünde tutmaktadır (32).

BAP1'in sık mutasyonu UM'da muhtemel terapötik hedef olarak araştırabileceğini işaret etmektedir. *BAP1*, DNA hasar yolağında yer aldığından dolayı, poli-ADP Riboz polimeraz inhibitörleri *BAP1*-mutantlı kanserlerde terapötik etkinlik için test edilebilir (61).

Germline *BAP1* mutasyonu, yeni kalıtsal kanser sendromuna neden olmaktadır; UM, akciğer kanseri, meningioma ve muhtemelen diğer kanser çeşitlerindeki hastalar yatkınlık gösterir. *BAP1*'in kalıtsal UM'da, aday genlerden küçük bir alt sınıf olup, diğer aday genleri desteklediği düşünülmektedir (44). Ailesel melanomada nadir *BAP1* varyantları bulunmuştur (65). Metastazik hastalığı bulunduran hastalardaki germline *BAP1* mutasyonunun yüksek oranı, UM'ın bu hastalarda daha agresif olduğunu düşündürmektedir (52).



Şekil 2.21. *BAP1*'in uveal melanoma, cilt melanoma, atipik melanosit, mezotelyoma ve olası diğer kanserlerdeki germline mutasyon dağılımı (31).



Şekil 2.22. 2013 yılına kadar belirlenen *BAP1*'in germline mutasyon dağılımı (41).

Tablo 2.10. 2013 yılına kadar raporlanan *BAP1* germline mutasyon vakaları ile ilgili Cheung et al. tarafından hazırlanan tablo (41).

Pedigree/individual in question	Germline DNA change	Mutation type	Mutation location in gene	Predicted effect on protein	Cancer type(s) observed
Family	c.75insG	in/del	exon 3	p.K25fs*43	UM, CM
Family	c.79delG	in/del	exon 3	p.V27Cfs*45	MM, CM
714 (individual)	c.178C>T	nonsense	exon 4	p.R60*	CM
Family W	c.438-2A>G	splice	intron 6	p.P147fs*48	MM
FAM562 (family)	c.706_707insG	in/del	exon 9	p.D236Gfs*7	UM, CM
Family	c.723T>G	nonsense	exon 9	p.Y241*	MM, UM, CM
Family	c.758_759insA	in/del	exon 9	p.T254Dfs*30	MM, UM
FUM036 (family)	c.799C>G	nonsense	exon 10	p.Q267*	MM, UM, CM
FAM729 (family)	c.1153C>T	nonsense	exon 12	p.R385*	UM, CM
MM087 (individual)	c.1318-1319insA	in/del	exon 12	p.E402fs*2	UM
Family 1	c.1305delG	in/del	exon 13	p.Q436Nfs*135	UM, CM
Individual #1	c.1480_1481delGA	in/del	exon 13	p.D494fs	UM
Family	c.1708C>G	splice	exon 13	p.L570fs*40	MM, UM, CM
SP-002 (individual)	c.1832delC	in/del	exon 13	p.L573fs*3	MM, UM
Individual #2	c.1806G>C	missense (or splice)	exon 14	p.E602D (or truncation)	UM
3123 (individual)	c.1831_1834del4	in/del	exon 14	p.E611Rfs*5	UM
SP-008 (individual)	c.2008-2011delTCAC	in/del	exon 14	p.S628fs*8	MM, UM
2734 (individual)	c.1899_1900ins5	in/del	exon 15	p.A634Gfs*5	UM
3101 (individual)	c.1975A>G	nonsense	exon 15	p.K659*	UM
Family L	c.2050C>T	nonsense	exon 16	p.Q684*	MM, UM, CM
Family 2	c.2057-2A>G	splice	intron 16	p.M687Efs*28	MM, UM, CM

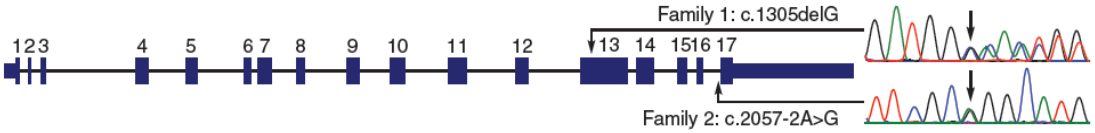
Abbreviations: in/del, insertion/deletion; MM, malignant mesothelioma; UM, uveal melanoma; CM, cutaneous melanoma.

BAP1 kaybı melanosit tümörlerle ilişkilidir. *BAP1*'in melanosit neoplazmlardaki rolü onkogen, hücre orjini ya da her ikisi ile de ilişkine bağlı olabilir (32).

BAP1 germline mutasyonu, melanosit tümörlerde yüksek penetrans ile karakterize edilen, muhtemelen cilt (cutaneous), uveal melanoma ve mezotelyoma gibi diğer tümörler için artan riskle ilişkili olan ve yeni bir otozomal dominant sendroma neden olarak tanımlanmıştır (32, 66).

Melanosit neoplazmlardan etkilenmiş kardeş üç üyede aynı maternal kopya bulunup, etkilenmeyen diğer üye farklı maternal kopyaya sahipti. Yapılan SNP analizleri, bütün tümörlerde 3p bölgesinin paternal kopyası kayıp olup, maternal kopyasının muhafaza edildiğini gösterdi. Bu sonuç, 3p21 bölgesinde mutasyona uğrayan genin maternal yolla kalıtıldığı düşündürmektedir. Mutant geni tespit için yapılan incelemede *BAP1*'de çerçeve kayması mutasyonu (c.1305delG, p.Gln436Asnfs*135) belirlenmiştir. *BAP1* germline mutasyonunun populasyon oranını tespit için, 1000 Genom Projesinde 629 birey taranmış truncant mutasyon görülmeyip, nadir olduğu görülmüştür (32).

İncelenen başka bir ailede ise, son ekzondaki akseptör splays bölgesi uzaklaştırılan farklı *BAP1* germline mutasyonu(c.2057-2A>G, p.Met687Glufs*28) fark edilmiştir. Bu aile de melanosit tümörden etkilenen iki üyenin cDNA analizleri, splays esnasında son intronun uzaklaştırılmadığı görülmüştür (32).



Şekil 2.23. *BAP1*'in gen yapısı ve iki ailedeki kanserden etkilenmiş üyelerde gözlenen germline mutasyonlar (32).

BAP1 ekspresyon kaybı baskın olarak epitelyum hücrelerinin proliferasyonu ile ilişkili ve bilinen BAP1-pozitif cinside dahil edilen sekiz tane birleştirilmiş melanosit tümörleri raporlanmıştır. Bu lezyonların altısı bifenotip olup örnekleri üç kadın, üç erkekten elde edilmiştir ve yaş aralığı 16-59 şeklindedir. Lezyon örneklerin birinde (2.vaka) *BAP1*

sekanslamasında, *BRAF* mutasyonu ile *BAP1* çerçeve kayması mutasyonu belirlenmiştir (BAP1: c.568_569delinsT, p.P190Sfs*41) (66).

Şekil 2.24. Melanosit lezyona sahip hastada *BAP1*'in çerçeve kayması mutasyonu (66).

*BRAF*V600E-*BAP1*loss melanosit tümörlerde malignitenin ilerleme riski düşük görünmesine rağmen bazı tümörlerde melanoma ilerleyebilir (66).

BAP1'in azalması, melanosit farklılaşma programında görevli (*MITF, TRPM1,TYR ve DCT*) genlerin down regülasyonuna, kök hücre ve gelişim sürecindeki genlerin up-regülasyonuna neden olmuştur. BAP1 aktivitesinin, melanosit hücre özgüllüğünü devam ettirmede önemli olduğu düşünülmektedir (40).

BAP1 azalması nöral krest göç genleri *(ROBO1)*, melanositte farklılaştıran genler (*CTNNB1, EDNRB* ve *SOX10*) genlerinin mRNA seviyesinin azalmasına neden olmaktadır (42).

BAP1 kalıtsal kanser sendromu, *BAP1*-mutantlı atipik intradermal tümörleri veya Atipik Spitz Tümör (AST)'leri kapsar, bu lezyonlar sıklıkla *BAP1* biallelik germline inaktivasyonuna sahiptir (58).
Rastgele seçilen 156 tümör örneğinde yapılan *BAP1* sekanslaması, 31 uveal melanoma örneğinde, 2 atipik Spitz tümör örneğinde ve üç melanoma örneğinde somatik *BAP1* mutasyonu sonucunu vermiştir (32).

BAP1 ile ilişkili cilt lezyonları bilinen AST'lerden farklılıklar göstermektedir, moleküler seviye de bu lezyonlar incelendiğinde BAP1 inaktivasyonlarının yanı sıra aynı zamanda BRAF mutasyonları da bulundurmaktadırlar, AST veya Spitz tümörlerin özellikleri çok az ya da hiç göstermemektedir (37).

3p delesyonları küçük hücreli akciğer kanseri ve renal hücreli kanserinde hemen hemen %100'ünde, küçük olmayan-hücreli akciğer kanser hücre hatlarında %90'ın üzerinde ve %80'in üzerinde göğüs kanserlerinde bulunmuştur (27).

Renal hücreli karsinomlar (RCC) hücre hatlarında BAP1 apoptoza yol açmaksızın hücre proliferasyonunu baskılar. Aslında BAP1 hücre proliferasyonunu tamamen durdurmaz. RCC'de HCF-1 bağlanma motifine zarar veren mutasyonlar monoubikitinleşen Histon 2A Lizin 119'un deubikitine olmadığı hücre proliferasyonunda BAP1 yoluyla tümör baskılanması da olumsuz etkilemektedir (39).

Renal hücreli karsinomalarda yapılan tüm genom, ekzon sekanslama ve tumorgraft analizleri sonucu *BAP1*'in de dahil olduğu birkaç aday çift-vuruş tümör supressör genini tanımlamıştır. Nükleer deubikitinasyon fonksiyonu olan BAP1 proteini ccRCC'de %15 inaktive şekildeydi ve *in vitro* hücrelerde BAP1 kaybı genotoksik stresse duyarlı olup, ileri dereceli tümör ile bağlantılıdır (39).

98 Clear cell renal hücreli karsinomun (ccRCC), %8'inde daha önce bu hastalık grubunda belirtilmemiş olan *BAP1* mutasyonları görülmüştür. 9 tanesinin 7'sinde *BAP1*'deki sessizleştirmemiş mutasyonlar truncat protein kodladığı tahmin edilmektedir (67). 76 ccRCC tümöründe yapılan *BAP1* sekanslamasıyla 11 non-sinonim mutasyon bulunup, 10'u somatik orjinlidir.176 ccRCC tümörününün 24'ünde (%14) *BAP1* mutasyonu görülmüştür. En fazla mutasyon proteinde truncat şeklinde, mutasyonlar UCH domainini kodlayanlayan sekanslarda yoğunluktaydı (39).

RCC tümörlerinde BAP1 ve PBRM1 kayıpları birleştirildiğinde rabdoid özellik gösteren birkaç tümörle ilişkilidir. Birlikte gerçekleşen *BAP1* ve *PBRM1* gen mutasyonlarının bu tümörlerde bağlantılı olmadığını ve BAP1 ve PBRM1 proteinlerinin farklı gen programlamlarını regüle ettiği şeklinde görülmektedir (39).

BAP1 mutasyonları metastaz ccRCC hastalığıyla anlamlı şekilde bağlantılıdır (70). ccRCC'de *BAP1* mutasyonları splays bölgesinde tanımlanmış ve ileri dereceli tümörlerle önemli biçimde bağlantılıdır ve kanserde kısa yaşam süresi ile ilişkili görünmektedir. *BAP1* mutasyonları vakaların %6' sında saptanmıştır ve mutasyonların %36'sı truncat mutasyonlarıdır (47). BAP1-negatif tümörlü hastalarda spesifik olarak ccRCC vakalarında ölüm riskinin arttığı görülmektedir (68).

ccRCC'li hastada *BAP1*'in ayrı mutasyonlarını (p.Gln277*, p.Asn411fs and p.Pro519fs kodlayan) barındırmaktadır (69). Sporadik ccRCC vakalarında germline *BAP1* değişimleri raporlanmıştır, bazı germline *BAP1* mutasyonlarının ccRCC'de yatkın olabileceği unutulmamalıdır (70).

ccRCC'da ki *BAP1* ve *PBRM1* mutasyonları farklı gen ekspresyonlarını yapılarıyla ilişkilidir ve böylece biyolojileri de farklıdır. *BAP1* mutantlı tümörler agresif hastalığın patolojik özelliklerini destekleyici rolü vardır. *BAP1* mutantlı tümörler, *PBRM1* mutantlı tümörlere göre önemli ölçüde daha düşük sağkalım ile ilişkilidir. Kalan *BAP1* ve *PBRM1* allelinin mutasyonu tümör oluşumunu başlatabilir, mutant olan gene göre tümörün şiddeti değişkenlik gösterebilir. Böylece gelişecek olan tümörün agresifliği tümör gelişimi esnasında öngörülebilir (71). *BAP1* ve *PBRM1* mutasyonlarının ccRCC riskinde bir rolünü işaret etmektedir (70).

RNA-seq profillemesi yapılan ccRCC örneklerinde *BAP1 ve PBRM1* genleri, uzun kodlanmayan RNA(lncRNA)'ya dayalı birikim analizlerinde yüksek oranda anlamlı biçimde ilişkilidir (72).

Sık rastlanan mutasyonlar tüm tümör hücrelerinde mevcuttur ve başlangıç olaylarını içerir. ccRCC'de *BAP1* ve *PBRM1* mutasyonlarının keşfi, hedeflenen yeni nesil terapiler için imkan verebilir (71).

ccRCC'de *BAP1, PBRM1,SETD2* ve *KDM5C* genlerinde tekrarlayan mutasyonlar belirlenip, dikkate değer şekilde bu genlerin hepsi gen ekspresyonunda epigenetik kontrolde önemli rol oynarlar (47). Bu genlerle beraber *KDM6A* geni de histon ve kromatin regülatörlerini kodlar (73).

Tablo 2.11. 128 sporadik ccRCC hastasındaki *BAP1, SETD2, KDM6A, PBRM1* mutasyon dağılımı (70).

Summary	BAP1	SETD2	KDM6A	PBRM1	*JARID1c*[a]
Frameshift deletion	2	4	2	15	0
Frameshift insertion	2	1	0	3	0
Nonframeshift deletion	1	0	2	1	0
Non synonymous missense	3	3	0	8	3
Stop gain	4	10	0	10	1
Stop loss	1	0	0		0
Splicing	1	2	0	5	1
Total	14 (10.9%)	20 (15.6%)	4 (3%)	42 (32.8%)	5 (3.9%)

[a]Also two synonymous missense.

ccRCC'de BAP1 inaktivasyonu ile Rapamisin kompleks 1 (mTORC1)'in memelilerde hedefinin aktivasyonu arasında bağlantı bulunmaktadır. İlave olarak bütün high-grade tümörlerde BAP1 negatif değildir, muhtemelen high-grade özellikleri tetikleyen diğer genetik faktörler bulunmaktadır. Aslında high-grade tümörlerin mevcut olmasına karşın prognozun yeterince anlaşılamaması nedeniyle genetik etiyoloji olarak atfedilmiştir (68).

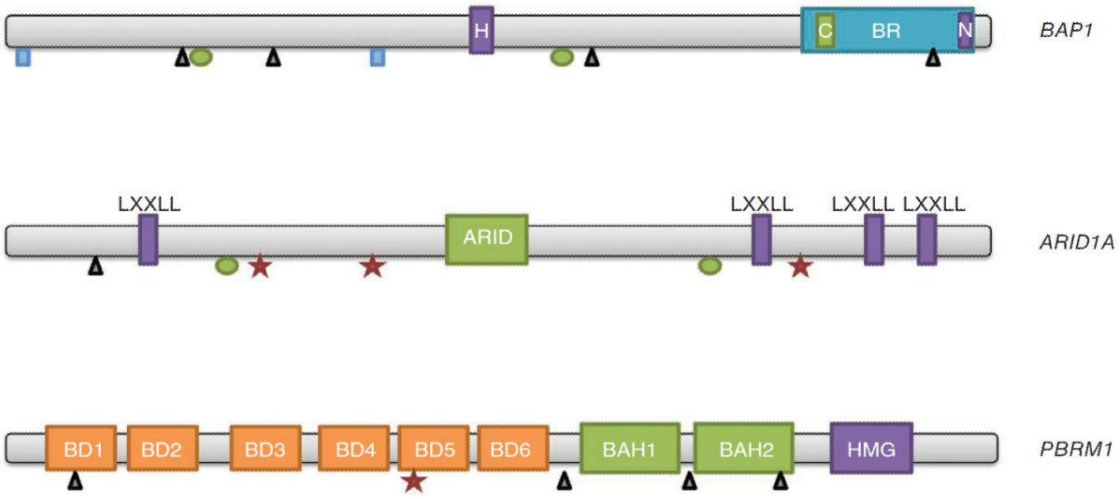
ccRCC'de BAP1 negatif tümörlerde survivin ve Ki-67'in daha fazla eksprese olduğu ve PDL1-pozitif olmasının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. BAP1 kaybı ve PDL1 ekspresyonu arasındaki ilişki terapötik etkiye sahip olabilir. Biyolojik açıdan bakıldığında BAP1 mutasyonunun PDL1, survivin ve Ki-67 ekspresyonunda direk olarak bağlantılı olursa RCC'de artan ölüm riskinde BAP1 ekspresyonu ilişki açıklanamaz (68).

Verilerimiz, BAP1'in ccRCC'de en agresif formda bulunduğu göstermektedir ve bunun sonucunda ccRCC olan hastalarda cerrahi müdahale sonrası yönetimi daha iyi değerlendirmek için BAP1 markırından yararlanılmasını desteklemektedir. BAP1 ekspresyonu, düşük riskli ccRCC hastaların prognozunda bağımsız marker olduğu bulunmuştur. ccRCC'de BAP1 için güncel klinik olasılıklar metastazik tesbit veya desteklemede bireyselleştirilmiş yaklaşımlarla birlikte hedeflenen terapilerin uygulanması ve tanımlanmasında uygulanabileceği vurgulanmaktadır (68).

Kolanjyokarsinom hastalarında *BAP1*'in somatik değişimin olduğu 2 missense, 3 nonsense ve 11 insersiyon-delesyon mutasyonları belirlenmiştir. Birden fazla siRNA'lar kullanılarak knockdown *BAP1* kolanjiyokarsinom hücre hatlarında (H69) hücre proliferasyonu artmaktadır. Aynı hücre hatlarında wild type *BAP1*'in aşırı ekspresyonu sonucu hücre proliferasyonu baskılanmaktadır (74).

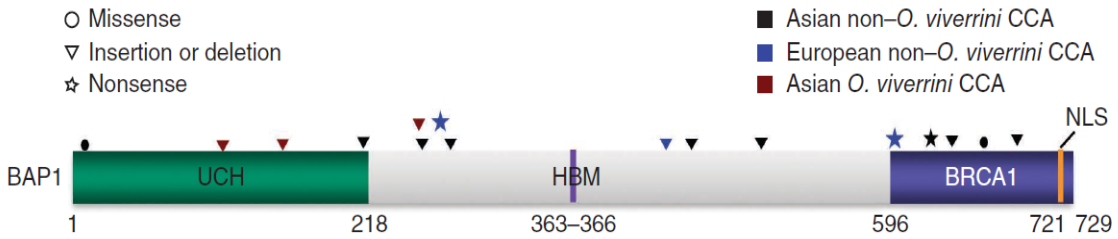
BAP1, ARID1A, PBRM1'de içeren birkaç kromatin-remodelling genlerinde intrahepatik kolanjiyokarsinomlarda sıklıkla inaktivasyona neden olan mutasyonlar bulunmaktadır, 32 hastanın 8'inde (%25) somatik *BAP1* mutasyonu görülmektedir. Somatik *BAP1* mutasyonları daha önce çeşitli kanserlerde raporlanmasına rağmen gastrointestinal kanserlerde raporlanmamıştır. Bu genlerin sıklıkla bozulumu bu tümör tipinde kromatin-remodelling fonksiyonunda anahtar rollerine işaret etmektedir (75).

Farklı 32 kolanjiyokarsinom hastadan elde edilen tümörlerde *BAP1*'i de içeren muhtemelen fonksiyonel 17 kromatin remodelling genlerinin sekanslaması sonucu çoklu mutasyonlar görülüp 5 hastada *BAP1* mutasyonu bulunmuştur. İki çalışma birleştirildiğinde 64 tümörün 13'ünde(%20) *BAP1* mutant durumundadır (75).



Şekil 2.25. İntrahepatik Kolanjiyokarsinomadaki inaktive edilen mutasyonlu genler. İnaktivasyon mutasyonları *BAP1, ARID1A* ve *PBRM1*'de kodlanan sekanslar boyunca meydana gelir. Dikdörtgen: Splasy alan mutasyonu; Üçgen: İnsersiyon-delesyon; Çember: Missense; Yıldız: Nonsense; BR: BRCA-1 ile etkileşen domain; C: coiled-coil domain; N:Nükleer Lokalizasyon Sinyal; H: HBM benzeri motif (75).

108 vakanın *Opisthorchis viverrini* enfeksiyonuyla,101 vakanın bu türle ilişkisi olmayan Asya ve Avrupa'dan 209 kolanjiyokarsinom hastasından 15'in de tüm genom sekanslaması, 194'ün de prevelans sıklığına bakıldığında *BAP1* ve *ARID1A*'nın sık şekilde tekrar eden mutasyonları görülmüştür. *BAP1* daha çok *Opisthorchis viverrini* ile ilişkili olmayan kolanjiyokarsinomlarda mutant şekildedir. Bu bulgular, farklı etiyolojik nedenlerin aynı tümör tipinde dahi belirgin somatik bozulmaları tetikleyebileceğini işaret etmektedir. Bu farklılıklarla ilgili muhtemel iki faktör göz önünde tutulmaktadır: anatomik bölge(intrahepatik/extrahepatik) ve coğrafya (74).



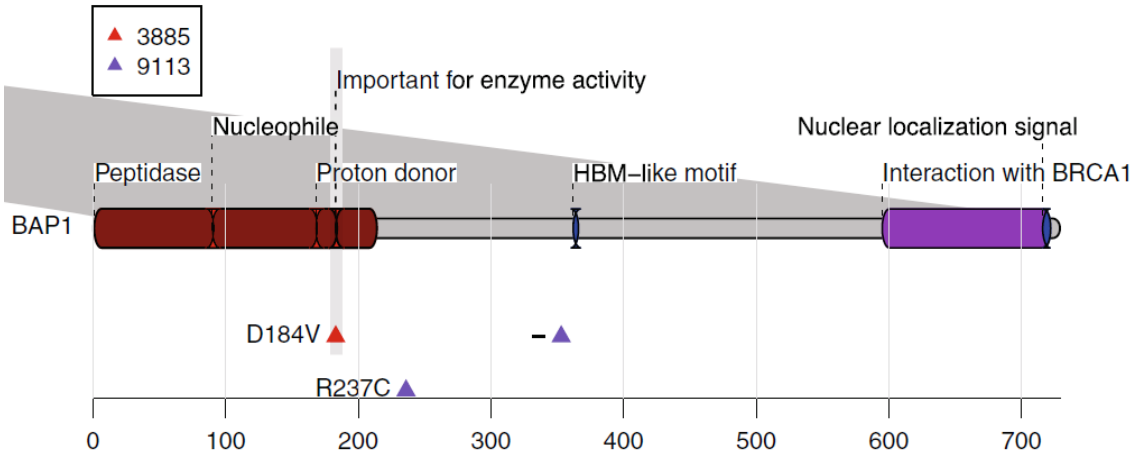
Şekil 2.26. Kolanjiyokarsinom vakalarındaki hücre proliferasyonunda *BAP1*'in fonksiyon inhibisyonu ve somatik mutasyon dağılımı. CCA: Kolanjiyokarsinom; NLS: Nükleer Lokazisyon Sinyali; BRCA: BRCA-1 ile etkileşen domain; UCH: Ubikitin C-terminal hidrolaz domain; HBM: HCF'ye bağlanan motif (74).

Ailelerinde çeşitli kanser vakaları bulunan ikisi UM'lı, üçüncüsü hepatik kolanjiyokarsinomdan muhtemelen metastazik adenokarsinom olan üç hastada germline patojenik BAP1 mutasyonu (c.2050 C>T, pGln684*; c.1182C>G, p.Tyr394*, and c.1882_1885delTCAC, p.Ser628Profs*8) tanımlanmıştır (52).

UM, CM, RCC, mezotelyomanın yanı sıra kolanjiyokarsinom ve göğüs kanseride kalıtsal *BAP1* kanser sendromunda fenotipin bir parçası olabilir (52).

Hepatit B ve C ile ilişkili 12 Hepatosellüler karsinom(HCC) hastasının örneğiyle yapılan yeni nesil sekanslamada *BAP1*'i de içeren DNA tamir, hücre kontrol ve apoptozisden görev alan genlerde en az bir tane moleküler anomalilikler tespit edilmiştir. HCC hastalarında en sık kopya sayısı varyasyonların biri de *BAP1*'de (%4) gösterilmiştir (76).

42 HCC hastanın örneğiyle yapılan yeni nesil (deep) sekanslamada *BAP1*'in muhtemel fonksiyonel mutasyonu bulunmuştur, mutasyon sıklığı düşüktür, aynı zamanda nokta mutasyonlarıda tespit edilmiştir. HCC'de BAP1'in somatik mutasyonu ilk kez raporlanmıştır (77).



Şekil 2.27. Yeni nesil sekanslamayla HCC'de belirlenen *BAP1* mutasyonları. 3885 kodlu hastada çerçeve kaymasına neden olan delesyon sonucu katalitik bölgede önemli olan D184V mutasyonu gözlenmiştir. 9113 kodlu hasta 354.pozisyonda çerçeve kayması delesyonu ve R237V nokta mutasyonu taşıyıcısıdır. HBM: HCF'ye bağlanan motif (77).

Pankreatik ve bilier kanserleri de birkaç *BAP1* ailesinde raporlanmıştır(52). 40 ileri derece pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) tümör örneğinin RNA-seq ve Kanser Genom Atlas (TCGA) analizleri *BAP1*'in de dahil olduğu olası altı genden beşi ile miRNA-125b ekspresyonu arasında negatif korelasyonu işaret etmektedir(78). 9 Safra kesesi karsinom hastasında ise *BAP1* mutasyonuna rastlanmamıştır (75).

Tablo 2.12. 2014 yılına kadar raporlanan *BAP1* somatik mutasyon vakaları ile ilgili Battaglia tarafından hazırlanan tablo (37).

MUTATION TYPE	MUTANT SAMPLES	PERCENTAGE(S)
Substitution nonsense	44	14.86
Substitution missense	113	38.18
Substitution synonymous	14	4.73
Insertion inframe	0	0.00
Insertion frameshift	12	4.05
Deletion inframe	8	2.70
Deletion frameshift	71	23.99
Complex	3	1.01
Other	40	13.51
Total	296	100

Tablo 2.13. 2014 yılına kadar raporlanan *BAP1* germline mutasyon vakaları ile ilgili Battaglia tarafından hazırlanan tablo (37).

PEDIGREE	TUMOR TYPES	GERMLINE DNA CHANGE	MUTATION TYPE AND LOCATION IN GENE	PREDICTED EFFECT ON PROTEIN
Family	RCC	c.41T>A	Missense (or splice) exon 1	p.L14H
Family	UM, CM	c.75insG	in/del exon 3	p.K25fs*43
Family	MM, CM	c.79delG	in/del exon 3	p.V27Cfs*45
714 (individual)	CM	c.178C>T	nonsense exon 4	p.R60*
Family	RCC	c.256_277 and c.277A>G	In/del exon 5	p.I87Mfs*X4 and p.T93Afs*
Family	UM	c.299 T>C(mother)	missense Exon5	pL100fs*
		c.299 T>C(son-monosomy of 3)	missense Exon5	pL100fs*
Family	MM	W c.438-2A>G	splice intron 6	p.P147fs*48
Family	UM	c.581-2A>G	splice exon 8	Premature truncation
FAM562 (family)	UM, CM	c.706_707insG	in/del exon 9	p.D236Gfs*7
Family	MM, UM, CM	c.723T>G	nonsense exon 9	p.Y241*
Family	MM, UM	c.758_759insA	in/del exon 9	p.T254Dfs*30
FUM036 (family)	MM, UM, CM	c.799C>G	nonsense exon 10	p.Q267*
FAM729 (family)	UM, CM	c.1153C>T	nonsense exon 12	p.R385*
FUM103	AdenoK (rib)	c.1182C>G	nonsense exon 12	p.T394*
MM087 (individual)	UM	c.1318-1319insA	in/del exon 12	p.E402fs*2
Family 1	UM, CM	c.1305delG	in/del exon 13	p.Q436Nfs*135
Individual #1	UM	c.1480_1481delGA	in/del exon 13	p.D494fs*
Family	MM, UM, CM	c.1708C>G	splice exon 13	p.L570fs*40
SP-002 (individual)	MM, UM	c.1832delC	in/del exon 13	p.L573fs*3
Individual #2	UM	c.1806G>C	missense(or splice)exon 14	p.E602D (or truncation)
3123 (individual)	UM	c.1831_1834del4	n/del exon 14	p.E611Rfs*5
SP-008 (individual)	MM, UM	c.2008-2011delTCAC	in/del exon 14	p.S628fs*8
FUM104	RCC	c.1882_1885delTAC	In/del exon12	pS628Profs*8
2734 (individual)	UM	c.1899_1900ins5	in/del exon 15	p.A634Gfs*5
3101 (individual)	UM	c.1975A>G	nonsense exon 15	p.K659*
FUM064	UM	C2050C>T	nonsense exon 16	pG684*
Family L	MM, UM, CM	c.2050C>T	nonsense exon 16	p.Q684*
Family 2	MM, UM, CM	c.2057-2A>G	splice intron 16	p.M687Efs*28

Tablo 2.14. 2014 yılına kadar raporlanan BAP1 kanser sendromları ile ilgili Battaglia tarafından hazırlanan tablo (37).

CATEGORY	SUBCATEGORY	FEATURES
Inheritance	–	Autosomal dominant
Head and Neck	Eyes	Uveal melanoma
Respiratory	Lung	Mesothelioma, malignant, after asbestos exposure
		Lung adenocarcinoma
Skin, Nails, Hair	Skin	Melanocytic skin
		tumors/papules, skin-colored to
		reddish-brown, dome-shaped or
		pedunculated, well
		circumscribed with an average
		size of 5 mm/ASTs/MBAITs[53]
		Cutaneous melanoma
Urinary	Kidney	Renal Cells Cancer
Neoplasia	–	Mesothelioma
		Uveal melanoma
		Cutaneous melanoma
		Meningioma
		MBAITs
		Lung adenocarcinoma
		Renal Cells cancer
		Breast Cancer
		Meningioma
		Paraganglioma
		Colon Cancer
Miscellaneous	–	Tumor predisposition syndrome

2.3.10. *BAP1* GENİ VE LÖSEMİ

Dey ve arkadaşları tarafından, BAP1'in lösemideki rolünü saptanmış ve enzimin moleküler hedefi açıklanmıştır. Farelerde özellikle kemik iliklerinde BAP1'in hedefindeki eksik olan HCF-1 ile lösemi gelişmektedir. BAP1, tümör baskılanması ve normal hematopoesis için gen ekspresyon ve histon modifikasyon regülasyonunda kompleksin bileşeni olarak görünmektedir (79).

Tamoksifen enjeksiyonundan 4 hafta sonra BAP1 Knock out (KO) (*Bap1*$^{fl/fl}$ creERT2+) farelerde, toplamda lökosit sayısı monosit ve nötrofilden dolayı artmıştı, bu durum CMML'ye benzer hastalıkla uyumludur. Farelerde trombositopeninin tamoxifen

enjeksiyonundan 1 hafta sonra gözlenmesi, hasta olan tüm farelerde ilerleyen aneminin gelişimi, eritroiddisplazinin raporlanması, blastların nadir olduğu alanlarda miyelodisplastik sendrom (MDS) ile uyumlu olan mitotik şekil ve apoptotik hücrelerin varlığı ile tüm bu veriler, *Bap1* delesyonunun insan CMML özellikleri ile miyeloproliferatif/miyelodisplastik hastalıklarına neden olduğunu göstermektedir (35).

BAP1 tek allelde oluşan inaktivasyonun (haploinsuffiency) etkilerini belirlemek için, tamoksifen tedavisinden sonra farelerde heterozigot *Bap1*$^{fl/+}$ karakterize edildi. *Bap1*' de ki bir kopyanın kaybı önemli sonuca neden olmamıştır fakat süreçte hematolojik defekt gözlenmesi ve bir hasta da tanımlanmış çerçeve kayması mutasyonunun heterozigot olmasından dolayı önemlidir (35).

Dey ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, yetişkin farelerde *BAP1* kaybı sonucu fenotipler anormal progenitör kırmızı kan hücreleri(myelodisplazi), düşük trombosit sayımı ve dalakta kan hücreleri öncüllerini yüksek oranda içermektedir (45).

BAP1 KO (*Bap1*$^{fl/fl}$ creERT2+) fareler üzerinde yapılan çalışmada farelerin tamamında splenomegali gelişip, bu fenotip wild-type *Bap1*'de gözlenmemiştir (35). Hematopoetik kök hücre düzeyinde, farelerde Bap1 delesyonu kemik iliğinde hücre sayısının artışına neden olmuştur (50).

BAP1 KO (*Bap1*$^{fl/fl}$ creERT2+) farelerde MDS gelişimi göz önüne alınırsa insanda MDS hastalığına yol açıp açmadığı araştırıldığında, de novo MDS hastalardan alınan 32 çift tümör ile normal örneklerin *BAP1*'in full-lenght ile yeniden sekanslanması sonucu BAP1'in UCH katalitik domaininde prematüre sonlanmasına neden olan *BAP1* geninde çerçeve kayması mutasyonu 1 hasta belirlenmiştir. Bu hasta DNA'sı, normal DNA ile karşılaştırıldığında çerçeve kayması mutasyonlu alleli belirlenemedi, bu da MDS klonlarında gerçekleşen çerçeve kayması *BAP1* mutasyonunun somatik orjinli olması ile uyumludur. MDS hastalarında bulunan *BAP1*'in katalitik mutasyonu, BAP1'in fonksiyon kaybının fare ve insanlarda benzer sonuçlara sahip olduğunu belirtmektedir (35).

Yukarıdakilere ek olarak, son zamanlarda *de novo* MDS'ye ve tek ek somatik anormallik olarak 20q'nin delesyonuna sahip olan hastalarda somatik heterozigot *BAP1* mutasyonu tanımlanmıştır. Hastaların yalnızca küçük bir kısmının (toplam 32) *BAP1* mutasyonları için sekanslaması yapıldı, yaşıtlarıyla kıyasladığındığında *de novo* MDS'li

hastalardan CD34+ hücrelerinde *BAP1*'in ekspresyonunda daha sık downregülasyonu belirlenmiştir (50).

Somatik *BAP1* mutasyonlu hasta da, fare modellerimizde görünen sitopeni ve multilinaj displazi ile benzer olan, sitopeni ve multilinaj displazi tedavisine cevap vermemesiyle sonuçlanmıştır. Mikroarray verileri incelendiğinde *BAP1* mRNA ekspresyonun sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında MDS hastalarındaki CD34 hücrelerinde ciddi olarak azalmıştır ve bu sonuç *BAP1*'in tümör süpressör olmasıyla uyumludur (35).

BAP1 kompleksi iki yönüyle göze çarpar. Birincisi ASXL1, CMML'de mutanttır; ASXL1 ve BAP1 mutasyonlarının aynı anda gerçekleşmediği varsayılırsa, ASXL1-BAP1 miyelodisplastik/CMML hastalığının baskılanmasında merkezi roldedir, aynı zamanda ASXL1'in sık BAP1 kaybının olduğu diğer tümör tiplerinde de mutant olabileceğini işaret eder. İkincisi BAP1 ile ASXL1'in *Drosophil*a'da sırasıyla ortologu olan Calypso ve Asx molekülleri PcG kompleksinin bileşenleridir ve *hox* gen ekspresyonunu muhtemelen histon deubikitasyonuyla kontrol ederler. Calypso'nun HCFC1 ile etkileşime giren motifi eksik olduğundan dolayı, BAP1-Calypso majör kompleksi insan ve *Drosophila*'da farklı şekildedir. BAP1 eksikliğinde hematopoetik hücrelerin HOX transkriptlerinde değişim gözlenmemiştir. Ayrıca, BAP1 ile bağlantılı HCFC-1 kompleksi proliferatif kontrolda önceden ilişkilendirilmiş HCFC-1 metiltransferaz kompleksinden farklı olabileceğini görülmektedir (45).

H2A'nın deubikitinasyonunda ASXL1 ile BAP1'in kesişimi ve myelopoiesisin regülasyonu merak uyandırmasına rağmen, bulguların çoğu *BAP1* ve *ASXL1*'in bağımsız fonksiyona sahip olabildiğini düşündürmektedir (50).

Myeloid maligniteler ve kronik miyelomonositik lösemi gibi fenotiplerde *ASXL1*'in sık mutasyonlarının temelinde BAP1 delesyonu gözlenmektedir, böylece BAP1-ASXL ekseninin miyelopoezde merkezi bir rolde olma ihtimali dikkat çekmektedir (50).

İnsanda kronik miyelomonosit lösemide (CMML) sıklıkla mutasyonu karşılaşılan ASXL1, BAP1 ile kompleks kurduğunda CMML'yi baskılayabilir (35).

Ayrıca, *ASXL1*'in lösemi ile ilişkili mutasyonları, wild-type ASXL1'e göre mutant formlarının azabilir stabilitesi ile sonuçlanabilir. *BAP1* ve *ASXL1* kaybı yoluyla

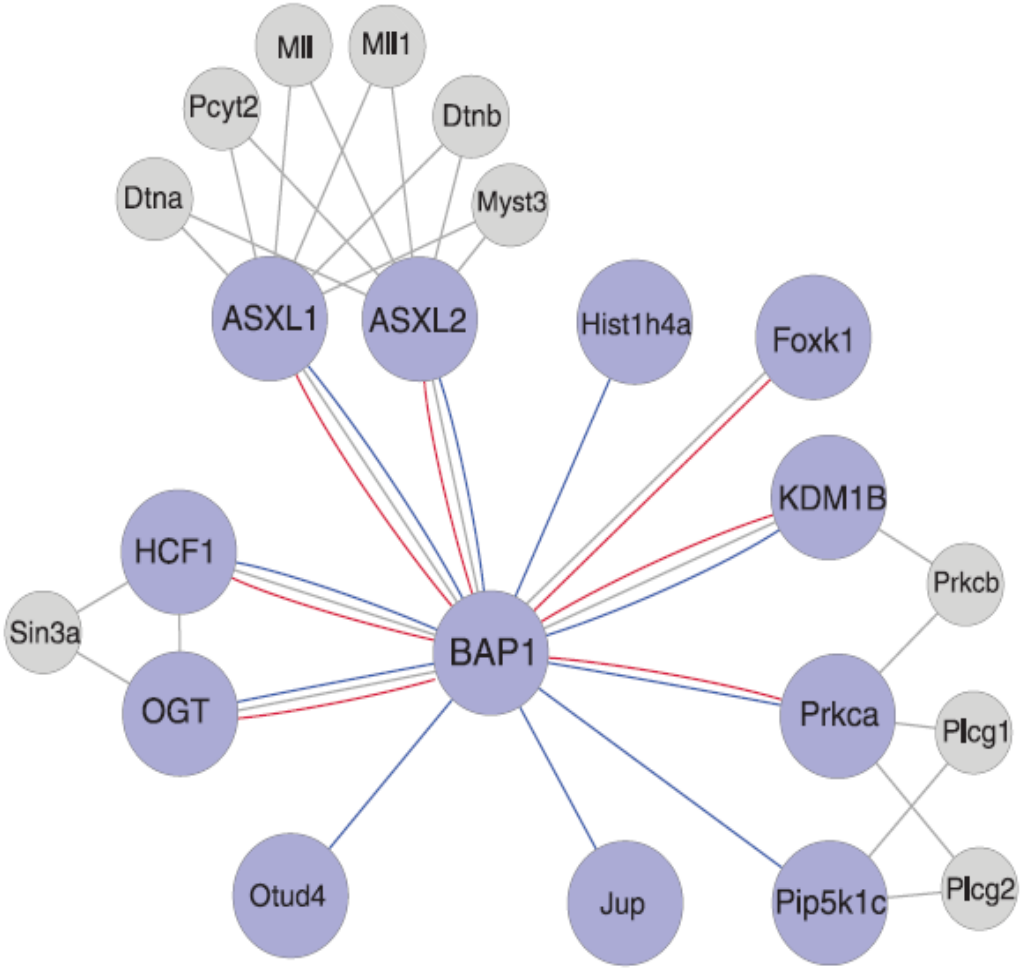
dönüşüm mekanizmasının araştırılması gelecekte hematolojik kanserleri tedavisine yeni terapötik yaklaşımla sonuçlanabilir (50).

BAP1 bulundurmayan farelerde ve insan tümörlerinde, sıklıkla yüksek agresiflikte Akut Myeloid Lösemi(AML) gelişmektedir (45). Farelerdeki Bap1'in sistemik delesyonundan kaynaklanan çarpıcı fenotip göz önüne alındığında, myeloid kanserlerdeki somatik *BAP1* mutasyonunun sıklığını tanımlamak amacıyla daha sonraki çalışmalar, *BAP1* mutasyonunun klinik bağlantısı ve downregüle edilen ekspresyonunun ve *BAP1*'in eksikliği ile birlikte gerçekleşen mutasyonların myeloid kanserlerin patogenezinde ki *BAP1*'in rolünü anlamamızda yardımcı olacaktır (50).

HCF-1 ve OGT kayıpları, BAP1'den yoksun hücrelerde görülmektedir. Bu sonuç ASXL1-BAP1'in, HCF-1 ve OGT ekspresyonlarının düzenlenmesinde temel rol aldığını düşündürmektedir. Yapılacak çalışmalarla, ASXL1/BAP1 kaybının etkisini anladıkça myeloid malignitelerin terapötik temeli sağlanabilir (34).

ASXL1'in somatik mutasyon ve delesyonları ilk defa Gelsi-Boyer et al. tarafından MDS ve CMML hastalarında rapor edilmiştir. *ASXL1* somatik mutasyonları aynı zamanda miyelofibrosisde de gözlendi ve MDS'den AML'ye dönüşmüştür. Myeloid lösemi hücrelerindeki *ASXL1* mutasyonları, *ASXL1* gen ekspresyonunun kaybıyla bağlantılıdır ve ASXL1 ekspresyonu ile H3K27 metilasyonu arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir (34). De novo MDS hastalarında CD34+ hücrelerinde downregüle *BAP1* ekspresyonu tanımlandı (37,50).

İnterlökin-7 ekspresyonu MDS'de azalmıştır ve hematopoetik hücrelerde düzenleyici olarak bilinmektedir. Bu nedenle BAP1 için hedef olarak aday reseptördür (35).



Şekil 2.28. Fare Beyin ve Dalağındaki BAP1 ile ilişkili proteinler (35).

Tablo 2.15. *BAP1* mutasyonunun tespit edildiği kanser türleri. CMML: Kronik Miyelomonosit Lösemi; DCIS: Tabii Vaziyette Göğüs Ucu Karsinom; MDS: Miyelodisplastik Sendrom; NEMMPs: Atipik Nevoid Melanoma Benzeri Melanosit. *:CMML'de (BAP1-ASXL1) kompleksi şeklindedir.

Somatik Mutasyon	**Referans**	**Germline Mutasyon**	**Refer.**
Akciğer (small-cell)	27	Malignant Mezotelyoma	31
Renal cell	27	Melanosit	32
Göğüs	27	Çoklu papüller melanosit	32
Melanoma	32	Nöroendokrin karsinom	37
Melanosit	32,66	Pankreatik kanser	37
İntrahepatik Kolanjiyokarsinom	34,75	Koroidal Uveal melanoma	41
ccRCC	39	Uveal Melanoma	41, 42, 44
Uveal Melanoma	42	Akciğer Adenokarsinom	44
Periton	52	Meningioma	44
Mezotelyoma	46,54	Mezotelyoma	46
Epitelsi Mezotelyoma	55	Cilt Melanoma	46, 56
Oküler ve Cilt Melanoma	56	Uveal Melanoma	51
Cilt melanoma	56	İyi Diferansiye Papiller Mezotelyoma	52
Atipik Spitz Tümör	58	Hepatik Kolanjiyokarsinom	52
Kolanjiyokarsinom	74	Epitelsi Malignant Mezotelyoma	55
Hepatosellüler Karsinom	76,77	Atipik melanosit proliferasyonu	56
MDS	35, 50	Oküler Melanoma	56
*CMML (BAP1-ASXL1)	35,45	DCIS,NEMMPs	56
		Bazal Hücreli karsinom	57
		Atipik İntradermal Tümör	58
		Atipik Spitz Tümör	58
		Clear Cell Renal Cell Karsinom	70

Tablo 2.16. *BAP1*'in kanser türlerinde somatik mutasyon dağılımı. LOH: Heterozigosite kaybı

Kanser türü	**Mutasyon Dağılımı**	**Referans**
Akciğer, Göğüs	Delesyon, LOH	27,37
Renal Cell	Delesyon, insersiyon, non-sinonim missense, splays, nonsense, truncat, LOH	27, 37, 39, 47, 70
Melanosit	Çerçeve Kayması, nonsense, missense, 3. Kromozom kaybı	32,66
MDS	Premature sonlanma, çerçeve kayması, heterozigot nonsense	35,45
ccRCC	Truncat, non-sinonim	39
Mezotelyoma	Çerçeve Kayması, Truncat Delesyon, Transisyon, Nonsense, missense, splays alan	43, 46, 52, 55
Ovaryum, pankreatik, baş ve boyun kanserlerinde	Delesyon	44
Oküler ve Cilt Melanoma	Missense, indel	56
Uveal Melanoma	Çerçeve kayması, missense, nonsense, indel, truncat, heterozigosite, delesyon, metilasyon, monozomi 3	42,61, 64
Kolanjiyokarsinom	Missense, nonsense, indel	74
İntrahepatik Kolanjikarsinom	Splays alanı, missense, indel.	75
Hepatosellüler Karsinom	Fonksiyon kaybı mutasyonlar, rearragement, truncat, çerçeve kayması, nokta mutasyonu	76,77
MDS	Heterozigot nonsense	35,45

Tablo 2.17. *BAP1'*in bazı kanser türlerinde somatik mutasyon bölgeleri.

Kanser türü	**Mutasyon bölgesi**	**Referans**
Melanoma	c.999-1050del	32
Uveal Melanoma	c.703 G>A	42
Uveal Melanoma	c. 1083-1093 delCCCCATCCCAC	42
Epitelsi Mezotelyoma	c.G605A	55
Malignant mezotelyoma	3p21.1 bölgesinde %42 delesyon	43
Melanosit	c.568_569delinsT	66

Tablo 2.18. *BAP1*'in bazı kanser türlerinde germline mutasyon bölgeleri.

Kanser türü	Mutasyon bölgesi	Referans
Çoklu papüller melanosit, uveal melanoma	c.1305delG (13.ekzon)	32
Melanosit, uveal melanoma	c.2057-2A>G (17.ekzon)	32
Uveal Melanoma	c.1806G>C	41
Uveal Melanoma	c.723T>G	41
Koroidal UM	c.758_759insA	41
Uveal Melanoma	c.1318-1319insA	42
Uveal Melanoma, Akciğer Adenokarsinom	c.799 C/T	44
Uveal melanoma	c.75ins (3.ekzon)	61
Uveal Melanoa	c.581-2A.G	62
Uveal Melanoma	c.299 T>C	64
Mezotelyoma	Ekzon 13 (c.1832delC)	46
Mezotelyoma	Ekzon 14 (c.2008-2011delTCAC)	46
Mezotelyoma, Göğüs veya renal	Ekzon 6-7 arasındaki bağ	46
Mezotelyoma, cilt	Ekzon 16'da C/G-T/A transisyonu	46
Hepatik kolanjiyokarsinom	c.2050 C>T	52
Hepatik kolanjiyokarsinom	c.1182C>G	52
Hepatik kolanjiyokarsinom	c.1882_1885delTCAC	52
Epitelsi Malignant mezotelyoma	1 ve 15. Ekzonda biallel delesyonu	55
Oküler melanoma	c.1899_1900ins5	56
Oküler melanoma, Göğüs Lipoma	c.1975A.G	56
Oküler melanoma	C.1831_1834del4	56
Oküler melanoma, Akciğer, DCIS	c.1153C.T	56
Cilt melanoma, NEMMPs	c.706_707insG	56
Cilt melanoma, NEMMPs	c.178C.T	56
Cilt melanoma, kolanjiyokarsinom	c.1153C.T	56
Basal hücreli karsinom	c.437+1G>A	57

2.4. *ANAPC7 (APC7)*

2.4.1. *APC* FONKSİYONU

Anafaz ilerletici kompleks veya siklozom(APC/C), mitotik çıkış ve anafazı başlatan ve önemli geçişleri kontrol eden nadir bir E3 ubikitin ligazdır ve temel proteindir (80-82).

APC/C ökaryotik hücre döngüsünde G1 fazını devam ettirir. APC'nin mitotik kontrol ve G2 fazı için gerekli olması, APC aktivasyonunu düzenlemede yetersizlik nedeniyle kromozom stabilizasyonunun bozulmasına neden olabileceği düşünülmektedir (81,83).

APC/C' nin ilk görevi hücre döngüsünü düzenlemektedir, akson büyümesindeki gibi mitozdan sonraki sürecede katılır (82). Büyüme faktör-β'nın sinyal yolağındaki dönüşüme katılan SnoN, APC'nin hedef molekülü olduğu gösterilmiştir (83).

APC/C ubikitin ligaz fonksiyonu hücre döngüsü düzenleyici rolünün yanı sıra, diğer hücresel süreçleri düzenleme fonksiyonu da olabilir. APC, ökaryotlarda mitotik çıkış ve homolog kromozomların ayrılmasında anahtar düzenleyicidir (84,85).

APC/C, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ubikitine bağımlı yıkımında ana görev alır. APC/C'nin karmaşık çoklu alt sınıf biçimi substrat-ubikitin konjugatlarının oluşumunda bağlanmayı kolaylaştırır ve tüm süreçte substrata özgünlük sağlanır. APC, 26 S proteozom tarafından yıkım için hücre döngüsü regülatörlerini hedef alır (85,86).

E3 ubikitin ligaz fonksiyonu bulunan APC/C, protein substratlarını ubikitinleyerek 26S proteozom yoluyla yıkım için ubikitinler, hücre döngüsünde mitoz ve sonraki G1 fazı boyunca ilerlemeyi koordine eder (89).

Arabidopsis'de(pirinç ve kavak) bazı APC altüniteleri ve aktivatör genlerinin, hayvanlarla karşılaştırıldığında bitkilerde gen dublikasyon olaylarında karşılaşılmaktadır (86). İnsan APC yapısı *Saccharomyces cerevisiae*'nin APC homoloji modeli ile uyumludur ve endojen insan APC ile kıyaslandığında TPR (Tetratricopeptid tekrarları) lobunun yapısal esnekliği ile ilgili hiçbir kanıt görülememiştir (87).

Omurgalılarda APC'nin yapısal olarak TPR altünitesi ile ilişkili en yaygın dört tane bileşeni vardır. Üç TPR altsınıfının ortologu *Drosophila*'da tanımlanmıştır. *Drosophila* APC olan Apc3 (Cdc27 olarakta bilinmektedir) gelişimde temel rol alır ve fonksiyonundaki bozulum mitotik siklin birikimine ve metafaza benzer sonlanmayla sonuçlanır (85).

APC'nin TPR içeren alt ünitelerinin protein-protein etkileşimleri gibi benzer fonksiyonlara sahip olduğu tahmin edilmektedir. APC'nin TPR içeren alt sınıflarındaki herhangi bir yapısal eksiklik, oluşum ve fonksiyonunu anlamamızı engellemektedir (82).

APC üzerinde tanımlanan 43 fosforlanma alanının en az 34'ü mitoz bölünmeye özeldir, 32 alanda Apc7'ninde dahil olduğu TPR alt üniteleri ve Apc1 kısmen toplanmıştır ve diğer birçok ubikitin ligazlar gibi, APC küçük RING finger alt ünitesini içerir (80,81).

Protein Kinaz A (PKA), APC aracılı proteolizisi negatif şekilde düzenler fakat APC'nin PKA yoluyla direk olarak fosforlanıp fosforlanmayacağını bilinmemektedir. *İn vitro* olarak PKA fosforlanabilir ve insandaki APC yapısını inhibe edebilir. Mitotik APC üzerinde fosfatlamış üç tirozin rezidüleri tanımlanması, mitoza özel tirozin kinazlar tarafından bu kısımların oluşturulup oluşturulmadığının belirlenmesi ilgi çekici olacaktır (80).

Mitozda temel APC hedefleri anafaz inhibitörü sekurindir (81). Ayrıca SnoN gibi APC'nin hedef molekülleri onkogen olabileceği raporlanmıştır ve bazı hedef molekülleri kolon, göğüs kanser dokularında upregüle şekildedir. Bu nedenle APC'nin düzenlemesindeki yetersizlik tümör oluşumuyla ilişkili olabilir (83).

Normal hücre döngüsü sürecinde APC/C'nin kritik rollerinin elde edilmesi, aktivitesindeki düzenlemenin bozulması muhtemelen tümör gelişimine katkıda bulunabilir. APC/C'nin altünitelerindeki genetik değişim insan kanserlerinde nadir görülmüştür, fakat substrat seviyesindeki artış birçok kanser türünde gözlenmiştir. Bu durum genetik değişimden ziyade APC/C'nin anormal düzenlenmesinin tümör gelişimine neden olabileceğini düşündürebilir. Bu fikirle uyumlu olan APC/C aktivitesini düzenlemede görev alan kontrol noktaları birçok kanser hücre hattıyla ilişkili olmasıdır (84).

APC'nin aynı zamanda mitotik iğ ipliklerinin mikrotübülleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bazı yayınlara göre APC bileşenlerinin kaybı ölümü tetikleyebilir. Kromozoma bağlanan iğ ipliklerindeki denetimin bozulması hücre ölümüne neden olduğu halde, p53 mutasyonu ile birleşen kanser hücreleri mitotik kontrole engel olur ve anormal mitoz yüzünden hücre ölümü ortaya çıkar. Bu durumunda, APC regülasyonundaki anormalliğin programlanmamış mitoz süreci indüklediğine

inanılmaktadır. Ek olarak, p53 yoluyla transkripsiyonu düzenlenen APC/C'nin DNA hasarına karşı genom bütünlüğünü korumada APC/C-CBP/p300 etkileşiminde olası rolünü düşündüren veridir (80, 83, 84).

Tablo 2.19. APC'nin rol aldığı fonksiyonlar

Fonksiyonel işlem	**Referans**
Anafazı başlatır.	80
Mitotik çıkışı ve önemli geçişleri kontrol eder.	80,81
Mitozdaki hedefi sekurindir.	81
E3 Ubikitin Ligaz aktivitesine sahiptir.	82
G1 fazı devamını sağlar ve G2 fazı için gereklidir.	81,83
Hücresel süreci düzenlemede fonksiyonel olabilir.	84
Homolog kromozomların ayrılmasında rolü vardır.	85
DNA hasarına karşı genom bütünlüğünü korumada rolü olabilir.	84

2.4.2. APC, CHD1 VE CDC20 İLİŞKİSİ

APC aktivasyonu, Cdc20 (Hücre Bölünme Döngüsü 20)'ye bağlanmasına ve APC fosforilasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. CDC20 ve CDH1 (Cadherin Tip 1)'in karboksil ucu APC aktivasyonu için temel faktördür (80,81).

İn vitro ortamda CDC20 ve CDH1'in karboksil ucu, TPR alt ünitelerinden APC3 ve APC7 ile bağlanır. Substrat ubikitinasyonu için, TPR alt üniteleri APC3 ve APC7'nin C ucu vasıtasıyla etkileştiği CDH1 ve CDC20 aktivatör proteinleri gerekmektedir (81).

APC' nin Cdc20 bağlanmasıyla gerçekleşen ubikitinasyon mitozu kontrol etmede kilit rolü vardır. APC-Cdc20, kromozomlara bağlanan iğ ipliği mikrotübüllerini (spindle microtubules) lokal olarak düzenleyebilir. Mitozda TPR altünitelerinin fosforilasyonu APC'nin TPR altüniteleri ve Cdc20 arasındaki etkileşimi direk olarak etkileyebilir (80).

2.4.3. APC -SİKLİN B1 İLİŞKİSİ

Fosfor antibadileri kullanıldığında APC fosforilasyonu, siklin B1'i çekirdeğe alımı esnasında profazı başlatabileceğini işaret etmektedir. Fosforlanan APC prometafazda, sitozol boyunca görülen siklin B'nin ubikitinasyonu başlatıldığı sentrozomda birikir ve mitotik çıkışta kaybolur. Bu gözlemler APC aktivasyonunun geç profaz hücre

çekirdeklerinde yer alan Siklin bağımlı kinaz-1 (Cdk1) yoluyla başlatılabileceğini belirtmektedir (80).

İn vivo koşullarda Siklin bağımlı kinaz-1, birçok APC fosforilasyon alanında üretilebilir ve *in vitro* koşullarda bu alanlarda APC'nin ubikitinasyon aktivitesini uyarır. Diğer kinazlarda APC fosforilasyonuna katkı sağlarlar (80).

Siklin B1'in göğüs kanserinde G1 fazında da ekspresyonuna dair raporlamalar hücrenin anormal mitotik hücre döngüsünün varlığını devam ettirebildiğini düşündürmektedir (83).

Erken mitozda APC inhibitörü Emi1'in yıkımı, uygun siklin A ve B'nin yıkımı için gerekli olabileceğini raporlanmıştır. Bu nedenle profazda Emi1'in varlığı APC fosforilasyonu ve siklin A yıkımının başlaması arasında gecikmeye neden olabilir. Bunun yanında, kromozomların bağlandığı iğ ipliklerinin kontrol edilişi metafaza kadar siklin B ve sekurin ubikitinasyonunu seçici olarak inhibe ettiğinden dolayı, APC fosforilasyonu *in vivo* ortamda siklin B ve sekurin yıkımında yeterli değildir fakat gereklidir. Fosforlanmış APC'nin iğ ipliği kutuplarında arttığı gözlenmiştir (80).

2.4.4. APC, CBP ve p300 İLİŞKİSİ

CBP (CREBBP) (cAMP'ye cevap elemente bağlanan protein) ve E1A'ya bağlanan *p300 (EP300)* histon proteinleri modifiye eden enzimleri kodlayan genlerdir. CBP ve E1A'ya bağlanan p300 (EP300), hematopoez ve gelişimde görev olan birbirine oldukça benzer transkripsiyonel koaktivatörlerdir. Histon proteinlerini modifiye eden enzimleri kodlar. Transkripsiyon faktörleriyle, asetillenen (actylate) histonlarla ve diğer proteinlerle zaman zaman etkileşirler. İnaktivasyonlarına neden olan mutasyonları çeşitli kanserlerde yer alır. *CBP* ve *p300*'ün birbirine bağlı olmayan mutasyonları tümör baskılanmasında haploinsufficiency anlamına gelen genellikle heterozigot şeklindedir. *CBP* ve *p300* mutasyonları birkaç lenfomada, az sayıdaki lenfoid lösemi ve epitelyal karsinom hastasında tanımlandı. Her iki proteindeki mutasyon sıklıkla histon asetilasyonu ve diğer temel proteinleri katalizleyen domainlerinde bulunmaktadır. *In vitro* çalışmalarla, CBP/p300 mutant hücrelerde P53 ve BCL6 proteinlerini asetilleme kabiliyeti azalmış olmasının yanı sıra H3K18 asetilasyonunda azaldığı gösterilmiştir (34).

CBP ve *p300* mutasyonlarının onkogenik mekanizmaları tam olarak aydınlatamamıştır. CBP ve p300'ün kanserle bağlantısı uzun zaman önce bulunmasına rağmen kanser biyolojisindeki mutasyon etkileri hala açığa çıkmaktadır. Birçok fonksiyonları ve çeşitli etkileşimleri olmasından dolayı birçok mekanizmada farklı mutasyonların etkilerinde rol alabilir, bazılarıda epigenetik mekanizmalar yoluyla gerçekleştirmeyebilir.(34).

Hem CBP hem de p300, aktif APC/C E3 Ligaz kompleksiyle bağlantılıdır. APC/C'nin CBP ve p300 transkripsiyon koaktivatörleriyle APC5 ve APC7 altünitesi yoluyla etkileşir. Bu etkileşimin fonksiyonel önemi, hücre döngüsü sürecini ve transkripsiyonu düzenleme gösterilmiştir. Bunun yanı sıra APC/C-CBP/p300 komplekslerinin büyümenin düzenlemesinde farklı rolleri tanımlanmıştır (84,89).

CBP/p300'ün transkripsiyonel koaktivatör fonksiyonu, sayısız spesifik transkripsiyon faktörlerini ve histonları hedef alan asetil transferaz aktivitesine ve temel transkripsiyon mekanizmalarına sahip çeşitli transkripsiyon faktörlerini bağlama özelliğine büyük oranda aracılık eder (84).

CBP ve p300, sayısız transkripsiyon faktörleri ve tümör süpressör gen ürünleriyle etkileşimi yoluyla çeşitli hücrelerdeki fonksiyonların ayarlanmasında görev alması APC/C'ninde bu süreçlerde bulunabileceğini düşündürmektedir (89).

APC5 ve APC7, protein-protein etkileşimi domainleri sayesinde CBP ve p300 koaktivatörleriyle direk olarak etkileşir. Bu etkileşim CBP/p300 asetiltransferaz aktivitesini uyarır ve CBP/p300'e bağımlı transkripsiyonun etkisini artırır (89). İki endojen promotor (*p21 ve Cdc6*), APC/C holoenzimini APC5/7-CBP/p300 etkileşimi yoluyla promotorleri harekete geçirdiği ortaya çıkmıştır ve böylece APC/C, CBP/p300'ün promotor affinitesinden etkilenmeden promotor bölgesinde histon H4 asetilasyonunu düzenlemektedir. Aslında APC/C, lisin 1499'un otomatik asetilasyonunu tetikleyerek in vitro durumda p300'ün asetiltransferaz aktivitesini hızlandırmaktadır. Bu sonuçlar APC/C'in transkripsiyon aktivitesi ve histonları hedef alan CBP/p300'ün asetiltransferaz aktivitesini ilerleten tatmin edici bir model olduğunu düşündürmektedir (84).

Hücrelerde CBP yetersizliği, eş zamanlı olmayan kültürlerde G2/M fazında hücrelerin birikimine neden olur (84). CBP'nin APC/C fonksiyonunda gerekli olduğu saptanmıştır; özellikle RNA-aracılı interferans yoluyla CBP geninin inaktivasyonu E3 ubikitin ligaz

aktivitesini ve mitoz boyunca hücrenin ilerlemesini zayıflatır (89). RNAi yoluyla p300 olmadan sadece CBP'nin azaltılması APC/C ubikitin ligaz aktivitesini siklin B1 yönünde azaltır ve çeşitli substratlarının hücrede seviyesini artırır (84).

CBP ve APC/C'nin, metafaz ve anafaz esnasında kromozomların bağlandığı iğ ipliği ve kutuplarında beraber saptanmıştır. p300'den bağımsız CBP spesifik mekanizmanın mitozun son veya orta evresinde APC/C fonksiyonunu düzenlediğini ve benzer senaryonun belirlenmemiş olsada G1 fazı gibi diğer döngü fazlarında da gerçekleşebileceğini düşündürmektedir (84).

Turnell ve arkadaşları tarafından adenoviral E1A proteininde CBP/p300 kompleksi ile etkileşen motifler ve hem APC5 hem de APC7 altüniteleri arasında iki sekans bölümü tanımlanmıştır. APC5 ve APC7, CBP/p300 kompleksine bağlı olacak şekilde E1A aracılı dönüşümünü baskılar, bu durum APC/C'nin bu bileşenlerinin hücresel dönüşüm esnasında hedef olabileceğini işaret etmektedir (84,89).

APC5 ve APC7, in vitro ortamda CBP/p300'e bağlanmak için E1A ile rekabet halindedir. Mutant olmasa dahi CBP/p300 ile etkileşemeyen APC5/7, ve E1A aracılı hücresel dönüşüme karşı koyabilir. Sonuçta APC/C-CBP/p300 etkileşimdeki zarar E1A aracılı hücresel dönüşümde kritik yere sahiptir (84).

APC5 ve APC7, E2F1/DP1 kompleksi transaktivasyonunu CBP/p300'e bağımlı olarak artırır. Hem APC5 hem de APC7 interfaz hücrelelerinde CBP ile yan yanadır (89).

APC5/7-CBP/p300 işbirliği hücre döngüsü durumuna göre etkilenmediğinden dolayı, APC/C, CBP/p300 koaktivatör fonksiyonu yoluyla hücre döngüsüyle ilişkili olmaksızın hareket edebilir (84).

Tablo 2. 20. Siklin B1, CBP, p300 Fonksiyonları ve APC ile ilişkisi.

Siklin B1	**Referans**
Siklin B1'in çekirdeğe alınmasıyla APC profazı başlatabilir.	80
Cdk1, APC aktivasyonunu profazın sonuna doğru hücre çekirdeklerinde başlatabilir.	80
Cdk-1, APC'nin ubikitinasyon aktivitesini uyarır.	80
CBP ve p300	**Referans**
Transkripsiyonel koaktivatördür.	84
Asetil transferaz enzimiyle histon ve transkripsiyon faktörlerini hedef alır.	84
APC ile hücre döngüsü sürecini ve transkripsiyonu düzenlemede etkilidir.	84
APC ile kompleksi büyümenin düzenlenmesinde farklı rolleri tanımlanmıştır.	89

2.4.5. ANAPC7 (APC7)

1998 yılında Yu et al. APC'nin altünitesini APC1, APC2, APC3, APC4, APC5, APC6, APC7 (ANAPC7 olarak da adlandırılır) ve APC8 olmak üzere sekiz proteinden oluştuğunu belirtti (88). 2003 yılında Vodermaier et al. APC'nin altünite sayısını en az 11, 2008 yılında Han et al. en az 13 olduğunu yayınladılar (81,82). 2013 yılında Zhang et al. göre İnsan APC yapısı en az 19 alt ünitenin birleştirildiği 14 farklı proteinden oluşmaktadır (87).

Kırmızı ve yeşil algler ile basit organizmalarda yer alan APC7 haricindeki diğer APC alt üniteleri kodlayan gen takımının tamamı bitki ve hayvanlarda bulunduğu düşünülmektedir(86).

Keşfedildiğinden itibaren omurgalılarda bulunan APC, birçok alt ünitesi üzerinden mitotik olarak fosforlanabileceği bilinmektedir (80). APC7, TPR çok sayıda kopyasını barındırmaktadır (88). APC3 ve APC7'nin TPR domainleri, APC'ye CDH1'in katılımını sağlar. APC3 ve APC7, C ucu vasıtasıyla etkileştiği proteinleri bağladığı TPR proteinlerinin üçüncü sınıfını temsil ediyor gibi görünmektedir (81).

Apc7, omurgalı APC sınıfında TPR içeren tek alt birimdir. Diğer TPR alt sınıfları gibi Apc7'nin iki kopyası her bir APC molekül yapısında mevcut durumdadır. İlave olarak Apc7, Apc3 sekans seviyeleri ile yüksek oranla bağlantılıdır. Sekans analizleri Apc7'nin N ucu domaini gibi Apc3'ün N ucundaki TPR içermeyen parçasının hidrofobik yüzü olduğuna işaret etmektedir (82).

Apc7'nin diğer TPR alt ünitelerine benzer şekilde 9-15 TPR motifi içerdiği tahmin edilmektedir. Apc7'nin N terminal domaini hücre döngüsünü düzenlemede fosforilasyon alanlarına sahip olduğu raporlanmıştır (82).

Mayalarda knock down *Apc6 (Cdc16), Apc8 (Cdc23), Apc7* genleri karşılaştırıldığında *Apc7*'nin fonksiyon kaybı diğerlerinin tersine anomaliliklerin artmasına neden olmamıştır. Kromozom ayrımına ve anafaz gecikmesinde rol oynamasına rağmen knock down *Apc7* hayvan ve fareler canlı ve fertildir. Buna rağmen Apc7 altünitesi, Apc7'nin fonksiyonel rolünü sınırladığı sanılan Apc8/Cdc23 ile genetik etkileşim göstermektedir. Bununla birlikte bu bilgiler yapısal olarak bağlantı olan TPR altünitelerinin Apc fonksiyonuna farklı biçimde katkı sağladığını düşündürmektedir (85).

Hem Knockout Vesiküler glutamat transporter 1 (VGLUT1), hem de knockout Hafif kronik stres (CMS) fare modellerinde hücre proliferasyonunun hızlandıran Anapc7 geni downregüle olmuştur (90).

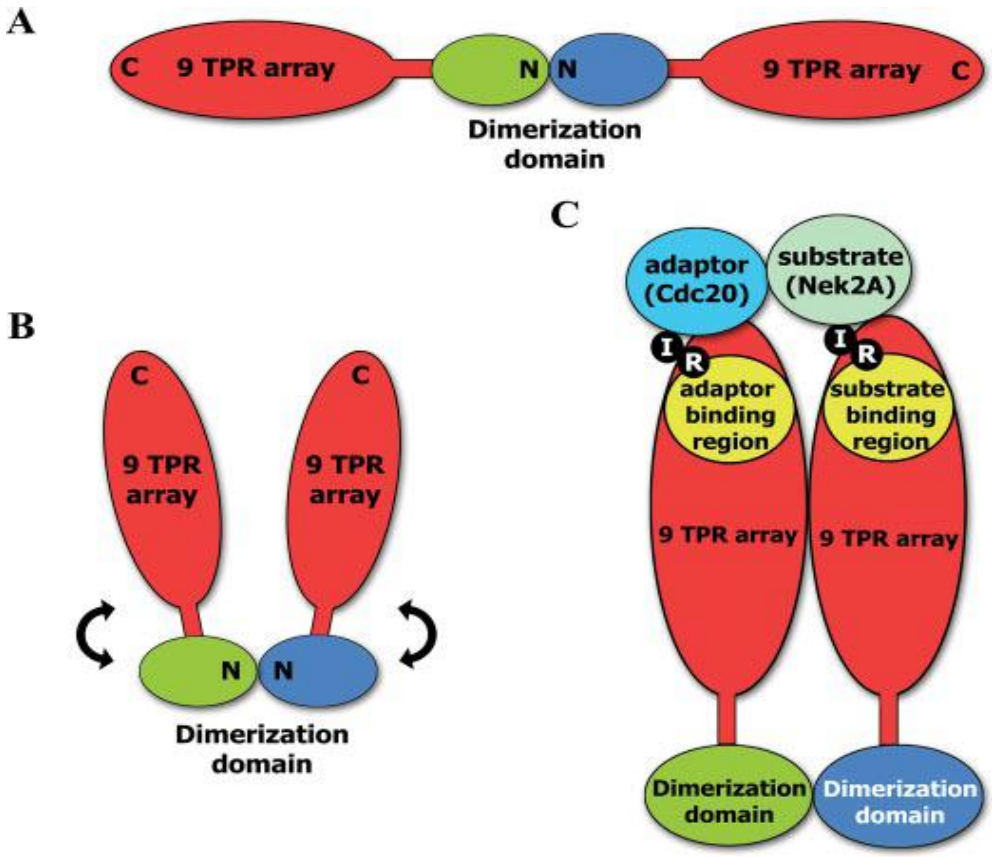
nApc7 (1-147 residülerdeki N ucu parçası) TPR sekansı içermemesi rağmen, nApc7'nin yapısı TPR'ye benzer motif olarak kabul edilir ve benzersiz bir dimerizasyon ara birimine sahiptir. nApc7'nin yapısı ve geçmiş çalışmalara bakıldığında modelimiz tam boyut Apc7 için varsayılan homodimerik yapısı önermektedir. Bu modelle TPR içeren alt sınıfların kendi arasındaki ilişkilerini ve APC'nin TPR içeren alt sınıflarının substrat ve adaptörlerine bağlanabileceği düşünülmektedir (82).

nApc7'nin yapısal formu tipik TPR proteininden farklıdır, hidrofilik residüleri olarak addedilen kısım TPR'ye benzer motif paketine katılmıştır. İki nApc7 monomeri kristalize yapıda iki kat simetri ile dimer olarak paketlenmiş ve solüsyon içinde dimer şeklinde görülmüştür. nApc7'nin N terminal yoluyla homodimerizasyonunun ilk örneğidir (82).

TPR motiflerinin OGT gibi birçok TPR içeren proteinler arasındaki ilişkiye aracılık ettiği bilinmesine rağmen Apc7'nin N terminal dimerizasyonu motifiyle gerçekleşen homodimerizasyona TPR protein N ucunun aracılık etmesi ilk örnektir (82).

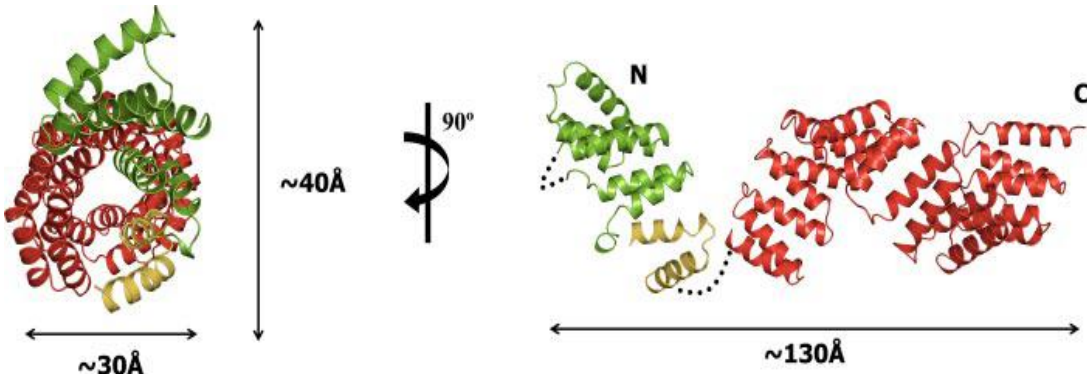
nApc7 ve C terminal TPR'ler OGT'nin TPR tekrarlı domainleri temel alınarak oluşturulan, orta bölgesi kusurlu ve esnetilebilir (işaretli alan, 169-200 residüleri) tam boyut Apc7 modeli, N terminal dimerizasyon domainleriyle etkileşime aracılık etmektedir. TPR domainlerinin N ve C terminalleri arasında olan esnek bölge yapısı ya uzatılmış formda ya da kıvrılmış U şeklinde homodimerizasyonu sürdürebilir (82).

Son çalışmalar Apc7'nin 416-435 (7. TPR) ve 362-368 (5.TPR) residülerinin CBP/P300 ile etkileşimi gösterilmiştir. Birkaç çalışmada substrat ve adaptörlere bağlanabilen bölgeleri içerdiğini göstermektedir, bu substrat (Nek2A) ve adaptörler (Cdc20) eş zamanlı olarak APC ile de etkileşirler. Bununla birlikte Apc7'nin homodimerik yapısı, uzatılmış dimer modelinden ziyade bizim U şeklindeki dimer modelimizle daha uygun olduğunu akla getirmektedir (82).



Şekil 2.29. Apc7 dimerleri için varsayılan tam boyut model. Dimer yapısının iki tipi tasvir edilmektedir. A. Dimerleşen Apc7'nin elongasyon modeli B. U-kıvrım yapıdaki

dimerleşen Apc7. C. Varsayılan Apc7 dimerinin şematik şekli, C-ucu TPR domainlerine substrat ve adaptörlerin nasıl bağlantı gösterilmektedir, Küçük ve büyük loplar sırasıyla TPR domainin N ve C ucunu temsil etmektedir (82).



Şekil 2.30. İnsanda bulunan Apc7'nin tam boyut modeli. 9 adeti kırmızı, 1 adeti sarı renkle gösterilen OGT temel alınarak hazırlanan yapılandırma. N ve C ucu TPR domainleri arasındaki alan 169-200 residüden oluşan kusurlu ve esnetilebilir işaretli alandır (82).

Sonuç olarak Apc7'ye özgü esnetilebilir homodimerik yapısı önceki bulgularla uyumludur. Önerdiğimiz U şeklindeki model *in vivo* ve *in vitro* ortamda geçerli olmasına rağmen, nApc7 için verilerimiz APC' de yer alan TPR içeren alt ünitelerinin yapısal şekildeki ilk delilini sağlamaktadır (82).

IL-17 sinyali iki reseptör (IL-17RA ve IL-17RC) altünitesinin desteklerini gerektirir. IL-17RC, IL-17 aracılığıyla sinyallerde temel rol alır, stoplazmik domainleri eksik olan mutant IL-17RC fonksiyonel değildir. Hem IL-17RC hem de IL-RA ile etkileşen adaylardan biri APC7'dir (91).

siRNA ile sessizleştirilerek Knockdown APC7'nin IL-17 üzerinde belirlenebilen pozitif veya negatif etki görülmemiştir. Fakat, APC7 ile etkileşen AnapC5 IL-17RA ve IL-RC ile bağlanabilme özelliğine sahiptir. AnapC5'in, IL-17 sinyalini engelleme yeteneğinin A20 *(TNFAIP3)* aracılığıyla düzenlenebileceği yorumlanmıştır; fakat APC7, A20 *(TNFAIP3)* ile ilişkili değildir (91).

Tablo 2. 21. APC7'nin rol aldığı fonksiyonlar

Fonksiyonel işlem	Referans
CDC20 ve CDH1'in C-ucu APC7'ye bağlanarak APC aktivasyonu sağlanır.	81
Omurgalılarda TPR içeren tek APC alt birimidir, çok sayıda TPR kopyası barındırır.	82,88
APC7, in vitro ortamda CBP/p300'e bağlanmak için E1A ile rekabet halindedir.	84
Kromozom ayrımında ve anafazın gecikmesinde rolü vardır.	85
APC, CBP/p300 ile APC7 altünitesiyle etkileşime girer.	89
CBP/p300 kompleksine bağlı olacak şekilde E1A bağlantılı dönüşümü baskılar.	89

2.5. REAL-TİME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON (RT-PCR)

Eş zamanlı gerçekleşen ölçülebilen PCR (Real Time kantitatif PCR), floresan sinyal üretiminin ölçümüdür ve amplikon sentezi PCR esnasında ölçülür. Real Time revers transkripsiyon PCR (real time RT-PCR), biyolojik örneklerin düşük miktardaki mRNA ekspresyonunu ölçmede kullanılan tekniktir. Ölçülen mRNA miktarını belirlemenin yanı sıra yüksek dinamik aralığı, verimliliği, hassasiyeti bu tekniğin faydalarındandır. Gelişmiş özgüllüğü özellikle immünolojik araştırmalarda kullanılır ve orijinal transkriptin farklı splays varyantlarından oluşan proteinin analizini güvenilir ölçüm için tek hassas tekniktir. İlk olarak örneklerden izole edilen RNA kalıp olarak kullanılır, RNA'dan komplementer DNA (cDNA) üretilir ve Real Time PCR ile cDNA'lar ölçülerek sonuca ulaşılır (92, 93, 94).

Real Time PCR'da floresan sinyalin üretiminde kullanılan iki temel teknik vardır: Birincisi, çift zincirli DNA'ya bağlanabilen SYBR Green gibi boya içerir. Bu teknikte sentezlenen herhangi bir amplikona boya bağlanarak sinyal üretilir ve cihazlarla ölçüm yapılır. Daha yaygın kullanılan ikinci teknikte, annealing ve extension fazı esansında hedef sekansın hibritlendiği sekansa spesifik floresan problar kullanılır. Bu probda FRET (Floresan resonans enerji transfer) teknolojisi kullanılır ki bununla probun 3' ucunda örtücü (quencher) ve 5' ucunda raportör(reporter) olmak üzere 2 ayrı floresan boya bulunur; 5' ucundaki boya prob bütünlüğünü koruduğunda 3' ucundaki boya

tarafından etkili şekilde örtülür. PCR esnasında prob denaturasyon aşamasından sonra hedef sekansı hibritleyebilir. Floresan sinyal primer uzaması esnasında oluşur. PCR esnasında, forward ve reverse primerler hedef nükleik asidinde bulunan bağlanma alanlarını hibridize eder ve Taqman probları primerler arasında hedef sekansını hibritler. PCR primerleri her bir amplifikasyon döngüsünün uzama aşamasında primerlere dNTP eklenerek yeni zincir oluşumuyla, zincirin uzaman kompleksinin biri etiketlenen probun 5'ucuyla karşılaşacaktır. Çatal benzeri yapısı oluştuğu zaman *Taq* DNA Polimeraz prob sekansı karşısına yerleşir ve prob *Taq* DNA Polimerazın 5' nükleaz aktivitesi tarafından parçalanarak raportör boya ile örtücü boyanın ayrımına neden olur ve sonuçta raportör boyadan floresans artışı olur. Bu süreç tüm probun uzaklaştırılması ve amplikonun tamamlanmasına kadar devam eder. Bu homojen tekniğin yapılışı kolaydır (94).

Real Time kantitatif PCR (RTQ-PCR)'da, iki ayrı standart metod hedef genlerin miktarını belirlemede kullanılır: 1. İnternal standart olarak Housekeeping genlerin transkriptleri kullanılarak rölatif kantitasyon. Housekeeping genler bütün hücre tiplerinde bulunur ve hücre yaşamının devamı için şarttır. Albümin, aktin, tubulin gibi genler housekkeping sınıfındadır. Bu genlerin mRNA sentezi çeşitli dokularda güvenilir ve stabildir. Rölatif kantitasyonda referans gen başka bir genle transkript miktarına göre analiz edilir. Kontrol ile tedavi grubunun hedef transkriptlerindeki PCR sinyalleriyle bağlantılıdır. 2. external standart ve bilinen konsatrasyonda hedef genlerin sekans klonlarının kullanılmasıyla mutlak(absolute) kantitasyon. Mutlak kantitasyonda hedef genin dilusyon aralığının adlandırılması gerekir, genellikle standart eğrideki PCR sinyalleriyle bağlantılı olarak ve kopya numara sayısı girilerek tespit edilir (95-97).

Reaksiyonlar, hedef amplifikasyonunun ilk belirlendiği noktada ya da PCR döngüsü tarafından özellikleri belirlenir. Bu değer genellikle ''eşik değeri döngüsü **(C t)**'', ''karşılaşma noktası(CP)'' veya ''sıçrama noktası (TOP)'' olarak adlandırılır. Ct, amplikasyon eğrisi ile eşik döngüsü çizgisinin keşişimidir. Bu değerde zemindeki floresan sinyallerine göre floresan yoğunluğu daha fazladır. (98, 99, 100).

RT-PCR dört aşamadan gerçekleşebilir: 1. Çizgisel düzlem (linear ground) fazı, 2. Matemaksil üsle tarif edilen faz öncesi (early exponential phase), 3. Matematiksel üsle tarif edilen faz (exponential phase), 4. Plato (plateau) fazı (98).

Linear ground fazda (genellikle ilk 10-15 döngüde) her bir döngüde floresan emilimi zemin çizgisinin üzerine çıkmaz ve istatistikte temel alınan çizgi(baseline) bu zamanda hesaplanır. Early exponential fazda, floresan miktarı eşik değerine ulaşır ve eğri zemin çizgisinden yüksektir. Yükselmeye başladığı döngü ABI Prism® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) şirketinde **Ct** veya LightCycler® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) şirketinde ‘’ karşılaşma noktası ’’ (CP) olarak adlandırılır. Bu değer, kalıpdaki başlangıç kopya sayısı temsil eder ve deney sonucunda hesaplama için kullanılabilir. Log-Linear fazda PCR, ideal şartlarda her döngüden sonra ürün artışıyla birlikte optimal amplifikasyon periyoduna ulaşır. Son olarakta Plato (plateau) fazda reaksiyon bileşenleri tükenir ve floresan yoğunluğu veri hesaplamada kullanılamaz (98).

Karşılaştırma güvenirliğinin tam olması için iki genin amplifiye olması gerekir. Bu popüler metod için bu bilgiler yeterlidir. Aslında alternatif olarak, birden fazla referans genin kullanımına izin verecek şekilde farklı amplifikasyonları doğrulamada daha genel kantitatif modeller geliştirilmiştir (100).

PCR etkinliğini anlamamızı sağlayan kalibrasyonlar; deney güvenirliğini, anatilik hassasiyeti, kopya sayısı tayinini, hızlı ve basit bir şekilde sağlar. Amplifikasyon etkinliği log-linear fazdaki kalibrasyon eğrisinin eğimi ile belirlenebilir. Formül aşağıdaki gibidir (100).

$$E = 10^{-\left[\frac{1}{eğim}\right]} - 1$$

E: Amplifikasyon etkinliği

Amplifikasyon etkinliği ile ilgili diğer formül şu şekildedir (97):

$$E = 10^{-\left[\frac{1}{eğim}\right]}$$

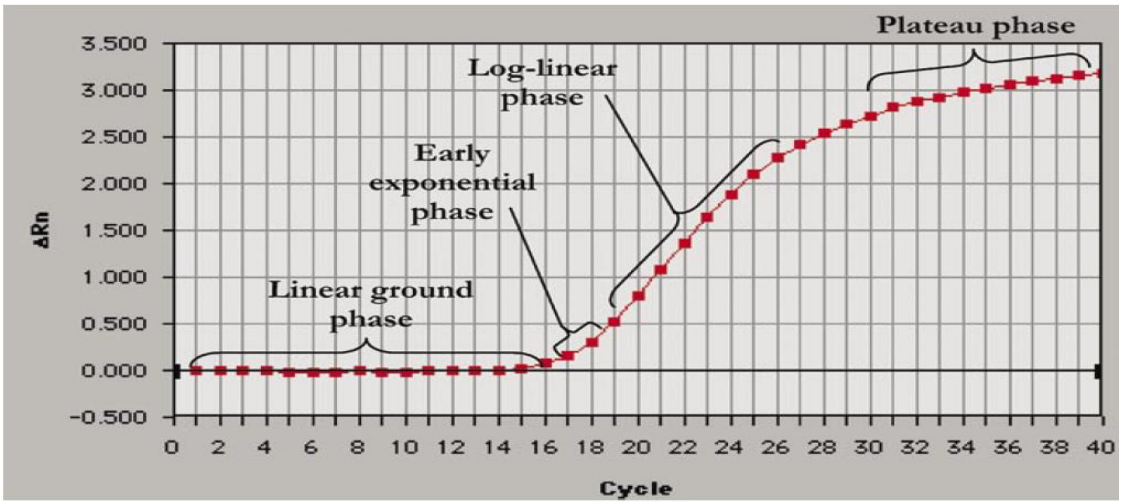
Negatif kontrol (NTC), veri tespitinde çalışma şartlarını anlamak için her bir çalışma düzeneğinde yer almalıdır. Cq değerinin 40’dan yüksek olması kalitenin düşüklüğü şüphesine neden olur ve genellikle rapor oluşturulamaz (100).

Rölatif kantitasyonda kullanılan hesaplama Pfaffl olarakta bilinir (97).

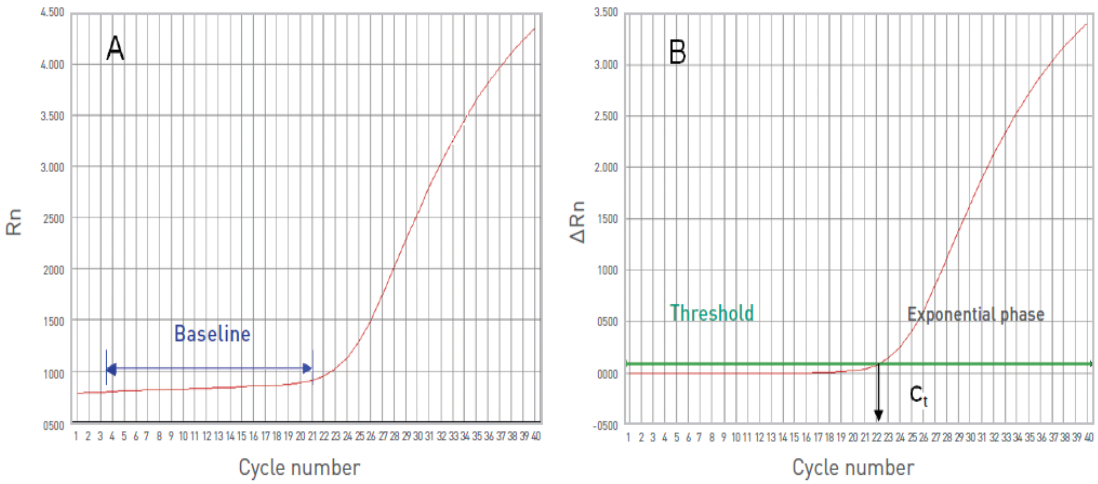
$$\textbf{Pfaffl metodu:}\ \frac{(E_{hedef\ gen})^{\Delta Ct_{hedef\ gen(kontrol-hasta)}}}{(E_{referans\ gen})^{\Delta Ct_{referans\ gen\ (kontrol-hasta)}}}$$

$\Delta Ct_{referans\ gen}$ = Referans genin kontrol grubuna ait Ct değeri – Referans genin hasta grubuna ait Ct değeri

$\Delta Ct_{hedef\ gen}$ = Hedef genin kontrol grubuna ait Ct değeri – Hedef genin hasta grubuna ait Ct değeri



Şekil 2.31. RT-PCR amplifikasyon eğrisindeki fazlar. ΔR: Floresan sinyalin artışı (98).



Şekil 2.32. RT-PCR'de baseline ve Ct noktası. A. Hesaplama için temel alınan çizgi(Baseline) B. Ct noktası (99).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın tipi

Araştırma deneysel (in vitro) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı

Bu araştırma Aralık 2013 Eylül 2014 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Erciyes Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalının ortak çalışması ile gerçekleştirildi. Laboratuvar işlemleri Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmada kullanılan Materyal

Bu çalışmada biri kontrol olmak üzere dört grup kullanıldı.

3.3.1. Hasta grubu

Çalışmaya dahil edilen bireyler Erciyes Üniversitesi İç Hastalıları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'na veya Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı'na başvurmuş, Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na yönlendirilmiştir. Yeni tanı veya takibe alınan hastalardan kemik iliği ya da periferik kan numunelerinden yapılan sitogenetik ve moleküler markır taramasında pozitif sonucunu alan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. 1. grup hastalar pozitif sonuçları negatif sonuca dönüşmeyen 24'ü yeni tanı, 6'sı takipte olan 30 hastadan oluşmaktadır.

2. ve 3. grup hastalar aynı bireylerin pozitif sonuçları negatif sonuca dönüşen 6'sı yeni tanı,4'ü takipte olan 10 hastadan oluşmaktadır. 2. grup pozitif sonucu, 3. grup negatif sonucu temsil etmektedir.

Çalışmaya 40 adet hasta dahil edilmiştir. Hastaların hepsi analizlere dahil edilerek çalışma tamamlanmıştır.

3.3.2. Kontrol Grubu

Kontrol grubuna dahil edilen bireyler, 9'u 18 yaş altı lösemi ile ilgisi olmayan kontrol grubu hastası, 21'i 18 yaş üstü sağlıklı olmak üzere 30 bireyden oluşmaktadır. Bu bireylerden periferik kan örnekleri alınmış ve analiz edilmiştir.

3.4. Veri Toplama Araçları

3.4.1. Demirbaş Malzemeler

- LightCycler 480 II (Rotkreuz, Switzerland)
- Thermal Cycler (LabCycler Sensoquest, Göttingen, Germany)
- Vorteks (IKA Vortex Genius 3)
- Santrifüj Cihazı Mikro 22 & Mikro 200R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany)
- -20 Buzdolabı (Vestel)
- +4 Buzdolabı (Profilo)
- NanoDrop 2000- Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre Cihazı (ThermoScientific, U.S.A.)
- Plate Perfect Spin (Peqlab, Erlangen, Germany)
- Isıtıcı Blok (HLC)
- Mikropipetler; 10'luk, 100'lük, 1000'lik (Nichipet Ex, HTL)
- 10'luk, 100'lük, 1000'lik pipet uçları (Greiner Bio-one, Axygen)

3.4.2. Sarf Malzemeler

3.4.2.1. Ekspresyon analizi için gerekli sarf malzemeler

1. Trizol (TriPure Isolation Reagent, Roche).
2. cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche)
3. İlgili genlere göre dizayn edilmiş primerler ve problar (RealTime ready Catalog Assays, Roche; RealTime ready Designer Assays, Roche)
4. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Prob mastır miks (LightCycler 480 Probes Master)

5. Light Cycler 480 cihazı ile uyumlu plate (LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (1x10 plate))

3.5. YÖNTEMLER

3.5.1.Uygulama Prosedürleri

3.5.1.1. Kan Örneklerinden Lökosit İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından alınan 2-3 cc kemik iliği veya EDTA'lı tüp içine 7-10 cc periferik kan örneklerinden Trizol reagent metoduna göre lökosit ve total RNA izolasyonu yapıldı.

1. Kan numuneleri 50 cc ' lik falkon tüplere aktarıldı.
2. Falkon tüpe 25-30 cc Red Cell Lizis eklendi.
3. 15-20 dakika +4 ^{0}C' de bekletildi.
4. 10 dakika/2000 RPM' de santrifüj edildi.
5. Falkon tüpte oluşan süpernatant atıldı.
6. Pellet kısmına 15-20 cc Red Cell Lizis eklendi. Homojenize edildi.
7. 10 dakika +4 ^{0}C' de bekletildi.
8. 10 dakika/2000 RPM' de santrifüj edildi.
9. Süpernant atıldı, pellet etrafındaki eritrositler 1000'lik ve 100'lük uçlarla temizlendi.
10. 1 mililitre Trizol eklenip homojenize edildi.
11. Örnekler falkon tüpten etiketlenen 2 mililitrelik ependorf tüplere aktarıldı.
12. -20 ^{0}C' ye kaldırıldı.

Kemik iliği kan örnekleri izolasyon edilirken ilk Red Cell Lizis eklemede 13 cc, ikinci red cell lizis eklemede 8 cc eklendi.

3.5.1.2. Lökositten Total RNA İzolasyonu

1. -20 0C' de örnekler oda sıcaklığına bırakıldı, erimesi tamamlandıktan sonra homojenize edildi.
2. 3-5 dakika tüpler 37 ^{0}C' de inkübasyona tabi tutuldu.
3. Tüplere 200 µl kloroform eklenerek vortekslendi.

4. 15 dakika 12000 xg'de santrifüj yapıldı. Bu aşamadan sonra -20 ^{0}C soğuk blokla çalışıldı.
5. Oluşan aköz faz pipetle dikkatlice etiketlenen farklı bir ependorf tüpe aktarıldı.
6. Tüplere 500-650 µl isopropanol eklenip resüspanse edilerek, 30 dakika -20 ^{0}C 'de bekletildi.
7. 10 dakika 12000 xg'de santrifüj yapıldı.
8. Süpernatant dikkatlice alınıp atıldı, pellet üzerine 1 mililitre etanol eklendi ve resüspanse edildi.
9. 5-6 dakika 7500 xg' de santrifüj edildi.
10. Süpernant kısmı dikkatlice atıldı, tüpler alkolün uçması için ağzı açık şekilde oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletildi.
11. Tüpler 2-3 dakika 37 ^{0}C' de inkübasyona tabi tutuldu.
12. Pellette yer alan RNA miktarına göre nükleaz free water eklendi.
13. RNA konsantrasyonları ölçülerek -20 ^{0}C' ye kaldırıldı.

3.5.1.3. cDNA Sentezi

- cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kiti kullanılarak yapılmıştır.
- RNA konsantrasyonları 400-600 ng/µl olacak şekilde her bir hasta için seyreltilecek RNA miktarları ayrı ayrı belirlendi. Belirlenen miktarlar reaksiyon tüplerine aktarıldı.
- Kit içeriğindeki ürünler (RNase inhibitör ve Reverse transkriptaz hariç) soğuk blok üzerinde çözülmeye bırakıldı. Vortekslenip kısa santrifüj yapıldı.
- RNase inhibitör ve Reverse transkriptaz kullanılacağı zaman soğuk blok üzerine çıkarılmasına özen gösterildi.
- Seyreltilen RNA'lardan 5 µl alınarak 500 µl'lik reaksiyon tüplerine aktarıldı.
- Tablo 3.1. deki miktarlara göre 1.karışım hazırlandı.

Tablo 3.1. cDNA reaksiyonu için 1. Karışım (ÖS: Örnek sayısı)

	Bir örnek için eklenecek miktar (µl)	Toplam
Random primer, 600 µM	1	1 x (ÖS+1)
Oligoprimer, 500 µM	1	1 x (ÖS+1)
dH20	4,4	4,4 x (ÖS+1)
Toplam	6,4 µl	6,4 x (ÖS+1)

- Seyreltilen her bir RNA örneklerine 6,4 µl 1. Karışımdan eklendi.
- RNA örnekleri 65 ^{0}C'de 5 dakika beklemesi için thermal cycler cihazına konuldu.
- Tablo 3.2.' deki miktarlara göre karışım hazırlandı.

Tablo 3.2. cDNA reaksiyonu için 2. karışım (1 örnek için), ÖS= Örnek Sayısı.

	Her bir hasta başına eklenecek miktar (µl)	**Tüm hastalar için eklenecek miktar**
5X Buffer (Tampon)	4	4 x (ÖS+1)
dNTP, 10 mM	2	2 x (ÖS+1)
RNase İnhibitör, 40 U/µl	0,5	0,5 x (ÖS+1)
Revers transkriptaz	1,1	1,1 x (ÖS+1)
DTT, 0,1 M	1	1 x (ÖS+1)
Toplam miktar	8,6 µl	8,6 x (ÖS+1)

- Hazırlanan karışım thermal cycler'dan alınan örneklere 8,6 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her bir reaksiyon tüpünde son hacim 20 µl'dir.
- cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon tüpleri Tablo 3.3.' de belirtilen sıcaklık ve sürelere göre termal cycler'da bekletildi.

Tablo 3.3. cDNA sentezi için gerekli sıcaklık döngüsü

Sıcaklık (^{0}C)	**Süre (Dakika)**
55	30
85	5
4	∞

- Elde edilen cDNA ürünleri +40C'de muhafaza edildi.

3.5.1.4. Ekspresyon analizi

- Bu çalışmanın ekspresyon analizleri Lightcycler 480 II (Roche Diagnostics Ltd. Rotkreuz, Switzerland) cihazı ile yapılmıştır. Analizler Lightcycler 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile yapılmıştır.
- Her hasta iki defa çalışılmıştır. Her çalışmada 2 adet negatif kontrol ve kalibratör koyulmuştur.
- Ürünler aşağıdaki protokole göre hazırlanıp cihaza yüklenmiştir:

1. Elde edilen cDNA'lara 25 µl distile su eklenerek sulandırıldı. Sulandırılan cDNA'lardan 5 µl alınarak plate' e aktarıldı.

2. Tablo 3.4.'e göre her gen için ayrı karışım hazırlandı. Housekeeping gen olarak B-actin tercih edildi.

3. Her kuyucuğa 15'er µl dağıtıldı.

4. Plate'in üzeri bant ile kapatıldı.

5. Plate perfect spin ile santrifüj yapıldıktan sonra cihaza yüklendi.

6. Lightcycler 480 Software açılarak Tablo 3.5.'deki programa göre çalışma başlatıldı.

Tablo 3.4. Ekpresyon analizi için reaksiyon karışımı (1 örnek için)

Ürün	**Her bir kuyucuğa eklenecek miktar (µl)**
Mastermix (LightCycler 480 Probes Master)	10
Su	4
Prob (RealTime ready Catalog Assays, Roche; RealTime ready Designer Assays, Roche) *BAP1* (Assay ID: 102242) *APC7* (Assay ID: 117502) *B-actin* (Assay ID: 143636)	1
Toplam Miktar	15

Tablo 3.5. Lightcycler 480 II software programına ayarlanan sıcaklık ve süreler

	Döngü sayısı	Sıcaklık (^{0}C)	Sıcaklık artış / azalış hızı (^{0}C)	Süre (Saniye)
Preinkübasyon	1	95	4,4	600
Amplifikasyon	45	95	4,4	10
		60	2,2	30
		72	4,4	1
Soğutma	1	40	2,2	30

3.4. İstatiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğunun değerlendirilmesinde histogram ve q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testleri kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için Mann-Whitney U testi ve Kruskal-Wallis H testi, nitel değişkenler için karşılaştırmalarda Pearson kikare analiz ve Fisher exact testleri kullanıldı. Gen ekspresyonları arasındaki ilişki Spearman testi ile değerlendirildi. Veriler sıklık ve yüzde veya ortanca ile 25. ve 75. yüzdelikler olarak ifade edildi. Verilerin analizi R 3.1.0 yazılımı (www.r-project.org) kullanılarak yapıldı. $p<0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada yeni takip ve takibe alınan AML hastalarında *BAP1* ve *APC7* ekspresyonlarının hastalık patogenezinde olası rolleri ve iki genin ekspresyon ilişkileri araştırıldı. Bu amaçla çalışmamızın hasta grubu 40 birey, kontrol grubu 30 bireyden oluşturuldu. Hasta grubunda 10 bireyin sitogenetik ve moleküler taramalardaki pozitif ve negatif sonuçları arasındaki ekspresyon farklılığı karşılaştırıldı.

Çalışmamıza yeni tanı veya takibe alınan hastalardan kemik iliği ya da periferik kan numunelerinden yapılan sitogenetik ve moleküler markır taramasında pozitif sonucunu alan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. 1. grup hastalar pozitif sonuçları negatif sonuca dönüşmeyen 24'ü yeni tanı, 6'sı takipte olan 30 hastadan oluşmaktadır.

2. ve 3. grup hastalar aynı bireylerin pozitif sonuçları negatif sonuca dönüşen 6'sı yeni tanı,4'ü takipte olan 10 hastadan oluşmaktadır. 2. grup pozitif sonucu, 3. grup negatif sonucu temsil etmektedir.

1. grup hastaların yaş sınırı 5-77, yaş ortalaması 40,66; 2-3. grup yaş sınırı 3-65, yaş ortalaması 24; kontrol grubu yaş sınırı 10-34, yaş ortalaması 28; tüm hastaların yaş sınırı 3-77, yaş ortalaması 32,33 şeklindedir.

1. grup hastaların rutin taramaları sonucu 8 hastada *NPM1-A* geni (%26,7), 6 hastada t(15;17) (%20), 5 hastada t(8;21) (%16,7), 4 hastada inv(16) (%13,3), 1 hastada *BAALC* geni (%3,3) mutasyonu, 6 hastada hem *NPM1-A* geni hem de *FLT3/ITD* geni (%20) mutasyonu tespit edilmiştir; numunelerin 14'ü kemik iliği (%46.7), 16'sı periferik kandır (%53.3); hastaların 24'ü 18 yaş üzeri (%80), 6'i 18 yaşının altındadır (%20); 12'si kadın (%40), 18'i erkektir (%60) (Tablo 4.1.).

2-3. grup hastaların 8'inde t(15;17) (%80), 1'inde t(8;21) (%10) ve 1'inde *NPM1-A* geni (%10) mutasyonu tespit edilmiştir; numunelerin 7'si kemik iliği (%70), 3'ü periferik kandır (%30); hastaların 6'sı 18 yaş üzeri (%60), 4'ü 18 yaşının altındadır (%40); hastaların 2'si kadın (%20), 8'i erkektir (%80) (Tablo 4.1.).

4. (kontrol) grup bireylerinin 15'i kadın (%50), 15'i erkektir (%50); 9'u 18 yaş altı (%30), 21'i 18 yaşının üzerindedir (%70); numunelerin tamamı periferik kandır (Tablo 4.1.).

İstatiksel olarak yaş ve cinsiyet faktöründe anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$). Mutasyon faktörlerinden t(15;17) dışındakiler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır, ancak *NPM1-A* mutasyonu ile gerçekleşen örnek sayısı artırılarak anlamlı olabileceği değerlendirilmiştir. Numune faktörü istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür ($p<0.05$).

RT-PCR, Lightcycler 480 II cihazında gerçekleştirildi. Kontrol ve hasta grubundaki her bir örnek, amplifikasyon eğrisi ve software programıyla (Lightcycler 480 release 1.5.0 SP4) ekspresyonun var olup olmadığı değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubunun tamamında hedef ve referans genin eksprese olduğu gözlendi.

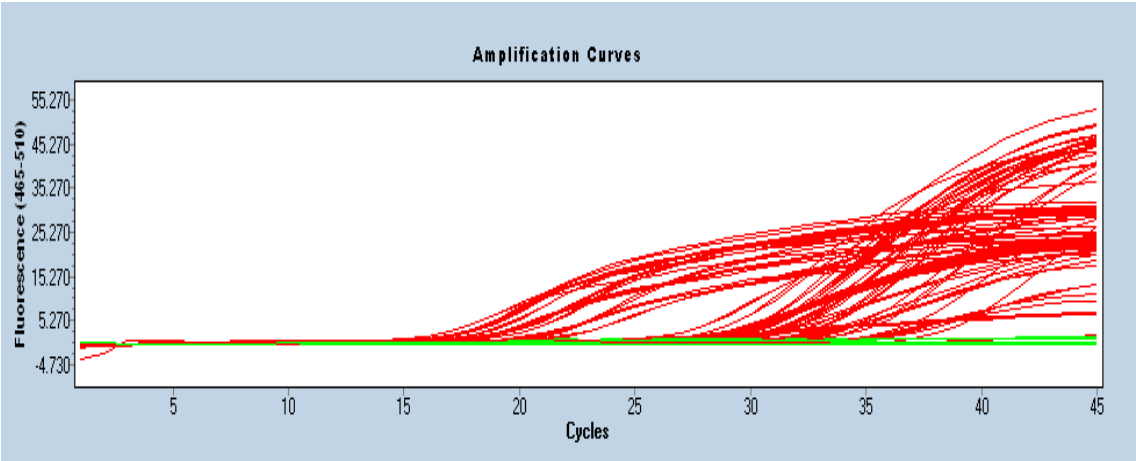
İstatistik analizlerinde *BAP1* ekspresyonunun 2. grup hastaları kontrol grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), fakat 1. grupta ve 3. grupta anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). 1 ve 2. grubun karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı görüldü, aynı sonuca 2 ve 3. grubun karşılaştırılmasında da ulaşıldı ($p<0.05$) (Tablo 4.2.). Ekspresyon analizlerinde 2. grubun aşırı ekspresyonu ve en fazla eksprese olan grup olduğu görülmektedir (Tablo 4.3.).

APC7 ekspresyonları, 1 ve 2. grup kontrol grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), fakat 3. grupta anlamlı görülmemiştir ($p>0.05$). 2 ve 3. grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$) (Tablo 4.2.). Ekspresyon analizlerinde 1. grupta fazla ekspresyon ve 2. grupta aşırı ekspresyon göze çarpmaktadır. *BAP1* ekspresyonundaki gibi *APC7*'de en fazla eksprese olan 2. gruptur.1. grup kontrol grubuna göre daha fazla eksprese görülmektedir (Tablo 4.3.). Ayrıca istatistiksel açıdan anlamlı olarak 3. grupta *APC7*'nin kemik iliğinde periferik kana göre daha fazla eksprese olduğu görülmüştür.

BAP1 ve *APC7* ekspresyon analizlerinde, 1.grupta iki gen arasında pozitif yönlü iyi düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu (rho:0.643, $p<0.001$), kontrol grubunda ise iki gen arasında pozitif yönlü orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu (rho:0.513, $p<0.001$). 2 ve 3. Gruptaki iki gen arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı görülmesede 2. grupta çok zayıf düzeyde pozitif korelasyon, 3. grupta çok zayıf düzeyde negatif korelasyon görülmektedir (Tablo 4.4.).

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda cinsiyet, yaş, numune, mutasyon dağılımı

		1.Grup	2-3. Grup	4.Grup (Kontrol)	Pearson Chi-Square ve Fisher's exact sonucu
Cinsiyet	Kadın	12	2	15	0,205
	Erkek	18	8	15	
Yaş	>18	24	6	21	0,330
	<18	6	4	9	
Numune	Kemik iliği	14	7	-	**<0.001**
	Periferik	16	3	30	
Mutasyon	*NPM1-A*	8	1	-	**0,060** (15 hastada)
	t(15;17)	6	8	-	**0,001**
	t(8;21)	5	1	-	1,000
	İnv(16)	4	-	-	0,556
	BAALC	1	-	-	1,000
	NPM1-A ve FLT3/ITD	6	-	-	-



Şekil 4.1. 1.grupdaki 12 hastanın 3 gende amplifikasyon eğrileri. Ct değerleri: *BAP1*:30.08-36.23; *APC7*: 28.06-35.76; *B-actin*: 17.02-26.8.

Tablo 4.2. *BAP1* ve *APC7* gen ekspresyonları p değerleri.

Gruplar	BAP1- p değeri	APC7 - p değeri
1-2	0.002	1.00
1-3	1.00	0.64
1-4	1.00	0.00
2-3	0.016	0.012
2-4	0.00	0.00
3-4	1.00	1.00

Tablo 4.3. *BAP1* ve *APC7* ekspresyonlarının gruplara göre istatistiksel analizi.

Grup No	BAP1			APC7		
	Median	%25	%75	Median	%25	%75
1	0.8833	0.6013	1,268	1.9675	1.084	3.563
2	2.896	1.327	5.033	2.676	2.46	4.068
3	0.9222	0.7237	1.174	0.8321	0.4994	1.347
4	0.89	0.5845	1.118	0.8805	0.6855	1.072

Tablo 4.4 *BAP1* ve *APC7* ekspresyonlarının korelasyon analizi

Spearman's rho	Grup1	BAP1	1,00	0,642**
		APC7	0,642**	1,00
	Grup 2	BAP1	1,00	0,115
		APC7	0,115	1,00
	Grup 3	BAP1	1,00	-0,118
		APC7	-0,118	1,00
	Grup 4	BAP1	1,00	0,513**
		APC7	0,513**	1,00

**:anlamlı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanserin genomla bağlantısını anlama çabalarında epigenetik faktörlerdeki tekrarlayan mutasyonların tanımlanması kritik role sahiptir. Kanser hücrelerindeki genomik anomaliler uzun süre boyunca kanser araştırmalarının temelini oluşturmuştur. Myeloid dönüşümde spesifik histon rezidülerindeki post-translasyonel modifikasyon çalışmalarıyla bir dizi yeni ve heyecan verici temel biyolojik bulgular ortaya çıkmıştır (34, 36).

Transkripsiyonel faktörlerin düzensizliği, myeloid kanserlerde transkripsiyonel faktörleride kapsayan tekrarlayan translokasyonun tanımlanmasına bağlı olarak myeloid dönüşümde önemli bir role sahip olmasından uzun zaman şüphelenilmiştir. Sonraki çalışmalarla transkripsiyonda epigenetik faktörlerin yanı sıra transkripsiyon faktörlerdeki tekrarlayan somatik mutasyonlar, sitogenetik olarak akut myeloid lösemili hastaların çoğunda tanımlandı. Bu hastalıklarda devam eden mutasyon tanımlama çabalarına ek olarak mutasyonların myeloid dönüşüme nasıl katkıda bulunduğunu fonksiyonel açıdan anlama, önemli hedef genleri ve bu değişikler tarafından etkilenen downstream transkripsiyonel programlamanın belirlenmesinede çalışılmaktadır(50).

BAP1, nükleer lokalizasyon sinyali içeren deubikitinaz enzimidir (25,29). Ayrıca apoptozis, hücre yaşlanma ve döngüsünde (32), histon modifikasyonunda (34), embriyonik gelişim ve epigenetik regülatörlerin stabilizasyonunda (farelerde) (35), kromatin modifikasyonu ve remodellingde (36), DNA tamir ve sinyal transdüksiyonunda (37,38), transkripsiyonel düzenlemede (55), hücresel farklılaşma, kök hücre ve gelişimsel süreçte (40,77), glikoneojenezde (77) görev alır ve tümör süpressör gendir (29,31,38).

Birkaç çalışmada çeşitli kanserlerde fonksiyonunu kaybetmiş temel tümör süpressör olarak BAP1 gösterilmesine rağmen kanser gelişimine karşı hücreyi nasıl koruduğu gizemli kalmıştır. Güncel yayınlara göre BAP1, substratlarında bilinen alt birimlerini düzenlediği hipotezinin geliştirilmesi önerilmektedir ki bu da gen ekspresyonunun tümör öncesi düzensizliğine neden olmaktadır. BAP1'in rolü için alternatif öneri bağımsız mekanizma veya direk olarak tümör süpressör/hızlandırıcı olarak fonksiyon yapmasıdır (37,38).

BAP1 ve *ASXL1* gen mutasyonları farklı hastalıklarda bu genlerin bazı biyolojik süreçlerde önemini açığa çıkarmaktadır. Hematopoetik hücrelerdeki bu genlerin araştırılması, myeloid malignitelerde nükleer protein deubikitinasyonlarının rolleri hakkında yeni bilgiler elde etmemizi sağlamıştır. *BAP1* ve *ASXL1* çok sayıda protein-protein etkileşimlerinde bulunuyor gibi görünmektedir. BAP1 aynı zamanda kök hücre oluşumu ve gelişiminde yer alan PR-DUB'u oluşturmak için ASXL1/2 ile etkileşir. Myeloid dönüşümde HCF-1 ve OGT'nin de muhtemel rolleri olması beklenebilir, Cevaplanmayan anahtar bir soruda BAP1 ve HCF-1'e bağımlı transkriptlerin kompleks yapısı tümör süpressör fonksiyonu ile örtüşen düzenleyici etkilerini nasıl meydana getirmesiyle alakalıdır. Diğer yeni gelişme ise memelilerde PCR2 aracılığıyla gen ekspresyonlarının anlaşılmasıdır. *BAP1* mutasyonu ve azalan *BAP1* ekspresyonu, PCR2 hedef genlerinde artan metilasyonla bağlantılı olabileceği gösterilmiştir. Polycomb-aracılığıyla kromatin remodelling ve histon ubikitinasyonu kanser sürecinde hayati önem taşıdığına dikkat çekilmiştir. BAP1-ASXL1 etkileşimin temel yapısını değerlendirmek ve bu etkileşim normal bir şekilde miyelopoesisi sınırlayan moleküler mekanizmasını araştırmak önemli olacaktır. Sonuç itibari ile gelecekte ASXL1 ve BAP1 mutasyonlarının etkisini araştırmak yeni terapötik kavramlarla sonuçlanabilir (31, 40, 45, 50, 54).

BAP1 geninin somatik veya germline mutasyonları akciğer, göğüs, renal cell (27, 39, 44), melanosit (32, 56), kolanjiyokarsinom (74), intrahepatik kolanjiyokarsinom (34, 52, 75), uveal melanoma (41, 42, 44, 51), cilt melanoma (46, 56), oküler melanoma (56), bazal hücreli karsinom (57), mezotelyoma (46, 52, 54, 55), meningioma (44), pankreatik kanser (37, 52), hepatosellüler karsinom (76, 77), MDS (35) 'de raporlanmıştır.

Yakın zamandaki yayınlarda germline *BAP1* mutasyonları (nonsense,in/del, splays alan) gösterildi ve *BAP1* mRNA'sının nonsense yoluyla yıkımına veya truncat proteine neden olduğu tahmin edilmektedir (41).

Hücre hatlarında Wild Type BAP1 ekspresyonları bazılarında büyümeyi hemen hemen tamamen bazılarında %60 oranda baskılamaktadır. Deubikitinaz aktivitesi ve nükleer lokalizasyondan eksik olarak eksprese olan BAP1 tümör baskılamasını gerçekleştirememektedir (27). Wilt type BAP1'in hücre hatlarında ekspresyonu DNA tamir noktalarını aktifleştirir ve hücre proliferasyonun azalmasına neden olur (38). Farelerde BAP1'in aşırı ekspresyonu, BRCA1 gerektirmeden tümör hücrelerinin büyümesini baskılamaktadır (45). Asbest maruziyetine bırakılmış farelerden oluşturulan malignant mezotelyoma kültürlerinde wild-type *Bap1* mRNA'sının fazla ekspresyonu gösterildi, fakat knock-out *Bap1* farelerindeki Malignant mezotelyoma hücrelerinde wild-type *Bap1*'e göre ekspresyon düşüktü, ancak *Bap1* mRNA'sının truncat formunda eksprese olduğu göz ardı edilmemelidir. Ayrıca Western Blot analizlerinde wilt-type Bap1 farelerinde protein ekspresyonu yüksek düzeyde, knockout Bap1 farelerinde protein ekspresyon kayıpları görülmektedir. Knockout Bap1 proteinin neden eksprese olmadığını öğrenmek için yapılan PCR analizleri wild-type *Bap1* allelinin bulunmayışı heterozigosite kaybı ile uyumludur. Malignant mezotelyomalarda asbest maruziyeti knockout *Bap1* farelerde, wild type'lara göre daha etkin durumdadır ve malignant mezotelyoma gelişimi knockout farelerde daha agresif olup anlamlı olarak hızlanmaktadır. Ayrıca yaşam süresi knockout farelerde daha kısadır (54). Malignant mezotelyoma hücre hatlarındaki BAP1 ekspresyon kaybı nedeni somatik mutasyon bölgeleridir ve germline mutasyonların yayılmış olmasıdır (55).

3p delesyonları ve heterozigosite kayıpları küçük hücreli akciğer kanseri ve renal hücreli kanserinde hemen hemen %100'ünde, küçük olmayan-hücreli akciğer kanser hücre hatlarında %90'ın üzerinde ve %80'in üzerinde göğüs kanserlerinde bulunmuştur(27,37). Melanosit neoplazmlardan etkilenmiş kardeş üç üyede aynı maternal kopya bulunup, etkilenmeyen diğer üye farklı maternal kopyaya sahipti. Yapılan SNP analizleri, bütün tümörlerde 3p bölgesinin paternal kopyası kayıp olup, maternal kopyasının muhafaza edildiğini gösterdi. Bu sonuç, 3p21 bölgesinde mutasyona uğrayan genin maternal yolla kalıtıldığı düşündürmektedir (32). BAP1'in kodlanan bölgedeki delesyon premature protein sonlanmasına ya da proteinde N-

terminal bölgesinin kaybına neden olmaktadır (37). BAP1 kaybı, hücre kimliğinin yok olmasına ve basit olarak kök hücre benzeri fenotip oluşumuna neden olur (40). Bazı tümörlerde *BAP1*'in biallel inaktivasyonu görülmüştür (31). Germline *BAP1* mutasyonu taşıyıcısı bir ailede wild-type *BAP1* allelinin 13 cilt tümörünün 9'unda, uveal ve cilt (cutaneous) melanomlarında inaktive olduğu bulunmuştur (32). Kromozom 3 için monozomik olan 2 tane class 2 metastazik uveal melanoma(MM) (MM 56 ve MM 70) tümörü analiz edildi ve periferal kan lenfositlerinden elde edilen normal DNA ile karşılaştırıldı. Her iki tümörde 3p21.1 bölgesine yerleşmiş *BAP1*'in inaktive olmuş mutasyonlarını içermekteydi. MM 56, olgunlaşmamış (premature) sonlanma kodonu (p.W196X) oluşturan C/G 'den T/A geçişi içeriyordu. MM 70, BAP1 olgunlaşmamış protein (p.Q322fsX100) sonlanmasına ve çerçeve kaymasına neden olan ekzon 11 'in 11 baz çiftinin delesyonunu içermekteydi. Kromozom 3'ün bir kopyası *BAP1*-mutantlı 17 class 2 tümörlerinin hepsinde kayıptı ve bu durum kromozom 3 kaybının resesif *BAP1* mutasyonunun ortaya çıkarılmasıyla uyumludur. Monozomi 3 belirlenen class 2 uveal melanoma tümörleri *BAP1*'i inaktive eden mutasyonlar içeriyordu (42). 53 MPM tümöründe %23 oranında non-sinonim somatik *BAP1* mutasyonu ve %30 oranında 3p21.1 kaybı tanımlandı. Toplamda tümörlerin %42'sinde *BAP1* kaybı, mutasyonu ya da her ikisini barındırmaktaydı. 10 malignant plevral mezotelyoma hastasındaki mutasyon analizlerinde, truncat mutasyonlarının genellikle nükleer lokalizasyon kaybı ve/veya C-terminal protein bağlanma domainlerinde kayıp ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir. *BAP1* kaybı ve/veya mutasyonları anlamlı biçimde çok az *BAP1* mRNA'ları eksprese olmasına neden oldu (43). Germline *BAP1* mutasyonu bulunan üç aile üyesinde, azalan BAP1 ekpresyonu ve nükleer lokalizasyon kaybı UM, akciğer adenokarsinom ve meningioma tümörlerinde tanımlandı (44). Germline *BAP1* mutasyonu olmaksızın anormal BAP1 ekspresyonu sporadik mezotelyomalarda gözlenmiştir, ayrıca somatik *BAP1* mutasyonları olan mezotelyoma örneklerinde BAP1 ekspresyonu mutasyon olmayan örneklerle karşılaştırıldığında azalmaktadır. Tümörlerin birinde bulunan bir kopyadaki transisyon *BAP1* promotorunun yakınında veya promotorundaydı. Bu da tümör hem splays alanında mutasyon hem de ekzon 4'de 25 bp delesyon içeriyordu, bu da çerçeve kayması mutasyonu ve BAP1'in premature sonlanmasına neden oldu. Sporadik mezotelyoma vakalı bireylerden alınan 26 germline DNA'da *BAP1* geninin sekanslanması ile 2 bireyde ekzon 13 ve 14 'te delesyona sahipti, bu da BAP1'in nükleer lokalizasyon sinyalini kodlayan bölgesindeki upstream stop

kodonuna neden olan çerçeve kaymasıyla sonuçlandı (46). Fare ve hücre hattı çalışmalarında BAP1'in aşırı ekspresyonu bu geni içeren lokusta homozigot kaybı bulunan dönüşüme uğramış farklı hücre tiplerinde tümör oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (50). Periton tümörleri incelendiğinde tümör olmayan dokularda kuvvetli BAP1 ekspresyonu gözlenmiştir (52). 14 germline varyantın 7'si karboksil uçtaki bölgede tanımlanmıştır, bu da BRCA1'e bağlanan domainin kanser yatkınlığında önemli olduğunu akla getirmektedir (56). Bazal hücreli karsinomlarda yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda kontrol grubunda görülmeyip *BAP1* mutasyon taşıcıyılarınında kısmen veya tamamen BAP1 nükleer ekspresyonunun kısıtlandığı raporlandı (57). Son tekniklerle, mRNA ekspresyonları baz alınarak UM iki alt sınıfa ayrılır: Sınıf I ve II. Sınıf II UM, *BAP1*'i inaktive eden mutasyon ile güçlü olarak bağlantılıdır ve düşük sağkalımla ilişkilidir. (59). BAP1-negatif tümörlü hastalarda spesifik olarak ccRCC vakalarında ölüm riskinin arttığı görülmektedir (68). Mikrosatellit markerları kullanılarak yapılan genotip değerlendirmesi ve tüm eksom sekanslaması *BAP1* gen lokusunda heterozigosite kayıplarını ortaya çıkarmıştır (61). BAP1 ekspresyon kayıpları melanositte raporlandı (66). ccRCC'de *BAP1*-mutantlı tümörler büyüme faktörü sinyallerine dahil olan genlerin ekspresyon değişimi ile bağlantılıdır (71). Uzun kodlanmayan RNA (lncRNA), post transkripsiyonel regülasyondan epigenetik remodelling ve nükleer organizasyona kadar hücre fizyolojisinde kilit rolleri olduğu kanıtlanmıştır. ccRCC örneklerinde *BAP1* geni RNA-seq profillemesi yapılan lncRNA'ya dayalı birikimlerde yüksek oranda anlamlı biçimde ilişkilidir (72). HCF-1'e bağlanan domain ile nükleer lokalizasyon sinyali hücre proliferasyonu ve tümör oluşumunu engellemek için gereklidir (74). İntrahepatik kolanjiyokarsinom hastalarında *BAP1* ve *ARID1A* genlerinin sıklıkla mutasyonu saptanmıştır (75). Pankreatik duktal adenokarsinom(PDAC) tümör örneklerinde *BAP1*'in de dahil olduğu muhtemel altı genden beşi ile miRNA-125b ekspresyonu arasında negatif korelasyonu işaret etmektedir (78). APC aktivitesini inhibe eden RASSF-1A and Mad2'ın tümör süpressör olabileceği raporlanmıştır (83).

Farelerde MDS gelişimi göz önüne alındığında, *de novo* MDS hastalardan normal örnekler ve 32 çift tümörde ki *BAP1*'in ile yeniden sekanslamasıyla insandaki MDS hastalığında meydana gelip gelmediği araştırıldığında BAP1'in UCH katalitik domaini içindeki prematüre sonlanmasına neden olan çerçeve kayması mutasyonlu hasta

belirlenmiştir. Bu hasta DNA'sı, normal DNA ile karşılaştırıldığında çerçeve kayması mutasyonlu alleli belirlenemedi, bu da MDS klonlarında gerçekleşen çerçeve kayması *BAP1* mutasyonunun somatik orjinli olması ile uyumludur. MDS hastalarında bulunan *BAP1*'in katalitik mutasyonu, BAP1'in fonksiyon kaybının fare ve insanlarda benzer sonuçlara sahip olduğunu belirtmektedir (35). FOXK2 ile etkileşebilen HCF-1'in, hem BAP1 ve hem de SIN3A bağlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca FOXK2, SIN3A'ya ve BAP1'in de dahil olduğu polycomb repressif komplesine bağlanabilir (30). Farelerde Sin3a proteinin HCF-1 ve OGT ile bağlantısı gösterilmiştir (35). ARID1A, Sin3a ve CBP/p300, RARA sinyal yolağıyla bağlantılı proteinlerdir (108).

Yukarıdakilere ek olarak, son zamanlarda tek ek somatik anormallik olarak 20q'nin delesyonuna sahip olan *de novo* MDS hastalarında somatik heterozigot *BAP1* mutasyonu tanımlanmıştır. Hastaların yalnızca küçük bir kısmının (toplam 32) *BAP1* mutasyonları için sekanslaması yapıldı, yaşıtlarıyla kıyasladığındığında *de novo* MDS'li hastalardan CD34+ hücrelerinde *BAP1*'in ekspresyonunda daha sık downregülasyonu belirlenmiştir. 32 MDS hastasının 1'inde BAP1'in hidrolaz domaininde heterozigot *BAP1* mutasyonu tespit edildi. Hematopoetik kök hücre düzeyinde, farelerde Bap1 delesyonu kemik iliğinde hücre sayısının artışına neden olmuştur (45,50).

APC anafazın başlamasında rolü alır, mitotik çıkışı ve önemli geçişleri kontrol eder (80,81). E3 ubikitin ligaz aktivitesine sahiptir (82). G1 fazının devamını sağlayan ve G2 fazı gereklidir (81,83) ve homolog kromozomların ayrılmasında rolü vardır (85).

BAP1'in 182-365 rezidüleri BARD1'in RING finger domaini ile etkileşir. BAP1, BARD1 ile etkileşme girerek BRCA1/BARD1'in E3 Ligaz aktivitesini inhibe eder. BAP1, BRCA1/BARD1 ilişkisini engeller. Bu ilişkideki küçük bir bozulum BRCA1 otoubikitinleşmesini ve BRCA1/BARD1 yoluyla NPM1/B23 ubikitinasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır (25). BAP1 ile etkileşebilen HCF-1'in bilinen spesifik bir rolüde S- fazının başlamasında gerekli olan genlerin transkripsiyonu için E2F1 transkripsiyon faktörünü H3K4 histon metiltransferazla bir araya getirerek G1/S sınırında hücre döngüsünü ilerletmesidir (37). APC5 ve APC7, protein-protein etkileşimi domainleri sayesinde CBP ve p300 koaktivatörleriyle etkileşip CBP/p300 asetiltransferaz aktivitesini uyarır ve CBP/p300'e bağımlı transkripsiyonun etkisini artırır (89). Oral skuamöz hücre karsinomlarında Histon H3 (baskın olarak K14), grade II oral tümörlerinde aşırı asettillendiği gösterildi. P300'ün aşırı asetilasyonu ve aşırı

ekspresyonu arasındaki ilişki, p300 oto-asetilasyonunun histonları aşırı asettilemede sorumlu kilit faktör olabileceğini düşündürmektedir. P300'ün oto-asetilasyonu NPM1 ve GAPDH tarafından indüklenir ve p300 tümör dokularında aşırı eksprese olur (101).

Mikrotübül çekirdek oluşumu için γ-tubulin halka kompleksi gereklidir, bu kompleks mitozda M fazında mitotik iğ ipliklerinin oluşumunun sağlanması için sentrozomda birikir. γ-tubulin'lerin ubikitinasyonları sentrozom dublikasyonu ve mikrotübül çekirdek oluşumunu düzenlemede hayati öneme sahiptir. γ-tubulin'lerin BRCA1/BARD1'e bağlı ubikitinasyonu sentrozom amplifikasyonuna neden olur. BAP1, γ-tubulin için deubikitinaz enzimidir. BAP1, insandaki normal göğüs epitelyal hücrelerle karşılaştırıldığında metastazik göğüs adenokarsinoma hücre hatlarında downregüle bulundu. Göğüs kanser hücre hatlarında BAP1'in azalan ekspresyonu mitotik anomalilikler ile bağlantılıdır ve genel olarak bakıldığında hastalarda düşük survi ile de ilişkilidir. Mutant olmayan BAP1 γ-tubulin'in ubikitinasyonunu azaltır ve mitotik hatalardan korur. γ-tubulin'in göğüs kanser hücrelerinde BAP1 tarafından deubikitinasyonu anormal mitotik iğ ipliklerinin oluşumu ve kromozom instabilitesinden korur (102).

Gland adenokarsinom hücre hatlarında CBP ekspresyonunun retinoik asid reseptörleriyle uyumlu retinoik asidlerinin uyarılmasıyla büyüme ve farklılaşmayı düzenleyici transkripsiyon aktivasyonuna aracılık ettiğine işaret edilmektedir (103). Histon asetil transferaz fonksiyonu bulunan p300, AML1-ETO füzyon proteinini t(8;21) asetilleyerek lösemi hücrelerinin kendini yenilemesine katkıda bulunur. P300, insanda kanser hücrelerinin G1'den S fazına düzenli geçişte gereklidir ve p300'ün inhibisyonu hücre döngüsünün S fazına geçişini engellemektedir. P300 tarafından AML1-ETO füzyon proteininin asetilasyonuyla *bcl-2* direk olarak aktif hale getirilebilir (104). PML, kritik büyüme ve tümör süpressör faktörlerinin transkripsiyonel fonksiyonunu artırır. PML, asetiltransferaz CBP ile direk olarak etkileşebilir. Akut promiyelositik lösemi (APL) tümörleri ve blastlarında PML-RARalfa füzyon oluşumu PML üzerinde dominant-negatif etki yapması sonucu tümör süpressör ve büyüme faktörleriyle etkileşimi bozulabilir (105). CBP ve p300 üzerine alternatif bir modelde benzersiz fonksiyonlara sahip olmalarıdır. CBP aktivitesi devam ettirilerek farelerde knockdown *p300* fibroblastlarda retinoik aside bağlı transkripsiyonda spesifik hatalar gözlenmiştir. Ayrıca Knockin *Cbp* farelerinde hematopoetik farklılaşmada yüksek penetransla

multilinaj hatalar bulunmaktadır ve malignite riskini artırmaktadır, bu sonuç knockin *p300*'de görülmemiştir. Bu nedenle *Cbp* normal hematopoetik farklılaşma için gereklidir. İlginç bir sonuçta ya CBP ya da p300 ribozimleri hücre hatlarında (F9) retinoik asitce indüklenen apoptozisi engeller (106). CBP'nin spinal kordlardan uzaklaştırılması hem Histon H3-asetillenmesini hem de H3-lizin-4-trimetilasyonunu azaltır (107).

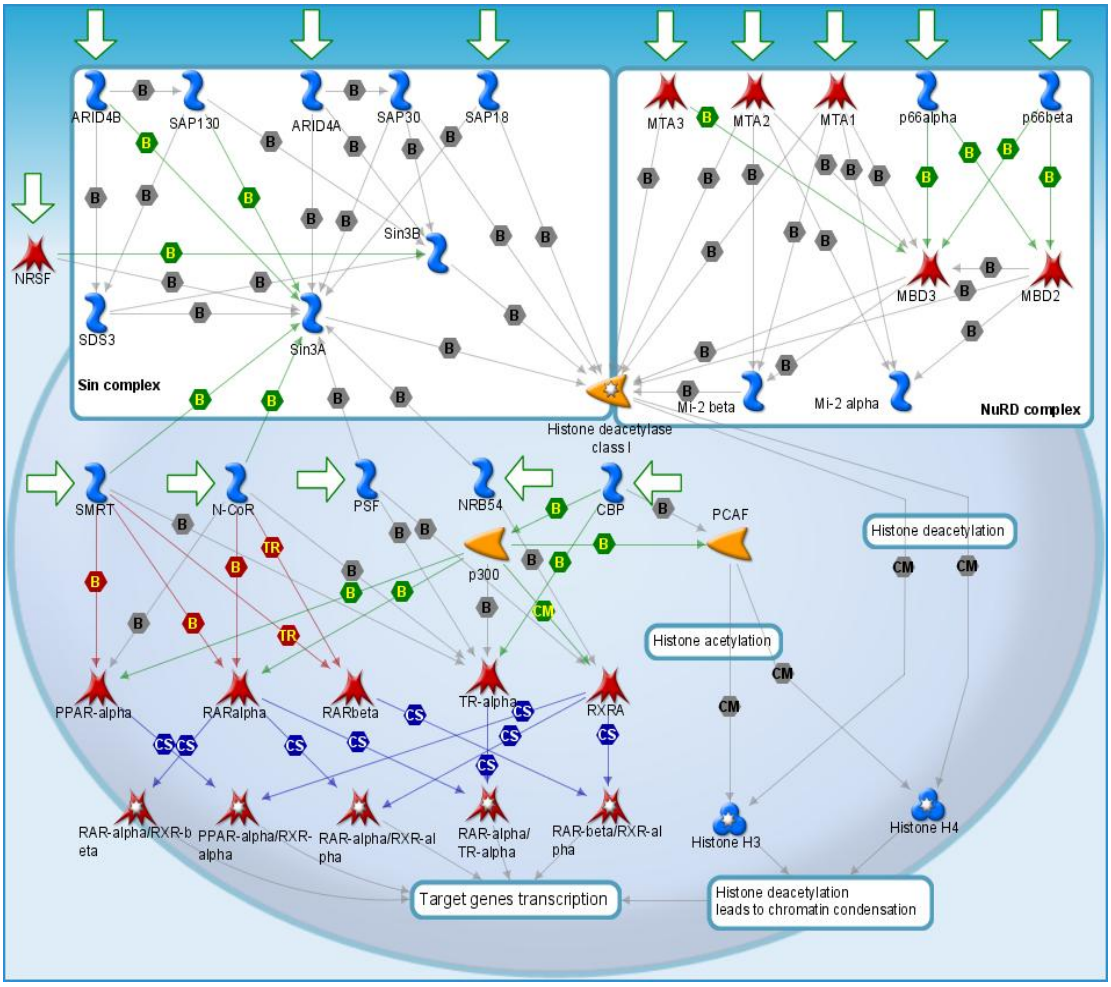
APC' nin Cdc20 bağlanmasıyla gerçekleşen ubikitinasyon mitozu kontrol etmede kilit rolü vardır. APC-Cdc20, kromozomlara bağlanan iğ ipliği mikrotübülleri (spindle microtubules) lokal olarak düzenleyebilir. Substrat ubikitinasyonu için, TPR alt üniteleri APC3 ve APC7'nin C ucu vasıtasıyla etkileştiği CDH1 ve CDC20 aktivatör proteinleri gerekmektedir (80,81). APC5 ve APC7, CBP/p300 kompleksine bağlı olacak şekilde Adenoviral onkogen E1A aracılı hücresel dönüşümünü baskılar. APC5 ve APC7, in vitro ortamda CBP/p300'e bağlanmak için E1A ile rekabet halindedir. E1A'nın ekspresyonu p300'e bağlı transaktivasyonu inhibe eder, hem APC5 hem de APC7 tarafından p300'e bağlı transaktivasyon etkili hale gelir. Rat embriyo fibroblastlarında, APC5 ve APC7, CBP/p300'ü hedef alarak E1A-aracılığıyla hücresel dönüşümü baskılar. Mutant APC5 ve APC7, CBP/p300'e bağlanamaz ve CBP/p300'ün E1A-aracılığıyla hücresel dönüşümü baskılama yetenekleri sınırlar. Mutant olmasa dahi CBP/p300 ile etkileşemeyen APC5/7, E1A aracılı hücresel dönüşüme karşı koyabilir. Sonuçta APC/C-CBP/p300 etkileşimdeki zarar E1A aracılı hücresel dönüşümde kritik yere sahiptir, bu durum APC/C'nin bu bileşenlerinin hücresel dönüşüm esnasında hedef olabileceğini işaret etmektedir (84,89). APC'nin düzensizliği anormal kromozom ayrılmasına yol açabilir, sonuçta anöploidi oluşur. APC'nin anormal düzenlemesi kromozom stabilitesini bozulması yoluyla malignant dönüşüme neden olabilir. Göğüs karsinom örneklerinde diploid gruplarda anöploid gruplara göre APC7 ekspresyonu daha yüksektir. Göğüs kanserlerinde APC aktivitesinin düzensizliği belkide APC7'nin downregülasyonundan kaynaklıdır ve göğüs kanseriyle tümör oluşumu ile ilişkili olabilir, APC7 proteini gözlenmeyen göğüs karsinomları oldukça agresif ve sık bi şekilde gözlenmiştir. Bu bulgu APC7'nin ekspresyonlarıyla göğüs kanseri oluşumu arasında bağlantı olabileceğini düşündürmektedir. APC7 ekspresyon kaybı bazı ileri dereceli göğüs kanserlerinde sınırlı gibi görünmektedir. APC7 ekspresyonları farklı göğüs karsinomlarında değişkenlik gösterebilir (83). Primer tümörlerden alınan

örneklerde ve hücre hatlarındaki mutasyon analizleri sonucu p300'ün klasik tümör süpressör gibi hareket edebileceği düşünülmektedir (84). APC/C, 14 farklı proteinden oluşan heterolog ekspresyon sistemlerini kullanarak ekspre olan büyük bir komplekstir (87). RNAi yoluyla sırasıyla CBP ve p300 ekspresyonları durdurulduğunda APC/C ubikitin ligaz aktivitesi *CBP* geni eksprese olmadığında düşmekte, *p300* ekspresyonunda aynı sonuç gözlenmemektedir. APC5 ve APC7'nin CBP/p300 etkileşimi CBP/p300 asetiltransferaz aktivitesini artırır ve CBP/p300'e bağımlı transkripsiyonu artırır. APC5 ve APC7'nin aşırı ekspresyonları Histon 4 promotor bağının CBP tarafından asetilasyonunu artırmaktadır. APC5 ve APC7, E2F1/DP1 kompleksi transaktivasyonunu CBP/p300'e bağımlı olarak artırır. Hem APC5 hem de APC7 interfaz hücrelelerinde CBP ile yan yanadır (89). APC7, OGT gibi TPR altüniteleri içerir ve TPR motifleri proteinler arasındaki ilişkiye aracılık eder (82).

Çalışmamızda 1.grup hastaların *BAP1* ekspresyonlarında kontrole göre istatistiksel olarak bir fark saptanmadı. Literatürle karşılatırıldığında *BAP1*'de monozomi 3, delesyon, gen lokusunda heterozigosite kayıpları, gende meydana gelen inaktive eden mutasyon, biallel inaktivasyonu, germline *BAP1* mutasyon taşıyıcılığı düşünülebilir. Hastaların bölümümüzde yapılan rutin tarama kayıtlarında monozomi 3'e rastlanmamıştır. Klasik sitogenetik taramaları yapılan hastalarda da herhangi bir yapısal ve sayısal anomalilere rastlanmamıştır. Çalışmamızda FISH analizleri bütçe sınırı nedeniyle yapılamamıştır. Diğer bir olasılıkta APC aktivitesini inhibe eden farklı tümör süpressörlerin olmasıdır.

2.grupta *BAP1* ekspresyonlarının kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ve aşırı ekspresyonu gözlemlendi. İki gen arasında korelasyon analizleri çok zayıf derecede pozitif yönlü korelasyon ile sonuçlandı. Ayrıca t(15;17) mutasyon faktörünün istatistiksel olarak anlamlı bulundu ve 2. grup hastaların %80'i t(15;17) mutasyonu belirlenen hastalardı. Bu sonuç literatür taramamızla karşılaştırıldığında eksprese olarak kodlanmayan RNA birikimini veya oluşan transkriptlerin nonsense mutasyonları aracılığıyla mRNA yıkımı, çerçeve kayması mutasyonlarıyla premature protein sonlanması ve miRNA-125'in *BAP1* transkriptlerini etkilemesi sonucu truncat protein şüphesinin yanısıra promotor çevresinde transisyon, kodlanan sekans bölgesindeki delesyon ve ekzon kayıpları nedeniyle nükleer lokazisyon kaybı ve HCF-1 ve NLS'ye bağlanan domainde fonksiyon kaybına yönelik olası somatik veya germline missense

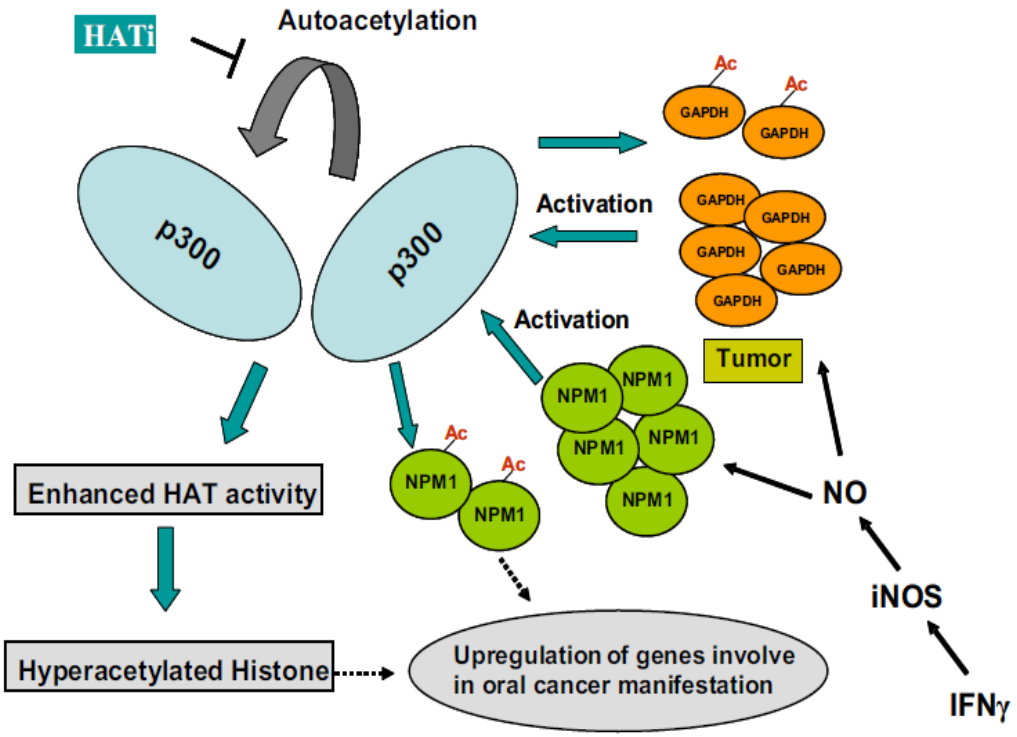
mutasyonları akla getirmektedir. Sekans analizleri ve protein düzeylerine bütçe sınırı nedeniyle yapılamamıştır.



Şekil 5.1. RARA sinyal yolağı (108)

1. ve 2. gruptaki *BAP1* ekspresyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu, benzer sonuç 2. ve 3. grup karşılaştırıldığında da elde edildi. 2. grupta *BAP1* ekspresyonu oldukça yüksek iken, 3. grupta ekspresyonun düşmesi ve hasta grubunda %80 t(15;17) mutasyonu içeren hastaların olması, HCF-1 ile OGT'nin Sin3a ile etkileştiği farelerde gösterilmesi, *ARID1A* ve *BAP1*'in kolanjiyokarsinom kanserlerde sıklıkla mutasyona uğraması, *BAP1*'in *RARA* sinyal yolağıyla ilişkisinin kuvvetli olabileceği imasını vermektedir. Bu sonuçlar 1. gruptaki hastalarda *BAP1* mutasyonlarının biallel inaktivasyonu ve heterozigosite kaybı durumunu, 2. gruptaki hastalardaki uzun kodlanmayan RNA'ların oluşumunu, miRNA etkisini, nonsense mutasyon yoluyla proteindeki fonksiyonel görevleri olan HCF-1 ve NLS domainlerine

etki etmesi ihtimalini güçlendirmektedir. 1. gruptaki *BAP1* ekspresyonları için diğer bir ihtimalde APC7'nin başka tümör süpressör mekanizmalarca kontrol edilebilmesidir.



Şekil 5.2. Oral skuamöz hücre karsinomlarında p300/NPM1 ilişkisi (101)

Çalışmamızda 1. ve 2. grup hastaların *APC7* ekspresyonları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. 1. grupta fazla ekspresyon, 2. grupta aşırı ekspresyon tespit edildi. 2 ile 3. grup ekspresyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ve 3.grupta ekspresyon ciddi oranda düşmüştür. Çalışmamızda rutin taramalarda t(15;17) mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir faktör olduğunu gösterdi ve *NPM1-A* mutasyonu bulunduran numune sayısı artırılması durumunda istatistiksel olarak anlamı olabileceği tahmin edilmektedir. Bunun yanı sıra *APC7*'nin ekspresyonları anlamlı olarak 3. grupta Kemik iliği göre periferik kanda daha azdı. Bu da hastalığın köken aldığı progenitör hücrelerde ekspresyonunun baskılanamaması ve hastalığın devam etmesi şeklinde yorumlanmıştır. 1 ve 2. grupta rutin taramalarda *NPM1-A* ve t(15;17) mutasyonu gözlenen hasta oranı yüksek olması ve literatürle karşılaştırıldığında, p300'ün NPM1 tarafından oral skuamöz hücre karsinomlarıda tetiklenmesi ve genlerin aşırı eksprese olması, *NPM1 ile APC7* ekspresyonları arasında bağlantı olabileceği düşüncesine sebep olmaktadır. Ayrıca CBP/p300'ün *RARA* sinyal yolağıyla bağlantısı

ve APC7' nin, CBP/P300 ile etkileşimi sonucu asetil transferaz aktivitesini artması, APC7-CBP/p300 arasındaki ilişkisinin AML'de hedef olabilme ihtimali, PML ve RARA'nın CBP ile direk olarak etkileşime girmesi *APC7* aşırı ekspresyonlarının t(15;17) hastalarında bağlantılı olabileceğini işaret etmektedir.

İki gen arasındaki korelasyon analizlerin kontrol grubunda iki gen arasıdan istatistiksel olarak orta derecede pozitif yönlü korelasyon ve 1. grupta istatistiksel olarak anlamlı biçimde iyi derecede pozitif yönlü korelasyonu göstermiştir. Literatürde BAP1'in OGT ile bağlantısı ve APC7'nin OGT gibi TPR altünitesi içermesinin gösterilmesi bu korelasyonunun literatürle uyuştuğunu göstermektedir. Fakat lösemide *BAP1* ve *APC7* korelasyonunu ortaya koyan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hastane sisteminde görebildiğimiz kadarıyla 1. grupta *NPM1-A* mutasyonu gözlenen 7 hasta, t (15;17) gözlenen 2 hasta, inv(16) gözlenen 1 hasta; 2. grupta t(15;17) mutasyonu gözlenen 1 hasta ex olmuştu. Literatürle karşılaştırdığımızda APC7' nin CBP/P300 ile etkileşimi, interfaz hücrelerinde APC7 ile CBP'nin yan yana olması, p300'ün NPM1 tarafından oral skuamöz hücre karsinomlarıda tetiklenmesi ve genlerin aşırı eksprese olması, BAP1'in BARD1/BRCA1 etkileşimini bozarak NPM1/B23 ubikitin katalizlemesini inhibe etmesi, γ-tubulin'lerin BRCA1/BARD1 komplesi tarafından ubikitine edilmesi sonucu kromozom instabilite riskinin artması ve BAP1'in bu ubikitinasyonu deubikitine edici enzim olarak belirtilmesi *NPM1-A* mutasyonuna sahip hastalarda *BAP1* ekspresyon veya BAP1 protein kayıplarının yanı sıra *APC7*'nin aşırı ekspresyonunun ciddi etkisi olabileceği görüşünü hakim kılmaktadır. Gelecekte bölünme sürecinin M fazına dönük *NPM1-A, APC7-CBP/p300, BAP1* üzerine yapılacak çalışmalar hastalık patogenezini anlamada yardımcı olabilir. Hücre hattı çalışmalarında (F9) CBP ya da p300 ribozimlerinin retinoik asitlerince indüklenen apoptozisi engellemesi, farelerde *Cbp*'nin normal hematopoetik farklılaşmada gerekli olması, Sin3a'nın HCF-1 ve OGT ile etkileştiğinin farelerde gösterilmesi, APC7 ile OGT'nin protein-protein etkileşimi sağlayan TPR motifleri içermesi, PML'nin CBP ile etkileşerek büyüme ve tümör süpressör faktörleri üzerine etkisi *BAP1* ve *APC7* ekspresyonlarında pozitif korelasyonu destekler niteliktedir.

Germline *BAP1* mutasyonları kanser sendromlarının yeni bir türüdür ve kesinlikle kanser şüphesiyle yüksek oranda bağlantılıdır. Germline *BAP1* mutasyon taşıyıcılarının kansere maruz kalma riskinin yüksek olduğu açıktır. Ayrıca *BAP1*, uveal melanomada

diğer aday gen/genleri kalıtsal kanser sendromunda muhtemelen tetikler. Deubikitinaz enzimi BAP1 bazı kanser türlerinde artan riskle beraber kalıtsal kanser sendromlarında mutanttır, bu nedenle erken safhada kanser teşhisinin yanı sıra *BAP1* mutasyon taşıyıcıları düzenli olarak tedaviden geçirilmelidir (31, 37, 52).

Birçok kanser tipinde tümör süreci ve prognoz ile *BAP1*'in aşırı ekspresyonu arasındaki ilişkiye dair gelecekteki bakış açısına göre anormal şekilde eksprese olan BAP1 aktivitesinin inhisyonunun faydalı bir terapötik etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Multivariate analizlerinde BAP1 ekspresyonlarının kolorektal kanserlerde bağımsız bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir (37). Oküler onkoloji merkezleri Uveal melanoma (UM)'lı hastalar için moleküler prognostik testlerini tercih etmektedir. Son tekniklerle, mRNA ekspresyonları baz alınarak UM iki alt sınıfa ayrılır: Sınıf I ve II. Sınıf II UM, *BAP1'*i inaktif eden mutasyon ile güçlü olarak bağlantılıdır ve düşük sağkalımla ilişkilidir (59). ccRCC'de BAP1 ekspresyonunun özellikle düşük riskli hasta grubunda bağımsız prognostik markır olduğu savunulmaktadır (68).

Gelecekte *BAP1, APC7, OGT, HCF-1, ASXL1, NPM1-A,ARID1A, SİN3A, CBP, P300, RARA* sinyal yolaklarına yönelik çalışmalar AML hastalarının tedavisine ışık tutabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Başaran N. Tıbbi Genetik 8. Baskı, Güneş & Nobel Tıp Kitabevi 1999: ss 373
2. Yıldırım M. Akut Lösemide Gravin Ekspresyonunun Prognostik Önemi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana 2006: ss 2
3. Çakır Z. The Roles Of Ceramide Metabolizing Genes On Resveratrol Induced Apoptosis In Human HL60 Acute Myeloid Leukemia Cells, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir 2010: pp 1
4. Terzi YK, Güran Ş. Kök Hücre Biyolojisi ve Hematolojik Malignitelerde Kök Hücrenin Rolü. Cumhuriyet Tıp Derg 2012; 34: 235-241
5. Özer V. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) ve Kronik Myeloid Lösemi (KML) Ön Tanılı Olgularda Füzyon Gen Ekspresyonlarının Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin 2011: ss 3-4
6. Dinç E, Argın MA, Kurtuluş UC, İsmi T. Bilateral Görme Kaybı ile Ortaya Çıkan Akut Myeloid Lösemi. Ret-Vit 2010; 18: 74-76
7. Berköz M. Akut Lenfoblastik Lösemi ve Akut Myeloid Lösemi Vakalarında *CYP2B6* Geni G15631T Gen Polimorfizminin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin 2007: ss 4
8. Ertop Ş. AML' de Risk Sınıflaması Ve Tedavi, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, s77, 2012, Antalya
9. Saydam G. Hematolojik Malignitelerde Sinyal İleti Sistemleri, Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu, 2005, Mersin

10. Özbek U. Akut Miyelositik ve Akut Lenfoblastik lösemilerde moleküler genetik ve prognoz, Türk Hematoloji Derneği Akut Lösemi Kursu, s19-21, 2006, Aydın
11. Deviren A. Hematolojik Malinitelerde Sitogenetik İnceleme. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Dizisi 2005, 45: 75-81
12. Apak H. Çocukluk çağı lösemileri. Türk Pediatri Arşivi 2006; 41: 189- 96
13. Ali R. Akut Lösemiler WHO Sınıflandırılması ve Nadir Akut Lösemi Tipleri, Türk Hematoloji Derneği Akut Lösemi Kursu, s7, 2006, Aydın
14. Çankaya E. Akut Lenfositer Lösemi VE Akut Myelositer Lösemili Hastalarda Adiponektin, İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-I, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein-3 Düzeylerinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum 2009: ss 3-4
15. Cömert M, Aydoğdu İ, Yetkin F, Kaya E, ve ark. Akut myeloid lösemi hastalarında febril nötropenik atakların değerlendirilmesi. Ege Tıp Dergisi 2014; 53: 33-39
16. Atamer T. Akut Myeloid Lösemi Standart Tedavi, Türk Hematoloji Derneği Akut Lösemi Kursu, s45, 2006, Aydın
17. Öztürk G. Akut Myeloid Lösemi (AML) Hastalarında Görülen *NPM1* Gen Mutasyonunun Türk Populasyonunda Taranması, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara 2011: ss 9-11
18. Anak S, Uysalol E. Akut Myeloid Lösemi (AML). Çocuk Dergisi 2012; 12: 153-158
19. Akyerli Boylu C. Analysis of Candidate Moleculer Target In Adult(CML) and Childhood (AML, ALL) Leukemias, Doktora Tezi, Bilkent Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ankara 2004: pp 3-28
20. Yeral M. Donör Aferez Ürünündeki CD34+ Hücre Sayısı ve Lenfosit Alt Gruplarının Allogeneik Periferik Kök Hücre Nakli Sonuçları Üzerine Etkisi, Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı, Ankara 2009: ss 3-6
21. Ali R, Özkalemkaş F, Özkocaman V, ve ark. Güney Marmara Bölgesi Akut Myeloid Löseminin Epidemiyolojik Özellikleri. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 28: 33-37

22. Kanarığ Gürel D. Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi Uygulanan Hastaların Yaşam Kalitesi Ve Bunu Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana 2007: ss 7
23. Ayyıldız O, Kalkanlı S, Batun S, ve ark. Akut Myeloid Lösemili Hastalarımızda t(8;21) ve inv (16)'nın Kantitatif RT-PCR ile Araştırılması. Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi 2005; 15: 15-17
24. Gülten T, Yakut T. Çocukluk çağı Lösemilerindeki Genetik Değişiklikler ve Klinik Önemi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 31: 57-62
25. Hiroyuki N, Wenwen W, Ayaka K, et al. BRCA1-Associated Protein 1 Interferes with BRCA1/BARD1 RING Heterodimer Activity. Cancer Res 2009; 69: 111–9
26. Güney Y, Bilgihan A. Ubikitin sistem. T Klin Tıp Bilimleri 2002; 22: 616-619
27. Karen HV, Narra SD, Kenneth LF, et al. BAP1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. Cancer Res. 2008; 68: 6953–6962
28. William D F, Andrew YS. In Brief: *BRCA1* and *BRCA2*. J Pathol 2013; 230: 347-349
29. Ying F, Da F, Xi-Zhong S. The Potential Role of Ubiquitin C-terminal Hydrolases in Oncogenesis. Elsevier 2010; 186: 1-6
30. Ji Z, Mohammed H, Webber A, Ridsdale J, et al. The forkhead transcription factor FOXK2 acts as a chromatin targeting factor for the BAP1-containing histone deubiquitinase complex. Nucleic Acids Research 2014; 42: 6232-6242
31. Joseph RT, David M, Joshua DS. Connecting Molecular Pathways to Hereditary Cancer Risk Syndrome. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2013: 81-90
32. Wiesner T, Obenauf AC, Murali R, et al. Germline mutations in *BAP1* predispose to melanocytic tumors. Nat Genet 2011; 43: 1018-1021
33. Scheuermann JC, Gutiérrez L, Müller J. ‘’Histone H2A monoubiquitination and Polycomb repression’’ Landes Bioscience 2012; 6: 162-168
34. Aumann S, Abdel-Wahab O. Somatic alterations and dysregulation of epigenetic modifiers in cancers. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014, in press

35. Dey A, Seshasayee D, Noubade R, et al. Loss of the Tumor Suppressor BAP1 Causes Myeloid Transformation. Science 2012; 337: 1541-1546
36. Stratton MR. Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise. Science 2011; 331: 1553-1558
37. Battaglia A. The Importance of Multidisciplinary Approach in Early Detection of BAP1 Tumor Predisposition Syndrome: Clinical Management and Risk Assessment. Clinical Medicine Insights: Oncology 2014; 8: 37-48
38. Yu H, Pak H, Hammond-Martel L, et al. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. PNAS 2014; 111: 285-290
39. Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. Nature Gen 2012; 44: 751-759
40. Matatall KA, Agapova OA, Onken MD, et al. BAP1 deficiency causes loss of melanocytic cell identity in uveal melanoma. BMC Cancer 2013; 13: 371
41. Cheung M, Talarchek J, Schindeler K, et al. Further evidence for germline BAP1 mutations predisposing to melanoma and malignant mesothelioma. Cancer Genetics 2013; 206: 206-210
42. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. Science 2010; 330: 1410-1413
43. Bott M, Brevet M, Taylor BS, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. Nature Gen 2011; 43: 668-671
44. Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, et al. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. J Med Genet 2011; 48: 856-859
45. White AE, Harper JW. Emerging Anatomy of the BAP1 Tumor Suppressor System. Science 2012; 337: 1463-1464
46. Testa JR, Cheung M, Pei J, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. Nat Genet 2011; 43: 1022-1025
47. Hakimi AA, Chen YB, Wren J, et al. Clinical and pathologic impact of select chromatin modulating tumor suppressors in clear cell renal cell carcinoma. Eur Urol. 2013; 63: 848-854

48. Rohini Roy, Chun J, P SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. Nature Reviews Cancer 2012; 12: 68-78
49. Ladanyi M, Zauder MG, Krug LM, et al. New strategies in pleural mesothelioma: BAP1 and NF2 as novel targets for therapeutic development and risk assessment. Clin Cancer Res. 2012; 18: 4485-90
50. Abdel-Wahab O, Dey A. The ASXL–BAP1 axis: new factors in myelopoiesis, cancer and epigenetics. Leukemia 2013; 27: 10–15
51. Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. Carcinogenesis 2013; 34: 1413-1419
52. Pilarski R, Cebulla CM, Massengill JB, et al. Expanding the Clinical Phenotype of Hereditary BAP1 Cancer Predisposition Syndrome, Reporting Three New Cases. Genes, Chromosomes & Cancer 2014; 53: 177–182
53. Kindler HL. Peritoneal Mesothelioma: The Site of Origin Matters. Asco Educational Book 2013: 182-187
54. Xu J, Kadariya Y, Cheung M, et al. Germline Mutation of *Bap1* Accelerates Development of Asbestos-Induced Malignant Mesothelioma. *Cancer Res* 2014; 74: 4388-4397
55. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, et al. Biallelic germline and somatic mutations in malignant mesothelioma: Multiple mutations in transcription regulators including mSWI/SNF genes. Int. J. Cancer 2014; 00: 1-12
56. Njauw Ching-Ni J, Kim I, Piris A, et al. Germline BAP1 Inactivation Is Preferentially Associated with Metastatic Ocular Melanoma and Cutaneous-Ocular Melanoma Families. Plos One 2012; 7: e35295
57. de la Fouchardière A, Cabaret O, Savin L, et al. Germline *BAP1* mutations predispose also to multiple basal cell carcinomas. Clin Genet 2014: 1-4
58. Martorano LM, Winkelmann RR, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH, Campbell SM. Ocular melanoma and the BAP1 hereditary cancer syndrome: implications for the dermatologist. International Journal of Dermatology 2014; 53: 657–663
59. Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE. Molecular pathology of uveal melanoma. Eye 2013; 27: 230–242

60. Bentley ML, Corn JE, Dong KC, et al. Recognition of UbcH5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex. The Embo Journal 2011; 30: 3285–3297

61. Höiom V, Edsgard D, Helgadottir H, et al. Hereditary Uveal Melanoma: A Report of a Germline Mutation in BAP1. Genes, Chromosomes & Cancer 2013; 52: 378–384

62. Aoude LG, Wadt K, Bojesen A, et al. A *BAP1* Mutation in a Danish Family Predisposes to Uveal Melanoma and Other Cancers. Plos One 2013; 8: e72144

63. Zhang Y, Jia R, Wang J, et al. Targeted Silencing of MART-1 Gene Expression by RNA Interference Enhances the Migration Ability of Uveal Melanoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 15092-15104

64. Maerker DA, Zeschnigk M, Nelles J, et al. *BAP1* germline mutation in two first grade family members with uveal melanoma. Br J Ophthalmol 2014; 98: 224–227

65. Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, et al. *POT1* loss-of-function variants predispose to familial melanoma. Nature Genetic 2014; 46: 478

66. Busam KJ, Sung J, Wiesner T, Deimling Av, Jungbluth A. Combined BRAFV600E-positive Melanocytic Lesions With Large Epithelioid Cells Lacking BAP1 Expression and Conventional Nevomelanocytes. Am J Surg Pathol 2013; 37: 193–199

67. Guo G, Gui Y, Gao S, et al. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. Nature Gen 2011; 44: 18

68. Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, et al. Loss of BAP1 Protein Expression Is an Independent Marker of Poor Prognosis in Patients With Low-Risk Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Cancer 2014; 120: 1059-1067

69. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. Nature Genetic 2014; 46: 225-233

70. Gossage L, Murtaza M, Slatter AF, et al. Clinical and pathological impact of *VHL, PBRM1, BAP1, SETD2,KDM6A,*and *JARID1c* in clear cell renal cell carcinoma. Genes, Chromosomes & Cancer 2014; 53: 38-51

71. Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, et al. Effects on survival of *BAP1* and *PBRM1* mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospectiveanalysis with independent validation. Lancet Oncol 2013; 14: 159-167

72. Malouf GG, Zhang J, Yuan Y, et al. Characterization of long non-coding RNA transcriptome in clear-cell renal cell carcinoma by next-generation deep sequencing. Mol Oncol. 2014: 1-12

73. Pawłowski R, Mühl SM, Sulser T, et al. Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression. Int. J. Cancer 2013; 132: E11–E17

74. Chan-On W, Nairismägi ML, Ong CK, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke related and non-infection-related bile duct cancers. Nature Genetic 2013; 45: 1474-1477

75. Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in *BAP1*, *ARID1A* and *PBRM1* in intrahepatic cholangiocarcinomas. Nature Genetic 2013; 45: 1470-1473

76. Janku F, Kaseb AO, Apostolia M, et al. Identification of novel therapeutic targets in the PI3K/AKT/ mTOR pathway in hepatocellular carcinoma using targeted next generation sequencing. Oncotarget 2014; 5: 3012-3019

77. Jhunjhunwala S, Jiang Z, Stawiski E, et al. Diverse modes of genomic alterations in hepatocellular carcinoma. Genome Biology 2014; 15: 436

78. Bera A, VenkataSubbarao K, Manoharan MS, Hill P, Freeman JW. A miRNA Signature of Chemoresistant Mesenchymal Phenotype Identifies Novel Molecular Targets Associated with Advanced Pancreatic Cancer. PlosOne 2014; 9: e106343

79. Hurtley S. Identifying BAP1 Targets. Science 2012; 337: 1431

80. Kraft C, Herzog F, Gieffers C, et al. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. The EMBO Journal 2003; 22: 6598-6609

81. Vodermaier HC, Gieffers C, Maurer-Stroh S, Eisenhaber F, Peter JM. TPR Subunits of the Anaphase-Promoting Complex Mediate Binding to the Activator Protein CDH1. Current Biology 2003; 13: 1459-1468

82. Dohyun H, Kyunggon K, Yeonjung K, Yup K, Ji Yoon L, Youngsoo K. Crystal Structure of the N-terminal Domain of Anaphase-promoting Complex Subunit 7. The Journal Of Biological Chemistry 2009; 284: 15137–15146

83. Park KH, Choi SE, Eom M, Kang Y. Downregulation of the anaphase-promoting complex (APC)7 in invasive ductal carcinomas of the breast and its clinicopathologic relationships. Breast Cancer Research 2005; 7: R238-R246

84. Liu J, Fuchs SY. Cross-Talk Between APC/C and CBP/p300. Cancer Biology & Therapy 2006; 5: 760-762

85. Pál M, Nagy O, Ménesi D, Udvardy A, Deák P. Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. J Cell Sci. 2007; 120: 3238-3248

86. Lima M de F, Eloy NB, Pegoraro C, et al. Genomic evolution and complexity of the Anaphase promoting Complex (APC) in land plants. BMC Plant Biology 2010; 10: 254

87. Ziguo Z, Jing Y, Eric HK, et al. Recombinant expression, reconstitution and structure of human anaphase-promoting complex (APC/C). Biochem. J. 2013; 449: 365–371

88. Hongtao Y, Jan-Michael P, Randall WK, et al. Identification of a Cullin Homology Region in a Subunit of the Anaphase-Promoting Comple. Science 1998; 279:1219-1222

89. Andrew S. T, Grant SS, Roger JAG, et al. The APC/C and CBP/p300 cooperate to regulate transcription and cell-cycle progression. Nature 2005; 438:690-695

90. Tordera RM, Garcia-García AL, Elizalde N, et al. Chronic stress and impaired glutamate function elicit a depressive-like phenotype and common changes in gene expression in the mouse frontal cortex. European Neuropsychopharmacology 2011; 21: 23–32

91. Allen WH, Abhishek VG, Leticia M, et al. The Anaphase-Promoting Complex Protein 5 (AnapC5) Associates with A20 and Inhibits IL-17-Mediated Signal Transduction. Plos One 2013; 8: e70168

92. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and Immuniyu 2005; 6: 279-284

93. Yin LY, Sackel NA, Zekry A et al. Real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. Immunology and Cell Biology 2001; 79: 213-221

94. Snider JV, Wechser MA, Lossos IS. Human disease characterization: real-time kantitatif PCR analysis of gene expression. DDT 2001; 6: 1062-1066

95. Eleaume H, Jabbouri S. Comparison of two standardisation methods in real-time kantitatif RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. Journal of Microbiological Methods 2004; 59: 363– 370

96. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Kantitatif PCR and the 2-ΔΔ***C*t** Method. Methods 2001; 25: 402-408

97. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleid Acid Research 2001; 29: 00

98. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques 2005; 39: 75-85

99. WEB_1. (2014). Life Technology.http://www.lifetechnologies.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/pcr-understanding-ct-application-note.html. Real Time PCR: Understanding C t. Real Time PCR Application Note, AB applied biosystems by life technologies. (10.10.2014)

100. Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of *Kantitatif* Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry 2009; 55: 00

101. Arif M, Vedamurthy BM, Choudhari R et al. Nitric Oxide-Mediated Histone Hyperacetylation in Oral Cancer: Target for a Water-Soluble HAT Inhibitor, TK7A. Chemistry & Biology 2010; 17: 903-910

102. Zarrizi R, Menard J, Belting M, Massoumi R. Deubiquitination of γ-tubulin by BAP1 prevents chromosome instability in breast cancer cells. Cancer Res. 2014, in press

103. Kyakumoto S, Kito N, Sato N. Expression of cAMP response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP) and the implication in retinoic acid-inducible transcription activation in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. Endocr Res. 2003; 29: 277

104.Gao X-n, Lin J, Ning Q-y, et al. A Histone Acetyltransferase p300 Inhibitor C646 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis Selectively in AML1-ETO Positive AML Cells. PLOSone 2013; 8: e55481

105. Salomoni P, Pandolfi PP. The role of PML in Tumor Suppression. Cell 2002; 108: 166-168

106. Chan HM, La Thangue NB. P300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. Journal of Cell Science 2001; 114: 2365

107. Lee S, Lee B, Lee JW and Lee S-K. Retinoid Signaling and Neurogenin2 Function Are Coupled for the Specification of Spinal Motor Neurons through a Chromatin Modifier CBP. Neuron 2009; 62: 652

108. WEB_2. (2014). Life Science Research. lsresearch.thomsonreuters.com/maps/672 (23.10.2014)

109. WEB_3. (2014). Genecard. http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAP1 (30.09.2014)

110. WEB_4. (2014). Türkiye Hematoloji Derneği. http://www.thd.org.tr/thd_halk/?sayfa=akut_miyeloid (25.08.2014)

111. WEB_5. (2014). Klinik Bonn Üniversitesi. http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000526538.jpg (28.10.2014)

EKLER

ETİK KURUL KARARI

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULUN ADI	: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Akut myeloid lösemi hastalarında BAP1ve ANAPC7 gen ekspresyonlarının araştırılması				
ARIŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU					
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Munis Dündar				
KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik				
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Munis Dündar				
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı/Kayseri				
DESTEKLEYİCİ					
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ					
ARAŞTIRMA FAZI	FAZ 1				
	FAZ 2				
	FAZ 3				
	FAZ 4				
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon				
	Yüksek Doz Araştırması				
	Diğer İse Belirtiniz	X	Yüksek Lisans Tezi		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ X	ÇOKMERKEZ	ULUSAL X	ULUSLARARASI	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe	İngilizce	Diğer
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe	İngilizce	Diğer
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe	İngilizce	Diğer
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe	İngilizce	Diğer

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI		Açıklama
TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ		
SİGORTA		
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		
BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFERFORMU		
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ		
İLAN		
YILLIK BİLDİRİM		
SONUÇ RAPORU		

ASLI GİBİDİR

T.C.

Bahri YANCAR

Fakülte Şefi

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER			
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

ASLI GİBİDİR

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

KARAR BİLGİLERİ		
	Karar No : 2013/549	**Karar Tarihi :** 20.08.2013
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nazan DOLU	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rekonst.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Alper YURCİ	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Hasan B. ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mehmet A. SOMDAŞ	KBB	Kayseri Eğitim Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Ferhan ELMALI	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	Sivil-Tiyatro Sanatçısı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

I. BİLGİLENDİRME BÖLÜMÜ

Araştırmanın Adı: AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALIĞINDA BAP1 VE ANAPC7 GEN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI.

Araştırmanın Amacı: Lösemiler hemopoetik hücrelerin malign transformasyonu sonucu oluşan neoplastik hastalıklar grubudur. Köken aldıkları hücre tipine göre lenfoid, miyeloid; sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de akut ve kronik olarak sınıflandırılırlar. Akut lösemiler Akut Myeloid Lösemi (AML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Akut lösemilerin prognozunun ve patogenezinin anlaşılmasında moleküler, sitogenetik ve immünolojik çalışmalar katkıda bulunur.

Son 10 yıl içerisinde, kanserin genetik bir hastalık olduğu daha iyi anlaşılmış ve kanser genetiği ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Lösemi oluşumunda da çeşitli genetik faktörler rol oynamaktadır.

Kanser gelişim sürecinde tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen ekspresyon önem taşımaktadır. BAP1 tümör baskılayıcı geni karsinomlarda en yaygın olarak mutasyona uğrayan gendir. ANAPC7 geni de hücre çoğalmasının düzenlenmesinde görev alır. Akut Myeloid Lösemi (AML) insidensi yaklaşık yılda 100.000'de 3,6 iken, Akut Lenfoid Lösemi (ALL)'nin tüm yaş gruplarınlarında toplam insidensi 100.000'de 1,3'dür. AML erişkinlerde ALL ise çocukluk çağında daha sık gözlenir. Dolayısıyla AML vakalarında BAP1 ve ANAPC7 genlerinin ekpresyonları araştırılmasıyla, hastalığın bu genlerle olan ilişkisi ve bu iki genin birbiri ile olan ilişkileri açıklanmaya çalışılacaktır.

Araştırmanın Süresi: 12 AY

Araştırmaya Katılan Gönüllünün Sayısı: 70 kişi

Araştırmayı kabul ettiğiniz takdirde kan örneğinizden çalışılacaktır. İsimleriniz tamamen gizli tutulacaktır. Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır;

ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Yapmak istediğimiz çalışmanın size bir risk getirmesi beklenmemektedir ve kabul etmediğiniz takdirde tedaviniz hiçbir şekilde etkilenmeyecektir. Araştırmanın sonucunda aranan bilgi elde edildiğinde size sonuçlar verilecektir. Bu formu imzalamadan önce veya imzaladıktan sonra çalışma ile ilgili 24 saat içinde aşağıda adı yazılı kişiye sorularınızı sorabilirsiniz:

Araştırmacının:

Adı ve Soyadı: M. Eren Korkmazer **Cep Tel:** 0545 585 36 00

Adres: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi 2.Kat Tıbbi Genetik AD.

II. GÖNÜLLÜ OLURU BÖLÜMÜ

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama, aşağıda adı belirtilen kişi tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün:

Adı: Tarih:

Soyadı:

İmza:

Açıklamaları Yapan Kişinin:

Adı: Tarih:

Soyadı:

İmza:

Tanık Olan Kişinin:

Adı: Tarih:

Soyadı:

İmza:

Bana anlatılanları ve yukarda yazılanları anladım. Bu formun bir kopyasını aldım. Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Muharrem Eren KORKMAZER
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 15 Eylül 1986, Malatya
Medeni Durumu: Bekâr
Tel: +90 545 585 36 00
email: eren_korkmazer@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2011-
Lisans	EÜ Fen Fakültesi Biyoloji AD	2010
Lise	Malatya (Y.D.A) Lisesi, Malatya	2004

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011	Erciyes Üniversitesi Patoloji Laboratuvarı	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce