

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**AKUT LÖSEMİLİ HASTALARDA 06-METİLGUANİN DNA TRANSFERAZ (*MGMT*)
VE MULT HOMOLOG 1 (*MLH 1*) DNA TAMİR GENLERİNİN PROMOTÖR
METİLSAYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Proje No: TSY-09-665

Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Çetin SAATÇI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Birimi tarafından TSY-09-665 nolu proje ile desteklenmiştir.

Araştırmacı

Keziban KORKMAZ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Temmuz 2014

KAYSERİ¹

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	3
ABSTRACT	4
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
4. BULGULAR	27
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	30
6.KAYNAKLAR	31

ÖZET

Normal kan hücrelerinin gelişim, olgunlaşma, ve/veya homeostasis sürecinde rol oynayan genlerin yapısal veya fonksiyonel olarak hatalı çalışmaları sonucu oluşan hastalığa lösemi denir. Lösemi alt gruplarını oluşturan Akut Myeloid Lösemi (AML) ve Akut Lenfoid Lösemi tanısı alan hastalara tedaviye yönelik olarak kemoterapi uygulanmaktadır. Kemoterapötik ajanlar DNA'da tek ya da çift zincir kırığı oluşturarak proliferasyonu durdurmayı amaçlamaktadır. Bir DNA tamir enzimini kodlayan Methylguanine-DNA Methyltransferase (*MGMT*) geni, ve bir DNA yanlış eşleşme tamir geni olan MutL Homolog 1 (*MLH1*) geninin promör bölgelerindeki epigenetik bir mekanizma olan metilasyon araştırılmak istenmiştir. Bu grup hastalarada kemoterapi sonrası DNA hasarı oluşacağı için *MGMT* ve *MLH1* genlerinde metilasyon kaynaklı olarak sessizleşme beklenmektedir. *MGMT* geninin beş CpG adacığı metilasyon açısından incelenmiştir. Ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler : AML, ALL, *MGMT*, *MLH1*, Metilasyon, CpG Adacığı, Promotör

ABSTRACT

Normal blood cell development, maturation, and / or processes involved in homeostasis of the structural or functional gene as a result of faulty operation is called disease leukemia. Forming sub-groups of leukemia acute myelogenous leukemia (AML) and acute lymphoid leukemia diagnosis to treatment to patients receiving chemotherapy is applied. Chemotherapeutic agents in single or double-strand breaks in DNA are used to stop proliferation by creating. A DNA repair enzyme encoding methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene, and a DNA mismatch repair gene that happy homolog 1 (MLH1) gene Promotor regions epigenetic mechanism, the methylation want to investigate. This group is to consist of DNA damage after chemotherapy in hastalara MGMT and MLH1 methylation in gene silencing is expected to be sourced. CpG island methylation of the MGMT gene was examined to five. However, there was no statistically significant.

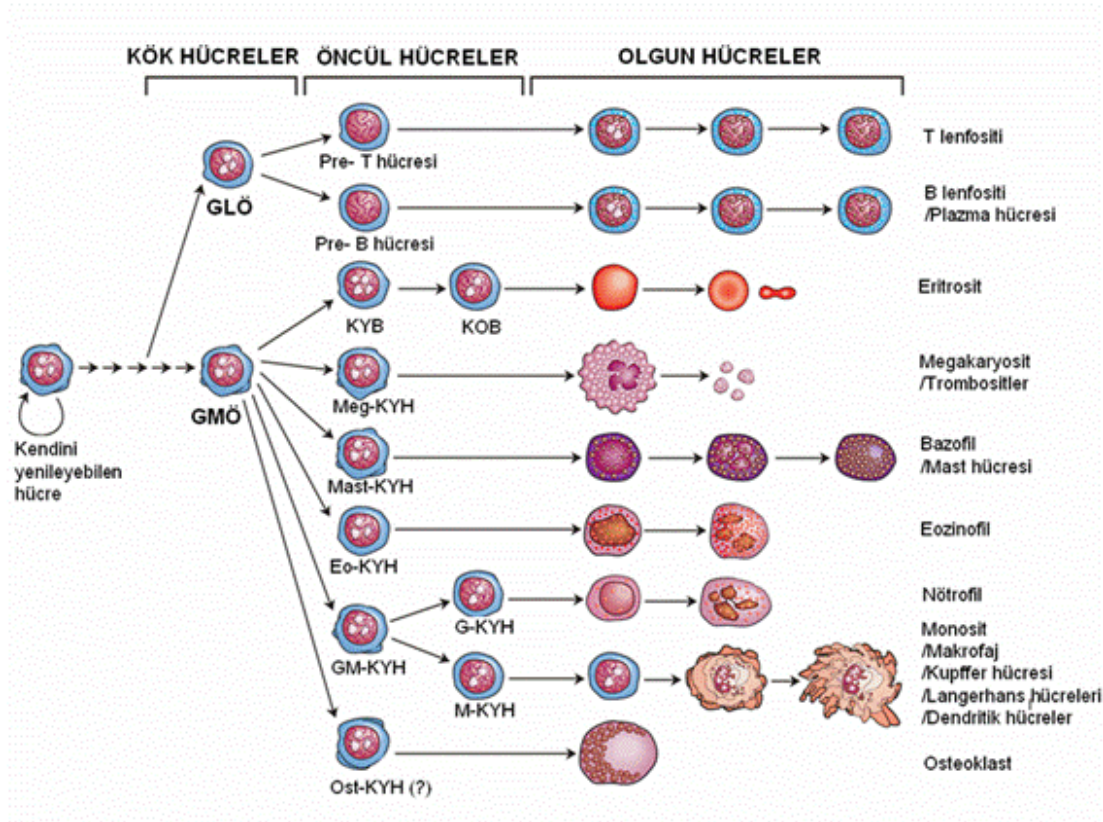
Key Words: AML, ALL, MGMT, MLH1, Methylation, CpG Island Promotor.

1. GİRİŞ

• GENEL BİLGİLER

Hematopoez, kan hücrelerinin üretim, farklılaşma ve gelişimi süreci olarak tanımlanabilir. Hematopoetik sistem, kemik iliği, karaciğer, dalak, lenf nodları ve timusları içerir. Hücrelerin farklılaşma ve gelişim yönünü belirleyen mekanizma özel büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin veya büyüme faktörü reseptörlerinin değişmiş ekspresyonu ya da bunların her ikisinin birlikte etkisi ile oluşur. Hematopoetik hücre jenerasyonunu ve bunların oluşumunu sağlayan adımların ilki uzun ömürlü “*pluripotent*” hücrelerin oluşumudur. Tüm kan hücrelerinin progenitörü “multipotent hematopoetik kök hücreler” olarak bilinen hücrelerdir (1).

Hematopoetik hücreler üç fazda ayrışabilirler. İlk grupta kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özelliklerine sahip en ilkel multipotent hücreler ikinci grupta öncül hücrelerden gelişen hücre hatları ve en gelişmiş grupta ise özel fonksiyonlarına en olgunlaşmış hücreler bulunur. Bu multipotent kök hücreler lenfositik ve nonlenfositik hücreler olarak adlandırılan iki büyük hücre grubunun öncüleridir. Kemik iliği multipotent kök hücrelerden olgunlaşmış kan hücrelerinin bu gelişimi ve teşekkülü büyüme faktörleri, inhibitörler ve mikro çevre tarafından kontrol edilir (1)



Şekil 1: Hematopoez ; Kendini yenileyebilen kök hücrelerden gelişen 8 farklı hematopoetik hücre hattı (1).

- **Lösemilerin sınıflandırılması**

Lösemiler kabaca hematopoetik sistemden kaynağını alan, klonal, neoplazik kan hastalıkları olarak tanımlanabilir. Başka bir deyişle lösemiler normal kan hücrelerinin gelişim, olgunlaşma, ve/veya homeostasis sürecinde rol oynayan genlerin yapısal veya fonksiyonel olarak hatalı çalışmaları sonucu oluşur. Hücre olgunlaşma derecesine bağlı olarak lösemi tipleri öncelikle 4 temel grupta toplanabilir (1)

- 1-Akut / Kronik myeloid lösemi
- 2-Akut / Kronik monositik lösemi
- 3-Akut / Kronik myelomonositik lösemi
- 4-Akut / Kronik lenfoid lösemi

Lösemiler çocukluk çağının en çok görülen malign hastalıkları olup çocukluk çağı kanserlerinin 1/4'ünü oluşturur. ALL diğer lenfoid malignansiler gibi tek bir anormal öncül hücrenin malign dönüşümü ile klonal çoğalma sonucunda ortaya çıkmaktadır. AML ise miyeloid, monositik, eritroid ve megakaryositik hücre serilerinin kemik iliği prekürsörlerinden oluşan heterojen dağılımlı hematolojik malignansi grubudur. Özellikle AML'de tedavi protokolleri üzerinde son 30 yıldır çok önemli gelişmeler olsa da halen 5 yıl hastalıksız yaşam oranı % 50'ler civarındadır (2).

- **Akut lösemiler**

Akut lösemiler, hematopoetik öncül hücrelerin neoplastik dönüşümü sonucunda gelişen, malign ve çocukluk çağı kanserleri içinde ölümcül etkisi bilinen en yaygın hastalıktır. Akut lösemiler, genç ve olgunlaşmamış hücrelerin lösemik formlarının periferik kan ve kemik iliğinde çoğalmaları ve istila etmeleri ile karakterizedir (1). Akut myeloid lösemi çocukluk çağında akut lösemilerin %15-20'sini oluşturmaktadır. Yetişkin hastaların yaklaşık %70'inde özellikle enfeksiyon sebepli mortalite görülmektedir. Tedavi edilmeyen bir akut myeloid lösemi hastası için ortalama yaşam süresi yaklaşık üç aydır. Çocukların %90'ı ve yetişkinlerin %70'inde tedavi ile hastalığın gerilemesi ve iyileşme görülebilmektedir. Modern tedavi metodları ile özellikle çocukluk çağı hastalarında büyük oranda iyileşme görülebilmektedir. Akut myeloid lösemi hastalığında en uzun iyileşme ve olası tam iyileşmenin sağlanması için gereken, hastalığın ilk tanı döneminde mümkün olduğunca çok hücrenin öldürülmesidir. Çünkü çeşitli tedavi protokolleri löseminin akut tiplerinin kesin tanısında hayati öneme sahiptir. Akut lösemiler akut myeloid lösemiler (AML) ve akut lenfoblastik lösemiler (ALL) olmak üzere iki büyük gruba ayrılabilir (1).

- **Akut Myeloid Lösemi (AML)**

AML, hemotopoetik sistemden kaynaklanan neoplastik hücrelerin kan, kemik iliği ve diğer dokuları infiltre etmesi ile karakterize, heterojen fenotipik ve genotipik özellikler gösterebilen klonal hemotopoetik kök hücre hastalığıdır (3). Ayrıca AML myeloid, monosit, eritroid ve megakaryositik hematopoetik prekürsörlerde olgunlaşmanın erken dönemde duraksadığı malign bir hastalıktır (1). AML'ye yönelik araştırmalarda, kök hücre kompartmanında normal

hematopoezis sırasında herhangi bir basamakta hücre tipinin farklılaşmasında yetersizlik ve/veya bazı kök hücre tiplerinin aşırı proliferasyonu ve/veya fonksiyonel olmayan miyeloblastların birikmesi gibi anormallikler saptanmıştır ((3)).

AML çocukluk çağı lösemilerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. Çocukluk çağı akut myeloid lösemi (AML) insidansı yenidoğan ve adolesan dönemindeki hafif bir artışın dışında genellikle tüm yaşlarda aynı orandadır (2) . Tüm dünyada görülme sıklığı yılda 5- 7/1.000.000 'dur (1). Down sendromu, Fankoni anemisi, Kostmann sendromu, Bloom sendromu, Diamond-Blackfan anemisi gibi kalıtsal hastalıklarda AML görülme sıklığı artar(2).Özellikle yeni doğan ve adolesan dönemde daha sık görülmektedir. Görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Erkeklerde ve beyaz ırkta diğerlerine oranla daha fazladır (1).

AML, miyelodisplastik sendromlar ve miyeloproliferatif hastalıklara sekonder olabilir. İyonize radyasyona maruz kalma veya kemoterapi ajanlarına bağlı olarak da sekonder AML görülebilir. Nitrojen mustard, Siklofosamid, Ifosfamid, Klorambusil, Melfalan, Etoposid sekonder AML gelişimi ile ilişkili kemoterapötik ilaçlardır (2).

AML'de klinik

AML hastalarında kemik iliği hasarıyla sonuçlanan semptomlar gözlenmektedir. En yaygın semptom şiddetli anemidir. Diğer semptomlar arasında halsizlik, kilo kaybı, pansitopeniye bağlı kanamalar, ekimoz, peteşi, sık görülen enfeksiyonlar sayılabilir. Hastalarda çoğunlukla lökosit sayısında artma görülürken nötrofil seviyesinde bir düşüş söz konusudur. Sıklıkla tutulan organlar, dalak, karaciğer ve dişeti olarak bildirilmiştir (1).

Prognoz

AML'de erken dönemde uygulanan agresif tedavi ile remisyon sağlanması olasılığı yüksektir. Özellikle 60 yaşın altındaki erişkin hastaların %15-20' si bu tedavi sonrası ortalama 3 yıllık bir yaşam süresine sahip olabilmektedir. Yaşın ilerlemesiyle birlikte (>65 yas) remisyon oranında hayatta kalım süresi de düşer. Bununla birlikte sınıflandırma tipine göre çeşitli kromozomal

translokasyonlar, inv(16) varlığı, remisyonda iken indüksiyon terapisinde blast sayısının düşmesi ve blastların kaybolması, normal metafazların varlığı ve bunun gibi daha birçok faktör iyi prognostik belirteç olarak, FLT3 geni mutasyonlarının varlığı, infeksiyonlar, lökosit sayısının aşırı artmış olması, merkezi sinir sistemi tutulumu gibi etkenler kötü prognostik belirteç olarak bilinmektedir (1).

2.1.1.2.2. Prognostik Faktörler

Asağıdaki özellikler AML için kötü prognostik faktörlerdir.

- Lökosit sayısı >100,000 /mm³
- Monozomi 7
- Sekonder AML
- FLT 3-ITD
- İndüksiyon kemoterapisinden sonra minimal reziduel hastalık varlığı (2,)

Bu mutasyonlardan AML’de en sık görülenlerinin, FLT3’ün aktivasyon mutasyonları olduğu bilinmektedir (3)

- **AML’de moleküler genetik değişiklikler**

Löseminin moleküler genetik temellerinin anlaşılmasına dair özellikle geçtiğimiz on yılda kayda değer ilerlemeler olmuştur. Lösemilerin en büyük sebebi hematopoetik öncü hücrelerdeki sonradan kazanılmış somatik mutasyonlardır. İki transkripsiyon faktörünün füzyonu dengeli resiprokal translokasyonlarla ilgili akut lösemilerde görülen yaygın bir durumdur. Bu transkripsiyon faktörleri evrim boyunca korunmuştur. Bu transkripsiyon faktörleri CBF, RAR α , HOX ve ETS ailesi üyeleridir (1).

AML’de genetik çalışmalar sonucu çeşitli tedavi örnekleri ve prognostik yaklaşımlar bulunmaktadır. Son zamanlarda prognostik ve terapötik önem taşıdığı düşünülen bazı moleküller ve moleküler değişiklikler belirlenmekte ve bunların tedavi ve prognoz açısından önemleri

araştırılmaktadır. FLT3 geni ve bu genin mutasyonları bunlardan biri ve belki de en önemlisi olarak karsımıza çıkmaktadır (3)

Bu kromozomal translokasyonlar tek başlarına lösemi fenotipini oluşturmak için yeterli değildir. AML patogenezinde sıklıkla FLT3 gibi bir tirozin kinaz'ın sürekli aktivitesi ile transkripsiyon faktörlerini etkileyen kromozomal translokasyonlar birlikte etkili olmaktadır. Tirozin kinazların aktivasyonuna yol açan mutasyonlar hücre çoğalmasını uyararak veya apoptozisi engelleyerek kansere yol açarken, transkripsiyon faktörlerinde füzyon proteinlerinin oluşumu ile sonuçlanan mutasyonlar hücre farklılaşmasını bozarak kanser oluşumuna katılır (1).

Akut Lenfoblastik Lösemi

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) çocukluk çağında en sık malign hastalık olup tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 30-35'ini kapsamaktadır. 1965 yılında sadece % 1 hasta uzun süreli yaşayabilmekte iken bugün % 80 civarında çocuk ve adolesan hastada kür sağlanmaktadır. Daha da önemlisi, lösemik relaps olan ALL hastalarında % 20-30'unda da uzun süreli ikinci remisyon sağlanmakta olup; ikinci bir kür şansına sahip olmaktadırlar. Bu başarı muhtemelen seri olarak dikkatli bir şekilde düzenlenen klinik denemelere bağlıdır. Ancak tedavi sonucundaki tüm bu gelişmelere rağmen relaps olan hatta kaybedilen ALL hasta sayısı yeni tanı alan akut myeloid lösemi hastalarından fazladır. Bu nedenle çocukluk çağı ALL, çocukluk çağı tüm kanserlerinin toplam mortalitesine anlamlı katkıda bulunmaya devam etmektedir (2).

Tedavi

AML tedavisinde uygulanan intensifikasyon ve induksiyon kemoterapisi sonrası hastalarda sepsis ve fungal enfeksiyon riski artmıştır. Yeni tanı almış AML hastaları induksiyon kemoterapisi boyunca yatırılarak hastanede takip edilmelidir. Bir çok yazar, ailede HLA uygun donör varlığında, AML-M3 ve Down sendromlu hastalar hariç AML'li tüm hastalara allojenik kemik iliği naklini ilk remisyonundan sonra önermektedir. Uygun donör yoksa hastalara yoğun kemoterapi uygulanmalıdır. AML-M3'lu hastalarda trans-retinoik asit (ATRA) ile remisyon sağlanabilir.

Ancak ATRA tek başına kullanıldığında direnç gelişebilir, idame tedavide kullanılması önerilmez. Aynı zamanda beyin omurilik sıvısına da geçmediğinden santral sinir sistemi tutulumunda da etkisizdir. Refrakter veya rekurren akut miyeloblastik lösemi tedavisi zordur. Yüksek doz kemoterapi ile remisyon sağlansa da tekrar relaps riski yüksektir (2).

FLT3

FLT3 geni reseptör tirozin kinaz sınıf 3 ailesi üyesidir (1,3). FLT3 bir tirozin kinaz reseptörü olup hücre proliferasyon ve farklılaşma yolları ile ilgilidir (2,3). Kemik iliğinde bir çok sitokin, kök hücre ya da progenitor hücre spesifik reseptörleri etkileyerek immatur hematopoetik hücrelerin birden fazla seriye farklılaşma ve çoğalma imkanını sağlamak üzere etki gösterirler.

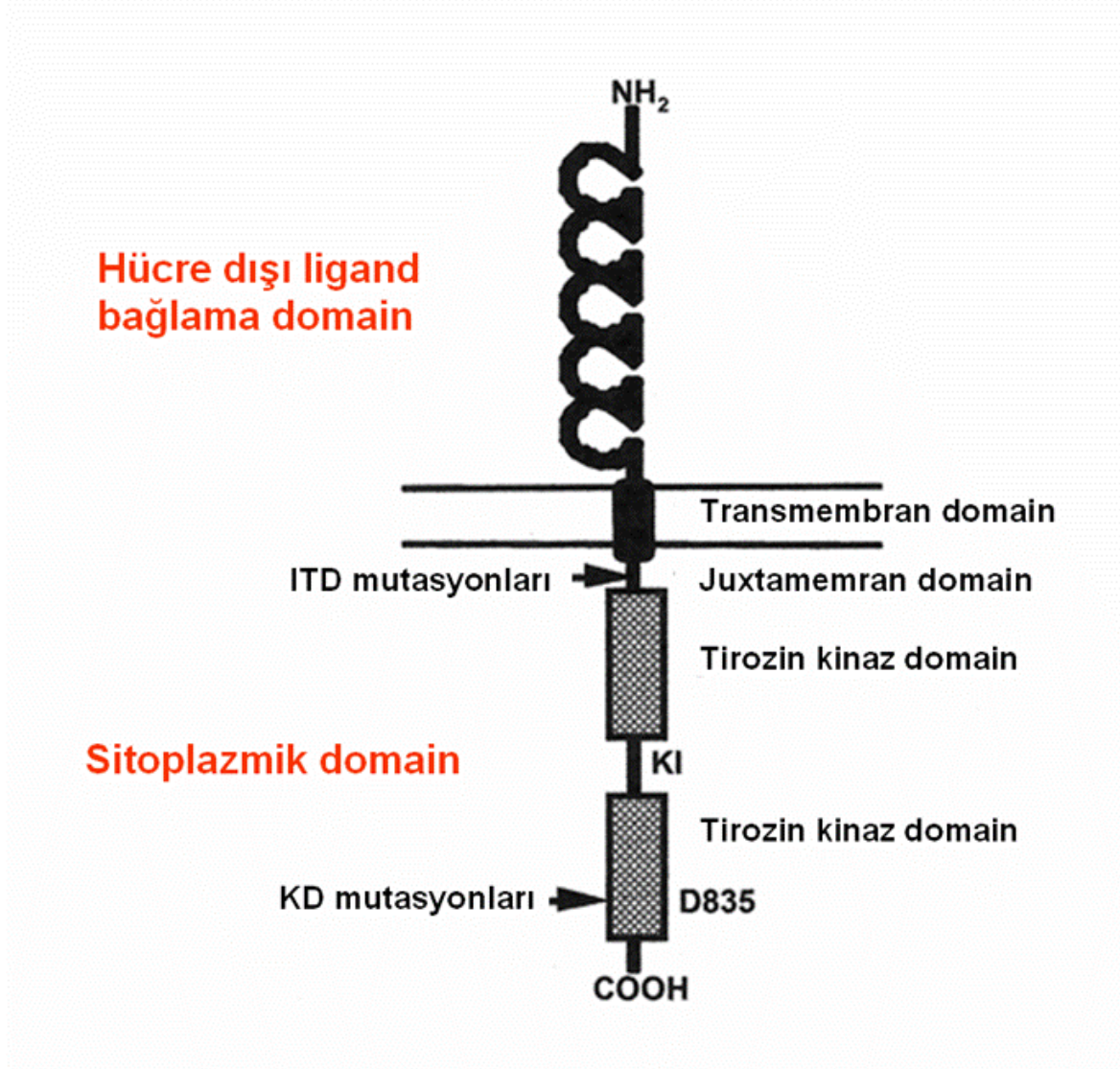
FLT3 ligandı (FL) erken hematopoiesi FLT3 sinyal iletim yolunu uyararak kontrol eder. FL bir tip I transmembran protein olup kök hücre faktörü (SCF), makrofaj koloni stimule edici faktörleri (M-SCF) içeren küçük sitokin ailesine aittir. FL protein sadece T lenfositler ve kemik iliği mikroçevresindeki stromal fibroblastlardan sentezlenmektedir (2)

Hematopoiesizde merkezi bir rol oynayan FLT3, kromozom 13q12 bölgesinde (1,3) 67 kilobaz büyüklüğünde 24 ekzonlu bir gendir. Ürünü 993 aminoasitlik bir protein olan FLT3 hematopoetik kök hücrelerde, (1,3) insan lösemi veya lenfoma hücre hatlarında (1) timus, lenf bezleri, beyin, plasenta ve gonadlarda (3) eksprese edilmektedir. Bu reseptörün sürekli aktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonlar AML ve ALL'ye neden olur (1).

FLT3 mutasyonu gen üzerindeki ilk tirozin kinaz bölgesi içerisindeki jukstamembran bölgede meydana gelir (1). Bu duplike olmuş diziler çoğunlukla ekzon 11' de ve bazen de intron 11'de bulunur (1). FLT3 geni mutasyonları AML'de en sık görülen mutasyonlardır (yaklaşık %25-30). Bu oran çocuklar arasında daha düşüktür (yaklaşık %5-22) (1). FLT 3 ITD pediatrik AML hastalarında daha kötü bir seyir görülür (2). Olguların yaklaşık %20-25' inde genin jukstamembran bölgesinin duplikasyonu (ITD) genin aktive olmasına neden olurken bu mutasyonla genin otoinhibitör bölgesinin hasara uğradığı ve kinaz aktivitesinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (1). AML vakalarının yaklaşık %5-10'unda genin D835. Pozisyonunda "aktive edici loop" bölgesinde oluşan nokta mutasyonunda tirozin aktivitesine neden olabilmektedir (1).

FLT3 anomalisi olan hastalar daha yüksek nüks riski ve daha düşük sağ kalım oranına sahiptirler. Ayrıca mutant/normal FLT3 gen oranlarının sağ kalımla ilişkili bir takip kriteri olarak kullanılabileceği de son zamanlarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (1).

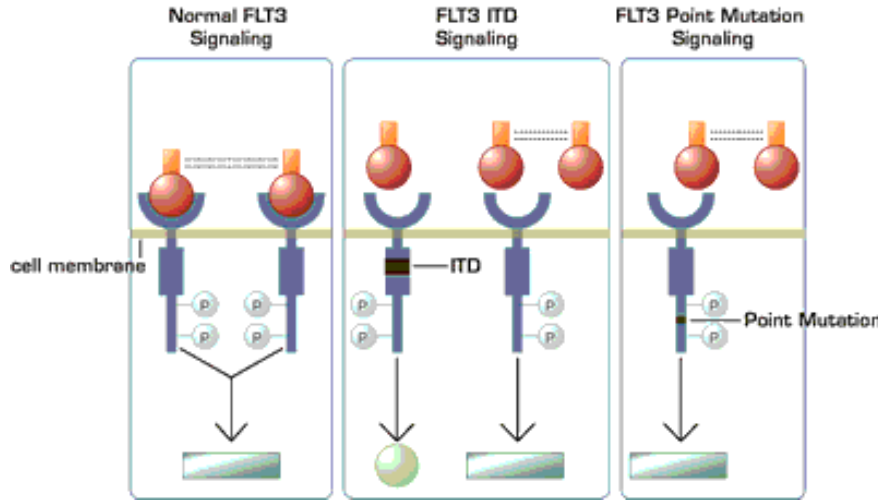
Şekil 2: FLT3 Reseptör Yapısı COSKUNPINAR



Lösemilerde FLT3

Onkogenез için iki önemli özellik kendini yenileme ve büyüme hormonundan bağımsız proliferasyondur. FLT3'un aşırı undiferansiye hematopoetik hücrelerin proliferasyonuna katılması bu sinyal yolunun onkojenik potansiyelini göstermektedir. Klinik ve deneysel kanıtların

her ikisi de FLT3'un lösemik blast hücrelerinin yaşam süreci ve proliferasyonlarını arttırabilen kapasiteye sahip protoonkogen olduğunu gösterirler. Wild tip FLT3 akut lenfoid lösemi, mixed lineage lösemi ve en dikkat çekici olarak da AML'de % 70-100 oranlarında eksprese edilmektedir. Anormal olarak aktive olan FLT3 yolu AML hastalarının % 29,9'unda gözlenmektedir. İki tip mutasyon etkilenen FLT3 reseptöründe görülebilmektedir (2).



Şekil 3: FLT3 Mutasyonu (2)

FLT3 internal Tandem Duplikasyon Mutasyonu

FLT3 reseptörü JM domaininde in-frame internal tandem duplikasyon (ITD) mutasyonu FLT ilişkili AML vakalarında en yüksek frekansa sahiptir (2). Klinik çalışmalar FLT3-ITD mutasyonlarının AML vakalarında % 17 ile % 26 arasında olduğunu saptamışlardır.

FLT3-ITD'na, ilk kez 1996'da Nakao ve arkadaşları tarafından yetişkin AML ve çocuk ALL hastalarında FLT3 mesaj ribonükleik asit (m RNA) sıklığı ve dağılımını araştırırken, polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) JM bölgesinde beklenmedik şekilde uzun fragmanlar olarak rastlanmış ve tanımlanmıştır. Bu fragmanlar incelendiğinde, çeşitli uzunluklarda sekanslar, adım adım

tekrarlar halinde araya girmiş halde bulunmuşlardır. Bu duplike olmuş fragmanların tümünün tirozinden zengin olduğu , tümünün exon 14-15 tarafından kodlanan JM bölgesi içinde olduğu, uzunluklarının 12-240-bp arasında değişebildiği gözlenmiştir (3)

JM bölgesinde ITD mutasyonu taşıyan hastalar incelendiğinde; çoğunlukla FLT3'ün iki allelinden birinde ITD mutasyonu olurken, diğer allelin “wild” tip allel olarak kaldığı veya daha az sıklıkla da biallellik mutasyona uğrayıp, “wild” tip allelin de kaybolduğu gözlenmiştir (3)

ITD mutasyonu FLT3 reseptör yapısal aktivasyonuna neden olur. RTK (Reseptör Tirozin Kinaz)'ların JM bölgelerinden birçoğu kinaz domainini regüle etmek için farklı mekanizmalar aracılı etki gösterirler. Normal FLT3 reseptörü kristal yapısı, JM domainin, kinaz domain katalitik etkisini regüle edebilmek için kullandığı mekanizmayı gösterip ITD'nun bu mekanizmayı nasıl bozabileceğini anlatmaktadır. JM bölümünün yapısı şunu gösterir ki, spesifik tirozin residüsü normal fosforilasyonun otoinhibisyonunu sağlamak için JM bölgesinin doğru katlanmasını engellediği zaman FLT3 aktivitesi oluşur (2).

FLT3-ITD'nin büyüme faktörlerinden bağımsız büyümeye neden olduğu, dolayısıyla normalde FLT3-FL reaksiyonu sonucu proliferasyon için büyüme faktörü gerekliyken (İnterlökin 3 (IL-3) bağımlı), FLT-ITD varlığında proliferasyon için bir büyüme faktörüne gerek olmadığı bildirilmektedir. Dolayısıyla proliferasyon artarken inhibitör aktivitenin azaldığı, lösemik blastlar ve proliferasyonun arttığı, inhibitör sinyallerin ise azaldığı gözlenmiştir. Buna karşın ITD mutasyonu eğer heterojen tipte yani wild tip FLT3'de var ise büyüme faktöründen bağımsız proliferasyon olmamıştır. Homojen tip mutasyonda ise wild tip FLT3 yoktur. Dolayısıyla biallellik mutasyon oluşmuş ve faktör bağımsız proliferasyon daha da artmıştır. Lökosit sayısı ise çok daha yüksektir (3).

ITD mutasyonu, AML tipleri içinde en çok M3 ve M5 ve daha sıklıkla M6, M7 de gözlenmiştir. Kısmi ve tam wild tip allel kaybı sonucu, mutant band hakimiyetinin her hastada farklı olduğu ve bunun da altta yatan genetik instabiliteye bağımlı olarak geliştiği bildirilmiştir. Genetik materyal kaybının mitotik rekombinasyon sonucu olduğu düşünülmektedir. (3)

FLT3'te Tek Amino Asit Mutasyonları

Anlamsız nokta mutasyonları FLT3 reseptör kinaz bölgesinde yapısal aktivasyonu sağlayabilirler (2). AML hastalarında, FLT3 –ITD mutasyonu dışında, FLT3'ün aktivasyon loop bölgesindeki tirozin kinazlarda da mutasyon gözlenmektedir (3). Bu mutasyon, ikinci tirozin kinaz domainin 20. exonundaki aspartik asit 835(D835) ve isoleüsin 836(I836) noktalarında amino asit yer değişimi ve araya girmesi olarak tanımlanmaktadır (2,3). Diğer pozisyonlardaki nokta mutasyonları, örneğin 836 ya da 841, FL-bağımsız aktivasyona neden olmaktadır. FLT3-D835 mutasyonu EcoRV restriksiyon bölgesi kaybına neden olduğundan kolaylıkla saptanabilmektedir (2).

Aktivasyon loop bölgesi , tirozin kinazlarda ortak bir bölgedir. Tirozin kinaz aktif değilken, bu loop Adenosine Three Phosphate (ATP) ve substrat girişini durdurur. Bu durum ATP' leri kinaz bölgesine yönlendirir. Tirozin kinaz aktif duruma geçtiğinde ise bu loop'taki spesifik bir tirozin rezidüsü fosforilize edilir. Böylece loop'ta bir konfigürasyon değişikliği oluşur ve aktif hale gelir. Böylece

kinaz için ATP ve substrat girişlerine serbest kılar. TKD mutasyonları, FLT3 reseptöründeki 2. tirozin kinaz bölgesinin inhibitör etkisini bozar. Sonuç olarak; yapısal kinaz aktivasyonuna neden olur. Bu etki, ITD mutasyonlarında gözlenen otoinhibitör mekanizmasının ortadan kalkması ile aynı sonucu doğurur. Yani kinaz aktivasyonu ile sonuçlanır (3).

TKD mutasyonu AML'de % 7 oranında pozitif bulunmaktadır (2,3). TKD mutasyonuna daha çok M4 ve M5 alt tiplerinde rastlanmaktadır. Bu konuda yapılmış çok sayıdaki çalışmaların sonuçları bir araya getirildiğinde; AML hastalarının yaklaşık % 30'unda FLT3 mutasyonunun mevcut olduğu, bunun ya FLT3-ITD (%24), yada FLT3-TKD (% 7) olduğu görülmektedir (3)

FLT3 ve Hücre Farklanması

FLT3 aktivitesi farklanma yollarını da regüle etmektedir. Farklanma çoğalma kapasitesi kaybı ve apoptozise eğilimin artması ile sıkı bir şekilde birliktedir. Normal miyeloid progenitor hücreleri farklanma boyunca kısıtlı ömre sahip olgun hücre fazına erişinceye kadar ilerler. Farklanmanın engellenmesi kanser gelişimi için önemli bir mekanizma olarak saptanmıştır. Primitif hematopoetik hücrelerde tercihli FLT3 ekspresyonu farklanmanın düzenlenmesinde rolünü göstermektedir (2).

FLT3 MUTASYONLARININ DÜZEYİ VE KLİNİK İLİŞKİSİ

AML hastalarında birden fazla FLT3-ITD varlığını araştıran bir çalışmada; daha kötü bir klinik seyir, daha yüksek lökosit ve kemik iliği blast sayısı ve daha kötü bir hastalıksız sağ kalım ile birliktelik gözlemlendiği bildirilmiştir (3).

Whitman ve arkadaşları (2001) ve Thide ve arkadaşları (2002) çalışmalarında, “wild” tip FLT3 alleleline göre daha yüksek oranda mutant FLT3 alleli taşıyan hastalarda, daha kötü bir klinik seyir bildirmişlerdir. Bu hastalarda daha yüksek lökosit sayısı, kemik iliğinde blast yüzdesi ve daha kısa genel ve hastalıksız sağ kalım olduğu da bildirilmiştir. Her iki çalışmada da normal sitogenetikli orta risk grubunda kabul edilen hastalarda, sadece wild tip FLT3 olduğunu bildirmişlerdir (3).

Bu verilere göre; mutant homodimerlerin, altta yatan genetik instabilite sonucunda oluşukları ve bu hastalarda daha kötü klinik seyir olduğu söylenebilir (3).

FLT3-ITD mutasyonu taşıyan hastalarda mutant tip wild tip FLT3 oranının birden büyük olmasının kötü prognozla birliktelik gösteren önemli bir prognostik faktör olduğu pek çok çalışmada vurgulanmaktadır (3).

İLK TEŞHİS KONDUĞUNDA VE RELAPSTA FLT3 MUTASYONU:

İlk AML tanısı konduğunda, FLT3-ITD pozitif hastaların, relaps ile geldikleri dönemde mutant oranının daha yüksek olduğu, genellikle wild tip allel kaybı ile birlikte olduğu gözlenmiştir. İlk tanı konduğunda birden fazla tip mutasyon taşıyan hastaların, relaps dönemlerinde ise sadece bir tip mutasyonun daha fazla arttığı belirlenmiştir (3).

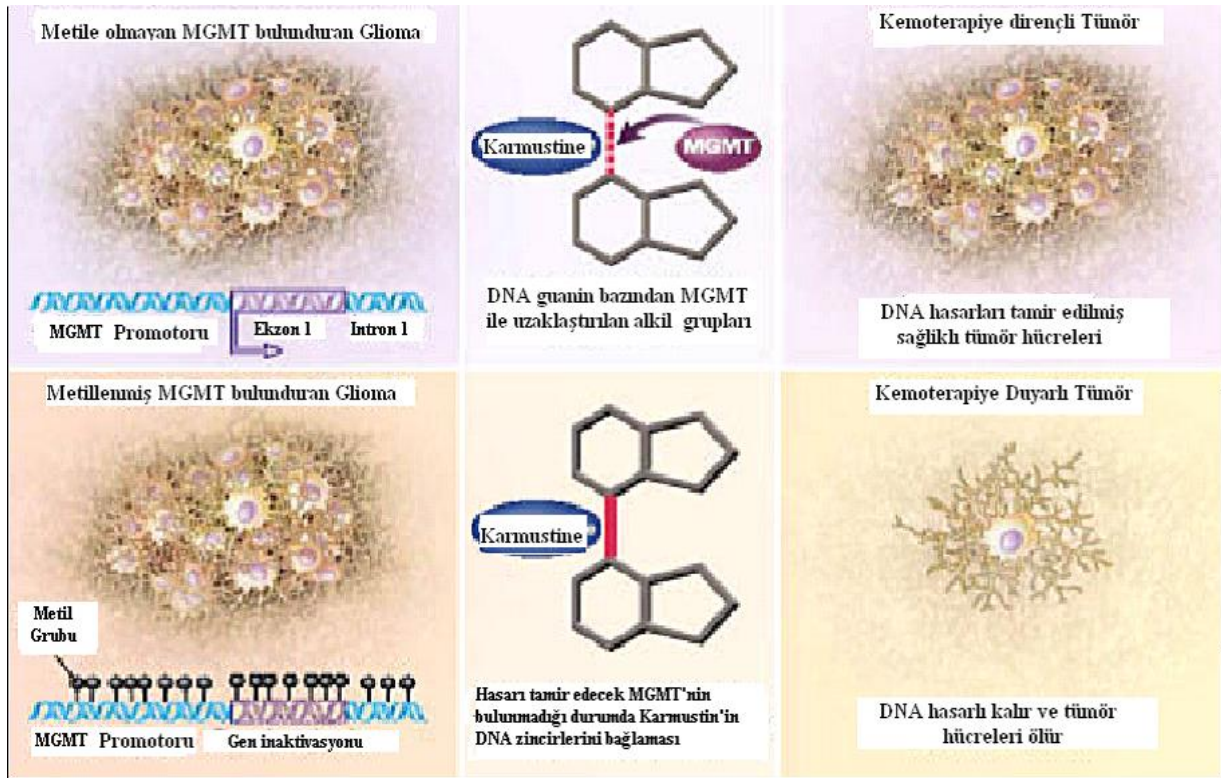
Bunların dışında birçok hastanın relaps örneklerinde, ilk tanıdaki örneklerde var olan mutasyonlardan daha farklı mutasyon varlığı gözlenmiştir. İlk rastlanan mutasyonların kaybolduğu, tamamen yeni mutasyonlar kazanıldığı belirlenmiştir. Bu hastaların relaps örneklerinin % 10'unda, yeni edinilmiş mutasyonlar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

MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz)

Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT), 10q26'da lokalize bir DNA tamir enzimidir (4). *MGMT* geni beş ekzonludur, en uzun transkripti 1759 bp (bazıdır) ve MGMT proteini 238 aminoasitten oluşur (a). O6-methylguanine, alkilleyici mutajenler sonucu oluşan DNA replikasyonu sırasında timinle çiftleşmeye yönelik eğilim göstermesi nedeniyle DNA üzerindeki ana karsinojenik ve mutajenik lezyonlardan biri olarak kabul edilmektedir. Guaninin O6 pozisyonuna eklenen bu DNA metil eki MGMT tarafından DNA'dan uzaklaştırılmaktadır. MGMT transfer ettiği metil eki ile kendi sistein rezidülerinden bir tanesini metillemektedir ve böylece kendi etkinliğine de geri dönüşümsüz olarak son vermektedir. Bu nedenle bir hücrenin O6-methylguanine tamir kapasitesi aktif MGMT molekülü ile orantılıdır (4).

Gliomaların tedavisinde kullanılan alkilizan nitrozürelere guaninin 6. oksijen atomuyla

birleşerek hücreye zararlı DNA bileşkeleri oluştururlar. DNA bileşkesi çaprazında bulunan sitozin ile de bağlanarak DNA da zincir kırılmasına yol açar. O6-Metil Guanin Metil Transferaz (MGMT) hücreye zararlı olan alkil gruplarını guaninin 6. pozisyonundan kesip çıkartmadan kendi sistin birimine bağlayarak uzaklaştıran bir DNA tamir proteindir. Üzerindeki sistine alkil grubunun bağlanması ile MGMT inaktive olur. Böylece proteinin bir intihar molekülü gibi görev yapması ve hasarı tamir ederken kendi işlevini kaybetmesi söz konusudur. Bu nedenle MGMT anlatım düzeyi hasarlı hücrelerde önem taşımaktadır. Proteinin translasyonu promotor bölgesinin metillenmesi ile kontrol edilmektedir. MGMT geninin metillenerek sessizleştirildiği durumda alkil gruplarının oluşturduğu DNA hasarı engellenemez ve hücre ölümü gerçekleşir (5).



Şekil 4 : MGMT enziminin alkil gruplarını DNA molekülünden uzaklaştırarak hasarı tamir etmesi ile tümör hücreleri alkilleyici ilaçlara karşı direnç geliştirirler. Ancak promotor bölgesi metillenerek etkisiz hale getirilen MGMT enzimi hasarlı DNA molekülünü onaramadığı için tümör hücresi apoptoz süreci sonunda kaybedilir (5)

Alkilleyici ilaçlar tümör hücrelerine karşı savaşta sık kullanılırlar. Klinikte kullanılan O6 alkilleyici ilaçlarının başlıcaları tabloda gösterilmiştir. Bu ilaçların oluşturacağı DNA hasarı ile tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması sağlanmaktadır (5). MGMT, kemateröpatiklere karşı hücreleri korur . Doğrudan tamir yolunda, mutajenik alkilleyici ajanlardan genomu koruyan O6-metilguanin–DNA metiltransferaz (MGMT) önemli rol oynar. MGMT, mutasyonlardan ve O6-metilguaninin (O6-meG) için yüksek duyarlılıkta bulunan alkilleyici ajanların O6-alkilguanin eklentilerinden kaynaklanan kromozomal hasarlardan genomun korunmasında çok önemlidir. İnsan kanserlerinde yüksek oranda üretilen MGMT, antikanser alkilleyici ajanların klinik kullanımı sonucu tümör direnç merkezi belirleyicisidir (5,6). Zayıf mutajenlere ve öldürücü etkili alkilleyici ajanlara karşı görev alır (6).

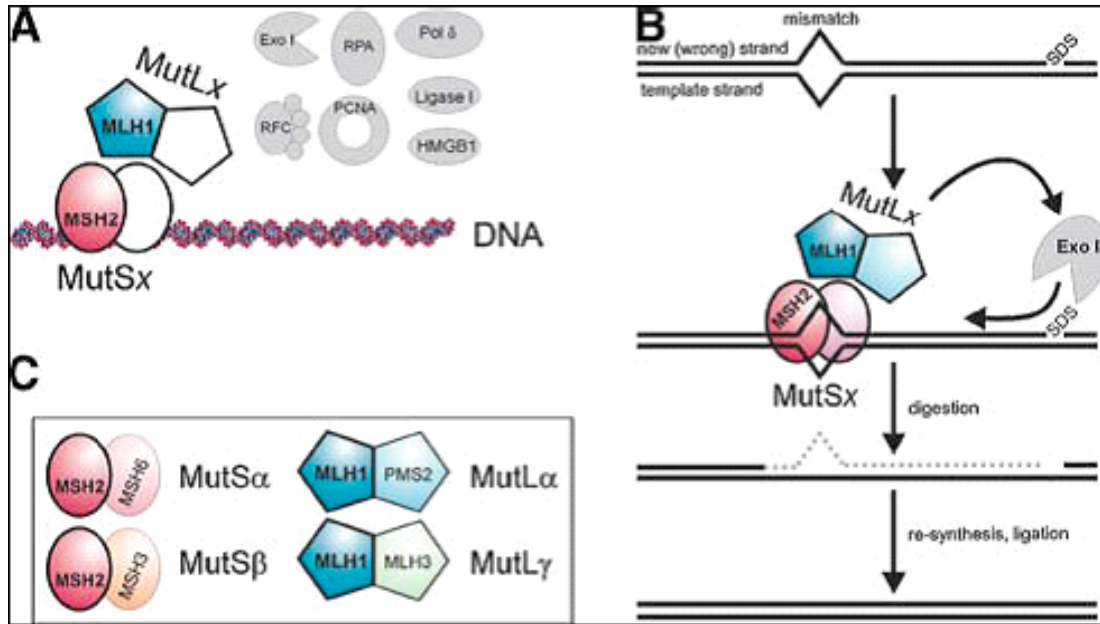
MGMT anlatımı tedaviye verilen yanıtta da önemli rol oynamaktadır. Anlatımın artışı hücrelerin DNA hasarını onararak ilacın etkisinden kurtulmaları ile sonuçlanırken, anlatımın azaldığı, proteinin metillenme yoluyla sessizleştiği hücrelerde yıkım gerçekleşir. Bu nedenle MGMT anlatımının artışı kemoterapiye karşı dirence neden olmaktadır (5).

MGMT sessizleşmesi bulunan tümörlerde alkilguanin uzaklaştırılamadığı için replikasyon sırasında alkilguanin, sitozin yerine timin ile eşleşir ve daha sonra hasarlı guaninin yerine adeninin yerleştirilmesi ile G-C den A-T ye dönüşüm gerçekleşir (5,6). MGMT metilasyonu bulunan astrositomalarda özellikle G:C→A:T dönüşümüyle oluşan TP53 mutasyonlarının arttığı saptanmıştır (5).

MGMT, endojen ve çevresel karsinojenlere karşı kanser hastalarında antikanser alkilleyici ajan olarak verilmektedir. Bu aktif metilleyici ajanlar, temozolomid, dacarbazin ve procarbazin O6-metilguanin olup hasarlara neden olur. AGT, bu hasarların giderilmesinde ve kanser tedavilerinde büyük öneme sahiptir (6).

YANLIŞ EŞLEŞME TAMİRİ (MISMATCH REPAIR, MMS)

Bu tamir sistemi prokaryotlar ve ökaryotlarda tanımlanmış olup en iyi şekilde bakterilerde açıklanmıştır. DNA yanlış eşleşme tamirinin (MMS) başlıca görevi, DNA replikasyonu sırasında oluşan hataları tanıyıp düzeltmesidir. Guanin:Timin (G:T), Adenin:Sitozin (A:C) ve en zorlu Sitozin:Sitozin (C:C) yanlış eşleşmiş baz çiftlerinin çok etkili bir biçimde tanır ve tamir eder. Yanlış eşleşme tamirinin en büyük hedefi küçük insersiyon/delesyon lopları ve yanlış eşleşen bazlardır. Hücrede bu tamirinin kaybı genetik kararsızlığa neden olur. İlk olarak 1989'da *E.Coli*' yanlış eşleşme tamirinde yer alan proteinler bildirilmiştir. Bunlar MutS, MutL, MutH, DNA helikaz II (UvrD), ekzonükleaz I, DNA ligaz ve DNA polimeraz III'dır. İnsanda MutS homolog heterodimeri MSH2 ve MSH6 veya MSH2 ve MSH3, MutL homolog heterodimeri olan MLH1 ve PMS2 veya MLH1 ve MLH3 bulunurken MutH'nin homologu bulunmaz. Bunlar insan yanlış eşleşme tamirinde replikasyon faktörlerine bağlanırlar (6).



Şekil 5: Yanlış eşleşme tamiri (MMS). **A:** MMS'de MutS ve MutL protein dimeri ve diğer proteinler **B:** MMS reaksiyonunda genel dizilim. **C:** İnsanda yanlış eşleşme tamiri (6).

PCNA (çoğalma hücre nükleer antijeni), replikasyon faktör C (RPC), ekzonükleaz I (Exo I), replikasyon faktör A (RPA), HMGB1, polimeraz δ ve DNA ligaz yanlış eşleşme tamirinde görevli diğer proteinlerdir (6).

MMS reaksiyonunda genel yol yeni sentezlenmiş iplikteki yanlışlığı MutS tanır, bağlanır ve düzeltir. Ekzonükleolitik sindirim (digestion) işlemleri yanlış eşleşmiş bölgeye doğrudur ve hatalı nükleotidlerin uzaklaştırılmasından sonra hemen sonlandırılır. Boş kalan bölge DNA polimeraz ile doldurulur ve doğru şekilde kopyalanması tamamlanan iplik DNA ligazla bağlanır. İnsan yanlış eşleşme tamirine katılan MutS ve MutL heterodimerleri. MSH2, MSH6 ve MSH3 ile dimerleşerek MutS α ve MutS β formlarını oluştur. Yine MLH1, PMS2 ile MutL α formunu ve MLH1, MLH3 ile MutL γ formunu oluşturur. Yanlış eşleşme tamiri reaksiyonlarındaki genel yol bütün organizmalarda aynıdır (6).

MutL Homolog 1 (MLH1)

MLH1 geni 3p21.3 bölgesinde lokalize olan bir DNA yanlış eşleşme tamir genidir. Bu gen 19 ekzonlu, 2752 bp uzunluğunda bir gendir ve Mlh 1 proteini ise 756 aminoasitten oluşur.

- **GEREÇ VE YÖNTEM**

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı’ndan sağlanan 28 hasta ve 20 sağlıklı kontrol kullanıldı. EDTA’lı tüpe alınan periferik kan örneklerinden MagNa Pure LC (Roche) cihazı ile otomatik DNA izolasyonu yapıldı. 1 µl’de 10 ng DNA olacak şekilde hasta grubu ve kontrol grubu DNA’sı seyreltildi. EpiTect Plus Bisulfite Conversion Kit (Qiagen) kullanılarak bisülfite işlemi gerçekleştirildi. Bisülfite dönüşümünü ispatlamak için metile ve unmetile kontrol DNA (Qiagen) kullanıldı.

Bisülfite Mix	85 µl
DNA Protect Buffer	35 µl
RNase free water	15 µl
DNA	5 µl (total 50 ng DNA)

135 µl mix dağıtılır ve üzerine 5 µl DNA eklenir.

İnkübasyon şartları;

95 °C 5dk

60 °C 25dk

95 °C 5dk

60 °C 85dk

95 °C 5dk

60 °C 175dk

20 °C ∞

Bisülfite ile muamele edilen tüm örnekler Clean up işlemi uygulanır.

Clean Up;

- Bisülfitleme işlemi tamamlandıktan sonra PCR tüpleri kısa bir süre santrifüj edildi ve temiz 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine alındı.
- 310 µl yeni hazırlanmış içinde 10 µg/ml taşıyıcı RNA, örneğe konuldu, vorteklendi ve maksimum hızda çok kısa santrifüj edildi. (Eğer örnek 100ng DNA'dan fazla ise carrier RNA gerekli değildir.)
- 250 µl ethanol (%96-100) koyuldu. 15 sn vortekslendi ve kısa süre santrifüj edildi.
- EpiTect kolonlara alınan örneklerde aynı işlemler 2.kez yapıldı ve 1 dk daha maximum hızda kolonlar santrifüj edildi.
- 500 µl Buffer BW her kolona ilave edildi ve maximum hızda 1 dk santrifüj edilip yeni toplama tüpü takıldı.
- 500 µl Buffer BD eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon uygulandı. (15°-25° C)
- 1 dk boyunca maximum hızda yeniden santrifüj edilen örnek, 2 kez daha Buffer BW eklenip her defasında süpernatantda arındırıldı.
- Kolonlardan 2 ml'lik toplama tüpüne alınan örnekler 1 dk boyunca kalıntı sıvıdan arındırılmak için maximum hızda santrifüj edildi.
- 250 µl ethanol (%96-100) her bir kolona koyuldu ve maksimum devirde 1dk santrifüj edildi.
- Kolonlar kapakları açık olacak şekilde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ısıtıcı blokta 60° C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Kolonlar 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı. 20 µl Buffer EB her membranın merkezine dağıtıldı. Kolonlar oda ısısında 1dk santrifüj edildi.
- 15000 x g (12,000 rpm) de 1 dk santrifüj sonucu purifiye DNA elde edildi.

Clean up sonrası DNA'lar tekrar ölçüldü. Peaklerin temizliği ve DNA konsantrasyonu takip edildi.

PCR ve sekans Primerleri hazırlandı. Bisülfite ile muamele edilen tüm örneklerle ek olarak bisülfite converted metile DNA, bisülfite converted unmetile DNA'lara da pcr uygulandı.

MGMT için PCR;

Master Mix	12,5 µl
F	0,5 µl
R	0,5 µl
RNase free water	6,5 µl
Bisülfite converted DNA	5 µl

20 µl mix dağıtılır üzerine 5 µl Bisülfite converted DNA seyreltilmeden eklenir.

Pcr Şartları;

95 °C 15dk

94 °C 30sn

56 °C 30sn

72 °C 30sn

72 °C 10dk

+4 °C ∞

MLH 1 için PCR;

Master Mix	12,5 µl
F	0,5 µl
R	0,5 µl
RNase free water	6,5 µl
Bisülfite converted DNA	5 µl

20 µl mix dağıtılır üzerine 5 µl Bisülfite converted DNA seyreltilmeden eklenir.

Pcr Şartları;

95 °C 15dk

95 °C 20sn

45 döngü

55°C 20sn

72 °C 20sn

72 °C 5dk

+4 °C ∞

Pyro Sekanslama;

Streptavidin	3 µl
Binding Buffer	37 µl
Pyro distile su	30 µl
Pcr ürünü	10 µl

70 µl mix 24'lük plate dağıtıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl pcr ürünü dağıtıldı. Plate seal yapıştırılıp 5-10 dk 1400 rpm'de karıştırıldı. Platedeki karışım vakuma çekildi ve sırasıyla vakumlandı;

5 sn	Ethanol
7 sn	Denaturasyon solüsyonu
10 sn	Washin Buffer

Başka bir plate;

Annealing Buffer	22 µl
------------------	-------

Sekans Primeri	3 µl
----------------	------

1dk titreterek primer- DNA eşleşmesi sağlanır. Kamera alttan okuduğu için plate çizilmeden primer bırakılmalıdır.

2dk 80 C° 'de bekletilir. Daha sonra 5-10 dk oda sıcaklığında bekletilir. Bu sırada şekildeki kartuş hazırlanır.

E	A	S
C		T
	G	

Cihaza kartuş ve plate koyulup run'a basıldı.

- **BULGULAR**

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı’ndan sağlanan 28 hasta ve 20 sağlıklı kontrol grubuna *MGMT* geni promotor metilasyonu çalışması yapılmıştır. Bulgular aşağıda olduğu gibidir. *MLH 1* geni ise optimize edilememiştir. O yüzden bu genin metilasyonuna ilişkin sonuç elde edilememiştir.

CpG1;

			grup		Total
			Kontrol	Hasta	
C1	unmetil	Count	19	21	40
		% within C1	47,5%	52,5%	100,0%
		% within grup	100,0%	87,5%	93,0%
		% of Total	44,2%	48,8%	93,0%
	metil	Count	0	3	3
		% within C1	0,0%	100,0%	100,0%
		% within grup	0,0%	12,5%	7,0%
		% of Total	0,0%	7,0%	7,0%
Total	Count	19	24	43	
	% within C1	44,2%	55,8%	100,0%	
	% within grup	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	44,2%	55,8%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,553 ^a	1	,110		
Continuity Correction ^b	,990	1	,320		
Likelihood Ratio	3,076	1	,055		
Fisher's Exact Test				,243	,164
Linear-by-Linear Association	2,494	1	,114		
N of Valid Cases	43				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,33.

b. Computed only for a 2x2 table

CpG 2;

Crosstab

			grup		Total
			Kontrol	Hasta	
C2	unmetil	Count	17	20	37
		% within C2	45,9%	54,1%	100,0%
		% within grup	89,5%	83,3%	86,0%
		% of Total	39,5%	46,5%	86,0%
	metil	Count	2	4	6
		% within C2	33,3%	66,7%	100,0%
		% within grup	10,5%	16,7%	14,0%
		% of Total	4,7%	9,3%	14,0%
Total		Count	19	24	43
		% within C2	44,2%	55,8%	100,0%
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	44,2%	55,8%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,333 ^a	1	,564	,678	,453
Continuity Correction ^b	,018	1	,893		
Likelihood Ratio	,340	1	,560		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	,325	1	,568		
N of Valid Cases	43				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,85.

b. Computed only for a 2x2 table

CpG3;

Crosstab

			grup		Total
			Kontrol	Hasta	
C3	unmetil	Count	17	19	36
		% within C3	47,2%	52,8%	100,0%
		% within grup	89,5%	79,2%	83,7%
		% of Total	39,5%	44,2%	83,7%
	metil	Count	2	5	7
		% within C3	28,6%	71,4%	100,0%
		% within grup	10,5%	20,8%	16,3%
		% of Total	4,7%	11,6%	16,3%
Total		Count	19	24	43
		% within C3	44,2%	55,8%	100,0%
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	44,2%	55,8%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,827 ^a	1	,363		
Continuity Correction ^b	,243	1	,622		
Likelihood Ratio	,857	1	,355		
Fisher's Exact Test				,437	,316
Linear-by-Linear Association	,807	1	,369		
N of Valid Cases	43				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,09.

b. Computed only for a 2x2 table

CpG4;

Crosstab					
			grup		Total
			Kontrol	Hasta	
C4	unmetil	Count	18	23	41
		% within C4	43,9%	56,1%	100,0%
		% within grup	94,7%	95,8%	95,3%
		% of Total	41,9%	53,5%	95,3%
	metil	Count	1	1	2
		% within C4	50,0%	50,0%	100,0%
		% within grup	5,3%	4,2%	4,7%
		% of Total	2,3%	2,3%	4,7%
Total	Count	19	24	43	
	% within C4	44,2%	55,8%	100,0%	
	% within grup	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	44,2%	55,8%	100,0%	

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,029 ^a	1	,865		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,029	1	,866		
Fisher's Exact Test				1,000	,694
Linear-by-Linear Association	,028	1	,867		
N of Valid Cases	43				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,88.

b. Computed only for a 2x2 table

CpG5;

Crosstab					
			grup		Total
			Kontrol	Hasta	
C5	unmetil	Count	17	18	35
		% within C5	48,6%	51,4%	100,0%
		% within grup	89,5%	75,0%	81,4%
		% of Total	39,5%	41,9%	81,4%
	metil	Count	2	6	8
		% within C5	25,0%	75,0%	100,0%
		% within grup	10,5%	25,0%	18,6%
		% of Total	4,7%	14,0%	18,6%
Total	Count	19	24	43	
	% within C5	44,2%	55,8%	100,0%	
	% within grup	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	44,2%	55,8%	100,0%	

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,487 ^a	1	,228		
Continuity Correction ^b	,667	1	,414		
Likelihood Ratio	1,539	1	,215		
Fisher's Exact Test				,270	,209
Linear-by-Linear Association	1,433	1	,231		
N of Valid Cases	43				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,53.

b. Computed only for a 2x2 table

• TARTIŞMA ve SONUÇ

Normal kan hücrelerinin gelişim, olgunlaşma, ve/veya homeostasis sürecinde rol oynayan genlerin yapısal veya fonksiyonel olarak hatalı çalışmaları sonucu oluşan hastalığa lösemi denir (1). Lösemi alt gruplarını oluşturan Akut Myeloid Lösemi (AML) ve Akut Lenfoid Lösemi tanısı alan hastalara tedaviye yönelik olarak kemoterapi uygulanmaktadır. Kemoterapötik ajanlar DNA'da tek ya da çift zincir kırığı oluşturarak proliferasyonu durdurmayı amaçlamaktadır. Bir DNA tamir enzimini kodlayan Methylguanine-DNA Methyltransferase (*MGMT*) geni, ve bir DNA yanlış eşleşme tamir geni olan MutL Homolog 1 (*MLH1*) geninin promör bölgelerindeki epigenetik bir mekanizma olan metilasyon araştırılmak istenmiştir. Tümör baskılayıcı genler kanser hücrelerinde mutasyon ya da delesyon ile inaktive olabilmesine rağmen promotör bölgeleri içindeki CpG adacıklarının anormal metilasyonunu kapsayan epigenetik mekanizmalar genin sessizleşmesine katkı sağlar (7). Günümüzde ise tüm makro moleküler yapılar, genom nükleotid dizileri tarafından belirlenirken, gen ifadesini belirleyen, kalıtılma yeteneğine sahip, hücreden hücreye aktarılabilen mekanizmaya epigenetik kod denilmektedir (8).

epigenetik regülasyon DNA sekansında hiçbir değişiklik olmaksızın birbirini takip eden hücre bölünmeleri boyunca hücrelerin gen ekspresyon profillerini hatırlamalarına olanak sağlar. DNA'da herhangi bir sekans değişikliği olmaksızın gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar, genomun üstündeki ya da üzerindeki modifikasyonları kapsar (9). Gen ifadesi temel olarak iki mekanizmayla düzenlenmektedir. Bu mekanizmalar; transkripsiyonu aktive eden ve baskılayan proteinlerin aktivitelerinin düzenlenmesi ve DNA ile kromatinde meydana gelen modifikasyonlardır (epigenetik kontrol) (10).

AML ve ALL hastalarada kemoterapi sonrası DNA hasarı oluşmaktadır. *MGMT* ve *MLH1* genlerinde metilasyon kaynaklı olarak sessizleşme beklenmektedir. *MGMT* geninin beş CpG adacığı metilasyon açısından incelenmiştir. Her bir CpG adacığında düşük oranda da olsa metilasyona rastlanmıştır. Ancak elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

• **KAYNAKLAR**

1. Coskunpinar E. M., Çocukluk Çağı Akut Myeloid Lösemi Hastalarında Kromozomal Değişiklikler ve Flt3 Gen Mutasyonlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2008.
2. Leblebistan G., Çocukluk Çağı Akut Lösemilerinde Flt3 (Fms-Like Tyrosine Kinase 3) Mutasyonları, Tıpta Yandal Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji, Adana, 2008.
3. Akfırat H., Akut Miyeloblastik Lösemili Hastalarda Flt3 Dublikasyon ve Mutasyonlarının Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2005.
4. Onay H., Konvansiyonel Renal Hücreli Kansere Oluşumunda Etkili Olan Genlerin Metilasyon Durumunun Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2006:96.
5. Eren P., Düşük Dereceli Gliomalarda Egfr, Pten, Pdgfr-A, Mgmt İfadelerindeki, Tp53 Ve P53 Yolağı (Mdm-2 Ve P14arf) Genlerindeki Düzensizlikler Ve Klinik Etkileri, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2006.
6. Özcan A., Hematolojik Maligniteli Hastalarda Dna Tamir Genlerindeki (Xrcc1 Ve Xpd) Polimorfizmlerin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2008.
7. [Huang YW](#), [Luo J](#), [Weng YI](#), et al. Promoter Hypermethylation of CIDEA, HAAO and RXFP3 Associated with Microsatellite Instability in Endometrial Carcinomas. [Gynecol Oncol](#). 2010; 117(2):239-47.
8. Özdemir F., Kolorektal Kansere Hastalarda SFRP1 Geninin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2009:82.
9. [Cock-Rada A](#), [Weitzman JB](#). The Methylation Landscape of Tumour Metastasis. [Biol Cell](#). 2013; 105(2):73-90.
10. Pehlivan M., Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Hastalarında SFRP1 Geninin Promotör Bölgesinin Epigenetik ve Genetik Değişikliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İzmir 2008:135.

