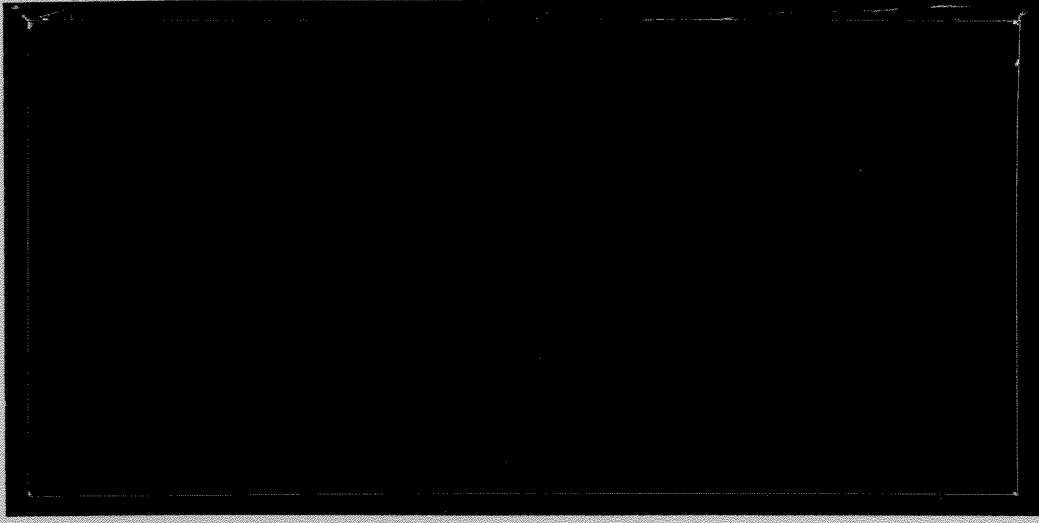


1997-420



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

**BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE
KANSER HASTALIĞININ DNA
DÜZEYİNDE İNCELENMESİ**

TBAG-DPT/3

PROJE NO : TBAG-DPT/3

**PROF.DR.UFUK GÜNDÜZ
EMEL EREN
UĞUR AYTAÇ**

**EYLÜL 1994
ANKARA**

ÖNSÖZ

Bu rapor Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan DPT-TBAG/03 sayılı projenin yürütülmesi sırasında elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir.

Çalışma ile ilgili bütün deneyler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Gösterdikleri yardımlardan dolayı, Devlet Planlama Teşkilatı'na, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na ve Temel Bilimler Araştırma Grubu'na şükranlarımızı sunarız.

Çalışmada kullanılan kan örneklerini sağlayan ve bu proje boyunca değerli katkılarını bizden esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastahanesinden Prof. Dr. Emin Kansu'ya ve Doç. Dr. Görgün Akpek'e teşekkür ederiz.

Çalışmamızda Kronik Myeloid Lösemi'de kromozomlar arasındaki translokasyonun moleküler düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır. İkinci bir hedef olarak da moleküler biyoloji, moleküler onkoloji ve biyoteknoloji çalışmalarında önemli yarar sağlayacak alt yapı ve birikimin oluşturulması düşünülmüştür. Çalışma sonucunda gerek Southern blot gerekse Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemlerinin kansere neden olan translokasyonların hassasiyetle belirlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

ÖZ

Son yıllarda, kanser tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilirken, özellikle kan ve lenf sistemi ile ilgili kanser türlerinde erken tanı sayesinde tamamen iyileşen vakaların sayılarında da belirgin bir artış dikkati çekmektedir. Moleküler biyoloji alanındaki en önemli gelişmelerin birisi de kansere neden olan moleküler değişikliklerin anlaşılmaya başlanmasıdır.

Hüresel ve moleküler düzeyde bütün yaşamsal işlevlerimizin kontrol merkezi olan DNA'da meydana gelecek bir bozukluk neticesinde kanser hastalığı başlayabilmektedir. Bu yolla oluşan kanser türlerine en önemli örnek olarak lösemi gösterilebilir. Lösemide en sık gözlenen genetik bozukluklardan birisi kromozomlar arası parça değişiklikleridir. Kronik Myeloid Lösemi'ye özel olan kromozomal değişiklik ise 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasındaki kopma ve yer değiştirmedir. Bunun sonucunda meydana gelen anormal kromozoma Philadelphia Kromozomu (Ph') adı verilmektedir. Çalışmamızın amacı bu translokasyonun DNA düzeyinde belirlenmesidir. Amaca ulaşmak için iki ayrı yöntem kullanılmıştır. Bunlar, radyoaktif işaretli problemlerin hibridizasyonunu içeren Southern blot yöntemi ile bölgeye özgün primer kullanılarak gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemidir. Bu yöntemler ilk tanı sırasında ve tedavinin planlanmasında çok önemli olduğu gibi, tedavi edilen hastaların ne ölçüde iyileştiklerinin takibinde de son derece yararlı olmaktadır. Bahsedilen bu çalışmalar Türkiye'de bundan sonra yapılacak olan moleküler onkoloji alanındaki benzer araştırmalara zemin oluşturabilecek niteliktedir.

Anahtar kelimeler: Kronik Myeloid Lösemi, Philadelphia kromozomu, Translokasyon, Southern blot, Polimeraz Zincir Reaksiyonu.

ABSTRACT

In recent years, as a result of the progresses in detection and therapy of cancer, a profound increase has been observed in the number of patients in complete remission by early detection of the hematological malignancies. One of the most important developments in molecular biology is the understanding of the molecular changes leading to malignant disorders.

Cancer may develop as a result of mutations at DNA which is the main center for our vital functions at the cellular and molecular levels. Leukemia is one example for the hematological disorders in which chromosomal translocation are most frequently seen. The chromosomal abnormality specific for Chronic Myeloid Leukemia is the reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, which in turn results in Philadelphia chromosome (Ph'). The aim of the project is to detect this translocation at DNA level by two different approaches; One of them is to use radioactively labeled probes for hybridization (Southern Blot Method) and the other is to apply Polymerase Chain Reaction (PCR) by using several primers specific for the translocation region on Ph' chromosome. Both approaches are very useful not only for the first detection and treatment of the disease, but also for the follow-up of the patients and determination of the residual disease after treatment. These studies will provide a basis for similar type of studies on molecular oncology in our country.

Key Words: Chronic Myeloid Leukemia, Philadelphia Chromosome, Translocation, Southern Blot, Polymerase Chain Reaction.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
TABLoların LİSTESİ	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	vii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GELİŞME	12
II.1. Materyal ve Metod	12
II.1.1. Kan Örnekleri	12
II.1.2. Kimyasallar	12
II.1.3. Kandan DNA İzolasyonu	12
II.1.4. DNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	13
II.1.5. Southern Blot'un Hazırlanışı	13
II.1.6. Prob DNA'nın Elde Edilişi	14
II.1.7. Alkali Liziz Yöntemi	14
II.1.8. Prob DNA'sının Restriksiyon Enzimleri ile Plazmitlerden Çıkartılması	16
II.1.9. Prob DNA'sının Radyoaktif Olarak İşaretlenmesi	17
II.1.10. Ön Hibridizasyon	18
II.1.11. Hibridizasyon	18
II.1.12. Otoradyografi	18
II.1.13. Kandan RNA İzolasyonu	18
II.1.14. RNA'dan cDNA Sentezlenmesi	19
II.1.15. PCR Yöntemi ile cDNA Amplifikasyonu	19
II.2. Bulgular	22
II.2.1. Kandan DNA İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimleriyle Kesim Koşulları	22
II.2.2. Prob DNA'sının Elde Edilişi	22
II.2.3. Southern Blot Analizi ve Otoradyografi	22
II.2.4. Kandan RNA İzolasyonu ve PCR	28
BÖLÜM III SONUÇ	36
III.1. Tartışma	36
III.2. Öneriler	40
KAYNAKLAR	42
BİBLİYOGRAFİK BİLGİ	48

TABLULARIN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo II.1. KML hastalarından elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları	23
Tablo II.2. KML hastalarının farklı restriksiyon enzimleri ile DNA kesim sonuçları	31

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

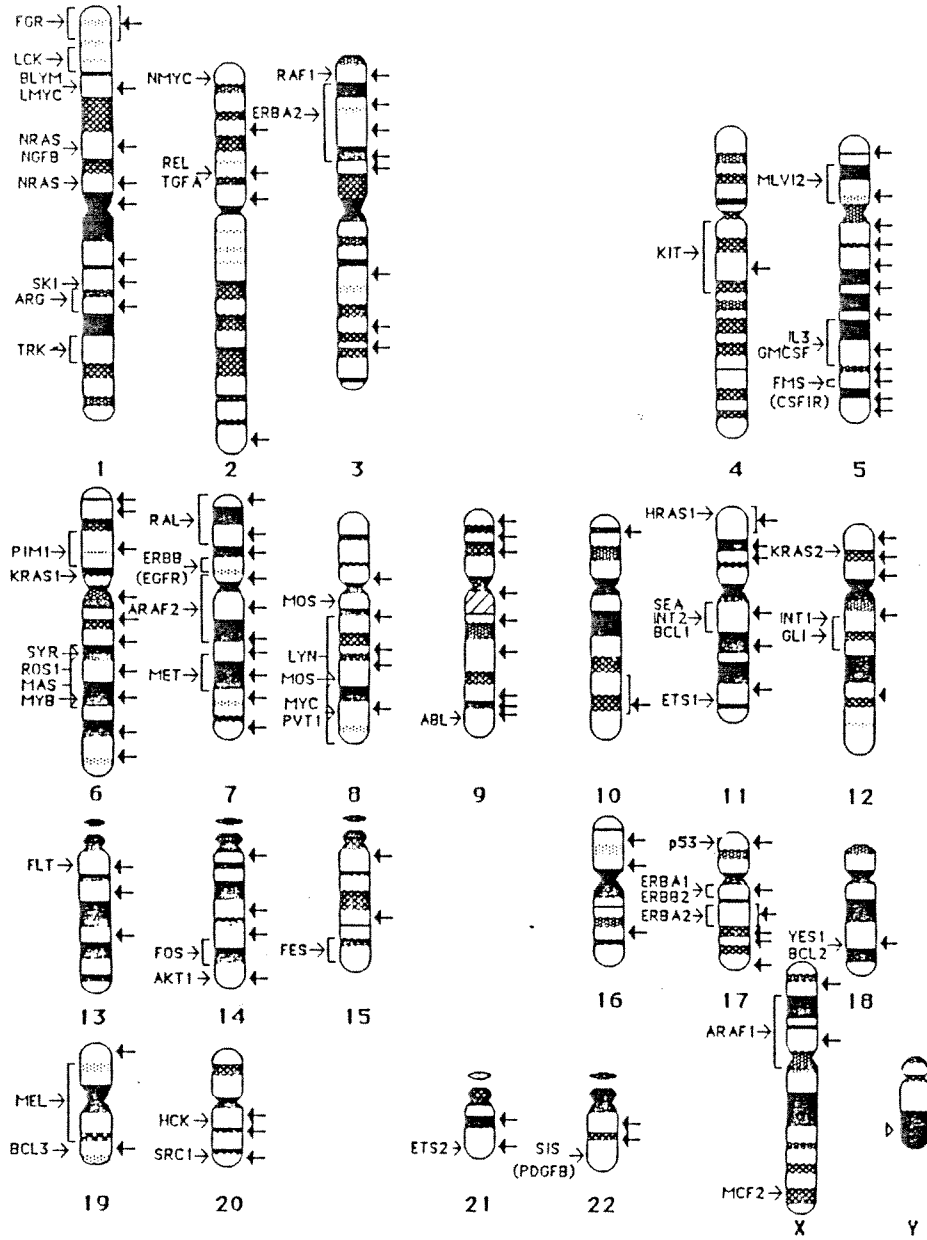
	<u>Sayfa</u>
Şekil I.1. İnsan kromozomları üzerinde bugüne kadar tanımlanmış olan hücresel onkogenlerin haritası	3
Şekil I.2. Kronik Myeloid Lösemide t(9;22) translokasyonu	6
Şekil I.3. KML'de translokasyon bölgesindeki kırılmaların haritaları ve oluşan hibrit genin mRNA'sı	7
Şekil I.4. RT-PCR Yönteminin basamakları	10
Şekil II.1. Hoefer Transvac Vakum Blot Cihazı	15
Şekil II.2. A. cDNA üzerinden iki basamakta gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) B. PCR'de kullanılan primerler	21
Şekil II.3. Hasta DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesimlerinin agaroz jel üzerindeki profili	24
Şekil II.4. pUC vektörü ve içerdiği 1.2 kb'lık prob DNA'sı	25
Şekil II.5. pUC vektörü ve içerdiği 0.6 kb'lık prob DNA'sı	26
Şekil II.6. Değişik restriksiyon enzimleri ile kesilmiş normal ve hasta DNA örneklerinin otoradyogramları	27
Şekil II.7. Otoradyogram örneği	29
Şekil II.8. Otoradyogram örneği	30
Şekil II.9. 22. kromozomun restriksiyon enzimleriyle kesim haritası ve 6 kırılma bölgesi	32
Şekil II.10. KML hastalarının kanlarından elde edilen RNA'ların agaroz jeli üzerindeki profili	33
Şekil II.11 Normal ve hasta kanlarından yapılan PCR sonuçları	35

BÖLÜM I

GİRİŞ

Günümüzde oldukça yaygın olarak görülen kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak klonal biçimde proliferasyonu şeklinde ortaya çıkar. Başta genetik bozulmalar, normal farklılaşma antijenlerinin eksikliği veya normal bölünme ve çoğalma sinyallerine karşı hücrelerin cevapsız kalması bu sonucu doğurabilmektedir. İlk olarak 1970'lerde başlayan ve daha sonraki yıllarda giderek artan moleküler onkoloji alanında gelişme ve bulgular bu hastalığın nedenleri hakkında her geçen gün araştırmacılara giderek artan bir ışık tutmaktadır. Bugün artık kanserin ortaya çıkışında genetik faktörlerin çok önemli olduğu bilinmektedir. Hücresel ve moleküler düzeyde bütün yaşamsal işlevlerimizin kontrol merkezi olan genetik şifreyi (DNA) oluşturan gen dizilerinde meydana gelecek bir bozukluk sonucunda kanser olayı başlayabilmektedir. (Masson, 1988). Bu genetik değişikliklerin başında nokta mutasyonları, delesyonlar, duplikasyon ve translokasyonlar sayılabilir. Özellikle lenfoma ve lösemilerde olmak üzere diğer birçok katı tümörde en sık gözlenen genetik bozukluklardan birisi hücre genomunda yeniden düzenlenmedir (genomic rearrangement). Sitogenetik tekniklerdeki ilerlemeler sonucu, kromozom karyotiplerinin incelenmesi ile kan hastalıklarında çok yüksek oranda rastlantısal olmayan bazı kromozomal değişiklikler gösterilmiştir (Rowley, 1988). Bu gelişmeyi takiben *in situ* hibridizasyon gibi çok daha duyarlı moleküler biyolojik tekniklerin bulunması ve uygulamaya girmesi ile kromozomlarda meydana gelen anormalliklerin gen düzeyinde nasıl olduğu sorusuna cevap aranmıştır. Bu çalışmalara paralel olarak, kansere neden olduğu belirlenen ve daha sonra RNA tümör virüsleri olarak adlandırılan virüslerin tanımlanması, kanser çalışmalarına farklı bir yön vermiştir. İlk olarak bu virüslerde saptanan ve onkogen adı verilen bir takım özel genlerin aslında kanserden sorumlu aktif genler olduğu bulunmuştur (Bishop, 1983). RNA virüslerinde yer alan bu genlerin, evrim

sürecinde normal hücrelerin son derece iyi korunmuş olan gen bölgelerinden virüslerin genomuna taşındığı anlaşılmış ve proto-onkogen olarak adlandırılmıştır (Bishop, 1987). Virüslerin gen regülasyonu altına giren ve normalde sessiz olan bu genler, aktif birer onkogen haline dönüşerek hücrelerde transformasyona neden olabilmektedir. Moleküler biyoloji alanındaki son gelişmeler, artık kanserden sorumlu bu hücrel onkogenlerin kromozomlardaki yerlerinin belirlenmesini mümkün kılmış ve böylece değişik kanser türlerine özel onkogenlerin kromozomal yerleri (locus) belirlenmiştir (Sandberg, 1986) (Şekil I.1). Proto-onkogenlerin normal hücrel yaşamda önemli rolleri olması nedeni ile bu genlerin kontrolünde bir hata olması durumunda, hücrenin normal metabolizmasına uygun olmayan aşırı bir gen ekspresyonu meydana gelmekte ve oluşan yeni ya da miktarca normal düzeyinin çok üstünde yer alan gen ürünü diğer faktörlerin de katkısı ile neoplastik transformasyonu başlatabilmektedir. Aslında lösemi ve lenfomalarda translokasyonun incelenmesi sonucu, bu değişikliklerin pek çoğunun doğrudan proto-onkogenler üzerinde olduğu belirlenmiştir. Örneğin bizim de bu çalışmada esas olarak ilgilendiğimiz Kronik Myeloid Lösemilerde (KML) 9. kromozom üzerinde yer alan c-abl proto-onkogeni, 22. kromozomdaki kırılma bölgesine (bcr) gelip bağlandığında, bcr/abl denilen yeni bir birleşik gen parçası oluşmakta ve bu hibrid genin farklı transkripsiyonu sonunda oluşan anormal bir protein (p 210) sentezlenmektedir. Bu anormal protein, hücrenin normal büyüme ve çoğalmasında önemli rol oynayan tirozin kinaz enzim aktivitesini kontrolsüz biçimde artırmakta ve sonuç olarak aşırı hücre bölünmesi ve çoğalmasına yol açmaktadır. KML'dekine benzer translokasyon bazı Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) ve Akut Promyelositik Lösemi (APL) vakalarında da görülmektedir (Clark, 1988). APL'de t(15;17) translokasyonu sonucu c-erbA ve c-fes onkogenlerinin aktivasyonu söz konusudur (Larson, 1984). Benzeri bir örnek de AML'de t(8;11) translokasyonu sonucunda aktive olan c-myc ve c-mos onkogenleridir (Cuheo, 1992). Translokasyonun yanısıra 5. ve 7. kromozomlarda meydana gelen kromozom kayıpları



Şekil I.1. İnsan kromozomları üzerinde bugüne kadar tanımlanmış olan hüresel onkogenlerin haritası

(monozomi) ve uzun kollarda kopmalar, (delesyon) AML'de bu kromozomlarda bulunan birkaç hücrenel onkogenin anormal sentezine ve böylece sekonder lösemilerin gelişmesine yol açabilmektedir.

Genel olarak hematolojik kanserler, hematopoietik kök hücrelerinin kontrolsüz olarak klonal biçimde proliferasyonu ile gelişirler. Bunun sonucunda meydana gelen anormal hücreler olgunlaşıp normal fonksiyon görme yeteneğinde olmayıp, şekil olarak da normal hücrelerden farklılık gösterirler.

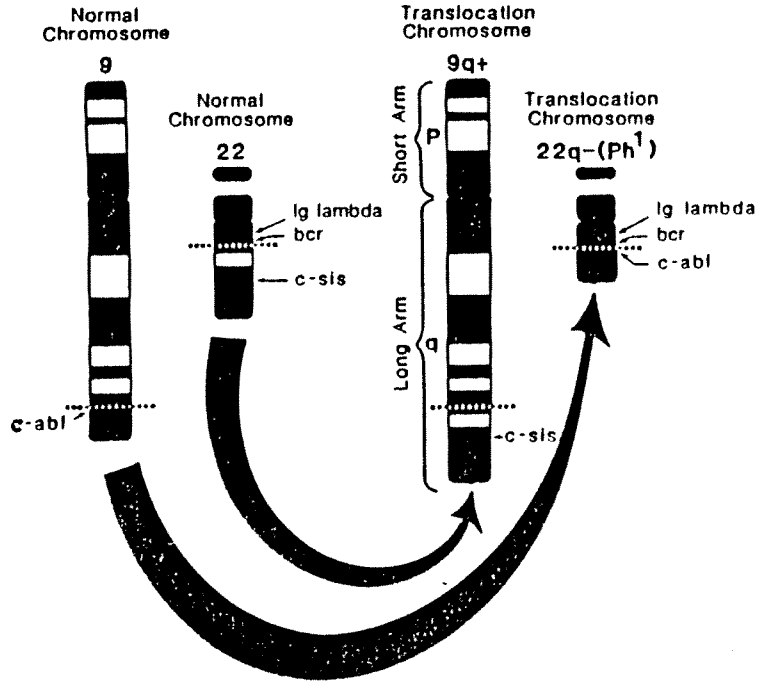
Hematolojik kanserler içinde oldukça önemli bir yeri olan Kronik Myeloid Lösemi'nin (KML) kromozomlar arası bir translokasyon sonucu oluştuğu 1960'lı yıllarda Nowell ve grubu tarafından bulunmuştur. Hastalığın en önemli özelliği, Philadelphia Kromozomu (Ph') adı verilen sitogenetik bir anormallik göstermesidir (Nowell, 1960; Rowley, 1973). Ancak bu anormallik, hastaların %90 - %95'inde görülmektedir. %5'lik bir dilim içerisine giren ve sitogenetik olarak normal görünen hastaların varlığı ise yine aynı yıllarda Nowell ve grubu tarafından açıklanamayan ilginç bir bulgu olarak rapor edilmiştir. (Nowell, 1988). Philadelphia Kromozomu ALL'de %20-33 ve çocuk ALL'de %2.5-5 oranında görülmektedir (Ribeino, 1987; Crist, 1990).

KML, granüositlerin kanda yükselmesi ile başlamaktadır. Hastalığın ilk fazına "kronik faz" denilmektedir (Gate, 1985; Cannistra, 1990). Bu faz sırasında hücreler morfolojik ve fonksiyonel açıdan normal görünmekte, yalnızca sayılarında çok önemli bir artış gözlenmektedir. Ph' kromozomunun ilk olarak ortaya çıktığı kronik faz yıllarca sürebilmekle beraber "blast kriz" olarak adlandırılan ikinci faz kaçınılmazdır. Blast krizi fazında kanda olgunlaşmamış myeloid hücrelerin sayısı giderek artmaktadır. Oldukça agresif bir görünümde olan bu faz sırasında hücre farklılaşması tamamen durmakta, KML'nin blast fazı sonucunda oluşan ve tam

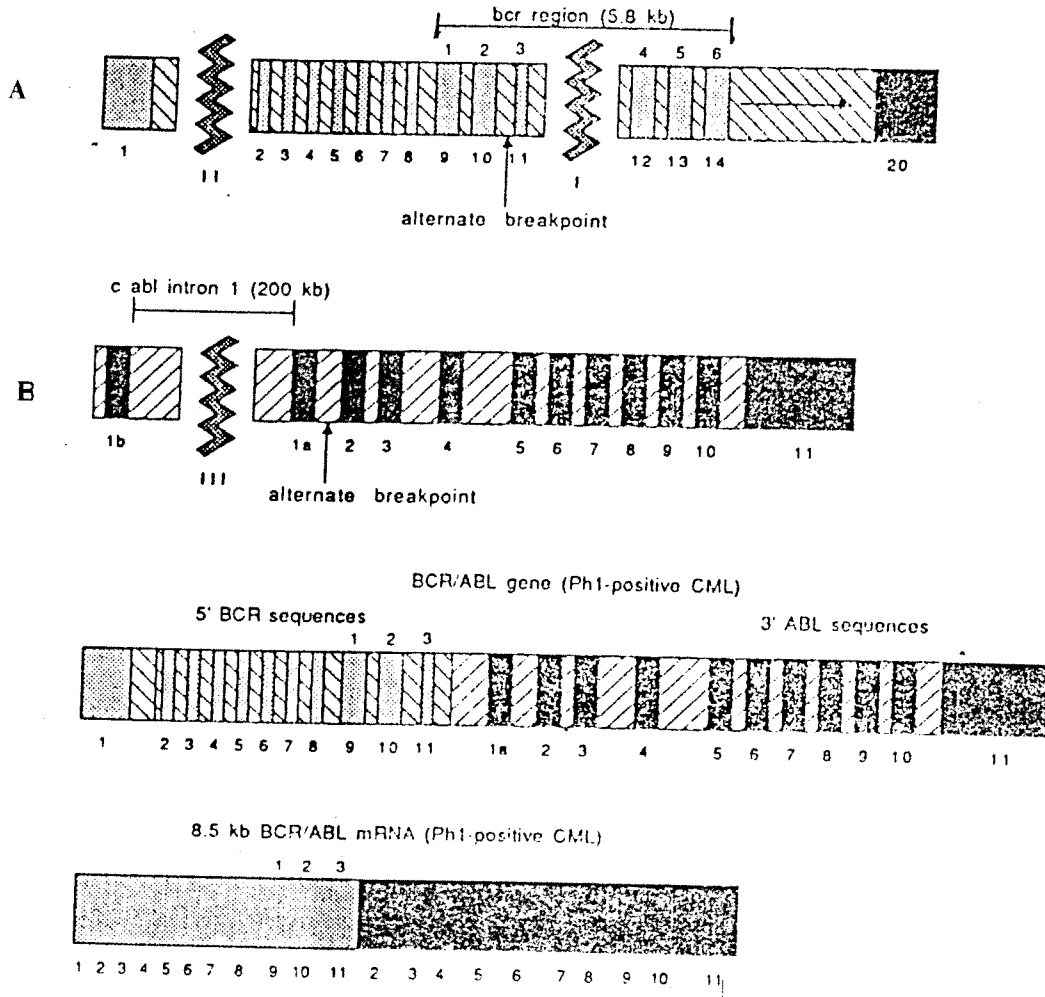
olarak farklılaşmamış kök hücreleri büyük bir hızla çoğalarak kan ve kemik iliğini sarmaktadırlar. Hastalığın kronik fazında görünen Ph' kromozomunun oluşumunda 9. ve 22. kromozomlar arasındaki kırılma ve parça alışverişinin söz konusu olduğunu kanıtlanmıştır (Groffen, 1984; Heisterkamp, 1985). Sözü edilen kırılma ve parça değişimi 9. kromozomun uzun kolundaki 9q34 bantı ile 22 nolu kromozomun uzun kolundaki 22q11 bantları arasında gerçekleşmektedir (Şekil I.2). Bu translokasyon 9 no'lu kromozomun uzun kolunun biraz daha uzamasına (9q+), 22 no'lu kromozomun (Philadelphia) uzun kolunun biraz daha kısalmasına (22q-) yol açmaktadır (Rowley, 1982; Prakash, 1984). 1984 yılında Groffen ve gurubunca yapılan translokasyon bölgesinin klonlanması çalışmaları, 9 no'lu kromozomdaki c-abl (Abelson) geninin 22. kromozomdaki bcr (breakpoint cluster region) adı verilen kırılma bölgesine taşındığını göstermiştir. İnsanda c-abl, 11 ekzondan oluşan 290 kb uzunluğunda büyük bir gendir ve 145 kD molekül ağırlığında bir proteini (p145) kodlamaktadır. Bu protein sinyal iletişimde rol oynayarak, hücre bölünmesini kontrol eden bir enzim olan tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir (Konopka, 1984; Kloetzer, 1985; Konopka, 1988). Translokasyon sonucu oluşan ürünün (210kD protein) tirozin kinaz aktivitesi, normal ürüne oranla oldukça artmaktadır (Meriah, 1986; Maxwell, 1987; Kurzrock, 1988).

Bcr geni ise 22 no'lu kromozom üzerinde 70 kb uzunluğunda ve 20 adet ekzonu bulunan bir gendir. Son yıllardaki araştırmalar bu genin 160 kD moleküler ağırlıkta serin/threonin kinaz aktivitesine sahip bir fosfoprotein olduğunu göstermiştir (Gale, 1993). Bu genin tam olarak görevi bilinmemekle birlikte, hücre metabolizması için önemli olduğu sanılmaktadır.

KML'de abl geninin kırılması ilk intron üzerinde olmaktadır (Şekil I.3B). Bu intron 200 kb uzunluğundadır ve kırılma bu intron üzerinde birden çok bölgede gerçekleşebilmektedir. Kırılma bazen de 2. ekzon üzerinde oluşabilmekte ve



Şekil I.2. Kronik Myeloid Lösemide t(9;22) translokasyonu



Şekil I.3. KML'de translokasyon bölgesindeki kırılmaların haritaları ve oluşan hibrit genin mRNA'sı

böylece 2. ekzondan 11. ekzona kadar bütün abl geni bcr üzerine taşınmaktadır. Bcr geni üzerindeki kırılma ise 5.8 kb'lik bir bölgenin herhangi bir yerinde oluşabilmektedir (Bartram, 1983; Heisterkamp, 1990). Kırılmanın olduğu bölgeler en çok 11 ve 12 no'lu ekzonlar arasında olmaktadır. Bcr kırılma bölgesindeki bu ekzonlar Philadelphia kromozomunun oluşumundan sonra yeniden numaralandırıldığında bu bölgede en çok kırılmanın olduğu 11. ve 12. ekzonlar 2. ve 3. ekzona karşılık gelmektedir (Şekil I.3.A). Normal c-abl geninin oluşturduğu mRNA, 6 kb veya 7kb uzunlukta iken, translokasyon sonrası oluşan bcr/abl hibrit geninin mRNA'sının uzunluğu ise 8.5 kb'dir (Shtivelman, 1985; Stam 1985; Gale, 1984). Bu hibrit mRNA'nın oluşturduğu p210 proteininin yüksek tirozin kinaz aktivitesi sayesinde hücreye bir büyüme ayrıcalığı sağlıyor olabileceği düşünülmekte ve bu ayrıcalığın neoplastik transformasyonda gereken birçok basamaktan birini oluşturduğuna inanılmaktadır (Konopka, 1984; Kurzrock, 1987).

1990'lı yıllarda çalışmalar, bcr geni üzerindeki farklı kırılma bölgelerinin hastalığın prognoz ve süresini etkileyebileceğini göstermiştir (Saglio, 1990; Lion, 1992; Fioretos, 1993). Bcr bölgesi üzerindeki 3. ekzonun translokasyondaki varlığının KML hastalığının gidişatını büyük ölçüde etkilediği sanılmaktadır. Örneğin, kırılma 2. ekzondan olduğunda kronik fazın dolayısıyla da hastanın ortalama ömrünün kısaldığı gözlenmiştir (Shtivelman, 1987; Lai, 1990). Bu tür bir translokasyon kronik fazdan daha agresif görünümlü "Blast Krizi" fazına geçiş süresini de etkilemektedir. Bu nedenle DNA ve mRNA analizleri ile yapılan kırılma bölgelerinin haritalanmasının önemi daha iyi anlaşılmıştır (Shtivelman, 1987; Lai, 1990; Gehly, 1991; Hughes, 1990).

Tanı ve tedavinin izlenmesi sırasında hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir yöntemlerin kullanılması oldukça büyük önem taşımaktadır. KML'nin tanısı sırasında üç ayrı yol izlenebilir:

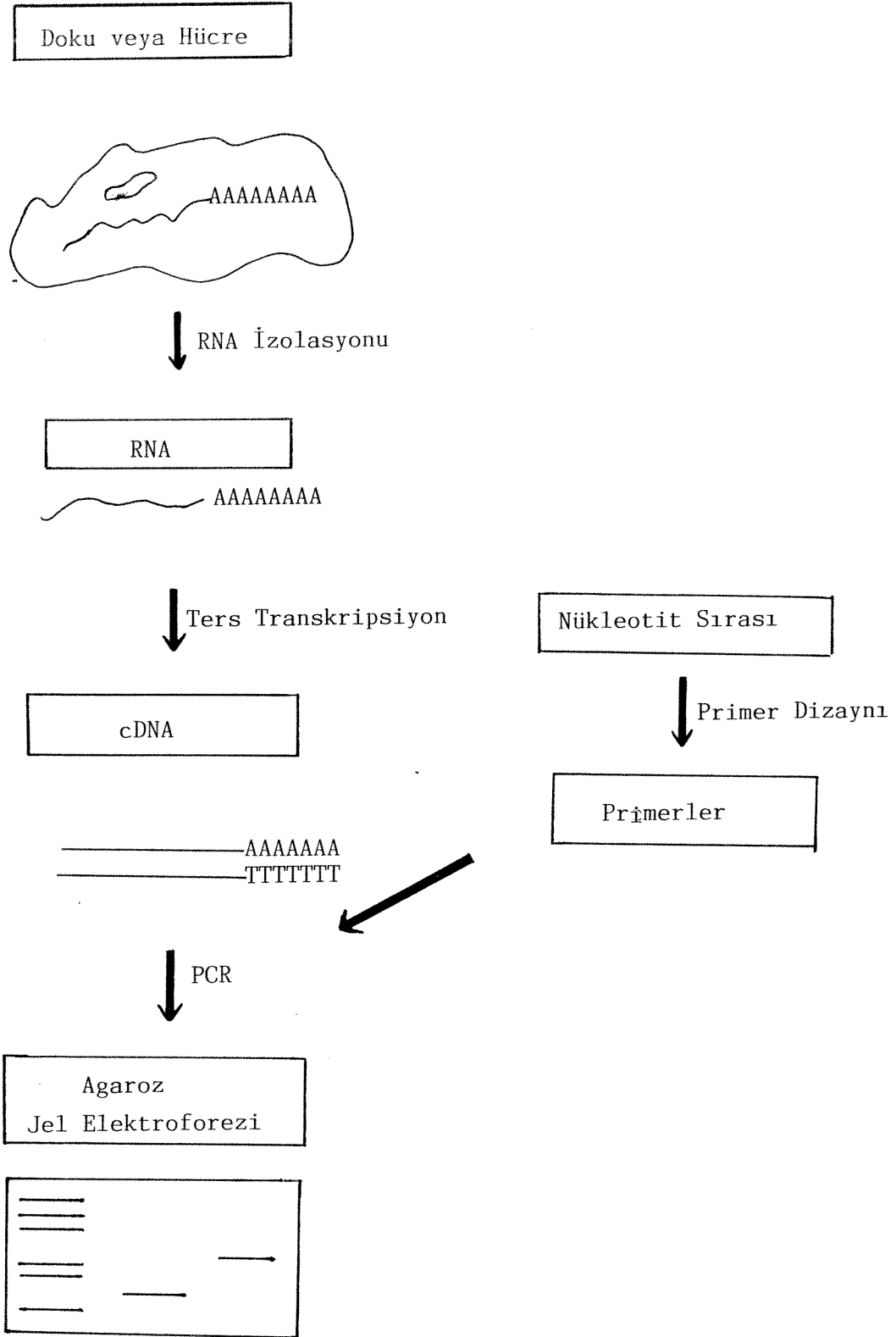
1- Hasta DNA'sı restriksiyon enzimlerle kesilip meydana gelen parçalar elektroforez ile ayrıldıktan sonra kırılma bölgesindeki DNA dizisine komplementer (karşıt) proplar kullanılarak kırılmanın varlığı ve niteliğinin saptanması (Southern Blot Yöntemi),

2- Kromozomdaki kırık bölgeden oluşan RNA'nın ters transkripsiyon ile komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülüp çoğaltılarak incelenmesi, RT-PCR (Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) (Şekil I.4),

3- bcr/abl füzyon geninin oluşturduğu hibrit proteinin (p210) immunolojik olarak saptanması,

Southern Blot yöntemi hastalığın tanısı aşamasında oldukça başarılıdır. Birden fazla restriksiyon enzimi ile DNA kesimi yapıldığında translokasyonun yerini bile belirlemek mümkün olabilmektedir. Ancak bu yöntemin hassasiyeti %5 civarında olup tedavi sırasında kandaki 100 myeloid hücre arasında 5'ten daha az sayıda hasta hücre kalacak olursa bunlar gözden kaçabilmektedir. Çok daha hassas bir yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), hastalığın tedavisi sırasında daha kesin bilgi vermektedir. Bu nedenle çalışmalarımızda KML tanı ve takibinde Southern blot yönteminin yanısıra, PCR yönteminin de uygulamaya sokulması amaçlanmıştır. Bu çalışmada Southern Blot yöntemi için 22. kromozom üzerindeki majör kırılma bölgesine (M-bcr) karşıt proplar, 3-4 ayrı restriksiyon enzimi ile kesilmiş hasta DNA örnekleri ile hibridizasyona sokularak, bu DNA'larda translokasyonun olup olmadığı ve varsa M-bcr kırılma bölgesi üzerindeki yeri yaklaşık olarak belirlenmiştir.

Yukarıda sözü edilen Southern Blot analiz yönteminde karşılaşılan bir başka sorun yüksek miktarda kan ve kemik iliği örneklerine gereksinim duyulmasıdır. Bu da her zaman mümkün olamamaktadır. PCR yöntemi ile analiz için gereken doku miktarı en aza inmiştir. Çünkü az miktardaki örnekten elde edilecek DNA veya RNA, PCR ile tüpte milyonlarca kez çoğaltılarak analizler için gerekli miktara



Şekil I.4. RT-PCR Yönteminin basamakları

ulaştırılmaktadır (Dobrovic, 1988; Elrich, 1991). PCR yöntemi defalarca tekrarlanan üç basamaktan oluşur.

1- Çoğaltılması istenen DNA parçasının yüksek sıcaklık kullanılarak, çift sarmallı halinden tek sarmallı hale dönüştürülmesi (Denatürasyon).

2- Uygun şekilde seçilmiş primerlerin bağlanabilmesi için gerekli sıcaklığın sağlanması.

3- Ortama eklenecek deoksiribonükleik asit monomerleri ve sıcağa dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimiyle primerler üzerinde DNA sentezinin gerçekleştirilmesi.

PCR yöntemi yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı çok yararlı olmasına rağmen çoğaltılacak DNA bölgesinin 2 kb'yi geçmesi halinde verimli bir şekilde gerçekleştirilememektedir. Kronik Myeloid Lösemilerde majör translokasyon bölgesinin yaklaşık 5.8 kb uzunluğundaki bir bölgeyi içermesi, hatta bazı durumlarda bu bölgenin daha da uzun olması nedeniyle bu DNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması mümkün olamamaktadır. Bu nedenle DNA üzerindeki intron bölgelerinin transkripsiyon sonrasında ayrılması ile oluşan mRNA'lar kullanılmakta, ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA, PCR metoduyla çoğaltılmaktadır (Kawasaki, 1988; Dobrovic, 1991). Bu metod RT-PCR olarak isimlendirilmiştir.

PCR metodu $1/10^5$ -lik bir hassasiyetle tedavi sonrasında geriye kalan hasta hücre miktarının incelenmesi açısından oldukça büyük bir önem taşımaktadır (Morgan, 1989; Vander Plas, 1991; Wisniewski, 1991).

BÖLÜM II

GELİŞME

II.1. MATERYAL VE METOD

II.1.1. Kan örnekleri

Bu projede kullanılan kan örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastahanesinde KML tanısı konulan hastalardan alınmıştır.

II.1.2. Kimyasallar

Bu projede kullanılan bütün kimyasallar moleküler biyoloji çalışmaları için özel olarak hazırlanan malzemeler arasından seçilmiştir. Agaroz Jeli Sigma Firmasından, EcoR1, Hind III, BamHI ve BglII restriksiyon endonükleazları Promega Firmasından, Mega Prime İşaretleme Kiti ve $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP ile N⁺ Hybond Blot filitresi Amersham Firmasından sağlanmıştır. Ayrıca cDNA ve PCR amacıyla kullanılan Taq DNA polimeraz enzimi, dNTP'ler, ve Revers Transkriptaz enzim ve tamponları da yine Promega Firmasının ürünleridir.

II. 1.3. Kandan DNA İzolasyonu

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Onkoloji Ana Bilim Dalına başvuran ve Kronik Myeloid Lösemi (KML) tanısı konulan hastalardan alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır (Maniatis, 1989). EDTA içeren tüplere alınan 10 cc kan, üzerine 30ml 2x liziz tamponu (10x liziz tamponu: 770mM NH₄Cl, 46mM KHCO₃, 10mM EDTA, pH: 7.5) eklenerek 10 dakika buz üzerinde karıştırılarak inkübe edilmiştir. Daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenen tüplerden üst faz atılarak hücreler 3ml tuz/EDTA tamponunda (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH7.5) çözülmüş, üzerine 300 ml %10 SDS, ve 20 ml Proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, örneklerin üzerine

3ml fenol (pH 8.0) konularak 10 dakika karıştırılmış ve 2000 rpm de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz, bir kez daha fenol ile aynen muamele edildikten sonra kloroform: isoamilalkol (25:1) ile yıkanmış ve satrifüj edilmiştir. DNA içeren su fazının iki hacim etanol ile karıştırılması sonucu DNA molekülleri çöktürülmüştür. Santrifüjlenerek ayrılan DNA uygun miktarda TE tamponu içinde (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5) çözülerek -20°C'de saklanmıştır.

II.1.4. DNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Kandan elde edilen DNA örneklerinin %0.8'lik agaroz jel elektroforezi ile saflık tayinleri yapılmış, ve miktarları 260nm ve 280nm dalga boylarındaki absorpsiyon ölçümü ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Daha sonra, Southern blot yöntemi için ilk basamak olan restriksiyon enzim kesimi gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri sırasıyla EcoR1, Hind III ve BamH1 (Bazı örnekler için BglII) enzimleri ile uygun koşullarda reaksiyona sokulmuştur. Bunun için, 10 µg DNA'ya yaklaşık 3 ünite enzim ve uygun miktarda enzim tamponu eklenerek, 37°C'de bir gece boyunca reaksiyona bırakılmıştır. Ertesi gün %0.8'lik mini agaroz jel hazırlanarak kesimleri kontrol edilen bu örnekler, 20x30 cm boyutlarındaki büyük agaroz jelde bir gece 50 mA (60V) da yürütülmüşlerdir. Bu şekilde birbirlerinden iyice ayrılmasını sağlanan değişik boydaki DNA parçaları Southern Blot transferi ile jel üzerinden N⁺ Hybond filitrelerine aktarılmıştır.

II.1.5. Southern Blot'un Hazırlanışı

Elektroforezden sonra etidyum bromür ile boyanan jel uv lambası altında incelendikten sonra gereksiz bölgeler kesilmiştir. Daha sonra jel 1 saat denatürasyon solüsyonunda (1.5 M NaCl, 0.5M NaOH) çalkalanarak, jel üzerinde yer alan DNA'lar denatüre edilmiştir. Yıkama işlemi bittikten ve jel 3x SSC ile nötralize edildikten sonra uygun boyutlarda kesilen N⁺ Hybond (Amersham) filitre kağıdı jel üzerine yerleştirilmiştir. Filitre üzerine ise önceden 3x SSC solüsyonu ile ıslatılmış

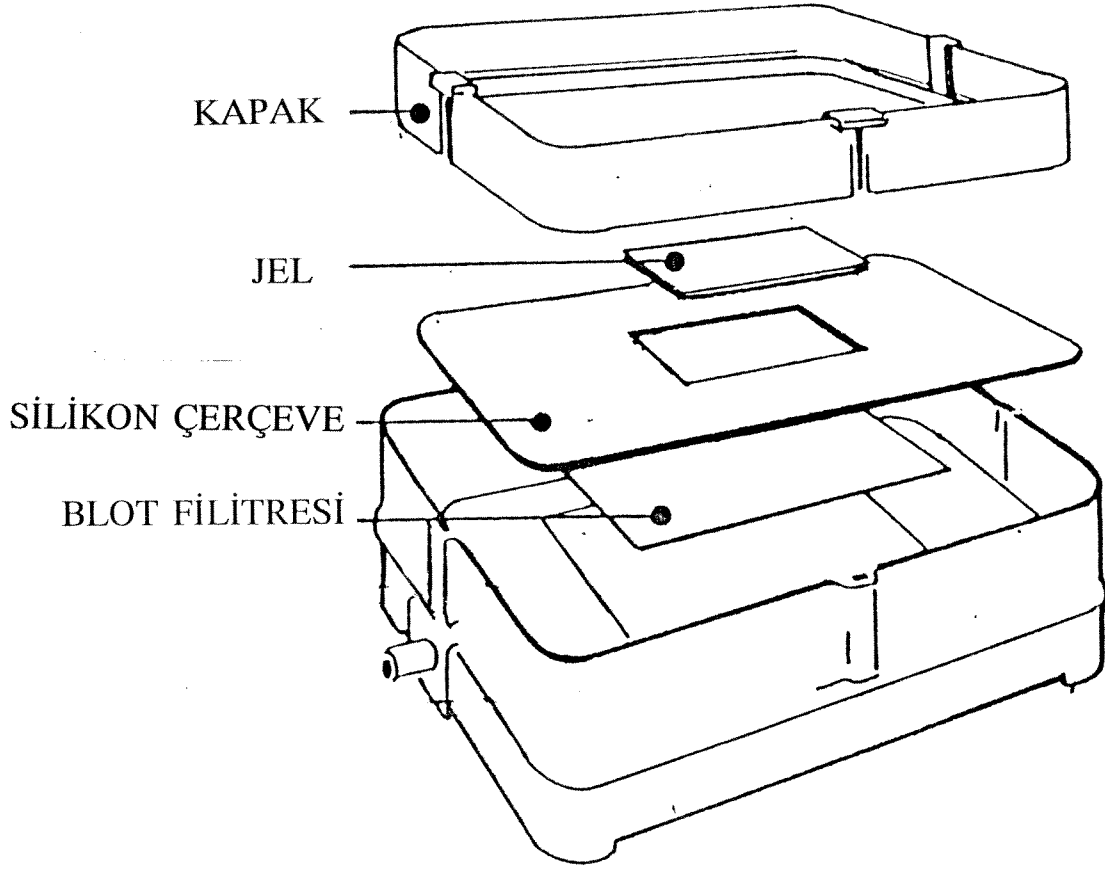
olan Whatman 3MM kağıt ve en üste uygun miktarda kağıt havlular yerleştirilerek 4-5 saatlik transfer başlatılmıştır. Bazı deneylerde transferin daha hızlı (1-2 saat) gerçekleşmesi amacıyla "vakum blot" cihazı kullanılmıştır (Şekil II.1). Bu sırada kuruyup incelen jel uv lambası altında incelenmiş, DNA transferinin başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediğinden emin olunduktan sonra, N⁺ Hybond filtresi uygun bir naylon torba içinde paketlenerek +4°C'de saklanmıştır.

II.1.6. Prob DNA'nın Elde Edilişi

Prob olarak Dr. John Groffen'in (Los Angeles, Children's Hospital) hediyesi olan pabIk2 ile Dr. Simon Guy'ın (St. Mary's Hospital, Manchester) hediyesi olan bcr-G kullanılmıştır. İlk prob M-bcr bölgesinin 3' ucunu tarayan pUC vektörüne takılı, 1.2 kb uzunluğunda bir DNA parçasıdır. bcr-G probu ise 2.9 kb'lik pUC vektörüne takılı olarak hazırlanmış ve yine M-bcr bölgesinin 3' ucuna yakın 0.6 kb'lik bir bölgeye karşılık gelen DNA parçasıdır. Her iki rekombinant plazmit vektörü de Ecoli/HB101 suşu içinde gönderilmiş olup, Alkali Liziz yöntemi ile laboratuvarımızda çoğaltılarak prob DNA izolasyonu yapılmıştır.

II.1.7. Alkali Liziz Yöntemi

Birnboim ve arkadaşlarının (1979) geliştirdiği Alkali Liziz yöntemi, laboratuvarımızda bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Bir gece 37°C'de ampisillinli ortamda büyütülen E.coli kültüründen 1.5 ml alınarak eppendorf tüplerinde çöktürülen hücreler Solüsyon 1'de çözülmüştür (Solüsyon 1: 50mM Glükoz, 10mMEDTA, 25mM Tris-HCl pH8.0). Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen tüplerin üzerine 200 ml 0.08N NaOH ve %1 SDS içeren Solüsyon 2 eklenerek elde yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra, 15ml önceden soğutulmuş olan Solüsyon 3 (Potasyum Asetat; pH4.8) koyularak tekrar karıştırılmış ve santrifüj edilen tüplerin üst fazları alındıktan sonra eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil-alkol (25:24:1) eklenerek temiz bir eppendorf tüpüne aktarılmış, eşit hacimde etanol



Şekil II.1. Hoefer Transvac Vakum Blot Cihazı

eklenerek 13.500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra, üst faz alınarak plazmit içeren çökelek kurutulmuş, ve uygun miktarda TE tamponu içinde çözülerek -20°C' de saklanmıştır.

Plazmit izolasyonu gerekli bazı durumlarda, büyük ölçekli olarak yapılmıştır. Bunun için Qiagen Firması tarafından üretilen "Q1A prep-spin" adlı hazır plazmit izolasyon kiti kullanılmıştır. Başlangıç olarak 200 ml'lik kültürün kullanıldığı bu tür izolasyonda solüsyonların miktarı yeniden ayarlanmıştır. Büyük ölçekli plazmit izolasyonlarının sonucunda elde edilen plazmit etanolde çöktürülüp, kit tarafından sağlanmış olan saflaştırma kolonlarından geçirilerek temizlenmiştir (Birnboim, 1983; Thomas, 1988). Elde edilen plazmit örnekleri II.1.8'de anlatıldığı gibi restriksiyon enzimleriyle kesilerek düşük erime noktalı agaroz jelinde yürütülmüştür.

II.1.8. Prob DNA'sının Restriksiyon Enzimi ile Plazmitlerden Çıkartılması

Elde edilen plazmit DNA'sı saflık tayini için %0.8'lik agaroz mini jelde yürütülmüştür. Kontrol olarak Hind III ile kesilmiş λ DNA'sı kullanılmış ve istenen plazmitin varlığı ve saflığı belirlenmiştir. Miktar tayini ise 260nm'de spektrofotometrik olarak yapılmıştır. pUC vektörüne takılı olarak çoğaltılan 1.2kb uzunluğundaki pabIk2 prob DNA'sı Hind III ve EcoR1 enzimleri ile kesilerek çıkartılmıştır. Bu iki enzimin kesim koşulları farklı olduğu için kesim iki ayrı basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk önce 10 μ g plazmit DNAsı, 2.5 ünite Hind III enzimi ile kendi tamponu içinde toplam 30ml olacak şekilde 37°C'de 3 saat kesime bırakılmış, daha sonra ikinci enzim olan EcoR1 ve bu enzime özel tampon eklenerek yine 37°C'de, 3 saatlik ikinci bir reaksiyona sokulmuştur. %1'lik düşük erime noktalı agaroz jel hazırlanarak ortaya çıkan bantlar incelenmiştir. Referans olarak λ /Hind III DNA'sı yürütülmüş ve buna göre 1.2 kb'lik bant saptanmıştır. Bu bant jelden dikkatle kesilerek 65°C'de eritilmiş ve fenol: kloroform: isoamil alkol (25: 24: 1) yöntemi ile agarozdan temizlenmiştir. Uygun hacimde TE tamponunda

çözülen proplar spektrofotometrik olarak miktar tayini yapıldıktan sonra -20°C'de saklanmıştır. Böylece prob DNA'sı bundan sonra yapılacak olan işaretleme reaksiyonu için hazır edilmiştir. Benzer şekilde bcr-G probu da PstI ve EcoRI enzimleri ile kesilerek pUC vektöründen çıkartılmıştır. Kesim reaksiyonu, her iki enzimin çalışma koşulları uygun olduğu için aynı tampon içinde tek basamakta gerçekleştirilebilmiştir.

II.1.9. Prob DNA'sının Radyoaktif Olarak İşaretlenmesi

Amersham "Mega Prime" DNA İşaretleme kiti kullanılarak prob DNA'sı ³²P- α - dCTP radyoizotopu ile işaretlenmiştir. Bu yöntemle göre gelişigüzel sıraya sahip 9 nükleotit uzunluğundaki primerler daha önceden denatüre edilmiş olan prob DNA üzerinde karşıt oldukları bir çok bölgeye bağlanırlar. Bu şekilde oluşan primer-DNA kompleksleri, DNA sentezi sırasında Klenow enzimi için uygun başlangıç noktaları oluşturur. Ortamda bulunan radyoaktif işaretli dCTP reaksiyon sırasında yeni sentezlenen DNA'ların işaretlenmesini sağlar. Verimi oldukça yüksek olan bu reaksiyon, kısa bir sürede az miktarlarda prob DNA'nın işaretlenmesini sağlar. Buna göre yaklaşık 25 ng olacak şekilde alınan prob DNA'sı üzerine uygun miktarda enzim tamponu, ³²P- α dCTP radyoizotopu ve 2 μ l Klenow enzimi konularak 37°C'de bir gece işaretlemeye bırakılmıştır. Her işaretleme öncesinde prob DNA'sı 5 dakika 95°C'de denatüre edilmiştir. İşaretleme sonrasında alınan 1 μ l'lik örnekler 20 kere seyreltilerek Whatman 3MM disklerle emdirilmiş ve sonra örneklerde total radyoaktivite 5 μ l sayım solüsyonunda β sayacı (LKB) ile belirlenmiştir. Aynı işaretleme ortamından alınan 1 μ l örnekler ise spesifik radyoaktiviteyi vermek üzere %10'luk soğuk TCA ile yıkanmış ve daha sonra %70'lik soğuk etanol ile fikse edilmiştir. İyice kurutulan diskler 5ml sayım solüsyonunda okunarak işaretleme verimi belirlenmiştir. Ortalama olarak bu işaretlemelerde %68-%70 oranında verim ve yaklaşık 20x10⁶ cpm/ μ gDNA özgün aktivitesi olan işaretli proplar elde edilmiştir.

II.1.10. Ön Hibridizasyon

0.25M NaH₂PO₄, 0.25M NaCl, %0.1 SDS ve 1mM EDTA'dan oluşan solüsyon içersine toplam konsantrasyonun %6'sı olacak şekilde polietilen glikol eklenerek içinde N⁺ Hybond filitre bulunan kap doldurulup 65°C'de en az 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

II.1.11. Hibridizasyon

Ön hibridizasyona sokulmuş olan filitreler önceden denatüre edilmiş ve miktarı ayarlanmış olan işaretli prob DNA'sı (25x10⁶ cpm / filitre) ile naylon torba içinde bir gece 65°C'de hibridizasyona bırakılmıştır.

II.1.12. Otoradyografi

Otoradyografi radyoaktif izotopların Röntgen filmi üzerinde reaksiyona neden olarak siyah lekeler oluşturması prensibine dayanır. Hibridizasyon sonunda filitreler 65°C'de 40 dakika olmak üzere sıra ile 3x, 2x, 1x, 0.1x SSC ve %0.1'lik SDS ile yıkanmıştır. Yıkamalar sonrasında filitreler torbalanıp karanlık odada kurşun kasetlere Röntgen filmi (X-OMAT, KODAK AR) ile birlikte yerleştirilerek, -70 °C'de 5-7 gün bekletildikten sonra banyo edilmiştir (SSC tamponu: 1.5 M NaCl, 1.5 M Tris Sodyum Sitrat, pH: 7.0).

II.1.13. Kandan RNA İzolasyonu

KML hastalığında translokasyonun belirlenebilmesi için ikinci bir yöntem olarak giriş bölümünde belirtilen RT-PCR yönteminde kullanılmak üzere normal ve hasta kanlarından RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla Chomczynski ve arkadaşları (1987) tarafından kullanılan yöntem ufak değişikliklerle en uygun hale getirilmiştir. Yöntem, lökositlerin kandan ayrılması ve daha sonra solüsyon D (4M Guanidinyum Tiosiyanat, 42mM Sodyum sitrat, %0.83 N-loril sarkozil, 0.2mM β-merkaptöetanol) ile patlatılarak RNA'nın fenol: kloroform: izoamil alkol ilavesi ile

özütlenmesi prensibine dayanmaktadır. Elde edilen RNA'lar izopropanol ile temizlendikten sonra, etanol içersinde çöktürülerek -20°C'de saklanmıştır. Daha sonra RNA'lar denatürasyon özelliği olan %1'lik formaldehit agaroz jelinde incelenmiştir.

II. 1. 14. RNA'dan cDNA Sentezlenmesi

Sentez 1-5 µg RNA, 0.5 µM özgün olmayan 9'lu DNA primerleri, 4 µl revers transkripsiyon tamponu (250mM Tris HCl pH:8.3, 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 2.5mM spermidin, 50mM DTT), 2µl DTT (100mM), 2µl dNTP (20mM), koyularak reaksiyon tüpü hazırlanır. Tüp 10 dakika 70°C'de denatürasyondan ve 100 ünite RNasin enzimi ile 100 ünite revers transkriptaz enziminin eklenmesinden sonra 40°C'de 1 saat bekletilerek tamamlanır.

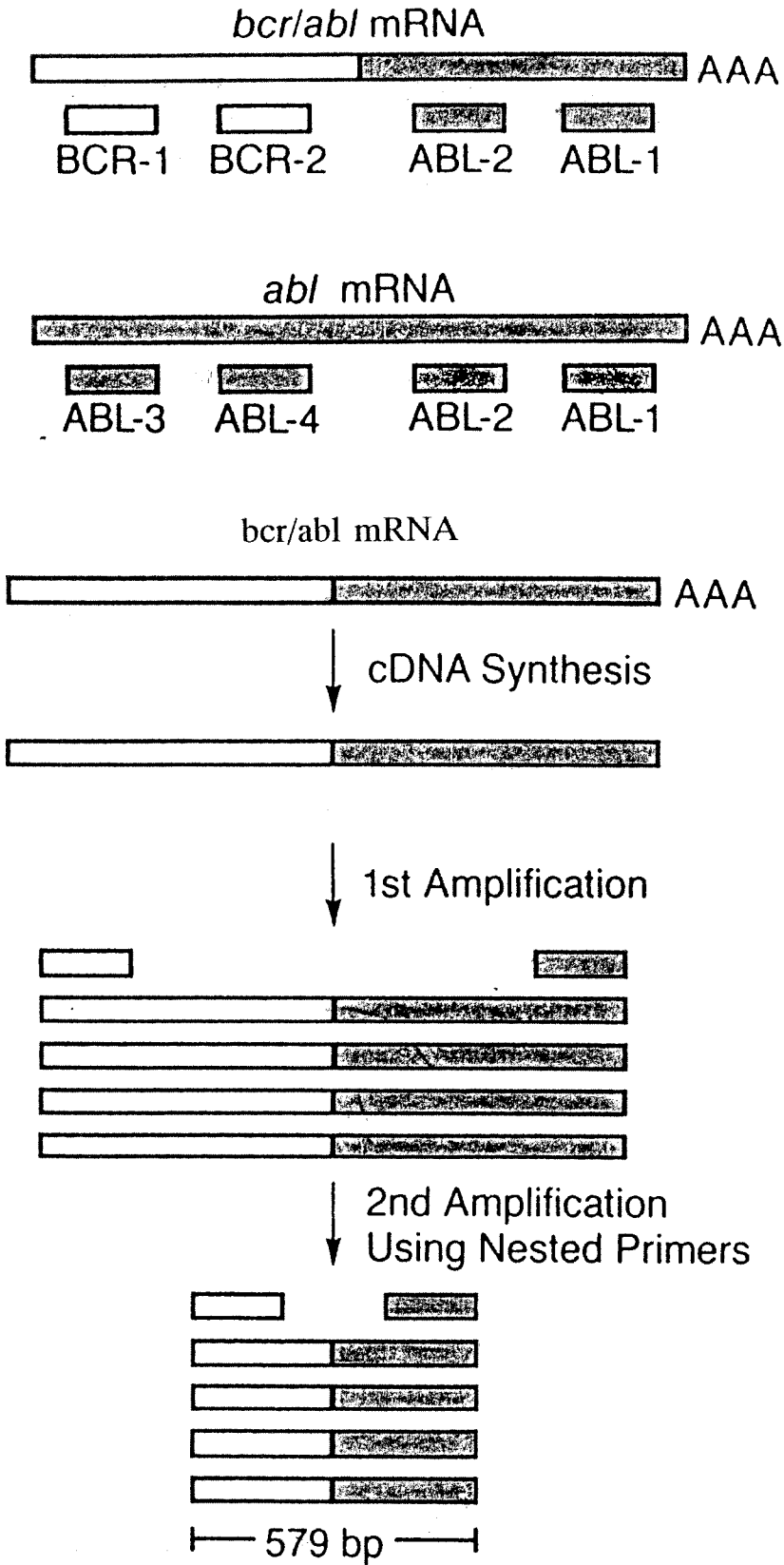
II.1.15. PCR Yöntemi ile cDNA Amplifikasyonu

Normal ve hasta kanlarından hazırlanmış cDNA'lardan 5µl alınarak, 2.5µl PCR tamponu (500mM KCl; 100mM Tris-HCl pH 9.0; %1 Triton X 100), 3.5µl dNTP, 5µl (5µM) uygun primer, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi ve 1.5 µl MgCl₂ (25mM) reaksiyon tüpüne konularak aşağıda belirtilen koşullarda PCR gerçekleştirilmiştir.

	Zaman	Isı	Reaksiyon
1.	1 dak.	94°C	Denatürasyon
2.	1 dak.	60°C	Primer bağlanması
3.	1 dak.	72°C	DNA sentezi
4.	10 dak.	72°C	DNA sentezinin tamamlanması
5.	10 dak.	10°C	Soğutma

PCR'da 1'den 3'e kadar olan basamaklar 35 kere tekrarlanmıştır. PCR reaksiyonu iki kademeli olarak gerçekleştirilmiştir. Önce cDNA üzerinde genişçe,

daha sonra biraz daha dar bir bölge (nested PCR) çoğaltılmıştır (Şekil II.2.A). Birinci basamakta, normal gen ürünü için abl 1 ve abl 3 primerleri, translokasyon ürünü için ise bcr 1 ve abl 1 primerleri kullanılmıştır (Şekil II.2.B). İkinci basamakta, bir önceki kademededen elde edilen normal ürün abl 2 ve abl 4 primerleri ile, translokasyon ürünü ise abl 2 ve bcr 2 primerleri ile yeniden çoğaltılmıştır. Primerler Oncogene Science Firması'nın "CML Phenotyping Kit"inden sağlanmıştır. PCR ürünleri daha sonra %2'lik bir agaroz jelde yürütülerek incelenmiştir.



Şekil II.2. A. cDNA üzerinden iki basamakta gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
 B. PCR'de kullanılan primerler

II. 2. BULGULAR

II.2.1. Kandan DNA İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimleriyle Kesim Koşulları

Hacettepe Onkoloji Hastanesi'ne başvurarak sitogenetik ve diğer klinik bulgular sonucunda KML tanısı konulan hasta kanlarından DNA örnekleri izole edilmiştir. (Tablo II.1). Elde edilen DNA örneklerinin EcoRI, HindIII, BglIII ve BamHI gibi restriksiyon enzimleri ile kesim şartları optimize edilmiştir. Blot analizi için, yukarıdaki restriksiyon enzimleri ile kesilen 10µg'lık DNA örnekleri % 0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil II.3'de kesilmiş DNA örnekleri görülmektedir.

II.2.2. Prob DNA'sının Elde Edilişi

Prob DNA'sını içinde taşıyan pUC vektörü alkali liziz yöntemiyle *E.coli*'de çoğaltılarak izole edilmiş ve prob DNA'sı restriksiyon enzimleriyle kesilerek plazmitten çıkartılmıştır. pUC plazmitine takılı olan 1.2 kb'lık 3'-bcr prob DNA'sı EcoRI ve Hind III enzimleri ile (Şekil II.4), 0.6 kb'lık prob DNA'sı ise EcoRI ve PstI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir (Şekil II.5). Şekil II.4.A'da birinci kuyu marker DNA'sını (λ /HindIII) ikinci kuyu ise 1.2 kb'lık probun plazmit vektörünü; Şekil II.4.B'de ise birinci kuyu marker DNA'sı, ikinci kuyu ise vektörden çıkartılmış 1.2 kb'lık prob DNA'sı gösterilmektedir. Kesim sonucunda vektörden çıkartılan prob DNA'sı düşük erime noktalı agaroz jelde yürütülerek, vektörün diğer parçalarından ayrılmıştır. Yeri, marker DNA ile belirlenen prob DNA'sı jelden kesilmiş ve ısıtılarak eritilen agarozdan fenol yıkamaları sonucu temizlenmiştir. Şekil II.5'te ise 0.6 kb'lık prob DNA'sını taşıyan vektörün yüksek miktarda eldesinden sonra restriksiyon enzimleri ile kesilmiş fotoğrafı görülmektedir. Bu agaroz jeldeki kuyular agaroz kirliliğini en aza indirmek için birleştirilmiştir.

II.2.3. Southern Blot Analizi ve Otoradyografi

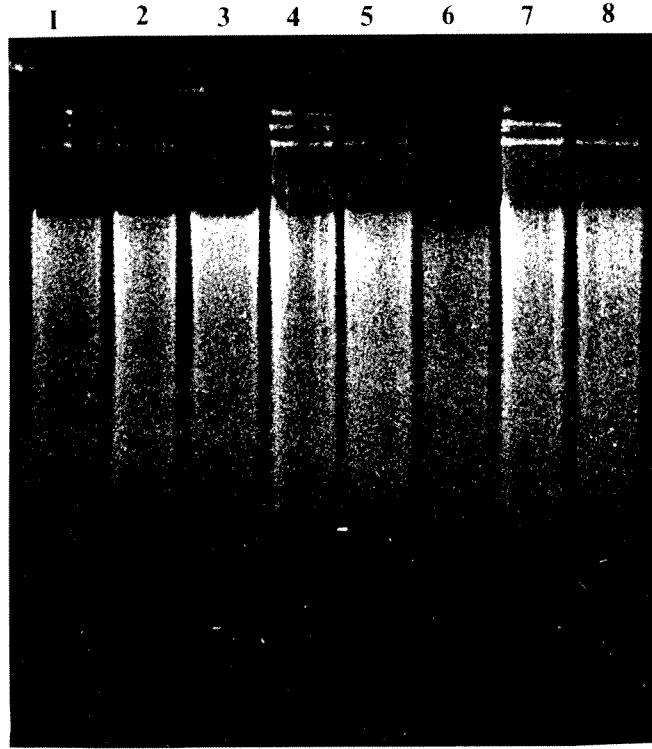
Normal bir DNA örneğinin otoradyogram profili Şekil II.6.A'da gösterilmektedir.

Hasta No	Konsantrasyon* ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	OD _{260/280}
1	770	1.5
2	830	1.9
3	1195	1.8
4	1352	1.8
5	1540	2.0
6	350	2.5
7	340	2.4
8	570	2.2
9	1255	1.85
10	775	1.72

* DNA Konsantrasyonu OD₂₆₀ değeri spektropotometrik olarak ölçüldükten sonra aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

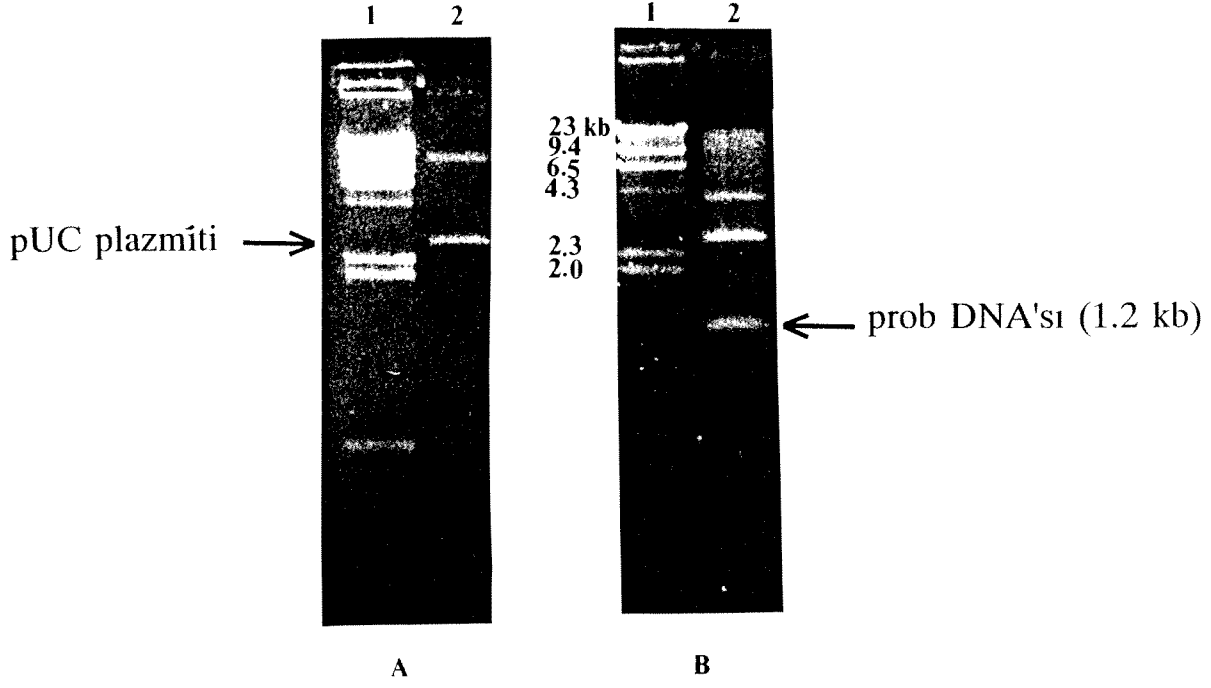
DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{ml}$): OD₂₆₀ x Seyreltme Faktörü x 50

Tablo II.1. KML hastalarından elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları



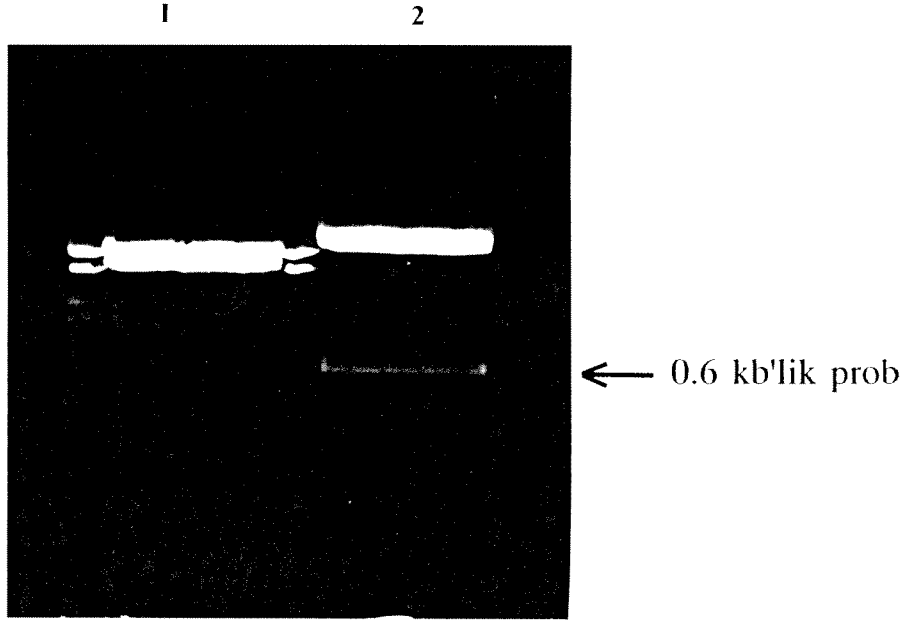
Şekil II.3. Hasta DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesimlerinin agaroz jel üzerindeki profili

1. kuyu: 1. hasta DNA'sının EcoR1 enzimiyle kesim profili
2. kuyu: 2. hasta DNA'sının EcoR1 enzimiyle kesim profili
3. kuyu: 1. hasta DNA'sının HindIII enzimiyle kesim profili
4. kuyu: 2. hasta DNA'sının HindIII enzimiyle kesim profili
5. kuyu: 1. hasta DNA'sının BglII enzimiyle kesim profili
6. kuyu: 2. hasta DNA'sının BglII enzimiyle kesim profili
7. kuyu: 1. hasta DNA'sının BamHI enzimiyle kesim profili
8. kuyu: 2. hasta DNA'sının BamHI enzimiyle kesim profili

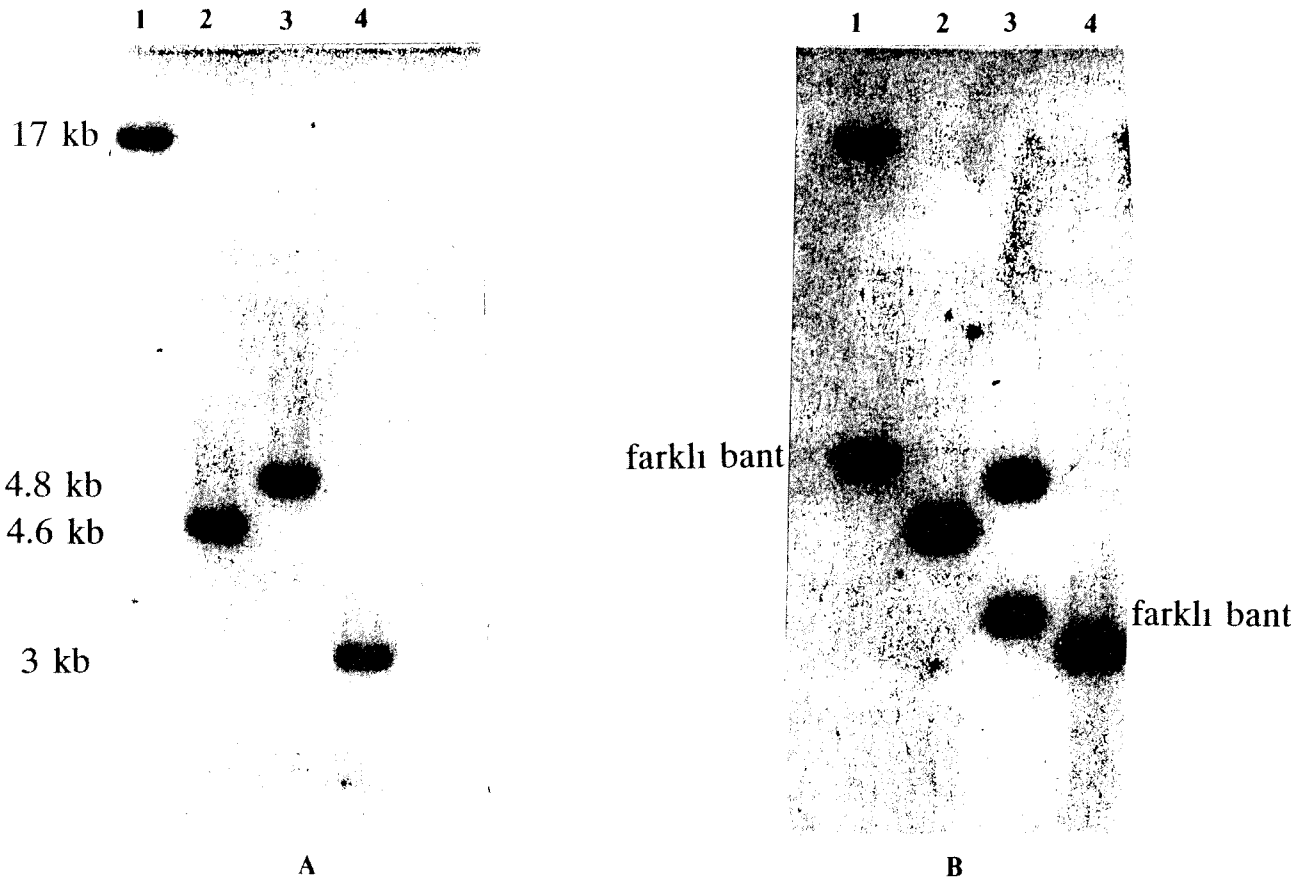


Şekil II.4. pUC vektörü ve içerdiği 1.2 kb'lık prob DNA'sı

- A.** 1. kuyu: λ /HindIII Marker DNA'sı
2. kuyu: pUC vektör plazmiti (kesim öncesi)
- B.** 1. kuyu: λ /HindIII Marker DNA'sı
2. kuyu: EcoR1 ve HindIII enzim kesimlerinden sonra 1.2 kb'lık prob ve vektörün geri kalan kısımları.



Şekil II.5. pUC vektörü ve içerdiği 0.6 kb'lık prob DNA'sı
1. kuyu: 2.9 kb'lık pUC vektörü
2. kuyu: pUC vektörünün PstI ve EcoR1 kesimleri sonrasında oluşan 0.6 kb'lık prob DNA'sı



Şekil II. 6. Değişik restriksiyon enzimleri ile kesilmiş normal ve hasta DNA örneklerinin otoradyogramları.

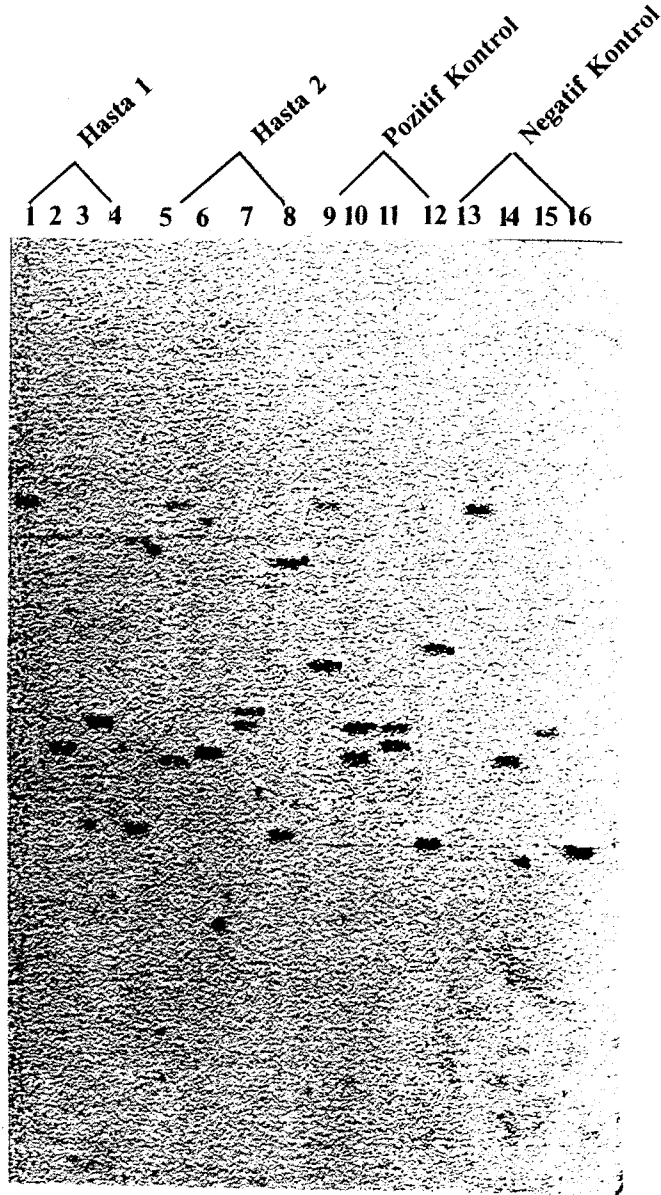
- A.** 1. kuyu: EcoR1 restriksiyon enzimiyle kesilmiş normal DNA örneği (17 kb)
 2. kuyu: HindIII restriksiyon enzimiyle kesilmiş normal DNA örneği (4.6 kb)
 3. kuyu: BglII restriksiyon enzimiyle kesilmiş normal DNA örneği (4.8 kb)
 4. kuyu: BamH1 restriksiyon enzimiyle kesilmiş normal DNA örneği (3.0 kb)
- B.** 1. kuyu: EcoR1 restriksiyon enzimiyle kesilmiş hasta DNA örneği (17 kb + yeni bant)
 2. kuyu: HindIII restriksiyon enzimiyle kesilmiş hasta DNA örneği (4.6 kb)
 3. kuyu: BglII restriksiyon enzimiyle kesilmiş hasta DNA örneği (4.8 kb + yeni bant)
 4. kuyu: BamH1 restriksiyon enzimiyle kesilmiş hasta DNA örneği (3.0 kb)

Bu şekilde sırasıyla EcoRI, Hind III, BglII ve Bam HI restriksiyon enzimleriyle kesim yapılmıştır. Buna göre 0.6 kb'lık proba yapılan hibridizasyon sonucunda her enzim için tek bant görülmektedir. Şekil II.6.B.'de ise aynı enzimlerle kesilmiş bir hasta DNA örneğinin profili görülmektedir. Şekil üzerinde EcoRI ve BglII enzimlerine ait kuyularda fazladan bir bantın varlığı, bir translokasyon olduğunu belirtmektedir. Bir başka deyişle, enzim kesimlerinde normal profile göre herhangi bir değişiklik DNA'da bir translokasyonun habercisi olmaktadır.

Şekil II.7 ve Şekil II.8'de değişik KML hastalarının DNA profilleri görülmektedir. Bunlardan Şekil II.7'de ilk hasta BamHI kesiminde, ikinci hasta EcoRI, BglII, Bam HI enzimleri ile yapılan kesimlerde normal bantların yanısıra farklı bantlar göstermektedir. Şekil II.8'de üçüncü hasta EcoRI ve BglII kesimlerinde, dördüncü hasta HindIII, BglII ve BamHI kesimlerinde, beşinci hasta ise EcoRI, BglII ve BamHI kesimlerinde farklı bantlar vermektedir. Bu sonuçlar Tablo II.2'de özetlenmiştir. Tablo II.2'deki (+) işaretler adı geçen restriksiyon enzimin kesim bölgesinde normal DNA'ya göre değişimin varlığını, (-) işaretler ise böyle bir değişikliğin bulunmadığını göstermektedir. Hastaların otoradyogram sonuçları Şekil II.9'da verilen 22. kromozomun restriksiyon enzim haritası yardımıyla yorumlanarak kırılma bölgeleri belirlenmiştir. Bu haritaya göre, tablonun son sütununda kırılmanın, restriksiyon haritasında belirtilen ve 0'dan 5'e kadar numaralandırılmış bölgelerden hangisi içinde olduğu belirtilmektedir. Tablo II.1'de 6, 7 ve 9 numara ile gösterilen hastalarda, bu prob ile (bcr-G) translokasyon belirten bir profile rastlanmamıştır. Bu hastaların DNA'ları normal görünümündedir.

II.2.4. Kandan RNA İzolasyonu ve PCR

Kandan elde edilen RNA'lar formaldehit içeren % 0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil II.10'da görülen bantlar RNA örneklerinin içerdiği mRNA, tRNA ve ribosomal RNA'lardan, hücrede en çok kopyaya sahip 18 S ve 28 S



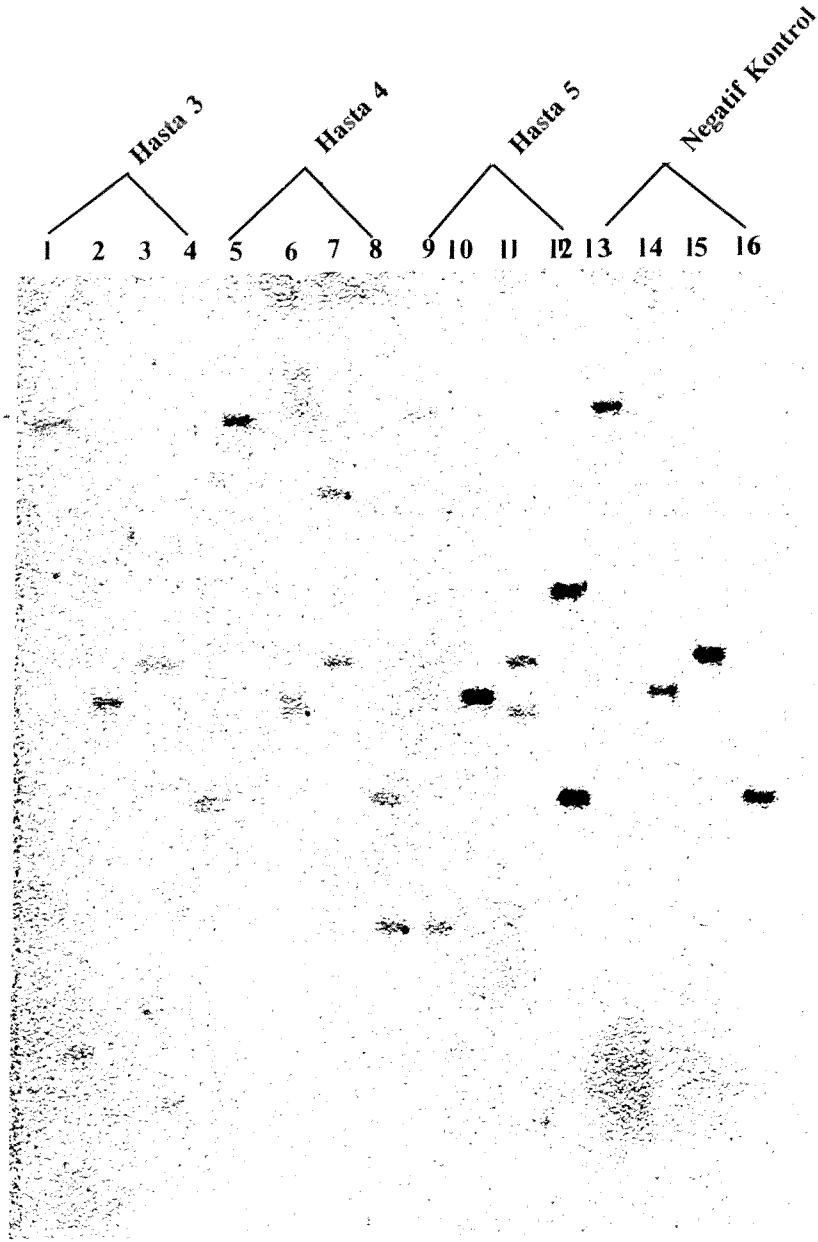
Şekil II. 7. Otoradyogram örneği.

Kuyu 1-4: Sırasıyla EcoR1, HindIII, BglII ve BamHI ile kesilmiş 1. hastanın DNA bantları.

Kuyu 5-8: Sırasıyla EcoR1, HindIII, BglII ve BamHI ile kesilmiş 2. hastanın DNA bantları.

Kuyu 9-12: Sırasıyla EcoR1, HindIII, BglII ve BamHI ile kesilmiş Ph' (+) kontrol DNA bantları.

Kuyu 13-16: Sırasıyla EcoR1, HindIII, BglII ve BamHI ile kesilmiş Ph' (-) kontrol DNA bantları.



Şekil II. 8. Otoradyogram örneği.

Kuyu 1-4: Sırasıyla EcoR1, HindIII, BglII ve BamH1 ile kesilmiş 3. hastanın DNA bantları.

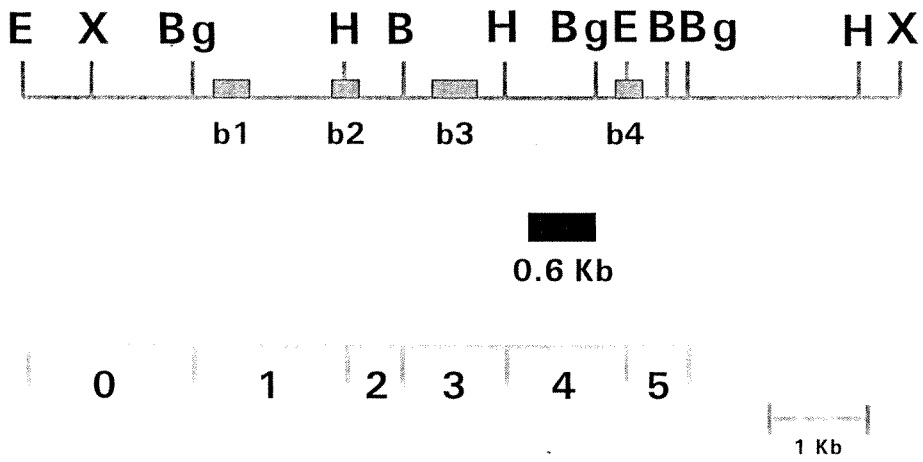
Kuyu 5-8: Sırasıyla EcoR1, HindIII, BglII ve BamH1 ile kesilmiş 4. hastanın DNA bantları.

Kuyu 9-12: Sırasıyla EcoR1, HindIII, BglII ve BamH1 ile kesilmiş 5. hastanın DNA bantları.

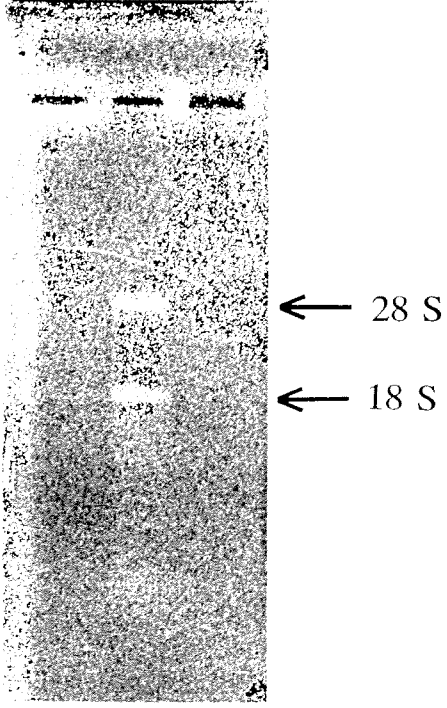
Kuyu 13-16: Sırasıyla EcoR1, HindIII, BglII ve BamH1 ile kesilmiş Ph' (-) kontrol DNA bantları.

Hasta No	Restriksiyon enzimleri				Translokasyon Bölgesi
	EcoRI	HindIII	BglII	BamHI	
1	-	-	-	+	5
2	+	-	+	+	3
3	+	-	+	-	1 veya 2
4	-	+	+	+	5
5	+	-	+	+	3
6	-	-		-	Yok
7	-	-		-	Yok
8	+	-		+	3
9	-	-		-	Yok
10	+	-		-	0 veya 1

Tablo II.2. KML hastalarının farklı restriksiyon enzimleri ile DNA kesim sonuçları



Şekil II.9. 22. kromozomun restriksiyon enzimleriyle kesim haritası ve 6 kırılma bölgesi

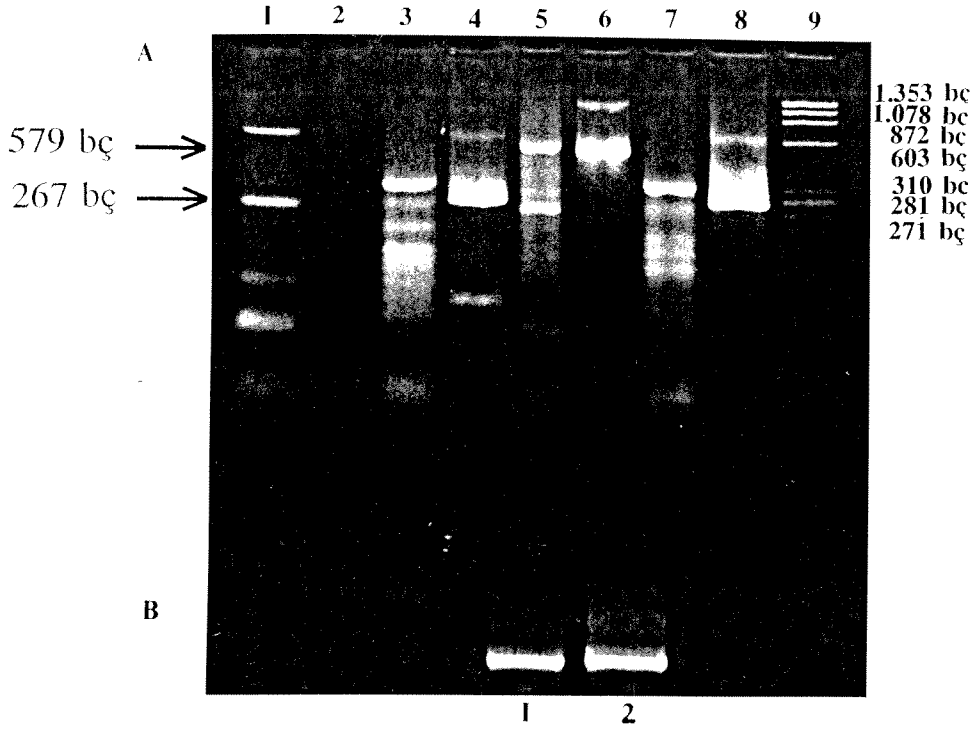


Şekil II.10. KML hastalarının kanlarından elde edilen RNA'ların agaroz jeli üzerindeki profili

ribosomal RNA'nın oluşturduğu bantlardır. mRNA'lar hem kopya sayısı hem de miktar bakımından farklılık gösterdiğinden jel üzerine gözle görülemeyecek şekilde yayılmışlardır. RNA örneklerinde var olan ancak agaroz elektroforezinde görüntülenemeyen mRNA örnekleri ters transkripsiyon yöntemi ile önce cDNA'ya dönüştürülmüştür (Bölüm II.1.14). Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile bu cDNA'lar milyonlarca kez çoğaltılmıştır (Bölüm II.1.15).

PCR'in ikinci basamağında elde edilen translokasyon ve normal gen ürünleri agaroz elektroforezi sonucu farklı profiller göstermektedir. Şekil II.11.A'da 2. kuyu, bcr/abl primerleri ile çoğaltılan örneğin translokasyon olmadığından herhangi bir ürün vermediğini göstermektedir. Ancak, aynı primerlerle çoğaltılan hasta DNA'sı 579 baz çifti (bç) uzunluğunda bir bant vermektedir (6. kuyu). 4. ve 8. kuyularda ise hem hasta hem de normal DNA örneklerinin abl/abl primerleriyle çoğaltıldığında, 267 bç uzunluğunda verdiği bant görülmektedir.

mRNA'da cDNA sentezi ve PCR reaksiyonunun çalışıp çalışmadığını kontrol amacı ile β -actin geni de aynı koşullarda uygun primerler yardımıyla çoğaltılmıştır (Şekil II.11.B).



Şekil II.11 Normal ve hasta kanlarından yapılan PCR sonuçları

- A.** 1. kuyu: Normal DNA'dan bcr/abl primeri ile çoğaltılmış PCR (1. basamak ürünü)
 2. kuyu: Normal DNA'dan bcr/abl primeri ile çoğaltılmış PCR (2. basamak ürünü)
 3. kuyu: Normal DNA'dan abl/abl primeri ile çoğaltılmış PCR (1. basamak ürünü)
 4. kuyu: Normal DNA'dan abl/abl primeri ile çoğaltılmış PCR (2. basamak ürünü)
 5. kuyu: Hasta DNA'sından bcr/abl primeri ile çoğaltılmış PCR (1. basamak ürünü)
 6. kuyu: Hasta DNA'sından bcr/abl primeri ile çoğaltılmış PCR (2. basamak ürünü)
 7. kuyu: Hasta DNA'sından abl/abl primeri ile çoğaltılmış PCR (1. basamak ürünü)
 8. kuyu: Hasta DNA'sından abl/abl primeri ile çoğaltılmış PCR (2. basamak ürünü)
 9. kuyu: Φ X174/Hae III marker DNA
- B.** 1. kuyu: Normal DNA'dan β -actin primeri kullanılarak çoğaltılmış PCR ürünü
 2. kuyu: Hasta DNA'dan β -actin primeri kullanılarak çoğaltılmış PCR ürünü

BÖLÜM III

SONUÇ

III.1. TARTIŞMA

Bu projede, Southern Blot ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemleri kullanılarak Kronik Myeloid Lösemili hastaların moleküler tanısı ve tedavi sonrası takibi amaçlanmıştır. Her iki yöntem de son on yıldır dünyadaki birçok araştırma merkezinde gerek kalıtsal metabolik hastalıklar, gerekse kanser için rutin olarak kullanılmaktadır. Bu tür çalışmaların ülkemizde de başlatılarak gerekli altyapının oluşturulması büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda ilk olarak Kronik Myeloid Lösemi'li hastaların kanlarından DNA izolasyonu yapılmış ve DNA'ların saflıkları spektrofotometrik olarak OD_{260}/OD_{280} oranına bakılarak saptanmıştır. DNA saf olduğu zaman bu oranın yaklaşık 1.8 olması beklenmektedir (Maniatis, 1989). Oranın 1.8'den küçük oluşu protein kirliliğine, büyük oluşu ise fenol veya RNA kirliliğine işaret etmektedir.

Uygulanan DNA izolasyon yöntemi normal kan örnekleri ile oldukça saf DNA elde edilmesini sağlarken, hasta kan örneklerine uygulandığında her zaman aynı derecede başarılı olamamıştır. Özellikle bazı hastalardan hiç DNA elde edilememesi bu hastalara uygulanan kemoterapi ile ilgili olabilir. İlginç bir bulgu da interferon tedavisi gördüğü bilinen hastaların DNA izolasyonları sırasında karşılaşılan güçlüklerdir. Bu tür hastaların kanlarında fenol ekstraksiyonu yapıldığında, fenol fazı ile su fazının ayrılamaması nedeniyle DNA içerisinde yüksek oranda protein kalabileceği gözlenmiştir. Protein kirliliği belirlenenen bu gibi durumlarda örnekler etil alkolde çöktürülerek ek fenol yıkamaları yapılmıştır. Bazı örneklerde ise yıkamalara rağmen OD_{260}/OD_{280} oranı istenilen düzeye gelmemiş ve bu nedenle bu örnekler analizlerde kullanılamamıştır.

DNA analizleri için restriksiyon enzimlerinin kullanılması gereklidir. Hangi restriksiyon enzimleri ile kesim yapılacağı ise kullanılacak proba bağlıdır. 0.6 kb'lik bcr-G probu kullanıldığında EcoRI, HindIII, BglIII, BamHI enzimleri ile M-bcr bölgesindeki hemen hemen bütün kırılmalar saptanabilmektedir. Bu nedenle hasta DNA'larının hepsi 3 ya da 4 ayrı enzim kullanılarak kesilmiş ve bcr-G probu ile hibridize edilerek translokasyon bölgesi detaylı bir şekilde belirlenmiştir.

Southern Blot yönteminin uygulanışı sırasında vakum blot cihazının DNA'ların jelden filitrelelere aktarımını hızlandırdığı, fakat bazı hallerde filitrenin her tarafına eşit ve homojen bir aktarım olmadığı gözlenmiştir. Daha verimli bir transfer elde edilebilmesi için çoğu zaman klasik Southern Blot düzeneği kullanılmıştır. Ayrıca bu yöntemde yapılan bir değişiklik kullanılan malzemeden tasarruf imkanı vermiştir. Bilindiği gibi klasik blot gerçekleştirilirken transfer tamponu kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise hiç tampon kullanılmadan da DNA'ların jelden filtreye verimli bir şekilde aktarıldığı gösterilmiş ve SSC tamponundan büyük ölçüde ekonomi sağlanmıştır.

Prob DNA'larının izolasyonu sırasında plazmitler alkali liziz yöntemi ile elde edildikten sonra etil alkol ve 2M NaCl ile çöktürülmektedir (Bölüm II.1.7). Yöntemler kısmında da belirtildiği gibi daha sonra plazmit vektörü içindeki prob, restriksiyon enzimi ile kesilerek plazmitten çıkartılmaktadır. Bazı durumlarda elde edilen plazmitlerin restriksiyon enzimiyle kesilemeyen bir konformasyon kazandığı gözlenmiştir. Bu değişik konformasyondaki plazmit, agaroz jelde değişik bir bant vermekte ve restriksiyon enzimine dayanıklılık göstermektedir. Plazmitlerin etil alkol ile çöktürülme aşamasında 2M NaCl kullanılmadığı zaman bu problem ortadan kalkmıştır.

Aynı yöntemle hazırlanan iki ayrı prob, radyoaktif işaretleme verimi

açısından büyük farklılık göstermiştir. 1.2 kb'lik 3'-bcr probu işaretlendiğinde verim %40 iken 0.6 kb'lik bcr-G probunda verim % 70-80 olmuştur. Bu nedenle bcr-G probu çalışmalarda daha sıklıkla kullanılmıştır.

İşaretlenen problarla hibridizasyon yapılırken normalde izlenen yöntemde bazı değişiklikler yapılmıştır. Örneğin, Bovine serum albumin, Ficoll ve Dekstran Sulfattan oluşan tamponun Hybond N⁺ filitreleri üzerinde çökelerek, otoradyogramlarda kirliliğe neden olduğu anlaşılmış ve yöntemlerde belirtilen değişik bir tampon kullanılmıştır. Ayrıca bu tamponlara genelde eklenecek salmon sperm DNA'sının gerekli olmadığı da belirlenmiştir. Bu değişiklikler aynı zamanda bol miktarda gereken bu tamponların daha ekonomik olarak hazırlanmalarını mümkün kılmıştır.

Yöntemlerde belirtildiği gibi RT-PCR için kandan RNA izolasyonu gerekmektedir. RNA izolasyonunun, DNA izolasyonuna göre çok daha dikkat ve özen gösterilmesi gereken bir işlem olduğunu burada belirtmek gerekir. RNA, ribonükleazlara çok hassas ve kırılabilir bir yapıdadır. RNA çalışmaları sırasında nükleaz kirliliği yapabilecek kaynaklardan uzak durulması, tüm cam eşya ve tamponların nükleaz inhibitörü DEPC (Diethyl pirokarbonat) ile muamele edilmesi, ve kısa sürede (3-4 saat) izolasyonun tamamlanması gereklidir. Ayrıca RNA'nın ancak taze kan örneklerinden elde edilebildiği anlaşılmıştır. Bu nedenle hasta kanı alınır alınmaz bir kısmı DNA izolasyonu için dondurularak saklanırken, kalan kısımdan hemen RNA izolasyonu yapılmıştır. Kanın kısa bir süre için bile bekletilmesi RNA'da kırıklara neden olmaktadır.

RNA izolasyonu sırasında guanidinyum tiosiyanat, cDNA sentezi sırasında ise RNasin enzimi ile ribonükleazların büyük ölçüde etkisiz kılınması mümkün olmaktadır.

Otoradyogramların incelenmesi sonucu KML'li hastaların çoğunda translokasyona rastlanmıştır (Tablo II.2). Birkaç hastada translokasyon görülmeysi değişik nedenlere bağılı olabilir. Daha önce de bahsedildiğı gibi eğer hastada 100 myeloid hücreden 5 veya daha az sayıdaki hücre translokasyon taşıyorsa, Southern Blot yöntemi bu translokasyonları belirlemede yetersiz kalacaktır. Bu tür hastaların incelenmesinde PCR yöntemi çok yararlıdır. Örneğın, erken tanı ve düzenli interferon tedavisi sonucu klinik olarak remisyonda görünen bir hastada Southern Blot yöntemi ile belirlenemeyen translokasyonun varlığı, RT-PCR yöntemi ile gösterilebilmiştir. Ancak elde edilen PCR ürününün miktarı diğer hastalara nazaran daha düşük düzeyde bulunmuştur. Translokasyonun belirlenememesinin diğer bir nedeni de kırık bölgenin bcr-G probu ile gösterilemeyeysi olabilir. Eğer kırık, 22. kromozomun restriksiyon enzim haritasında gösterilen (Şekil II.9) 0-5 arasındaki herhangi bir bölgede değilse 0.6 kb'lik prob yetersiz kalacaktır. Düşük bir olasılıkla da olsa (%5) bazı KML'li hastalarda kırık, major kırılma bölgesi dışında yer alabilmektedir (Grossman, 1989).

Çalışmamızda incelenen hasta sayısının az olması nedeni ile Türkiye'deki KML'li hastalarda kırılmaların yoğunlaştığı bölgeler hakkında bilgi edinebilmek mümkün değildir. Epigenetik faktörlerin kırılma bölgeleri ile olası ilişkileri araştırmacılar tarafından farklı toplumlarda incelenmiştir (Morris, 1986; Morris, 1990; Dyck, 1989).

Araştırmamızda yer alan hastalardan hemen hepsinin busulfan veya interferon α gibi sitotoksik ilaçlar ve bunlara ek olarak radyoterapi almış olmaları nedeni ile hastaların tanı safhasındaki durumları moleküler düzeyde incelenememiştir. Bu nedenle hastalığın patogenezi hakkında bir sonuç çıkarmak mümkün olamamıştır. Literatürde kombine terapi olarak geçen ve kemoterapinin yanısıra kemik iliğı nakli (BMT) yapılan kişilerde hastalığın tedavi sonrası takibi hem Southern Blot hem de

RT-PCR yöntemleri yapılarak rapor edilmiştir (Gabert, 1989; Roth, 1989; Hughes, 1991; Lange, 1991). Lange ve arkadaşları tarafından 28 KML hastası üzerinde kemik iliği nakli öncesinde ve sonrasında yapılmış olan araştırmalar, hastalığın kronik fazında nakil uygulandığı zaman bcr/abl mRNA'sının giderek azaldığını göstermiştir. Akut dönemde kemik iliği nakli yapılan iki hastanın kanlarında ise naklin 2-3. ayında bcr/abl mRNA'larını içeren hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Gabert ve arkadaşlarının (1989) bir grup KML hastasında yaptıkları benzeri çalışmalar kemik iliği nakline rağmen bcr/abl translokasyonu taşıyan hücrelerin çok çok az sayıda da olsa hastada tamamen ortadan kalkmadığını göstermiştir. Aslında lösemili hücrelerin hastada tamamen ortadan kaybolmasının uzun süreli bir iyileşme işareti olup olmadığı da henüz açıklık kazanmış değildir. Bazı araştırmacılar translokasyon bölgesinin yeri ile hastalığın prognozu (hastalığın evresi, kronik fazın süresi ve yaşam süresi) arasında ilişki kurmaya çalışmışlardır. Bu konuda birbiriyle çelişkili bulgular ortaya atılmıştır. Opalka ve arkadaşlarınca (1991) interferon tedavisi görmekte olan 61 KML hastasında yapılan çalışmalar kırılmaların prognostik önem taşımadığını göstermiştir. Diğer taraftan kırılma bölgesi bcr geninin 2. veya 3. ekzonundan olduğunda hastalığın farklı prognoz gösterdiğini ileri süren araştırmacılar da vardır (Mills, 1991). Fioretos ve arkadaşlarına göre (1993), eğer translokasyon M-bcr bölgesinin ucunda ise mutlaka 3. ekzonu da içermektedir. Fakat 133 hasta üzerinde yaptıkları çalışmalarda 3. ekzonun varlığı veya yokluğu ile çeşitli parametreler (kronik faz süresi vb.) arasında bir bağlantı gösterilememiştir. Bu çalışmadaki PCR verileri ise Türk hastaları için yukarıda belirtilen türde bir sonuca varmak için yeterli değildir.

III.2. ÖNERİLER

Aşağıdaki konularda daha kesin sonuçların çıkarılabilmesi için çok daha fazla sayıda hastayı kapsayacak ayrıntılı bir çalışmaya gereksinim vardır:

i) KML'de kırılma bölgeleri ile hastalığın prognozu arasındaki ilişkinin

belirlenmesi.

ii) KML'de Türk popülasyonuna özgün kırılma bölgelerinin belirlenmesi.

iii) Farklı kırılma bölgeleri ile özel tedavi şekillerine cevap verme arasındaki ilişkinin belirlenmesi.

Bundan sonraki çalışmalarda farklı problemler kullanılarak M-bcr bölgelerinin dışındaki kırılma bölgelerinin de incelenmesi daha geniş bilgi imkanı sağlayacaktır. Ayrıca KML dışında hematolojik kanserlere neden olan diğer translokasyonların da incelenmesi son derece yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Bartram C.R., de Klein A. et al., Translocation of the c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia Chromosome in Chronic Myelocytic Leukemia, Nature, 306, 277, (1983).
- Birnboim H.C., A rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA, Nucl. Acids. Res., 7, 1513-1522, (1979).
- Birnboim H.C., Rapid Alkaline Extraction method for the isolation of plasmid DNA, Meth., Enzymol, 100, 243-255, (1983).
- Bishop M.J., Cellular Oncogenes and Retroviruses, Ann Rew. of Biochem, 52, 301-54, (1983).
- Bishop M.J., The Molecular Genetics of Cancer, Science, 235, 305-11, (1987).
- Bloomfield C.D., The Philadelphia chromosome in adults representing with ALL a comparison al Ph⁺ and Ph⁻ - patients, Br. J. Haematol, 36, 347-358, (1977).
- Cannistra S.A., Chronic Myelogenous Leukemia as a Model for the Genetic Basis of Cancer, Chronic Leukemias, 4, 2, 337-56, (1990).
- Chomczynski P., Sacchi N., Single-Step method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate Phenol-Chloroform Extraction, Anal. Biochem, 162, 156-59, (1987).
- Clark S.S., Mchauplin J. Timmons M., et al. Expression of a Distractive bcr/abl Oncogene in Ph'-Positive ALL, Science, 239, 775-77, (1988).
- Crist W., Carroll A., Schuster J., Jackson J., Head D., Borowitz M., Behm F., Link M., Stenber P., Rapab A., Hirt A., Broch B., Lond V., Pullen J., Philadelphia Chromosome Positive Childhood ALL: Clinical and Cytogenetic Characteristics and Treatment Outcome. A pediatric Oncology Group Study, Blood, 76; 489-94, (1990).
- Cuheo A., Fapioli F., Pazzi I., et al. Morphologic, Immunologic and Cytogenetic Studies in Acute Myeloid Leukemia Following Occupational Exposure to

- Resticides and Organic Solvents, Leukemia Res., 16: 8, 789-96, (1992).
- Dobrovic A., Trainor K., Morley A.A., Detection of Molecular Abnormality in CML by use of the PCR, Blood, 72: 6, 2063-65, (1988).
- Dobrovic A., Morley A.A., Seshadri R., Januszewicz E.H. Molecular Diagnosis of Philadelphia Negative CML Using PCR and DNA Analysis, Leukemia, 5:3, 187-90, (1991).
- Dyck J.A., Bosco J.J. Clinical Stage of CGL and bcr breakpoint localization in South-east Asian Patients Br. J. Haematol, 72: 64-67 (1989).
- Elrich A.H., Recent Advances in PCR, Science, 252, 1643-1651, (1991).
- Fioretos T., Nilsson P.G., Amon P., et al., Clinical Impact of Breakpoint Position within M-bcr in CML, Leukemia, 7: 8, 1225-31, (1993).
- Gabert J., Lafage M., et al. Detection of residual bcr/abl translocation by PCR in CML after BMT Cancer, 2: 1125-28, (1989).
- Gale R.P., A 8 kb Abl RNA transcript in CML, PNAS, 81, 5648-5642, (1984).
- Gale R.P., Grosveld G., Canoani E., Goldman J.M., Chronic Myelogenous Leukemia; Biology and Therapy, Leukemia, 7: 4, 653-58 (1993).
- Gale R.P., The Molecular Biology of Chronic Myelogenous Leukemia, British J. Haematol, 60, 395-408, (1985).
- Gehly B.G., Chimeric Bcr-abl mRNA as a marker for minimal residual disease in patients transplanted for Ph chromosome positive ALL, Blood, 78, 458-465, (1991).
- Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G., Philadelphia Chromosome Breakpoints are clustered within a Limited Region, bcr, on Chromosome 22, Cell, 36: 93-99, (1984).
- Grossman A., Silver R.T., Arlin Z. et al., Fine mapping of chromosome 22 breakpoints within the bcr region implies a role for bcr exon 3 in determining disease duration in CML, Am. J. Hum Genet., 45: 729-38, (1989).
- Heisterkamp N., Stephenson J.R., Goffen J. et al., Localization of the c-abl

- Oncogene adjacent to a translocation breakpoint in CML, Nature, 306,239, (1985).
- Heisterkamp N., Stom K., Groffen J., et al., Structural Organization of the bcr Gene and its Role in the Ph' translocation, Nature, 315, 758, (1990).
- Hughes T.P., Biological importance of residual leukemic cells after BMT for CML, Bone Marrow Transplant, 5, (1990).
- Hughes T.P., Morgan G.J., Martiat P., Goldman J.M., Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation for CML, Blood, 77: 875-78, (1991).
- Kawasaki E.S., Clork S.S., Coyne M.Y., et al. Diagnosis of Chronic Myeloid and Acute Lymphocytic Leukemias by Detection of Leukemia-Specific mRNA Sequences Amplified in Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5698-5702, (1988).
- Kloetzer W., Kurczrock R., Smith L., Talpaz M., Spiller M., Gutterman J., Arlinghaus R., The Human Cellular abl gene Product in the Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line K562 has an Associated Tyrosine Protein Kinase Activity, Virology, 140, 230, (1985).
- Konopka J.B., Watanabe S.M., Witte O.N., An alteration of the Human c-abl Protein in K562 leukemia Cells unmasks associated Tyrosine Kinase Activity, Cell, 37, 1035, (1984).
- Konopka J.B., Witte O.N., Detection of c-abl Tyrosine Kinase Activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products, Mol Cell Biol, 5, 3116, (1988).
- Kurzrock R., Kloetzer W.S., Talpaz M., Blick M., Walters R., Arlinghaus R.B., and Gutterman J.U., Identification of Molecular Variants of p210 bcr-abl in CML, Blood, 70; 1, 233-36, (1987).
- Kurzrock R., Gutterman J.U., Talpaz M., The Molecular Genetics of Philadelphia Chromosome - positive leukemias, New Engl J. Med., 319, 990, (1988).

- Lai L.J., CML wit unusual variant Ph translokasyon, Cancer Genet Cytogenet, 48, 200-216, (1990).
- Lange W., Snyder D.S., Castro R., Rossi J.J., Blume K.G., Detection by enzymatic amplification of bcr/abl mRNA in peripheral blood and Bone marrow cells of patients with CML, Blood, 73: 1735-41, (1991).
- Larson R.A., Kondo K., Varminal J.V., et al. Every Patient with APL may have a 15:17 translocation, Am. J. Med., 76: 827-41, (1984).
- Lion, T, Izraelli S, Henn T, et al., Monitoring Residual Disease in CML by Quantitative PCR Leukemia, 6,6, 495-99, (1992).
- Maniatis T., Firsch E.F., Sambrook J., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).
- Masson A.M., Role of oncogenes in CML, Adv. in Cancer Res., 49, 53-74, (1988).
- Maxwell S.A., Kurzrock R., et al., Analysis of p210^{bcr-abl} tyrosine protein kinase activity in various subtyzen of Philadelphia Chromosome positive cells from Chronic Myelogenous Leukemia Patients, Cancer Res, 47, 1731, (1987).
- Meriah B., The CML specific p210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene, science, 233, 212-214, (1986).
- Mills K.I., Ben P., Birnie G.D., Does the breakpoint within the breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? An analytical comparison of current literature, Blood, 78: 1155-61, (1991).
- Morgan G.J., PLR for Detection of Residual Leukemia, The Lancet, 928-930, 1989.
- Morris C.M., Reeve A.E, et al., Genomic diversity correlates with clinical varriation in Ph'(-) CML, Nature, 320, 281-83, (1989).
- Morris S.W., Daniel L., Ahmed C.M.I., Elias A., Lebowitz P., Relationship of bcr breakpoint to chronic phase duration, survival and blost crisis lineage in CML patients in early chronic phase Blood, 75: 2035-41, (1990).
- Nowell P.C., Hungerford D.A., A Minute Chromosome in Human Granulocytic

- Leukemia, Science, 132, 1497, (1960).
- Nowell P.C., Jackson L., Weiss A., Kurzrock R., Historical Communication: Philadelphia-positive Chronic Myelogenous Leukemia Followed for 27 Years, Cancer Genet. Cytogenet., 34, 57-61, (1988).
- Opalka B., Wandl U., Beer U., Roggenbuck U., Kloke O., Niedeke N., Breakpoint Localization within the M-bcr and the clinical course do not correlate in patients with CML undergoing alpha interferon therapy, leukemia, 5: 452-56, (1991).
- Prakash O., Yunis J.J., High Resolution Chromosomes of the t(9;22) positive Leukemias, Cancer Genetics and Cytogenetics, 11, 361-67, (1984).
- Ribeiro R.C., Abromowitch M., Raimondi S.C., Murphy S.B., Behm F., Williams D.L., Clinical and Biological Hallmarks of the Ph' Chromosome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blood, 70: 948-53, (1987).
- Roth M.S., Antin J.H., Bingham E.L, Ginsburg D., Detection of Ph' chromosome (+) cells by PCR following BMT for CML, Blood, 74, 882-85, (1989)
- Rowley J.D., A new Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukemia Identified by quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining, Nature, 243, 290-303, (1973).
- Rowley J.D., Testa J.R., Chromosomal Abnormalities in Malignant Hematologic Diseases, Adv. in Can. Res., 36, 103-148, (1982).
- Rowley J.D., Chromosome abnormalities in leukemia, J.Chin. Oncol., 6, 194-202, (1988).
- Sandberg A.A., The chromosomes in human leukemia, Semin. Hematology, 23, 201-207, (1986).
- Saglio, G, Guernasio A, Rosso, C et al., New type of bcr/abl Junction in Ph' Chromosome-Positive CML, Blood, 76, 9, 1819-24, (1990).
- Secker-Walker L.M., Ph⁺ ALL in adults age distribution, bcr breakpoint and prognostic significance, Leukemia, 5, 196-199,

- Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R.P., Canoani E., Fused transcript of abl and bcr genes in Chronic Myelogenous leukemia, Nature, 315, 550, (1985).
- Shtivelman E., bcr-abl RNA in patients with CML, Blood, 69, (1987).
- Stam K, Heisterkamp N, Grosveld G, Deklein A, Verma RS, Colemon M, Dosik H, Groffen J, Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with Chronic Myelocytic Leukemia and the Philadelphia Chromosome, New Engl J. Med., 313, 1429, (1985).
- Thomas N.R., Koshy S., Şimşek M., Abraham A.K., A Precaution When Preparing Very Large Plasmid by Alkaline Lysis Procedure, Biotech App. Biochem., 10, 402-407, (1988).
- Vander Plas D.C., bcr-abl mRNA lacking abl Exon A2 detected by PCR in CML, Leukemia, 5, 457-461, (1991).
- Wisniewski D., Co-detection of Chimeric bcr/abl and β -actin messenger RNA in Individual CFU-GM Colonies Derived from CML Patients Using PCR, Leukemia Research, 5, 867-874, (1991).

Proje ile İlgili Tebliğlerle İlgili Bilgiler:

1) Yurtiçi Tebliğ:

- Eren, E., Aytaç, U. ve Gündüz, U., "Radyoaktif Problar ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ile Onkogen Mutasyonların Moleküler Düzeyde Tanısı" (1. Ulusal Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, Eylül 1994, Ankara) Poster Özetleri, 34.
- Aytaç, U., Eren, E., Kansu, E., Özgüç, M. and Gündüz U., "Detection of Human Oncogenes by Molecular Biology Techniques" (8. KÜKEM Kongresi, Ekim 1993, Ankara) KÜKEM Dergisi, 16: 2,3.
- Eren, E., Aytaç, U., Kansu, E. and Gündüz, U., "Detection of DNA Abnormalities in CML Patents by Molecular Biology Methods (2. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Eylül 1992, Ankara) Poster Özetleri, 1,71.

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
1- Proje No: DPT/TBAG-3	2- Rapor Tarihi: 30.10.1994
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.7.1992 - 1.7.1994	
4- Projenin Adı: Biyoteknolojik Yöntemlerle Kanser Hastalığının DNA Düzeyinde İncelenmesi.	
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ Arş.Gör. Emel EREN Arş. Gör. Uğur AYTAÇ	
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü 06531, Ankara	
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK- Temel Bilimler Araştırma Grubu	
8- Öz (Abstract): Kanser gen düzeyindeki değişikliklerden kaynaklandığı, özellikle hücre bölünmesini ve farklılaşmasını etkileyen genlerde mutasyon sonucunda meydana gelen değişikliklerin kanser oluşumunda temel neden olduğu bugün artık bilinmektedir. Proto-onkogen adı verilen bazı genlerin nokta mutasyonlar, kırılmalar, amplifikasyonlar ve translokasyonlar sonucu aktif şekle geçerek onkogenlere dönüştüğü belirlenmiştir. Kronik Myeloid Lösemisinin de 9. ve 22. kromozomlar arasında karşılıklı bir translokasyon sonucu yer değiştiren abl onkogeninin aktivasyonu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Çalışmada kML hastalarında görülen 9. ve 22 kromozomlar arasındaki translokasyon Southern Blot yöntemi ve PCR yöntemi kullanılarak DNA düzeyinde incelenmiştir.	
Kronik Myeloid Lösemi, Philadelphia kromozomu, Translokasyon, Anahtar Kelimeler: Southern Blot, Polimeraz Zincir Reaksiyonu.	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler Ekte sunulmaktadır.	
10- Bilim Dalı: 401 02 02 Doçentlik B. Dalı Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu:	ISIC Kodu:
11- Dağıtım (*): <input type="checkbox"/> Sınırlı	<input checked="" type="checkbox"/> Sınırsız
12- Raporun Gizlilik Durumu :	<input type="checkbox"/> Gizli <input checked="" type="checkbox"/> Gizli Değil

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz