

616-006.446.8:577.217.54

1997-851

G 975 k



TÜBİTAK

MFN: 5973

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

1997-851
TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

Proje No: TAG-0760

Tip Araştırma Grubu

Medical Sciences Research Grant Committee

616-006.446,8:577.217.534

G 975 k

KRONİK MYELOİD LÖSEMİLİ HASTALARDA DNA'DAKİ bcr/abl TRANSLOKASYONUNUN GÖSTERİLMESİ

80p's Temmuz - 1995

1997-851

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

Proje No: TAG-0760

Proje Yürütücüsü
Araştırmacılar

: Prof.Dr. Ufuk Gündüz
: Araş.Gör. Emel Eren
: Araş.Gör. Uğur Aytaç

19764

ŞUBAT 1995

Ankara

ODTÜ.
Biyoloji Bölümü

Sayı - 57

Ref - ~~57~~ 60

ÖNSÖZ

Bu rapor Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan TAG-0760 sayılı projenin yürütülmesi sırasında elde edilmiş bilgi ve sonuçları içermektedir.

Çalışmaları oluşturan deneylerin tümü Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

i

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Tıp Araştırma Grubu'na destek ve yardımlarından dolayı şükranlarımızı sunarız.

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

Çalışmamızda Kronik Myeloid Lösemi'de kromozomlar arası kırılma ve yer değiştirmenin moleküler düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma moleküler biyoloji ve moleküler onkoloji çalışmalarında önemli yarar sağlayacak alt yapı ve birikimin oluşmasına da olanak sağlamıştır.

ÖZ

Kanserin DNA düzeyinde moleküler değişikliklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Gerek nokta mutasyonları, gerekse kromozomlardaki kırılma, amplifikasyon ve translokasyonlar protoonkogenleri aktive ederek onkogenleri oluşturmakta ve kansere neden olmaktadır. Kronik Myeloid Lösemili (KML) hastaların %90'ında görülen Philadelphia kromozomu (Ph') DNA'daki özel bir translokasyonun sonucudur. 9. ve 22. kromozomlar arasında oluşan bu translokasyon, c-abl protoonkogenini 22. kromozomun bcr denilen bölgesine taşıyarak "bcr-abl" adı verilen hibrit bir gen meydana getirmektedir. Bu hibrit genin, yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahip bir protein kodladığı bilinmektedir. Bu çalışmada, KML'nin patogeneğinde çok önem taşıyan değişikliklerin moleküler biyoloji teknikleri uygulanarak tanımlanması amaçlanmıştır. Klinik tanısı konulmuş KML'li hasta kanlarından yapılan DNA izolasyonundan sonra bu DNA'lar radyoaktif olarak işaretlenmiş prob DNA'lar ile hibridizasyona sokularak (Southern blot yöntemi) bcr/abl translokasyonunun 22. kromozomdaki kırılma bölgeleri belirlenmiştir.

DNA'daki translokasyonların varlığı ve yerinin saptanmasında kullanılan Southern blot yöntemi, KML tanı ve tedavi takibinde hassas ve güvenilir bir yöntem olduğu gibi, özel translokasyon gösteren diğer kanserlerde de yararlı olacak bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Philadelphia Kromozomu, Kronik Myeloid Lösemi, Translokasyon, Southern Blot Yöntemi,

ABSTRACT

It is well known that cancer results from molecular changes at the DNA level. Mutations such as point mutations, amplification, and translocations activate protooncogenes, thus cause transformation of the normal cells.

Philadelphia chromosome (Ph'), which is an important hallmark for Chronic Myeloid Leukemia, results from a specific translocation. The translocation between chromosomes 9 and 22 moves the c-abl protooncogene from its normal location on chromosome 9 to the bcr region of chromosome 22, leading to a hybrid bcr/abl gene. The bcr/abl gene produces a hybrid protein with a high tyrosine kinase activity. The aim of this project, was to detect Ph' translocation in CML patient using molecular biology techniques. DNA isolation from CML patients was followed by Southern blot hybridization by using specific prob DNAs. This method is a very sensitive and efficient approach, for the detection and localization of the translocation in CML patients and is also applicable to the detection of other human malignancies having similar DNA translocations.

Key Words: Philadelphia Chromosome, Chronic Myeloid Leukemia, Translocation, Southern blot method

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
TABLoların LİSTESİ	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	vii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GELİŞME	14
II.1. Materyal ve Metod	14
II.1.1. Kan Örnekleri	14
II.1.2. Kimyasal Malzemeler	14
II.1.3. Kandan DNA İzolasyonu	14
II.1.4. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	15
II.1.5. DNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi	15
II.1.6. Southern Blot Yöntemi	16
II.1.7. Prob DNA'si	16
II.1.8. Alkali Liziz Yöntemi ve Prob DNA'sının Hazırlanması	18
II.1.9. Prob DNA'sının Plazmitten Restriksiyon Enzimleri ile Çıkarılması	19
II.1.10. Prob DNA'nın Radyoaktif Olarak İşaretlenmesi	20
II.1.11. Ön Hibridizasyon ve Hibridizasyon	21
II.1.12. Otoradyografi	21
II.2. Bulgular	22
II.2.1. Kandan DNA İzolasyonu	22
II.2.2. DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kesim Koşulları	22
II.2.3. Prob DNA'sının Seçilmesi	26
II.2.4. Prob DNA'nın Plazmitten Çıkarılması	28
II.2.5. Prob DNA'nın Agaroz'dan Temizlenmesi	33
II.2.6. Prob DNA'ların Radyoaktif Olarak İşaretlenmesi	35
II.2.7. Southern Blot Analizi ve Otoradyogram	35
II.2.8. KML Hastalarının Klinik ve Moleküler Bulgularının Karşılaştırılması	38
BÖLÜM III SONUÇ	44
III.1. Tartışma	44
III.2. Öneriler	49
KAYNAKLAR	51
BİBLİYOGRAFİK BİLGİ	57

TABLolarIN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo I.1. Translokasyona bağlı olarak ortaya çıkan kanser türleri	2
Tablo II.1. KML hastalarından elde edilen DNA'ların konsantrasyonları	23
Tablo II.2. Çalışmada kullanılmış olan prob DNA'lar ve zellikleri	27
Tablo II.3. Sitogenetik tanı konulan KML hastalarının moleküler analiz sonuçları	37
Tablo II.4. KML hastalarının farklı restriksiyon enzimleri ile DNA kesim sonuçları ve translokasyon oluşum bölgeleri	42
Tablo II.5. KML'li hastaların sitogenetik ve moleküler tanı sonuçları	43

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil I.1. İnsan kromozomları üzerinde bugüne kadar tanımlanmış olan hücresel onkogenlerin haritası	3
Şekil I.2. KML'de görülen translokasyonun kromozom haritası	7
Şekil I.3. KML'de translokasyon bölgesin, kırılma haritaları ve oluşan hibrit genin mRNA'sı	9
Şekil I.4. bcr/abl hibrit genin mRNA'sı ve protein ürünü	11
Şekil I.5. Southern blot yöntemi	12
Şekil II.1. Hoefer Transvac Vakum Blot Cihazı	17
Şekil II.2. A. Hasta DNA örneğinin restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçları (Kesim koşulları optimize edilmeden önce)	24
B. Hasta DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçları (Kesim koşullarının optimizasyonundan sonra)	25
Şekil II.3. Çalışmada kullanılan plazmitlerin agaroz jeli üzerinde görülen profilleri	29
Şekil II.4. A. 5'-bcr prob DNA'sının plazmitten çıkartılması	30
Şekil II.4. B. pUC vektörü ve içerdiği 1.2 kb'lik prob DNA'sı	31
Şekil II.4. C. pUC vektörü ve içerdiği 0.6 kb'lik prob DNA'sı	32
Şekil II.5. Elde edilen plazmit DNA'sının Gene Clean kiti ile temizlenmesi	34
Şekil II.6. Değişik restriksiyon enzimleri ile kesilmiş normal ve hasta DNA örneklerinin otoradyogram sonuçları	36
Şekil II.7. 22. kromozomun restriksiyon haritası ve translokasyona giren kırılma bölgeleri	39
Şekil II.8. Otoradyogram örneği	40
Şekil II.9. Otoradyogram örneği	41

BÖLÜM I

GİRİŞ

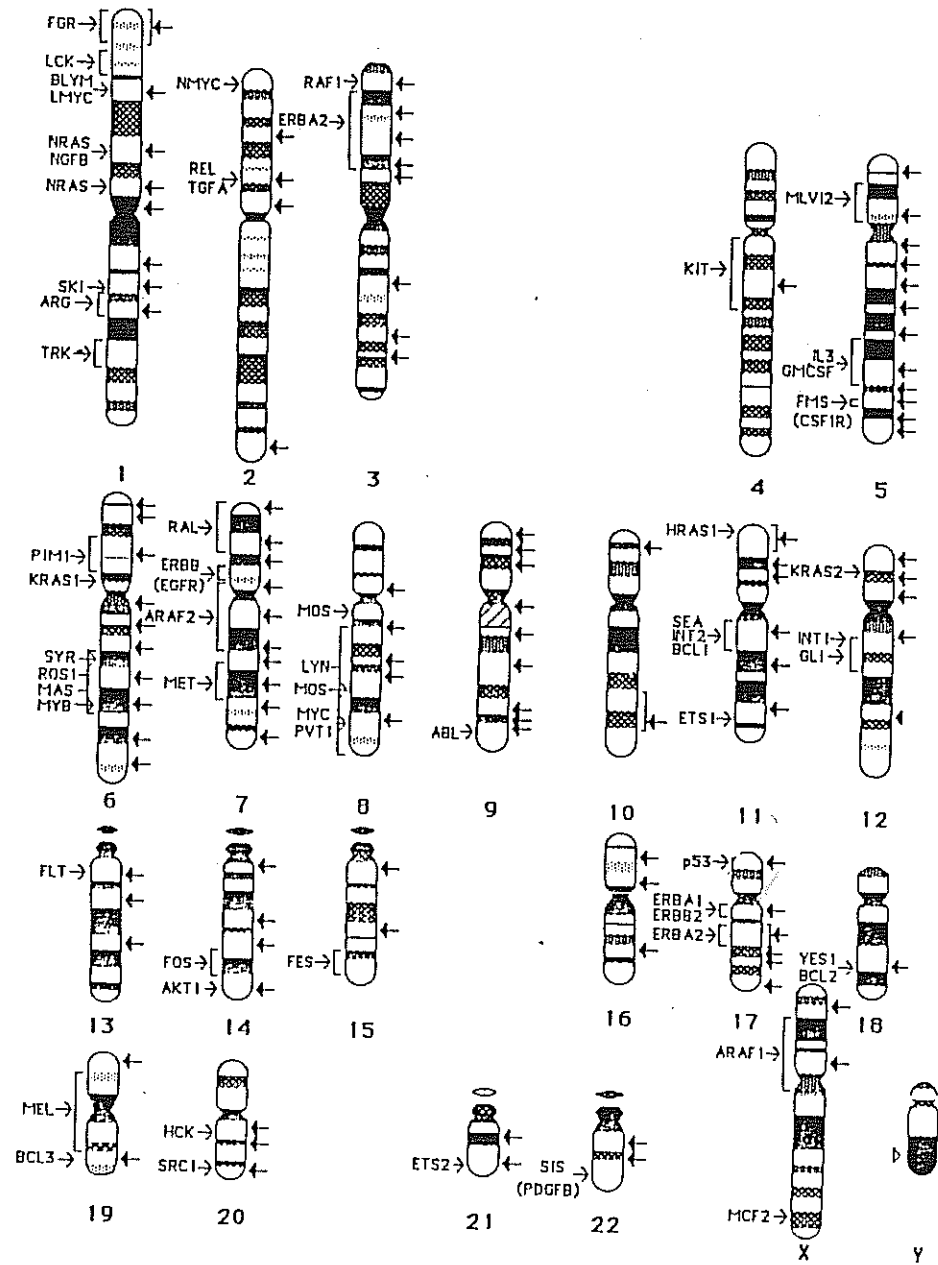
Günümüzde moleküler biyoloji, kanser hastalığının nedenlerinin araştırılmasında en etkili yöntemleri içeren bir alan haline gelmiştir. Bütün dünyada giderek artan bir sıklıkla görülen kanser hastalığı sağlıklı hücrelerin kontrol dışı proliferasyona girmesiyle oluşmaktadır. 1960'lı yıllara kadar hastalığın nedeni hakkında hemen hiçbir şey bilinmezken, moleküler onkolojinin gelişimiyle giderek hastalığın nedeni anlaşılmaya ve ilerleyişi belirlenmeye başlanmıştır. Moleküler düzeyde her türlü hücresel fonksiyonun ana merkezi olan DNA'daki bir bozukluk veya değişiklik kanser olayını başlatabilmektedir (Bishop, 1987; Rabbits, 1994). DNA'da nokta mutasyonu, delesyon, duplikasyon ve translokasyon olarak adlandırılan değişim mekanizmaları, hücre DNA'sında yer alan protoonkogenleri kansere neden olabilen aktif onkogenlere çevirebilmekte, ya da aktif olan tümör baskılayıcı genleri etkisiz kılabilir (Mitelman, 1985; Rabbits, 1991).

Lösemi ve lenfoma tipi kanserlerde neoplastik transformasyonu başlatan ve translokasyon adı verilen kromozomlar arası parça alışverişine sıklıkla rastlanmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiş olan translokasyona bağlı değişik kanser türleri Tablo I.1'de özetlenmiştir. Şekil I.1'de ise bu değişikliklerin etkilediği onkogen bölgeleri kromozomlar üzerinde gösterilmektedir.

Kromozomlar üzerinde yapılan karyotip analizleri, bu yeniden düzenlenmelerin bazı kromozomların belirli bölgelerinde yoğunlaştığını göstermektedir (Rowley, 1977; Rowley, 1982). Özellikle hematalojik

Translokasyon	Etkilenen gen	Hastalık
t(8; 14)(q24; q32) t(2; 8)(p12; q24) t(8; 22)(q24; q11) t(8; 14)(q24; q11) t(8; 12)(q24; q22)	c-MYC (8q24)	BL, BL-ALL T-ALL B-CLL/ALL
t(7; 19)(q35; p13) t(1; 14)(p32; q11) t(7; 9)(q35; q34)	c-MYC (8q24) c-MYC (8q24) BTG (12q22) LYL1 (19p13) TAL1/SCL (1p32) TAL2 (9q34)	T-ALL T-ALL T-ALL
t(11; 14)(p15; q11) t(11; 14)(p13; q11) t(7; 11)(q35; p13)	RBTN1/Ttg1 (11p15) RBTN2/Ttg2 (11p13)	T-ALL T-ALL
t(10; 14)(q24; q11) t(7; 10)(q35; q24)	HOX11 (10q24)	T-ALL
t(3; 14)(q27; q32) t(3; 4)(q27; p11)	Laz3/BCL-6 (3q27) Laz3/BCL-6 (3q27)	NHL/DLCL NHL
t(11; 14)(q13; q32) t(14; 18)(q32; 21) inv14 & t(14; 14)(q11q32) t(10; 14)(q24; q32) t(14; 19)(q32; q13.1) t(5; 14)(q31; q32) t(7; 9)(q34; q34.3) t(1; 7)(p34; q34) t(X; 14)(q28; q11)	BCL-1/(PRAD-1) (11q13) BCL-2 (18q21) TCL-1 (14q32.1) Irf-10 (10q24) BCL-3 (19q13.1) IL-3 (5q31) TAN1 (9q34.3) LCK (1p34) C6.1B (Xq28)	B-CLL ve diğer FL T-CLL B lenfoma B-CLL pre-B-ALL T-ALL T-ALL T-PLL
	Etkilenen gen	Hastalık
inv14 (q11; q32)	TCR- α (14q11) VH (14q32)	T/B- lenfoma
t(9; 22)(q34; q11)	CABL (9q34) BCR (22q11)	CML/ALL
t(1; 19)(q23; p13.3)	PBX1 (1q23) E2A (19p13.3)	pre-B-ALL
t(17; 19)(q22; p13)	HLF (17q22) E2A (19p13)	pro-B-ALL
t(15; 17)(q21-q11-22)	PML (15q21) RARA (17q21)	APL
t(11; 17)(q23; q21.1)	PLZF (11q23) RARA (17q21)	APL
t(4; 11)(q21; q23)	MLL (11q23) AF4 (4q21)	ALL/preB-ALL/ANLL
t(9; 11)(q21; q23)	MLL (11q23) AF9/MLLT3 (9p22)	ALL/preB-ALL/ANLL
t(11; 19)(q23; p13)	MLL (11q23) ENL (19p13)	pre-B-ALL/T-ALL/ANLL
t(X; 11)(q13; q23)	MLL (11q23) AFX1 (Xq13)	T-ALL
t(1; 11)(p32; q23)	MLL (11q23) AF1P (1p32)	ALL
t(6; 11)(q27; q23)	MLL (11q23) AF6 (6q27)	ALL
t(11; 17)(q23; q21)	MLL (11q23) AF17 (17q21)	AML
t(8; 21)(q22; q22)	AML1/CBF α (21q22) ETO/MTG8 (8q22)	AML
t(3; 21)(q26; q22)	AML1 (21q22) EVI-1 (3q26)	CML
t(3; 21)(q26; q22)	AML1 (21q22) EAP (3q26)	Myelodisplazi
t(16; 21)(p11; q22)	FUS (16p11)	Myeloid

Tablo I.1. Translokasyona bağlı olarak ortaya çıkan kanser türleri (Rabbits, 1994).



Şekil I.1. İnsan kromozomları üzerinde bugüne kadar tanımlanmış olan hüresel onkogenlerin haritası (Rowley, 1988).

kanserlerde kromozom değişiklikleri büyük bir rol oynamakta ve bu bozukluklar şaşırtıcı şekilde belli kromozom bölgelerini içerecek şekilde gerçekleşmektedir (Sandberg, 1986; Van den Berghe, 1987; Bitter, 1987; Rowley, 1988).

Benzer bir durum, Kronik Myeloid Lösemi (KML) adı verilen ve bu çalışmanın temel konusunu oluşturan lösemi türünde de sözkonusudur. Kronik Myeloid Lösemi, hematopoyetik kök hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu ortaya çıkan bir kanser türüdür. Hastalığın en belirgin özelliği, vakaların %90-95'inde görülen ve Philadelphia kromozomu (Ph') olarak adlandırılan bir kromozom yapısının ortaya çıkmasıdır. İlk olarak 1960 yılında Nowell ve Hungerford (Nowell ve Hungerford, 1960) tarafından KML hastalarından elde edilen myeloid hücrelerde belirlenen bu yapının, daha sonra Rowley (Rowley, 1973) tarafından yapılan araştırmalarda translokasyon sonucunda kısalan 22. kromozom olduğu anlaşılmıştır. KML tanısı konmuş hastaların kan ve kemik iliği dokularında yapılan sitogenetik araştırmalarda bu kromozom anormalliğine rastlanması, hem hastalığın tanısı açısından, hem de kanser türleri arasında ilk defa böyle belirgin bir kromozomal belirteçin varlığına rastlanması açısından çalışmalara hız kazandırmıştır. Ph' kromozomu 9 ve 22 nolu kromozomlar arasında meydana gelen karşılıklı translokasyon sonucu ortaya çıkar (Groffen, 1984). Bunun sonucunda, 9. kromozom üzerinde yer alan abl protoonkogeni (c-abl), 22. kromozom üzerinde bcr adı verilen bölgeye (breakpoint cluster region) eklenir (Kurzrock, 1988). t(9; 22) translokasyonu olarak adlandırılan bu kromozomal değişiklik sonucu, bcr-abl hibrit geni 210 kD ağırlığında ve normal abl proteinine göre daha yüksek bir aktiviteye sahip tirozin kinaz enzimini kodlar (Konopka, 1984; Kloetzer, 1985).

Protein kinazların (fosfokinazlar) hücre iletişim ve bölünmesinden sorumlu önemli bazı proteinleri aktif hale getirdiği düşünülmektedir. Tirozin kinaz aktivitesinde yukarıda belirtilen nedenden dolayı oluşacak değişikliğin, KML hastalığının patogeneğinde, mekanizması henüz tam olarak açık olmamakla birlikte, önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır (Meriah, 1986; Maxwell, 1987; Kurzrock, 1988).

KML'nin Klinik Özellikleri

Bir çok hastada KML 2 veya 3 aşamalı bir süreç izler. İlk aşama olan kronik faz devam edebileceği gibi (ortalama 3-3.5 yıl), zaman içinde birden akut veya blastik transformasyona girebilir. Philadelphia kromozomu kronik faz sırasında ortaya çıkmakla birlikte, bu fazda myeloid hücreler normal morfoloji ve fonksiyon gösterirler. Genellikle kronik fazdan sonra hastalık giderek hızlanan bir ara faza (accelerated phase) girerek en sonunda blast krizine dönüşmektedir (blast crisis ya da acute transformation) (Goldman, 1993). KML tanısı sırasında hastada en belirgin bulgu, kanda giderek artan olgunlaşmamış granulosit hücrelere bağlı olarak görülen son derece yüksek lökosit sayısıdır. Kronik fazda zamanla letarji, kansızlık ve bazı durumlarda da splenomegali sonucu ortaya çıkan abdominal rahatsızlıklar görülür. Olgunlaşmamış myeloid hücrelerin (blastic cells) giderek dalak, lenf, deri, karaciğer, testis ve kemiklerde görülmeye başlaması hastalığın blastik faza doğru ilerlediğinin işaretidir (Koeffler, 1981). Hastalığın bu en agresif dönemi akut lösemideki duruma benzerlik göstermektedir. Hücre farklılaşması tamamen durmuştur. Normalde eritrosit, nötrofil, monosit ve trombositlerin öncül hücreleri "çok potansiyelli kök hücreler" olup, kendilerini yenileyebilen ve aktif olarak bölünmeyen hücrelerdir. Farklılaşma sırasında bu hücreler hızlı bölünen blast hücrelere dönüşürler. Koloni stimülasyon faktörü adı verilen

büyüme faktörlerinin etkisi ile farklılaşma devam eder. Öncü hücreler olgun myeloid hücrelere dönüşürler. Hastalığın kronik fazında ilkel kök hücrelerinin kontrol dışı çoğalması ile CFU-GM, BFU-E gibi progenitör hücreler kemik iliği ve dalakta artar. Blastik dönemde hücreler farklılaşma özelliklerini kaybederek blast hücreler kan ve kemik iliğini sararlar. KML'de blast krizi döneminde olgunlaşmamış myeloid hücrelerin %70'inde Ph' kromozomuna ek olarak trizomi 8, izokromozom 17q veya iki adet Ph' kromozomu gibi yeni bazı kromozomal değişiklikler de görülmeye başlar (Cannistra, 1990).

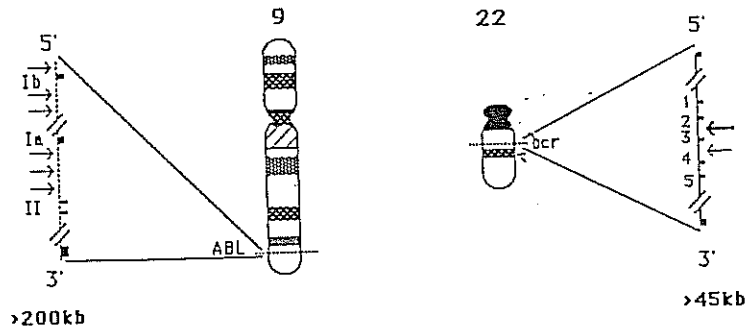
KML'nin Moleküler Biyolojisi

KML'de 9. kromozom üzerinde yer alan c-abl protoonkogeni, 22. kromozom üzerindeki kırılma bölgesine (bcr) gelip bağlandığında, bcr/abl geni içeren ve Philadelphia kromozomu (Ph') olarak adlandırılan yeni bir kromozom yapısı oluşturmaktadır (Bartram, 1983). Translokasyona giren parçalar 9. kromozomun uzun kolundaki 9q34 bandı ile 22. kromozomun kolundaki 22q11 bantıdır (Şekil. I.2). Bu parça alışverişi sonucunda 9. kromozomun uzun kolu bir az daha uzarken (9q⁺) 22. kromozom biraz daha kısalmaktadır (22q⁻) (Rowley, 1982; Prakash, 1984; Masson, 1988).

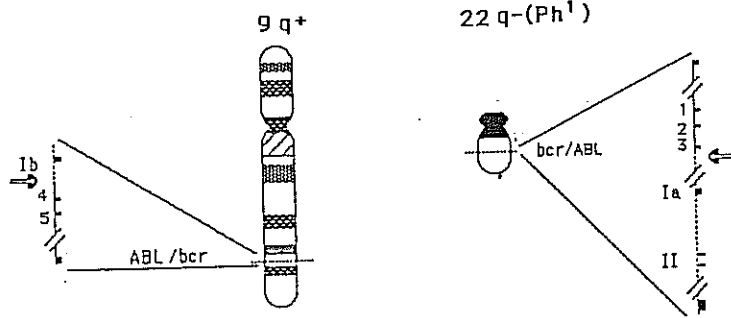
c-abl Onkogeni

Kansere yol açtığı bilinen RNA virüslerinden hazırlanan onkogen problemlerin yardımıyla, yüksek canlılarda DNA üzerinde yer alan ve viral onkogenlere (v-onc) homoloji gösteren DNA dizilerinin varlığı saptanmış ve bu genlere hücrel onkogenler adı verilmiştir (Bishop, 1983; Heisterkamp, 1985). Abelson murine leukemia virüsünde taşınan abl onkogeni (v-abl), insanda 9. kromozomun uzun kolundaki 34. bantta yer alan protoonkogen c-abl'e büyük bir benzerlik göstermektedir.

Normal Kromozomlar



Translokasyon sonrası kromozomlar



Şekil I.2. KML'de görülen translokasyonun kromozom haritası (Rowley, 1988).

(Saglio, 1990). Bu gen evrim boyunca oldukça iyi korunmuş olup, insan dışında *Drosophila melanogaster* gibi birçok canlıda görülmektedir.

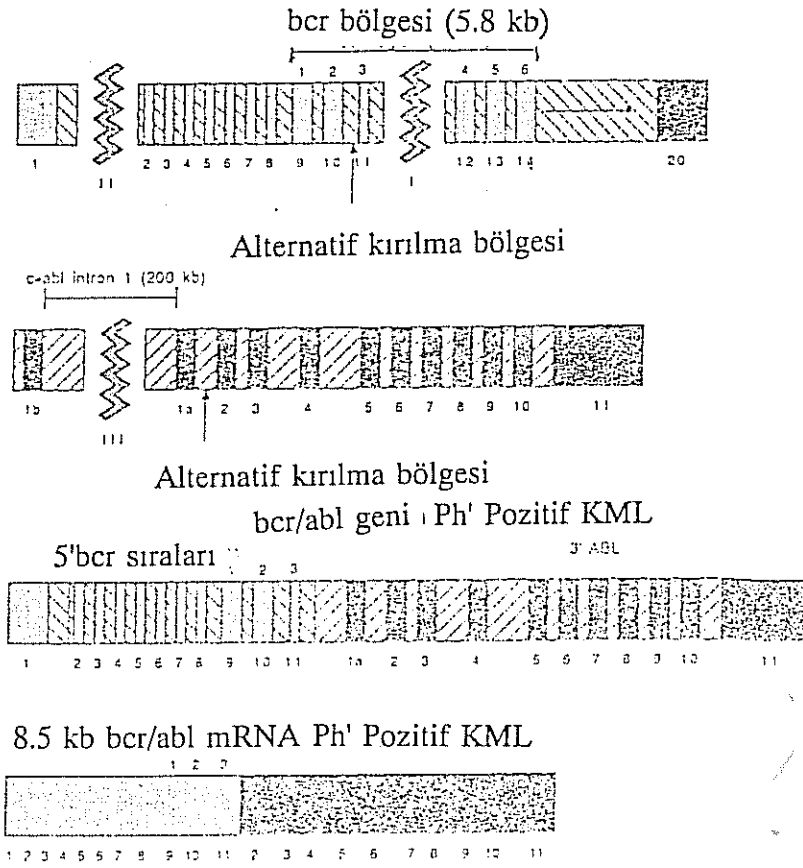
c-abl geni 11 ekzondan oluşan 250 kb uzunluğunda bir gendir ve tirozin kinaz aktivitesine sahip 145 kD'luk bir protein ürününü kodlamaktadır (Konopka, 1984; Kloetzer, 1985; Konopka 1988).

Normalde c-abl geninin ilk ekzonu 2 alternatifli olarak ya ekzon 1a ya da ekzon 1b seçilerek (splicing) mRNA'da yer alır (Şekil I.3). Yeni oluşan mRNA 6kb ya da 7kb uzunluktadır. Bu durum 2. ekzonun birden fazla birleşmeye elverişli ilginç bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Cannistra, 1990).

Philadelphia kromozom ürünü olan p210 proteininin, normal protein ürününe oranla (p145) tirozin kinaz aktivitesi daha yüksek olduğundan sinyal iletişimini dolayısıyla da hücre bölünmesini etkileyebileceği ileri sürülmektedir (Maxwell 1987, Kruzrock, 1987; Kruzrock, 1988).

bcr Geni

Philadelphia kromozomu oluşumunda c-abl geninin aktivasyonuna yol açan 22 nolu kromozomun üzerindeki bcr geni 70kb uzunluğunda ve 20 adet ekzonu bulunan bir gendir. Bu gen, normalde 160 kD ağırlığında serin/threonin kinaz aktivitesine sahip bir fosfoprotein ürününü kodlarken, Philadelphia translokasyonu sonucunda 210 kD ağırlığında füzyon proteininin oluşumuna neden olmaktadır. Ancak translokasyon sırasındaki kırılma, bu genin yalnızca m-bcr olarak adlandırılan 5.8 kb'lik kısmının herhangi bir yerinde gerçekleşmektedir (Bartram 1983; Heisterkamp, 1990). Kırılma en çok 11. ve 12. ekzonlar arasında olmaktadır. Translokasyonun gerçekleşmesinden sonra oluşan hibrit gen üzerindeki ekzonlar yeniden numaralandığında bcr geni üzerindeki 11. ve 12. ekzonlar 2. ve 3. ekzonlara karşılık gelmektedir

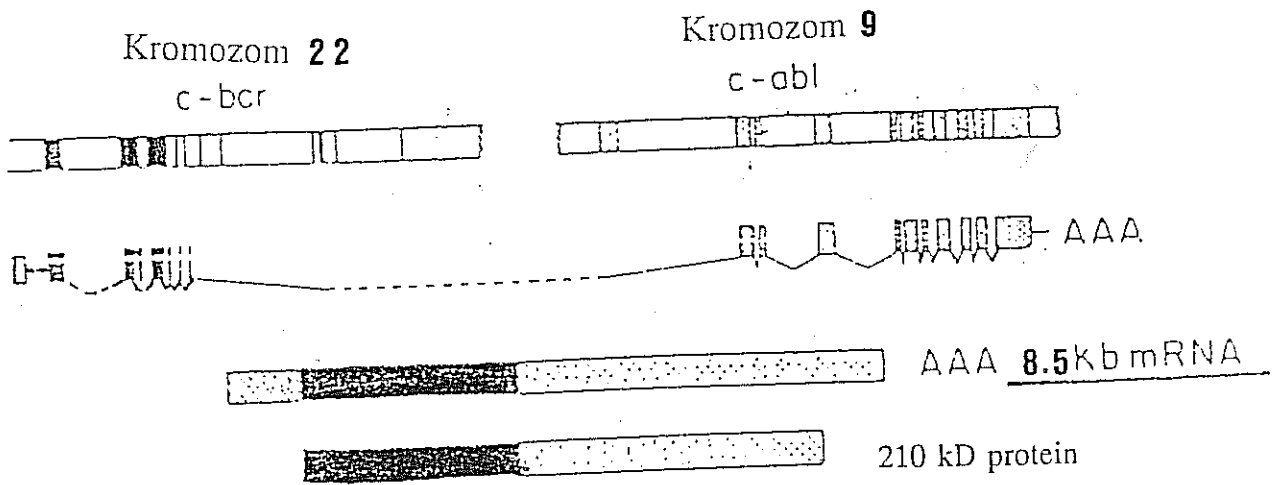


Şekil I.3. KML'de translokasyon bölgesi, kırılma haritaları ve oluşan hibrit genin mRNA'sı (Shtalrid, 1988).

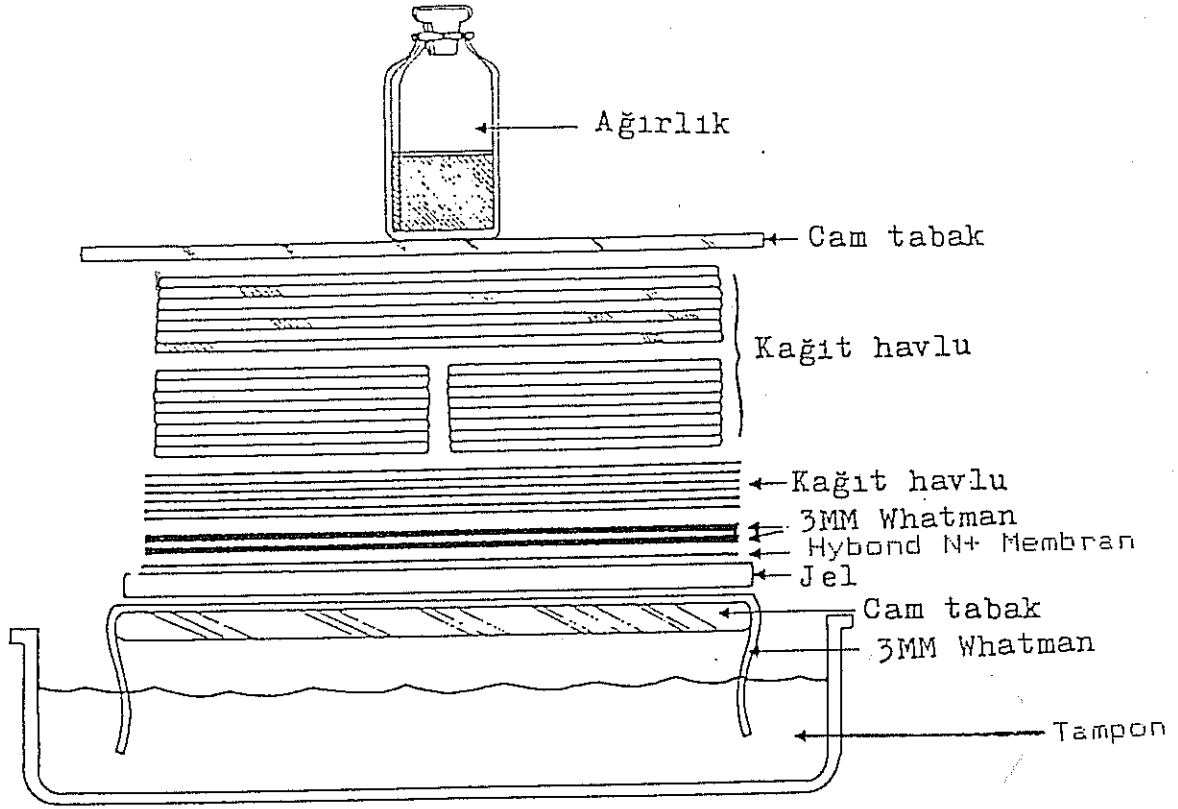
(Şekil I.3.). Translokasyon sonucu oluşan hibrit genden sentezlenen yeni mRNA ürünü normalden daha uzundur (8.5 kb) (Shtivelman, 1985; Stam, 1985; Shtivelman, 1987) (Şekil I.4).

KML'de Moleküler Tanı

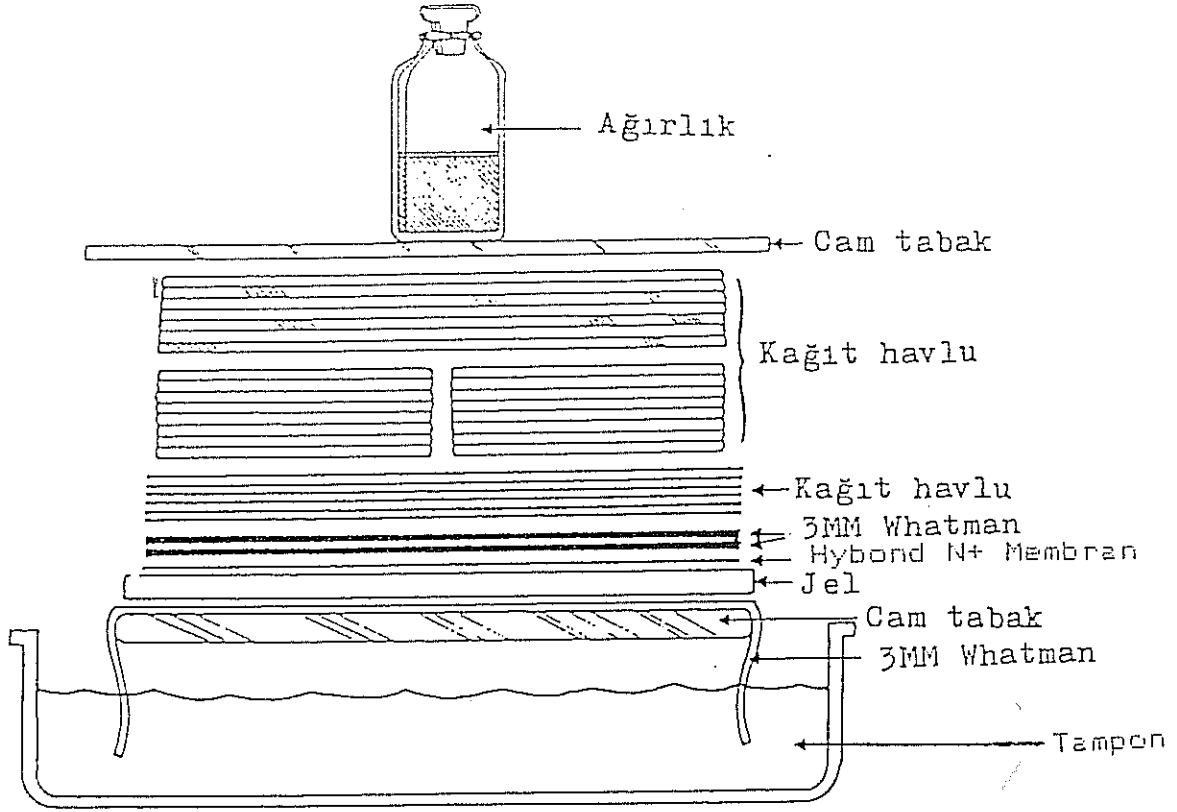
Kronik Myeloid Lösemili hastaların periferik kan örnekleriyle yapılan sitogenetik çalışmaların bazı durumlarda yetersiz kaldığı anlaşılınca çalışmalar moleküler tanı yöntemlerine kaydırılmıştır. Translokasyonun oluşumuna neden olan kırılmalar, belirli bir bölgedeki (m-bcr) birçok farklı noktada gerçekleşmektedir (Leibowitz, 1985). Yalnızca sitogenetik çalışmalara dayalı tanının %10-15'lik bir yanılığa sebep olabildiği görülmüştür. Sitogenetik olarak normal görünen ancak klinik olarak KML tanısı konulan bazı vakalarda DNA analizi ile bcr/abl translokasyonu belirlenmiştir (Shtalrid, 1988; Van der Plas, 1989). %10'luk bir sıklıkla görülen bu durum Ph(-) KML olarak adlandırılmaktadır (Van der Plas, 1991). Özellikle bu gruptaki hastaların tanısında hassasiyeti ve güvenilirliği açısından önemi büyük olan DNA analiz tekniklerinin kullanımı kaçınılmaz hale gelmiştir (Schaefer-Rego, 1987). Bu nedenle, bugün moleküler biyolojide kullanılan yeni yöntemler çeşitli kanser vakalarının tanısında oldukça yararlı olmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan Southern blot analizinde (Şekil I.5), DNA örnekleri hastanın kan yada kemik iliğinden izole edildikten sonra, kırılma bölgelerini belirlemek için özel restriksiyon enzimleriyle kesilmektedir. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülerek birbirinden ayrılması sağlanan kesilmiş DNA parçaları özel bir filtre kağıdına geçirildikten sonra radyoaktif işaretli prob DNA ile hibridizasyona sokulmaktadır. Bu problemler farklı gen bölgelerine karşıt olmalıdır. Filtrelerden elde edilen otoradyogramlar, kullanılan prob DNA'nın özelliğine göre yorumlanarak çok güvenilir ve tekrarlanabilir tanı



Şekil I.4. bcr/abl hibrit genin mRNA'sı ve protein ürünü (Masson, 1988).



Şekil I.5. Southern blot yöntemi



Şekil I.5. Southern blot yöntemi

olanağı sağlamaktadır (Morris, 1990). Çok daha yaygın olarak kullanılan PCR yöntemi ile analizlerde ise gereken doku miktarı (kan veya ilik) en aza indirilmiştir. Bu yöntemde DNA örneği tüpte milyonlarca kez çoğaltılarak analizler için gerekli düzeye ulaştırılmaktadır (Elrich, 1991). PCR yöntemi esas olarak üç ana basamaktan oluşmaktadır;

1. Çoğaltılacak DNA'nın ısı yardımıyla denatürasyonu
2. Özgün primer çiftlerinin hedef DNA'ya bağlanması
3. Tüpte DNA sentezinin gerçekleştirilmesi

Kronik Myeloid Lösemide bcr/abl füzyon geninin PCR yöntemi ile çoğaltılamayacak kadar uzun olması nedeniyle intronları taşımayan mRNA'dan başlanması uygun olmaktadır. Kandan elde edilen RNA Revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA'ya dönüştürülmektedir. Bu yöntem RT-PCR olarak bilinmektedir (Morgan, 1989). PCR metodu özellikle tedavi sonrası hasta kanı örneklerinin incelenmesinde çok yararlıdır. Remisyona giren hastalarda düşük sayıdaki hasta hücreyi tespit edebilmek ancak hassasiyeti $1/10^5$ 'lere ulaşan bu yöntemle mümkün olabilmektedir (Wisniewski, 1991). Yani 10^5 hücrede bir hasta hücre tesbit edilebilmektedir. Southern Blot yönteminde ise hassasiyet %1-5 civarındadır.

p210 hibrit proteininin immunolojik tanısı monoklonal antikolar kullanılarak mümkün olabilmekte ise de bu yöntemin hassasiyeti %0.1 düzeyindedir (Konopka, 1985). Hasta takibinde RT-PCR en uygun yöntem olarak tercih edilmektedir. Laboratuvarımızda sürmekte olan çalışmalarda Southern blot analizlerinde translokasyon görülmeyen hastalar için RT-PCR yöntemine başvurulmuştur.

Bu çalışmada Southern blot yönteminde 3-4 ayrı restriksiyon enzimiyle kesilmiş hasta DNA örnekleri 22. kromozom üzerindeki major kırılma bölgesine (m-bcr) karşıt proplar ile hibridize edilerek hastalığa özel translokasyonun varlığı incelenmiş ve m-bcr üzerindeki kırılmanın yeri belirlenmiştir.

BÖLÜM II GELİŞME

II.1. MATERYAL ve METOD

II.1.1. Kan Örnekleri

Bu projede incelenen DNA'lar Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesinde KML tanısı konulmuş olan hastaların kanlarından elde edilmiştir. ¹

II.1.2. Kimyasal Malzemeler

Projede kullanılan kimyasal malzemeler moleküler biyoloji çalışmaları için özel olarak hazırlanmış olanlar arasından seçilmiştir. Agaroz jeli Sigma firmasından, Hind III, Bgl II, EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimleri Promega firmasından, ³²P- α dCTP izotopu ile işaretleme kiti ve N⁺Hybond blot filtresi Amersham Firmasından sağlanmıştır.

II.1.3. Kandan DNA İzolasyonu

Hacettepe Onkoloji Enstitüsünde KML hastalarından alınan kan örneklerinden direkt ve sinkronize kültürler hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürlerin metafaz hücrelerinde "G-Banding" yapılmış ve translokasyon taşıyan hücre oranları hesaplanmıştır (Yunis, 1981; Missawa, 1986).

Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi'nde yukarıda anlatıldığı gibi sitogenetik analizi yapılarak KML tanısı konulan hastaların DNA örnekleri periferel kandan izole edilmiştir (Maniatis, 1989). Kan örnekleri EDTA içeren tüplere 10cc olacak şekilde alınarak, üzerine 30ml liziz tamponu (77 mM

NH₄Cl, 4.6mM KHCO₃, 1.0mM EDTA, pH:7.5) eklenmiş, 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 3000 rpm'de (Sorvall, SS34 rotor) 10 dakika santrifüjlenip üst faz atılmıştır. Santrifüj sonrasında çöken lökosit hücre çekirdekleri tuz/EDTA tamponunda (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH: 7.5) çözülmüş, üzerine 300 µl SDS (%10) ve 20 µl proteinaz K (10mg/ml'lik stok solüsyondan) eklenerek bir gece 37°C de inkübe edilmiştir. Ertesi gün örnekler 3ml fenol (pH:8.0) konularak iyice karıştırılıp 2000 rpm'de (Sorvall SS34 rotor) 10 dakika santrifüj edilmiş, bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra üst faz kloroform: izoamilalkol (25:1) ile ekstre edilip aynı hızda santrifüj edilmiştir. DNA içeren su fazı iki hacim etanol (%99) ile karıştırılarak DNA çöktürülmüştür. Santrifüjlenerek ayrılan DNA 250 µl TE tamponu (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 7.5) içinde çözümlenerek -20°C'de saklanmıştır (Maniatis, 1989).

II.1.4. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

Kandan elde edilen DNA'lar %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek incelenmiş ve miktarları 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon ölçümü ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

II.1.5 DNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi

DNA örnekleri EcoRI, Hind III, BamHI (Bazı hastalarda Bgl II) ile uygun koşullarda kesilmiştir. Reaksiyon 1µg DNA'ya karşılık 3-5 ünite enzim ve uygun miktarda enzim tamponu eklenerek 37°C'de bir gece inkübasyonla gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon sonunda kesim %0.8'lik mini agaroz jelde her reaksiyon tüpünden 3 µl'lik örnek alınarak kontrol edilmiş, kesim sonuçları istenildiği

gibi gerçekleşmiş olan örnekler Southern blot için hazırlanan 20x30 cm boyutlarındaki büyük agaroz jelde bir gece 60-80 V/cm'de yürütülmüştür.

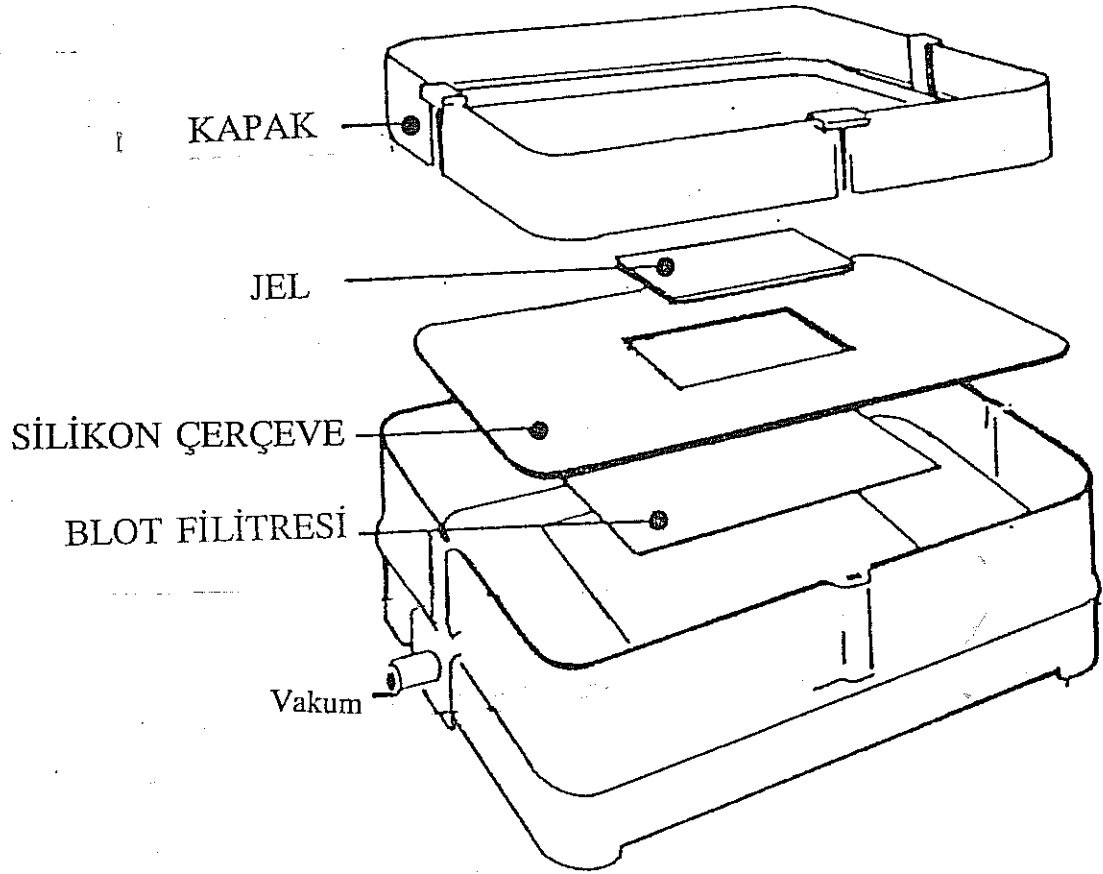
II.1.6. Southern Blot Yöntemi

Büyük agaroz jelinde birbirinden ayrılması sağlanan DNA bantları, Southern blot yöntemi ile jel üzerinden N⁺ Hybond filtre kağıdına geçirilmiştir.

Bu işlem için önce jel Etidyum bromür ile boyanıp, 312nm dalga boyunda UV lambası altında incelenmiş ve jel üzerindeki gereksiz bölgeler kesilmiştir. Jel önce 1 saat denatürasyon solüsyonunda (1.5 M NaCl, 0.5M NaOH) daha sonra da 1 saat 3xSSC nötralizasyon solüsyonunda (20xSSC: 3M Sodyum klorür, 0.3M Sodyum sitrat, pH.7.0) çalkalanarak yıkanmıştır. Jelin boyutları ölçülerek hazırlanan N⁺ Hybond (Amersham) filtre kağıdı jel üzerine şekilde gösterildiği gibi yerleştirilmiştir (Şekil I.5). Filtre üzerine ise önceden 3xSSC solüsyonunda ıslatılan Whatman 3MM kağıt ve en üstte uygun kalınlıkta kağıt havlu konularak blot düzeneği hazırlanmıştır. DNA'ların jel üzerinden N⁺Hybond'a geçmesi gece boyu bırakılarak sağlanmaktadır. Bazı deneylerde transferin daha hızlı gerçekleşmesini sağlayan "vacum blot" cihazı kullanılmıştır (Şekil II.1). Transfer sonrasında kuruyup incelen jel etidyum bromür ile boyanarak UV lambasında incelenmiştir. Transferin başarılı olduğundan emin olunduktan sonra filtreler yarım saat 0.4 N NaOH ve 1-2 dakika 3xSSC ile yıkanarak DNA fikzasyonu yapılmıştır. Özel torbalar içine konulan filtreler +4°C de saklanmıştır.

II.1.7. Prob DNA

Prob olarak Dr. John Groffen'in (Los Angles, Children's Hospital)



Şekil II.1. Hoefer Transvac Vakum Blot Cihazı

hediyesi olan pablk2 UK Human Genome Project'den sağlanan 5'-bcr probu ve Dr. Simon Guy'ın (St Mary's Hospital, Manchester) hediyesi olan bcr-G kullanılmıştır. İlk prob m-bcr bölgesinin 3' ucunu tarayan 1.2 kb uzunluğunda bir DNA parçasıdır ve pUC vektörü üzerinde taşınmaktadır. 5'-bcr probu 22. kromozom m-bcr bölgesinin 5' ucunda 1.95 kb'lik bir bölgeye karşıt olarak hazırlanmış (şekil II-7), bcr-G probu ise yine m-bcr bölgesinin 3' ucuna yakın 0.6 kb'lik bir bölgeye karşıt olup (şekil II.7.) 2.3 kb'lik pUC vektörüne takılı olarak hazırlanmıştır. Rekombinant plazmitler E.coli HB101 suğu içinde gönderilmiş olup üretildikten sonra "alkali liziz" yöntemi ile izole edilmişlerdir.

II.1.8. Alkali Liziz Yöntemi ve Prob DNA'sının Hazırlanması

Birnboim ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu alkali liziz yöntemi ilk olarak konakçı E.coli bakterilerinin çoğaltılması basamağını içermektedir (Birnboim 1979; Birnboim 1983; Thomas, 1988). Bunun için Ampisilinli ortamda bir gece büyütölmüş E.coli kültüründen 1.5 ml örnek alınarak Eppendorf tüplerine konulur. Hücreler çöktürölüp süpernatant atılır ve 100 µl solüsyon I (50mM glükoz, 10mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH:8.0) içinde yeniden çözölür. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletilen tüplerin üzerine 200 µl solüsyon II (0.08 N NaOH ve % 1 SDS) eklenerek iyice karıştırılır. 150 µl soğuk solüsyon III (3M Potasyum asetat pH:4.8) koyularak tekrar karıştırılan tüpler santrifüj edilip üst faza fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) eklenerek yeni bir tüpe aktarılır. Santrifüj sonrası su fazı %99'luk etanol ile karıştırılır ve 1 saat buz üzerinde bekletilir. Daha sonra santrifüj (13,500 rpm) edilerek prob DNA çöktürölür. Çökelek iyice kurutulup 30 µl TE tamponunda çözölerek -20°C de saklanır.

Plazmit izolasyonu sık aralıklarda prob kullanımını gerektiren durumlarda

zaman kazanılması açısından büyük ölçekli olarak hazırlanmıştır. Bunun için Qiagen Firmasınınca sağlanmış olan "QiA prep-spin" isimli hazır plazmit izolasyon kiti kullanılmıştır. Bu izolasyonlarda başlangıç hacmi 1.5 ml yerine 200 ml olarak alınmış ve tüm solüsyonların hacimleri buna göre ayarlanmıştır. Prob DNA'lar izolasyon sonucu kit içinde yer alan özel saflaştırma kolonlarından geçirilerek temizlenmiştir (Birnboim 1983; Thomas, 1988).

II.1.9. Prob DNA'sının Plazmitten Restriksiyon Enzimleri ile Çıkartılması

Bölüm II.1.8. de anlatıldığı gibi elde edilen plazmit DNA'sı %0.8'lik mini agaroz jelde yürütülerek saflik tayini yapılmıştır. Bu jelde ayrıca Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA'sı referans DNA olarak yürütülmüştür. İzole edilen plazmitlerin miktar tayini 260nm'de spektrofotometrik olarak yapılmıştır. pUC vektörüne takılı 3'-bcr probu Hind III ve EcoRI, bcr-G probu ise EcoRI ve Pst I restriksiyon enzimleri ile μ g DNA başına 2-3 ünite enzim olacak şekilde kesilmiştir. Reaksiyon tüpüne uygun miktarda enzim tamponu eklenmesinden sonra 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kesim işleminin tamamlanmasından sonra örnekler %1'lik düşük erime noktalı agaroz jelinde yürütülerek plazmitten ayrılan prob DNA'sı kesilip jelden alınmıştır.

Prob DNA'sının uzunluğu aynı jelde yürütülmüş olan λ /Hind III referans DNA'sı ile saptanmıştır. Elektroforez sonrasında jelden kesilen DNA bantı 65°C'de bekletilerek agaroz parçacıklarından ayrılmış ve fenol:kloroform:isoamilalkol (25:24:1) yöntemi ile tamamen temizlenmiştir. Temizlenen DNA, uygun hacimde TE tamponunda yeniden çözülüp küçük hacimlerde Eppendorf tüplerine konularak -20°C de saklanmıştır. Daha sonra işaretlemeye kullanılacak olan bu prob DNA'lar, bazı hallerde daha saf ve temiz olarak elde edilebilmesi amacıyla Gene Clean II adı verilen hazır kit ile agarozdan temizlenmiştir. Buna göre, istenen prob DNA bantı jelden kesilerek

çıkartılmış ve toplam jel hacmin 3 katı kadar 6M NaI solüsyonu ile 55°C de 5 dakika eritilmiştir. Uygun miktarda "Glassmilk" silika matriks eklenen ve santrifüj edilip çöktürülen matrikse bağlanan prob DNAsı, 3 kere NaCl-Tris-EDTA-Etil alkolden oluşan hazır New Wash solüsyonu ile yıkanarak uygun miktarda TE tamponunda karıştırılmış, kısaca santrifüj edilerek üst faz matriks kaldırılmadan dikkatlice alınarak işaretlemeye hazır hale getirilmiştir.

II.I.10 Prob DNA'nın Radyoaktif Olarak İşaretlenmesi

Prob¹ DNA'sının işaretlenmesi ³²P-αdCTP içeren Amersham "Mega Prime" kitinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. İşaretleme reaksiyonunda, 9 nükleotid uzunluğundaki özgün olmayan primerler kullanılarak daha önceden denatüre edilmiş olan prob DNAsı üzerinde yeni DNA sentezi yapılır. Bu yöntemde sentezi yapan Klenow enzimi ortamda bulunan işaretsiz dATP, dGTP, dTTP yanında işaretli dCTP'yi de kullanarak yeni sentezlenen zinciri işaretlemektedir. İşaretleme reaksiyonu 25 ng prob DNAsı, 50 µCi ³²P-αdCTP radyoizotopu, Klenow enzimi ile beraber 37°C'de 4 saat sürecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

İşaretleme sonrasında reaksiyondan alınan 1µl'lik örnekler 20 kere seyreltilerek Whatman 3MM'lik disklerle emdirilip 5ml sayım solüsyonu içine konulmuş ve β sayacında (LKB) total aktivite belirlenmiştir. Aynı reaksiyondan alınan diğer 1 µl'lik örnek %10'luk soğuk TCA (Trikloroasetikasit) ile çöktürülmüş ve %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır. Bu örneklerin β sayacında sayılması ile özgün aktivite belirlenmiş ve işaretleme verimi hesaplanmıştır. Ortalama olarak %80-85'lik verim ile 95x10⁶ cpm/µg DNA özgün aktiviteye sahip işaretli proplar elde edilmiştir.

Bu problemler hibridizasyon işlemi ile blot filtresindeki DNA'ya bağlanarak otoradyografi yapılmıştır.

II.1.11. Ön Hibridizasyon ve Hibridizasyon

Southern blot yöntemi ile blot filtresi üzerine geçirilen DNA örnekleri 0.25 M NaH_2PO_4 , 0.25 M NaCl, %0.1 SDS ve 1mM EDTA'dan oluşan solüsyon içerisine %6'lık Polietilen glikol eklenmesi ile oluşan ön hibridizasyon solüsyonunda 3-4 saat 65°C de banyo edilmiştir. Bu işlemden sonra hibridizasyonda kullanılan solüsyonun 10ml'si üzerine 100°C 'de 4 dakika denatüre edilen prob DNA'sı (25×10^6 cpm/filtre) eklenmiştir. Bu solüsyon blot filtresi ile birlikte torbalanarak gece boyu hibridizasyona bırakılmıştır.

II.1.12 Otoradyografi

Hibridizasyon sonucunda yapılan otoradyografi, radyoaktif izotopların Röntgen filmi üzerine siyah lekeler bırakması ile gerçekleşmektedir. Bunun için blot filtreleri hibridizasyon işleminin sonunda 3x, 2x, 1x, 0.1x SSC ve %0.1'lik SDS ile yıkanmıştır. Yıkamaların tamamlanmasından sonra filtreler torbalanıp X-OMAT AR KODAK röntgen filmi ile birlikte karanlıkta kurşun kasetlere kapatılıp intensifying screen ile, -70°C 'de 3-5 gün bekletilmiştir. Filmler banyo edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

**TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ**

II.2. BULGULAR

II.2.1 Kandan DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılacak olan DNA örnekleri Hacettepe Onkoloji Hastanesine başvurarak KML tanısı konulan hastalardan ve referans olarak kullanılmak üzere normal kandan elde edilmiştir.

Ayrıca çalışmalarda kontrol olarak kullanılan Ph(+) DNA örnekleri konsantrasyonu belirlenmiş olarak Manchester St. Mary's Hospital Regional Molecular Genetics laboratuvarından getirtilmiştir. Çalışmalarda kullanılan DNA örneklerinin konsantrasyonları Tablo II.1 de gösterilmektedir.

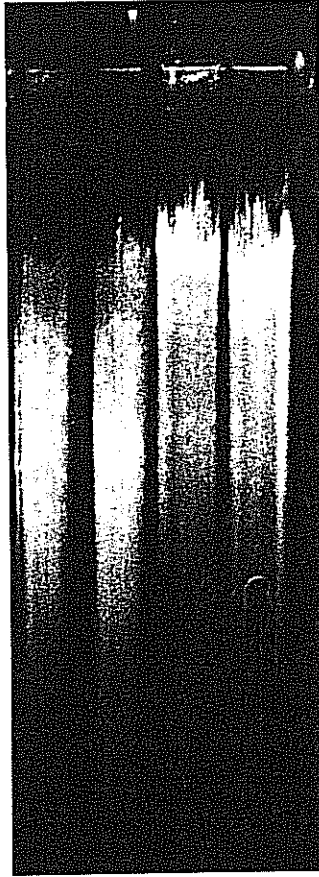
II.2.2. DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kesim Koşulları

DNA örneklerinin EcoRI, Hind III, Bgl II ve BamHI enzimleriyle kesim koşulları optimize edilmiştir. Blot analizinde kullanılmak üzere kesilen her DNA örneği (10 µg) %0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Restriksiyon enzimleriyle kesilmiş olan negatif ve pozitif kontrole hasta DNA örnekler ile birlikte kullanılmıştır. Şekil II.2.A ve B'de kesim sonuçları görülmektedir. Şekil II.2.A' da kesim koşullarının optimize edilmişinden önceki, Şekil II.2.B'de ise şartların ayarlanmasından sonraki kesim sonuçları görülmektedir.

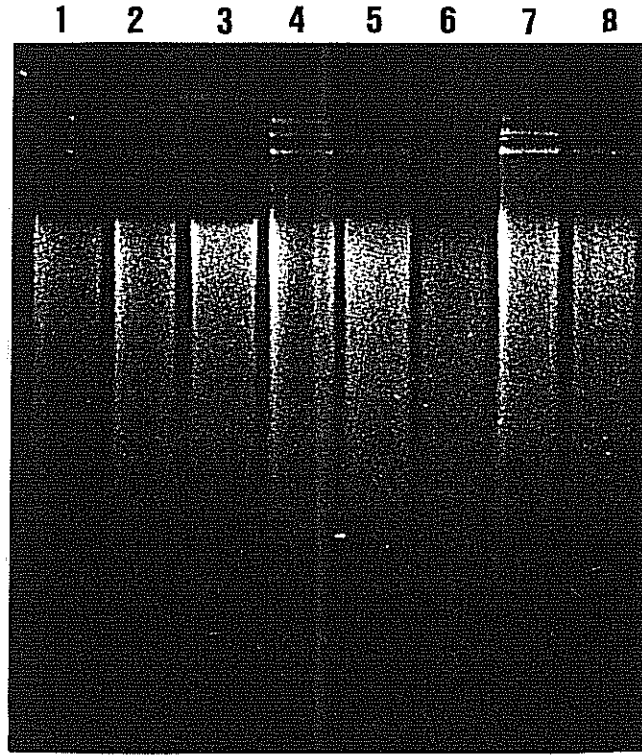
Hasta No	Konsantrasyon* ($\mu\text{g/ml}$)	OD _{260/280}
1	770	1.50
2	830	1.90
3	1195	1.80
4	1352	1.80
5	1540	2.00
6	350	2.50
7	340	2.40
8	570	2.20
9	1255	1.85
10	755	1.72
11	775	1.13
12	900	1.80
13	1110	1.53
14	1865	1.74
15	533	1.90
16	340	1.90
17	400	1.60
18	460	2.00
19	400	1.40
20	210	1.90

* DNA Konsantrasyonu OD₂₆₀ değeri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.
(DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$): OD₂₆₀xSeyreltme Faktörü x 50

Tablo II.1: KML hastalarından elde edilen DNA'ların konsantrasyonları.



Şekil II.2.A. Hasta DNA örneğinin restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçları
(Kesim koşulları optimize edilmeden önce)



Şekil II.2.B.

Hasta DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçları (kesim koşullarının optimizasyonundan sonra)

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 Hind III enzimiyle kesim profili
4. kuyu: 2. hasta DNA'sının Hind III enzimiyle kesim profili
5. kuyu: 1. hasta DNA'sının Bgl II enzimiyle kesim profili
6. kuyu: 2. hasta DNA'sının Bgl II enzimiyle kesim profili
7. kuyu: 1. hasta DNA'sının BamHI enzimiyle kesim profili
8. kuyu: 2. hasta DNA'sının BamHI enzimiyle kesim profili

II.2.3 Prob DNA'sının Seçilmesi

Çalışmada kullanılan prob DNA'sı seçiminde önemli olan nokta, translokasyonun en çok görüldüğü m-bcr bölgesine karşıt olarak hazırlanmış olmasıdır. Kullanılan problarla ilgili bilgiler Tablo II.2'de özetlenmiştir. m-bcr bölgesinin 3' ve 5' uçlarına ait problemlerin yanı sıra, bölgenin geniş bir kısmına karşıt olarak hazırlanmış universal prob DNA'sı da denenmiştir. Çalışmanın başlangıcında kullanılması düşünülen prob DNA'lardan universal prob'un plazmitten çıkartılması konusunda güçlüklerle karşılaşmış ve protokolde birçok değişikliklerin yapılmasına rağmen sonuç alınamamıştır. Ayrıca 3'bcr prob'unun işaretleme verimi birçok parametre değişikliğinin denenmesine rağmen düşük çıkmıştır. 5'bcr probu ise işaretlenme verimi açısından elverişli olmakla beraber hibridizasyon sonucunda özgün olmayan kirliliklere neden olmuştur. Bu nedenlerle çalışmalarda bu tür sorunlara neden olmayan ve en detaylı bilgiyi veren bcr-G prob DNA'sının kullanılması uygun bulunmuştur.

Prob DNA	Vektör	R. Enzimleri	Prob DNA Uzunluğu
3'-bcr	pUC	EcoRI/Hind III	1.2 kb
5'-bcr	pUC	Bgl II/BamHI	1.95 kb
universal	pUC	HindIII/EcoRI	~4kb
bcr-G	pUC	EcoRI/PstI	0.6kb

Tablo II.2: Çalışmada kullanılmış olan prob DNA'lar ve özellikleri

II.2.4. Prob DNA'nın Plazmitten Çıkartılması

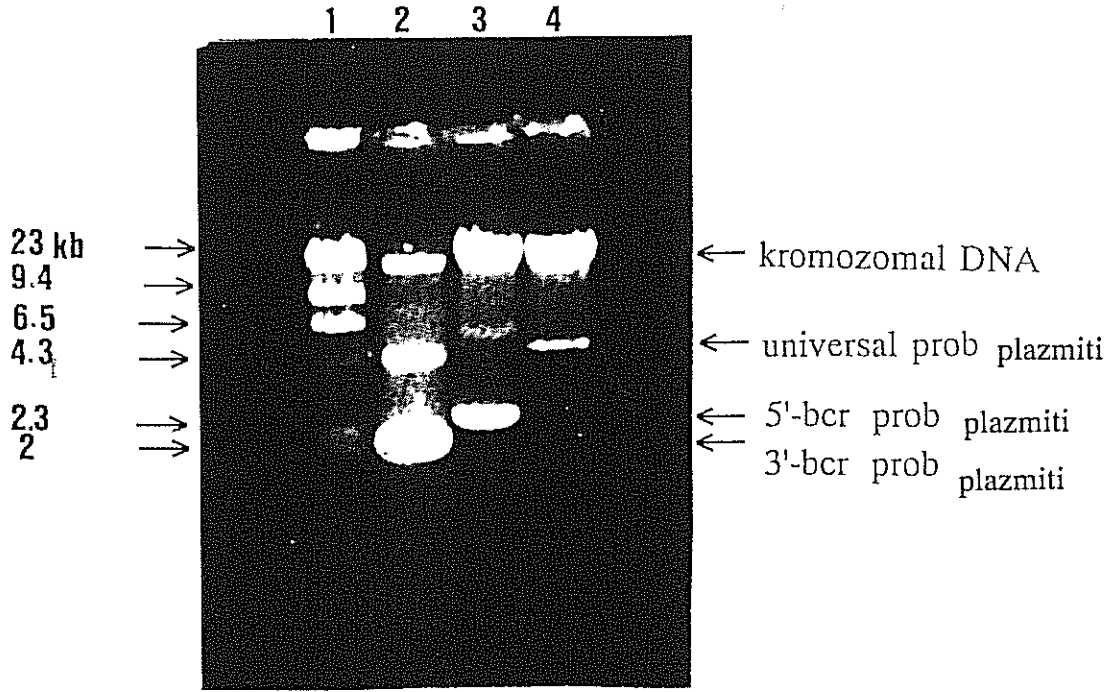
Prob DNA'lar taşıyıcı plazmitten Tablo II.2'de gösterilen restriksiyon enzimlerinin yardımıyla çıkartılmıştır. Kesim sonrasında örnekler %1'lik düşük erime noktalı agaroz jelde yürütülerek vektörün diğer parçalarından ayrılmıştır. Yeri λ /HindIII marker DNA'sı ile belirlenmiş olan prob DNA'sı jelden kesilerek ayrılmış ve ısıtılarak eritilen agarozdan fenol yıkamaları ile temizlenmiştir.

Şekil II.3'de birinci kuyuda λ /HindIII marker DNA'sı, ikinci kuyuda 3'-bcr, üçüncü kuyuda 5'-bcr, dördüncü kuyuda universal prob DNA'larını içeren rekombinant plazmitler gösterilmektedir. Düşük sıcaklıkta eriyebilen agaroz jel üzerindeki prob DNA'ların kesim sonrası profilleri ise Şekil II.4.A ve B'deki gibidir.

Şekil II.4.A'da birinci kuyuda λ /HindIII marker DNA'sı ikinci kuyuda 5'-bcr plazmiti, üçüncü kuyuda 5'-bcr plazmitinin Bgl II enzimi ile kesim sonucu, dördüncü kuyuda BamHI enzimi ile kesim sonucu agaroz jeli üzerinde elde edilen profil görülmektedir. Universal prob plazmitinin restriksiyon enzimleri ile kesimi istenilen verime ulaşamadığı için bu prob kullanılmamıştır.

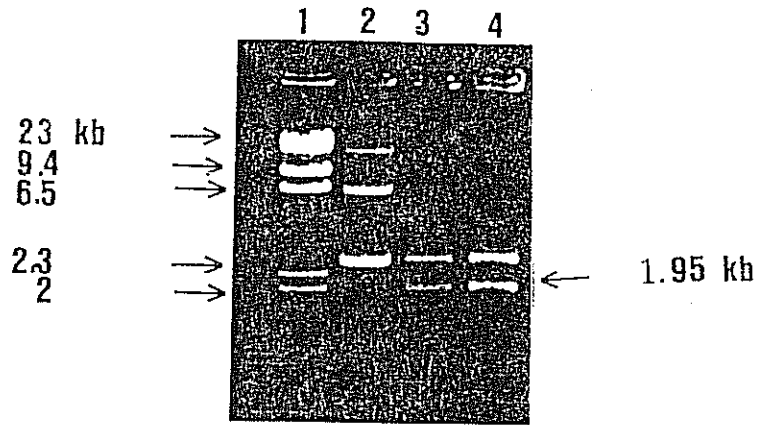
Şekil II.4.B'de birinci ve üçüncü kuyularda λ /Hind III marker DNA'sı, ikinci kuyuda 3'-bcr vektör plazmiti, dördüncü kuyuda ise 3'-bcr prob plazmitinin EcoRI/Hind III enzim çiftiyle kesiminden sonra elde edilen profili görülmektedir. Kesimler sonucu elde edilen prob DNA uzunlukları Tablo II.2'de verilmiştir.

Şekil II.4.C'de ise rekombinant plazmitin içerdiği bcr-G prob DNA'sının çıkartılması amacıyla Pst I/EcoRI enzim çifti ile kesiminden elde edilen



Şekil II.3. Çalışmada kullanılan vektör plazmitlerin agaroz jeli üzerinde görülen profilleri.

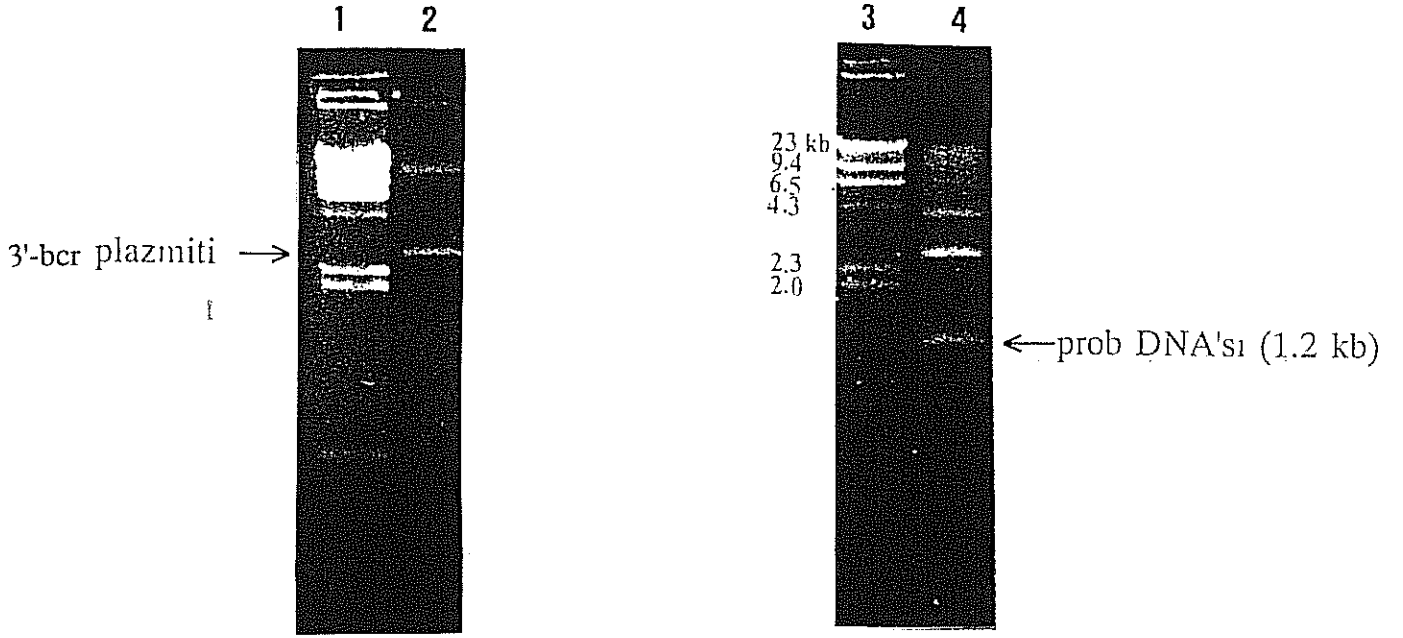
1. kuyu: λ /HindIII marker DNA
2. kuyu: 3'-bcr vektör plazmiti
3. kuyu: 5'-bcr vektör plazmiti
4. kuyu: universal vektör plazmiti



A

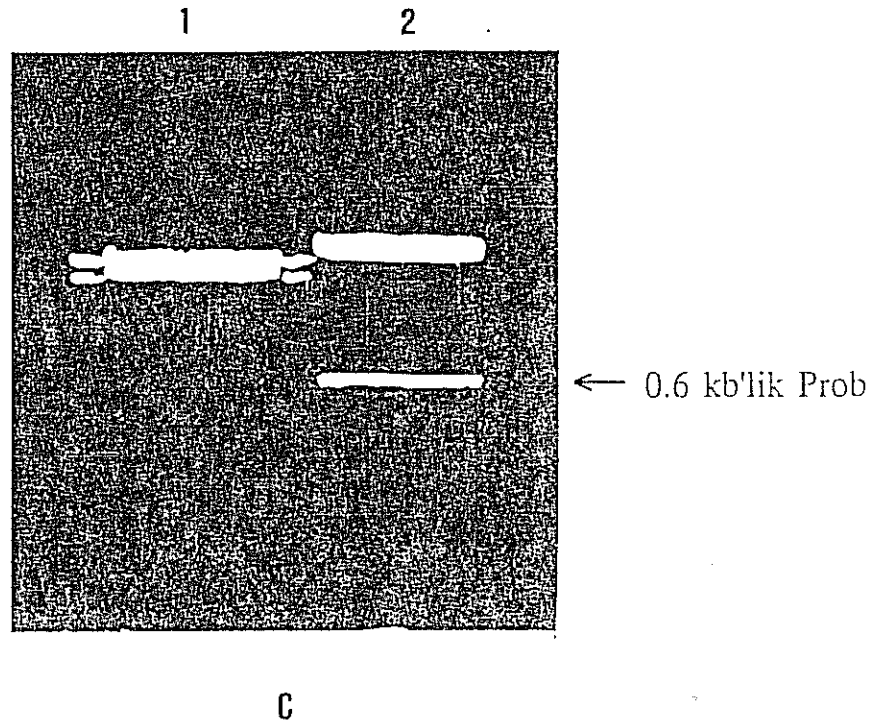
Şekil II.4.A. 5'-bcr prob DNA'sının vektör plazmitten çıkartılması

1. kuyu: λ /HindIII DNA markeri
2. kuyu: 5'-bcr plazmiti (kesim öncesi)
3. kuyu: 5'-bcr plazmitinin BgIII enzimi ile kesim sonucu
4. kuyu: 5'-bcr plazmitinin BamHI enzimi ile kesim sonucu elde edilen 1.95 kb'lik prob DNAsı



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

1. kuyu: λ /Hind III Marker DNA'sı
2. kuyu: 3'-bcr plazmiti (kesim öncesi)
3. kuyu: λ /Hind III Marker DNA'sı
4. kuyu: 3'-bcr vektör plazmitinin EcoR1 ve HindIII enzim kesimlerinden sonra, 1.2 kb'lik prob ve vektörün geri kalan kısımları.

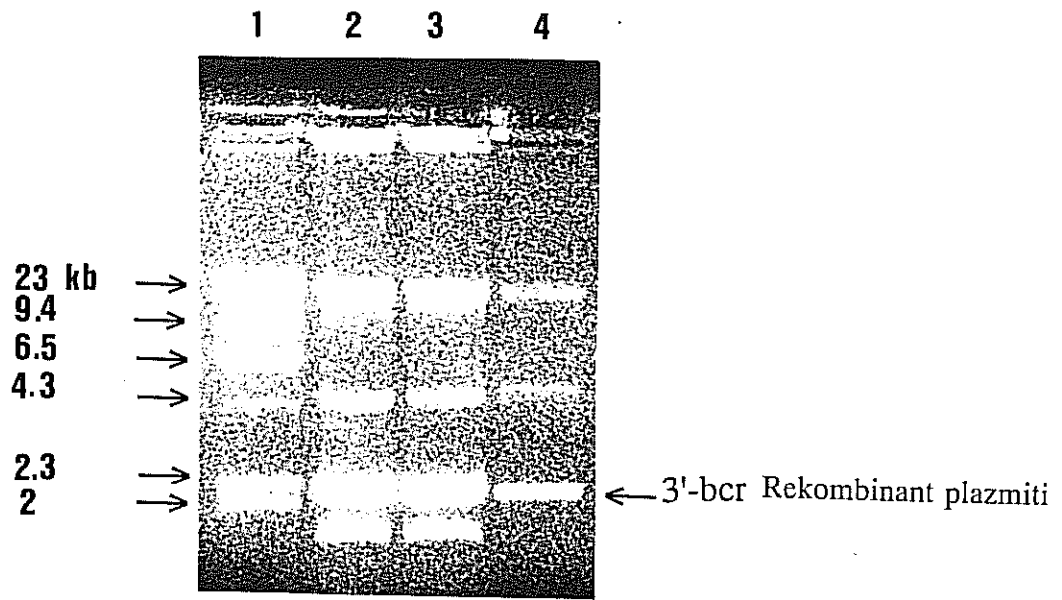


Şekil II.4.C. bcr-G/pUC rekombinant plazmiti ve içerdiği 0.6 kb'lik bcr-G prob DNA'sı
1. kuyu: 2.9 kb'lik Rekombinant plazmit
2. kuyu: Plazmitin PstI ve EcoR1 kesimleri sonrasında oluşan 0.6 kb'lik prob DNA'sı ve vektör

profil gösterilmektedir. Bu şekilde bcr-G probunun eldesinde agaroz kirliliğini en aza indirmek için kullanılan kuyuların birleştirilmesi yöntemi denenmiştir. Şekildeki gibi hazırlanan jel üzerinden geniş DNA bandının kesilmesi sonucu elde edilen prob içerisindeki agaroz kirliliği büyük ölçüde önlenmektedir. Şekil'de 1. kuyudaki plazmit cc DNA (çembersel) olduğundan ikinci kuyudaki kesim sonrası yürütülen plazmit DNA'ya (doğrusal) oranla jel üzerinde daha hızlı yürümüştür.

II.2.5. Prob DNA'nın Agaroz'dan Temizlenmesi

Düşük sıcaklıkta eriyebilen agaroz jelde yürütülerek ayrılan prob DNAsı. Gene Clean ya da yaygın yöntemlerden olan fenol/kloroform/izoamilalkol yöntemi ile temizlenmiştir. Bazı hallerde vektörün restriksiyon enzimleriyle kesim veriminin artırılması açısından izolasyon sonrası ek bir temizleme işlemine gerek duyulmuştur. Şekil II.5'de Gene Clean ile temizlenmiş olan 3'bcr rekombinant plazmitinin profili verilmektedir. Bu profilden de anlaşılacağı üzere temizlenen plazmit istenmeyen konfigürasyonlarından büyük ölçüde arındırılarak, ağırlıklı tek bir bant olarak elde edilmiştir.



Şekil II.5. Elde edilen plazmit DNA'sının Gene Clean kiti ile temizlenmesi
 1. kuyu: λ /HindIII marker DNA'sı
 2. ve 3. kuyu: Plazmit izolasyon sonucu (temizlemeden önce)
 4. kuyu: Gene Clean kiti ile temizlenmiş plazmit izolatı

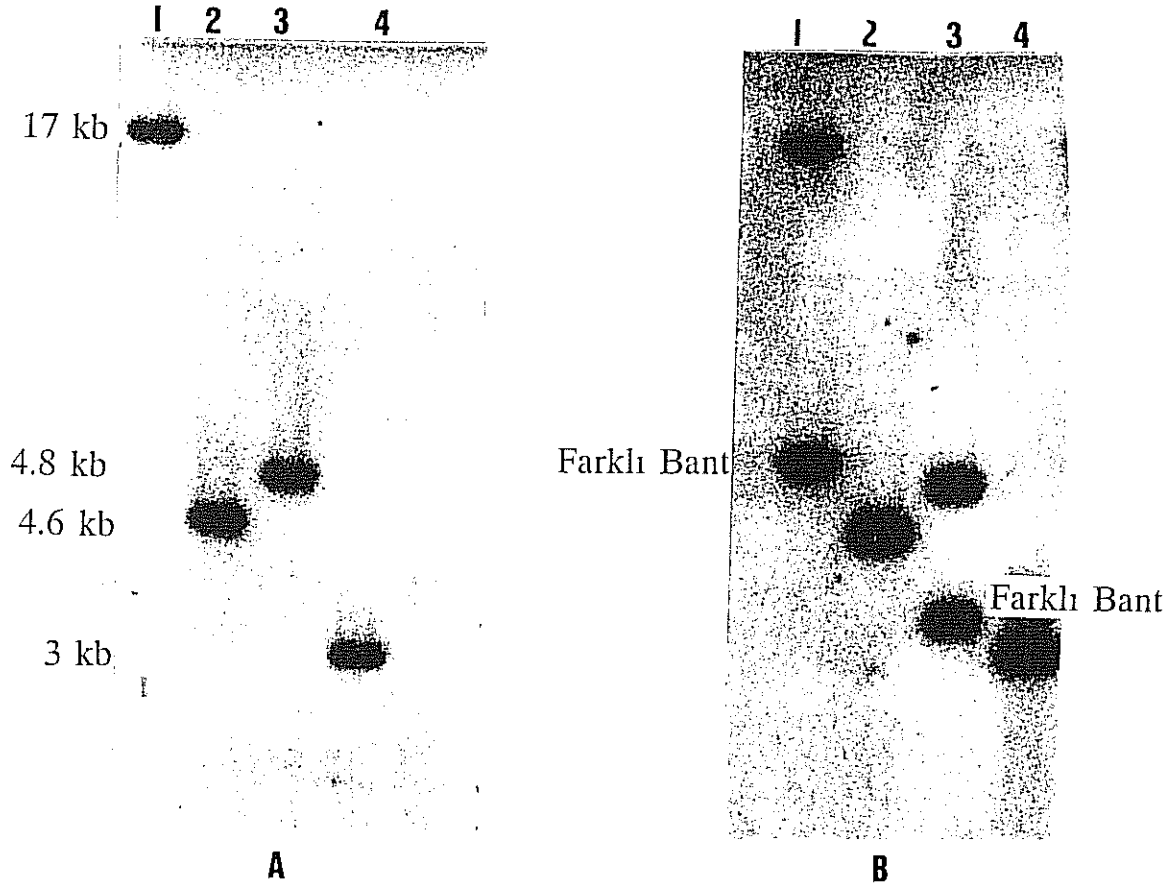
II.2.6. Prob DNA'ların Radyoaktif Olarak İşaretlenmesi

Bu amaçla Amersham "Mega Prime" DNA İşaretleme kiti kullanılarak prob DNAsı ³²P radyoizotopu ile işaretlenmiştir. Çalışmanın ilk dönemlerinde problemlerin işaretlenme verimi %10-20 arasında bulunmuş, ancak prob DNA'sının agaroz jelden yoğun tek bir bant şeklinde izole edilerek temizlenmesi ile, verimi yüksek (%85-90) işaretli problemler elde edilmeye başlanmıştır. Radyoaktif işaretlenme aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Radyoaktif Bağlanma Verimi (\%)} : \frac{\text{Bağlanan Radyoaktivite Miktarı (cpm)}}{\text{Toplam Radyoaktivite Miktarı (cpm)}} \times 100$$

II.2.7. Southern Blot Analizi ve Otoradyogram

Hibridizasyonda kullanmak amacıyla hazırlanan bütün Southern blot filtreleri EcoRI, Hind III, Bgl II, BamHI enzimleriyle kesilmiş olan normal DNA örneklerini de (Negatif kontrol) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Analiz sonuçlarının profilleri Şekil II.6.A'da görüldüğü gibidir. Şekildeki profil bcr-G prob DNA'sı ile hibridizasyon sonucunda elde edilmiştir. Buna göre normal DNA'nın EcoRI enzimiyle kesiminden elde edilen 17kb'lik bant 1. kuyuda, Hind III enzimiyle kesiminden elde edilen 4.6 kb'lik bant 2. kuyuda, BglII enzimiyle kesiminden elde edilen 4.8 kb'lik bant 3. kuyuda, BamHI enzimiyle kesiminden elde edilen 3.0 kb'lik bant 4. kuyuda görülmektedir. Bu profillerdeki herhangi bir değişiklik (farklı bir bant oluşumu) translokasyon belirteci olarak sayılır ve KML moleküler tanısını doğrular. Şekil II.6:B.'de hasta DNA'sının aynı reaksiyon enzimleri ile reaksiyona sokulması sonucunda EcoRI ve Bgl II enzim kesimlerinde görülen farklı bantlar translokasyon varlığını açıklamaktadır. Tablo II.3'te



Kullanılan prob : bcr-G

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

- 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)

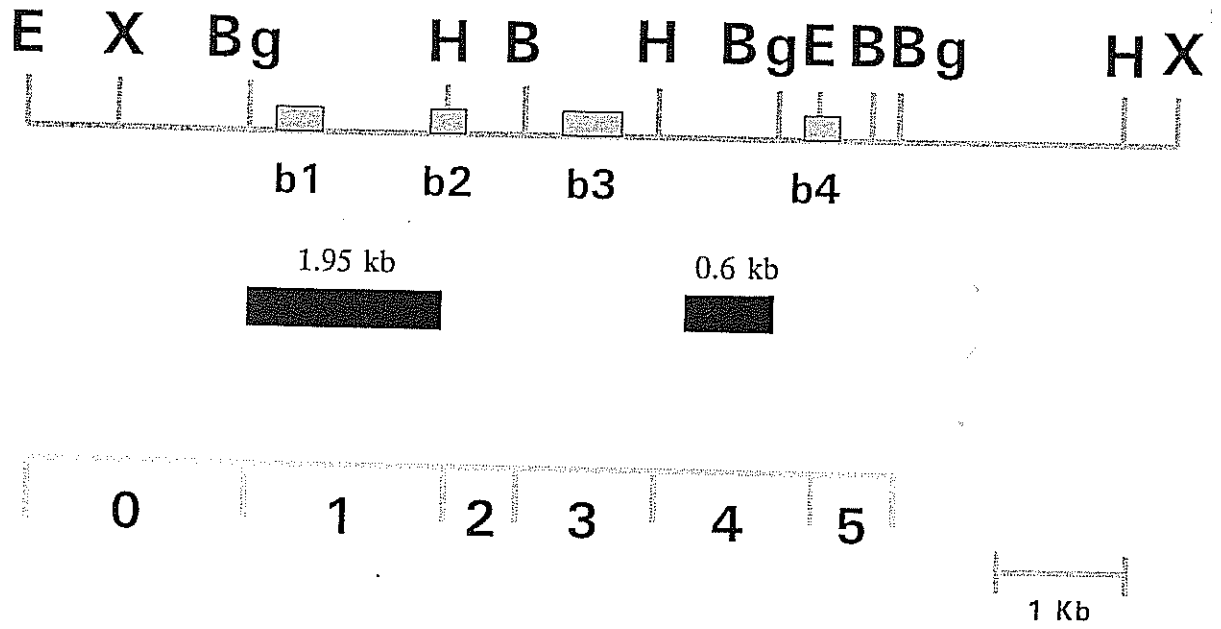
Hasta No	Translokasyon
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	-
7	-
8	+
9	-
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
15	+
16	+
17	+
18	+
19	+
20	-

Tablo II.3. Sitogenetik tanı konulan KML hastalarının DNA analiz sonuçları

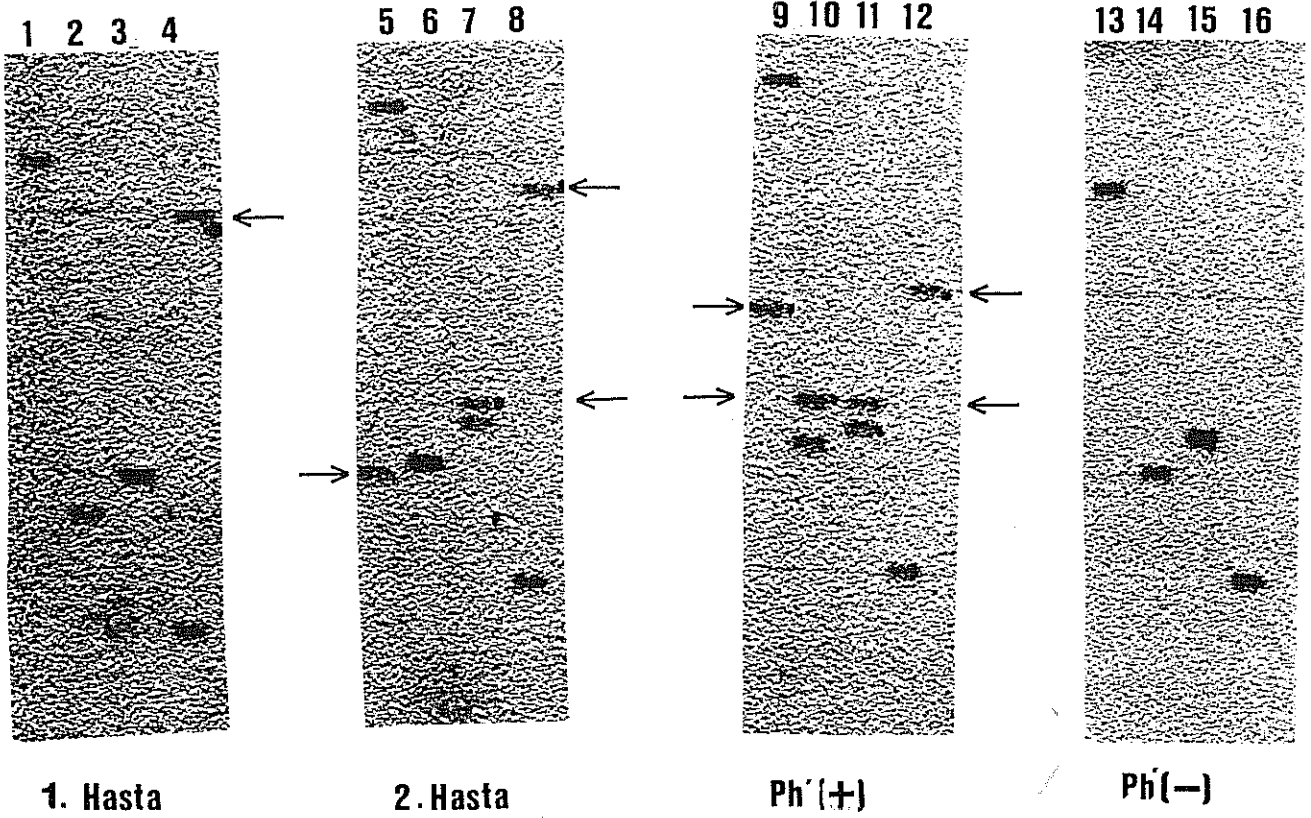
DNA analizlerinin sonuçları gösterilmektedir. Translokasyonun varlığının kesin olarak söylenebilmesi için birden fazla enzimin kullanımı gereklidir. Özellikle EcoR1 ve Hind III birlikte kullanıldığında hemen tüm kırılma bölgesi taranmış olmaktadır. Bgl II ve Bam H1 enzimleri ile translokasyon bölgesi hakkında daha detaylı bir bilgi edinmek de mümkün olmaktadır. Translokasyona neden olan kırılma bölgesi Şekil II.7'de 22. kromozomun restriksiyon haritasıyla karşılaştırılıp ayrıntılı olarak bulunabilir. Şekil II.8 ve 9 otoradyogram sonuçları verilen hastaların kesim profilleri haritadaki kesim bölgelerinin karşılaştırılmasıyla yorumlanmıştır. Buna göre elde edilen sonuçlardan bazıları Tablo II.4'de özetlenmiştir. Tablodaki (+) işaretler adı geçen enzim ile kesimde farklı bir bandın varlığını, dolayısıyla translokasyonun gerçekleştiğini, (-) işaretler ise böyle bir değişikliğin olmadığını göstermektedir. Tablonun son sütununda ise kırılmanın haritadaki 6 translokasyon bölgesinden hangisinin içinde olduğu verilmektedir. Bu tür detaylı bir çalışmanın hastalığın takibinde önemli olabileceği düşünülmektedir.

II.2.8. KML Hastalarının Klinik ve Moleküler Bulgularının Karşılaştırılması

Moleküler analizleri yapılan KML hastalarının aynı zamanda klinik ve sitogenetik bulguları ile tedavi şekilleri Tablo II.5'de özetlenmektedir. Tablodan anlaşılacağı üzere, sitogenetik ve moleküler analizler birbirini destekleyen yöndedir. Örneğin moleküler düzeyde translokasyon göstermeyen 6 ve 7 no'lu hastaların klinik bulguları hematolojik ve sitogenetik olarak remisyonda olduklarını göstermektedir. İlk tanıdan bu yana düzenli IFN tedavisi gören bu hastaların DNA örnekleri ile yapılan sitogenetik analizlerde 20 metafaz hücresinden hiçbirinde translokasyona rastlanmamıştır. 9 no'lu hastanın hematolojik remisyonda olması ve moleküler analizlerde translokasyon göstermemesine karşın sitogenetik analizlerde kullanılan kemik iliği örneğinde translokasyonun varlığı belirlenmiştir. Bu hastanın kan örneğinden elde edilen RNA ile yapılan RT-PCR sonuçları bcr/abl translokasyonun varlığını kesinleştirmiştir.



Şekil II.7. 22. kromozomun restriksiyon haritası ve translokasyona giren kırılma bölgeleri



1. Hasta

2. Hasta

Ph' (+)

Ph' (-)

→ : Farklı Bant

Kullanılan prob : bcr-G

Şekil II.8.

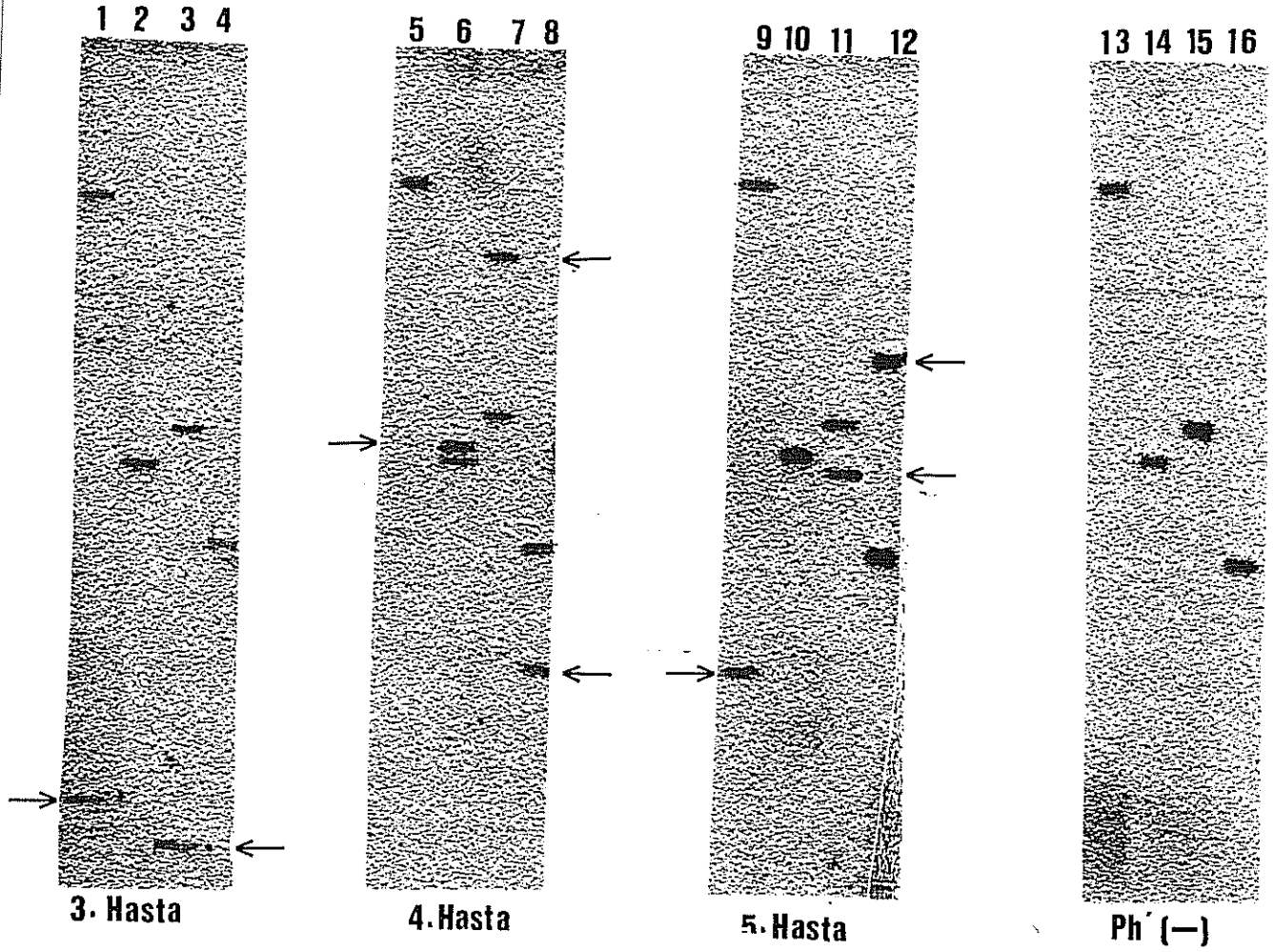
Otoradyogram örneği.

Kuyu 1-4: Sırasıyla EcoR1, Hind III, Bgl II ve BamH1 ile kesilmiş 1. hastanın DNA bantları.

Kuyu 5-8: Sırasıyla EcoR1, Hind III, Bgl II ve BamH1 ile kesilmiş 2. hastanın DNA bantları.

Kuyu 9-12: Sırasıyla EcoR1, Hind III, Bgl II ve BamH1 ile kesilmiş Ph' (+) kontrol DNA bantları.

Kuyu 13-16: Sırasıyla EcoR1, Hind III, Bgl II ve BamH1 ile kesilmiş Ph'(-) kontrol DNA bantları.



Kullanılan prob : bcr-G

Şekil II.9.

Otoradyogram örneği.

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

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

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

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

Hasta No	Restriksiyon Enzimleri				Translokasyon Bölgesi
	EcoR 1	Hind III	Bgl II	BamH1	
1	-	-	-	+	5
2	+	-	+	+	3
3	+	-	+	-	1 veya 2
4	-	+	+	+	5
5	+	-	+	+	3
6	-	-		-	Yok
7	-	-		-	Yok
8	+	-		+	3
9	-	-		-	Yok
10	+	-		-	0

Kullanılan Prob: Bcr-G

Tablo II.4. KML hastalarının farklı restriksiyon enzimleri ile DNA kesim sonuçları ve translokasyon oluşum bölgeleri

Hasta No	Hastalığın Durumu	IFN (+/-)	Sitogenetik Remisyon	Translokasyon
1	Hematolojik Remisyon	+	-	+
2	Kronik Faz	-	-	+
3	Kronik Faz	+	-	+
4	Kronik Faz	+	-	+
5	Kronik Faz	-	-	+
6	Hematolojik Remisyon	+	Tam Remisyon	-
7	Hematolojik Remisyon	+	Tam Remisyon	-
8	Kronik Faz	-	-	+
9	Hematolojik Remisyon	+	-	-
10	Kronik Faz	-	-	+

* Tam Remisyon: Sitogenetik analizlerde Ph'nin görülmemesi.

Tablo II.5. KML'li hastaların sitogenetik ve moleküler tanı sonuçları.

BÖLÜM III

SONUÇ

III.1. TARTIŞMA

Bu çalışmada, klinik tanısı yapılmış KML hastalarında Southern blot yöntemi kullanılarak translokasyonun DNA düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır. Proje sonucunda KML'deki translokasyonun en detaylı şekilde DNA düzeyinde incelenebilmesi mümkün olmuş, güvenilir bir moleküler tanı ve takip için gerekli tüm alt yapı ve bilgi birikimi sağlanmıştır. Yöntemin gerektirdiği bu tür altyapının sağlanması ve işlemlerin çalışır hale gelmesi bundan sonra yapılacak benzer çalışmalarda da yararlı olacaktır. Çalışmanın başlangıcında her ne kadar KML hastalarında interferon tedavisinin etkisinin moleküler düzeyde izlenmesi istenmiş ise de, kan örneklerinin yeterli sayıda olmayışı ve birçok hastanın tedavi öncesi kan örneklerinin bulunamayışı gibi nedenlerle bu tür bir bilgiye ulaşılamamıştır. Kan örneği elde edilebilen hastaların bir çoğu zaten değişik tedaviler görmüş ve bu arada interferon uygulanmış hastalardı. Ancak ilginç bir nokta olarak, translokasyonun moleküler düzeyde görülmediği birkaç durumda hastanın interferon tedavisi görmüş ve tam remisyona girmiş olduğu klinisyenler tarafından belirtilmiştir (Tablo II.5). Tablodaki sonuçlarda sitogenetik açıdan tam remisyon gösteren iki hastanın (6 ve 7 no'lu hastalar) Southern blot yöntemi ile yapılan analizlerde de translokasyon göstermediği anlaşılmıştır. Eğer Southern blot ile translokasyon görülüyorsa bu;

- Translokasyonun, kullanılan probun (bcr-G) taradığı m-bcr bölgesi dışında gerçekleşmesi,
- Hasta hücre sayısının başlangıca oranla Southern blot yöntemi ile

belirlenemeyecek düzeye inmesi,

- Örneklerin %10 olasılıkla Philadelphia negatif, Ph(-) KML hastalarına ait olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmada ilk olarak KML'li hastaların kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla denenen birkaç yöntemden DNA verimi en yüksek olan seçilmiş ve uygulanmıştır (Bölüm II.1.3). Yöntem esas olarak Maniatis ve arkadaşlarının önerilen yöntemi (Maniatis, 1989). Elde edilen DNA'ların saflik tayini spektrofotometrik yöntemle OD_{260}/OD_{280} oranına bakılarak yapılmıştır. Bu oranın yaklaşık 1.8 olması beklenmektedir. İstenen bu oranın üstünde veya altında okunan örneklerde RNA veya protein kirliliğinden şüphelenilmiştir. Bu gibi durumlarda izole edilen DNA 1 hacimlik %99 etanol eklenmesiyle gökürülüp yıkanarak temizlendikten sonra restriksiyon enzim kesimlerinde kullanılmıştır. DNA izolasyon yöntemi her hastada aynı verimi göstermemiş, hatta bazı hastalardan hiç DNA elde edilememiştir. Bunun da hastaya uygulanan kemoterapi ile bir ilgisi olabileceği düşünülmektedir.

1

Southern blot yöntemiyle DNA analizi için uygun restriksiyon enzimleri seçilmiş ve kesim reaksiyonunun gerektirdiği koşullar ayarlanmıştır. Bu ayarlarda önemli parametrelerden biri enzim miktarıdır ve μg DNA başına 2-3 ünite enzimin yeterli olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, reaksiyonda kullanılan enzim tamponu toplam hacmin $1/10$ 'nu geçmeyecek şekilde eklenmiştir.

Bununla birlikte, başarılı bir kesim reaksiyonu için en önemli etkenin DNA temizliği ve konsantrasyonu olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla başarılı bir kesim için DNA izolasyon yöntemi önem taşımaktadır. Ayrıca reaksiyon hacmi iyice küçültülerek enzimlerin verimi artırılmıştır. Hasta DNA örneklerinde bcr/abl translokasyonunu belirleyebilmek amacıyla major kırılma bölgesinde (m-bcr) kesim noktaları olan restriksiyon enzimleri özellikle seçilmiştir. Bunlardan EcoR1, Hind III, Bam HI ve Bgl II enzimleri kullanıldığında bcr-G probu kırılma bölgesinin m-bcr üzerindeki yerini bile belirleyebilmektedir.

I

Southern blot sonrasında, belirtilen enzimlerle kesilen DNA'lar işaretli bcr-G probu ile hibridize edildiklerinde, otoradyogramda farklı boyutta yeni bantlar vererek kırık bölgenin yerini belirtmektedir. Burada önemli bir nokta, bcr bölgesi içinde yer alan ve rastlantısal olarak restriksiyon enzim kesim bölgesine denk gelebilen polimorfik yerlerdir. Hatalı pozitif sonuçlar verebilen bu gibi olasılıkları ortadan kaldırmak için araştırmada birden fazla sayıda restriksiyon enzimi kullanılması ayrıca önem taşımaktadır.

Otoradyogramların incelenmesi sonucu KML'li hastaların çoğunda translokasyona rastlanmıştır. Birkaç hastada translokasyon görülmeşi değişik nedenlere bağlı olabilir. Daha önce de bahsedildiği 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 RT-PCR yöntemi çok yararlıdır. Örneğin, erken tanı ve düzenli interferon tedavisi sonucu klinik olarak remisyonunda görünen iki hastada Southern blot yöntemi ile belirlenemeyen translokasyonun varlığı, RT-PCR yöntemi ile gösterilmiştir (6 ve 7 No'lu hastalar Tablo II.5).

Translokasyonun belirlenememesinin diğerk bir nedeni de kırık bölgenin bcr-G probu ile gösterilemeyişı olabilir. Eğer kırık, 22. kromozomun restriksiyon enzim haritasında gösterilen 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.

Southern blot transferinin gerçekleştirilmesinde daha hızlı olmasından dolayı zaman zaman transvac blot aleti (Şekil II.1) kullanılmış, ancak hibridizasyon sonrasında, yapılan DNA transferlerinin homojen olmadığı anlaşılmıştır. Bunun üzerine verimli bir aktarım sağlayabilen klasik yöntem (Şekil I.5) yeniden dönülmüştür. Ancak, aktarımın yapıldığı filtre kağıtlarının kurutulmadan torbalanmasının, gerek hibridizasyon verimini artırması, gerekse aynı kağıtların temizlenip yeniden hibridizasyona sokulabilmesi için yararlı olduğu görülmüş, bu filtrelerin nemli olarak +4°C'de saklanması yoluna gidilmiştir.

Projenin başlangıcında bcr/abl translokasyonunu araştırmak amacıyla 4 ayrı prob DNA'sı denenmiş, 3'-bcr probunun radyoaktif olarak verimli bir şekilde işaretlenemediği anlaşılmıştır. Universal probun saflaştırılmasındaki güçlükler, 5'-bcr prob DNA'sı ile yapılan çalışmaların ise hem detaylı bilgi vermediği hem de hibridizasyonda kirliliğe neden olması gözönüne alınarak işaretleme verimi en yüksek (%80) ve en ayrıntılı bilgi veren bcr-G probunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Filtrenin radyoaktif işaretli problemlerle hibridizasyonu sırasında solüsyon içerisine katılan %0.6'lık Polietilenglikolün hibridizasyon verimini %100

arttırdığı anlaşılmış, yine aynı solüsyon ile yapılan ön-hibridizasyonda önceleri 1 saat olan süre 4 saate kadar uzatılmıştır.

Hibridizasyon sonunda filtrelerin daha uzun sürelerde yıkanması ve bu yıkamaların hep 65°C'de gerçekleştirilmesi, ortaya çıkan özgün olmayan hibridizasyonun giderilmesini, dolayısıyla da daha temiz bir geri plan üzerinde kolay görülebilen bantların oluşmasını sağlamıştır.

Çalışmada kullanılan hasta kan örnekleri, sayı bakımından Türk toplumunda görülen kırılmaların yoğunlaştığı bölgenin belirlenmesinde yeterli değildir. Ancak epigenetik faktörlerin kırılma bölgeleri ile olası ilişkisi olduğu farklı gruplarca incelenmiştir (Dyek, 1989; Morris, 1989; Morris, 1990). Çalışmada kullanılan örneklerin istatistiksel analizlerde kullanılacak sayıya çıkartılması bu tür bir sonucun elde edilmesini ileride sağlayabilecektir.

Kan örnekleri alınan hastaların hemen hepsi büsulfan veya interferon gibi sitotoksik ilaçlar ya da radyoterapi aldıktan sonra analiz edildiğinden tanı aşamasındaki durumları moleküler düzeyde incelenememiştir. Literatürde kombine terapi olarak adlandırılan ve kemoterapi ile birlikte kemik iliği nakli (BMT) yapılan kişilerde hastalığın tedavi takibi Southern blotun yanında Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile yapılan çalışmalarla gerçekleştirildiği bilinmektedir (Gobert, 1989; Roth, 1989; Hughes, 1991; Lange, 1991). Bunun nedeni kemik iliği nakli ve kombine terapi sonrasında oldukça az sayıda da olsa naklin 2-3. ayında bcr/abl translokasyonunu içeren hücrelerin varlığıdır (Kawasaki, 1988; Hughes, 1990) Bu hücreler çok az sayıda olmalarından dolayı Southern blot yöntemi ile saptanamamaktadırlar. Bu nedenle laboratuvarımızda Southern blot

yönteminden çok daha hassas olan RT-PCR yöntemiyle de KML translokasyonunun incelenmesine başlanmıştır. Uygun primerler kullanılarak kırık bölgenin amplifikasyonu sonucunda elde edilen bcr/abl DNA ürününün uzunluğuna göre kırılmanın olup olmadığı, hatta kırılma varsa bcr bölgesindeki ekzon 2 den sonra veya ekzon 3 ten sonra olduğu (Şekil I.3) bu yöntemle kolayca anlaşılabilir.

Translokasyon bölgesine giren kırılmaların hastalığın prognozu açısından önem taşıdığı bilinmekle birlikte, bu konuda hala çelişkili bulgular ortaya atılmaktadır. Opalka ve arkadaşlarının (Opalka, 1991) yaptığı çalışmalarda α -interferon tedavisi gören hastalarda kırılmalarla hastalığın evre ve yaşam süresini etkileyen prognozu arasında bir etkileşim görülemedi. Ancak kırılmanın bcr'in 2. ve 3. ekzonundan sonra olmasına bağlı olarak, farklı prognoz gösterdiğini ileri süren araştırmacılar da vardır (Mills, 1991). Son yıllarda birçok grup tarafından yapılan çalışmalarda 3.ekzonun varlığı ve yokluğu ile çeşitli parametreler (kronik faz süresi vs.) arasındaki bağlantı incelenmiştir (Dobrovic, 1988; Morgan 1989; Dobrovic, 1991; Vanderplas, 1991; Lion, 1992; Fioretos, 1993).

III.2. ÖNERİLER

Kronik Myeloid Lösemide bcr/abl füzyon geninin tanımlanmasında en ayrıntılı ve kesin sonuç, hastalığın hem nükleik asid düzeyinde (DNA ve RNA) hem de protein düzeyinde incelenmesi ile olmaktadır. Bu çalışmada uygulanan Southern blot yöntemi toplam 20 KML hasta kanı üzerinde denenerek laboratuvarımızda moleküler tanı yapılmıştır. KML hastalığında Türk toplumuna özgün kırılma bölgelerinin belirlenebilmesi amaçlanırsa çok sayıda kan örneği ve değişik problemler kullanmak gerekli olacaktır. Bu arada

çok daha hassas ve verimi yüksek bir yöntem olan PCR çalışmalarına geçilmiştir. Deneme amacıyla değişik hastalardan izole edilen RNA'lar RT-PCR ile çoğaltılarak incelenmiştir. Bundan sonra bu yönteme ağırlık verilmesi düşünülmektedir. Bu yöntem sayesinde tedavi sonrasında hasta hücre kalıp kalmadığı daha yüksek bir hassasiyetle belirlenebilecektir.

Çalışmanın daha yararlı olabilmesi açısından incelenen hastaların tedavi öncesi ve tedavi sırasında belli aralıklarla analize tabi tutulmasının gerekli olduğu ve bu nedenle Hacettepe Onkoloji Enstitüsü ile daha sıkı bir iletişime girilmesine karar verilmiştir.

KAYNAKLAR

- Bartram C.R., de Klein A, et al., Translocation of the c-abl oncogene correlates with the presence of a philadelphia chr. in CML, 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).
- Bitter M.A., Le Beau M.M., Rowley J.D., Associations Between Morphology, Karyotype, and Clinical Features in Myeloid Lukemias. Hum Pathol. 18, 211-225, (1987).
- 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).
- 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 Lancet, 2: 1125-28, (1989).

- Goldman J.M, Zydlo R., et al., Choise of Pretransplant Treatment and Timing of Transplants for CML in Chronic Phase, Blood, 82, 2235, (1993).
- 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).
- 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).
- Hughes T.P., Biological Importance al Residual Leukemic Cells after BMT for¹CML, 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).
- H.Van den Berghe, Mecucci C., Some Karyotypic Aspects at Human Leukemia, Haematology and Blood Transfusion, 31, 1710175, (1987).
- Kawasaki E.S., Clork S.S., Coyne M.Y., et al. Diognosis 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 on Associated Tyrosine Protein Kinase Activity, Virology, 140, 230, (1985).
- Koeffler P, Golde D.W., CML New Concepts, New England J of Medicine, 304, 1201-1209, (1981).
- Konopka J.B., Watanabe S.M., Wilte O.N., An Alteration of the Human c-abl Protein in K562 Leukemia Cells Unmasked Associated Tyrosine Kinase

- Activity, Cell, 37, 1035, (1984).
- Konopka, J.B., Watanabe, S.M., Singer J.W, Cell Lines and Clinical Isolates Derived from Ph (+) CML Patients Express c-abl Proteins with Common Structural Alterations, PNAS, 82, 1810, (1985).
- Konopka J.B., Witte O.N., Detection J. 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).
- Leibowitz, D., Schaefer R., Popenoe, D. W et al., Variable Breakpoints on Ph Chromosome in CML Blood 66, 243 (1985).
- 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).
- 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 Subtypes 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).
- Missawa S., Horry I.K.S., Kannivaki M. et.al Prefixatron treatment with EtBr for high resolution binding analysis of chromosom for cultured human Bonn Marrow Cells, Cancer Genet. Cytogenet., 22: 319, 1986.
- Mitelman F., Catolog et al., Chromosome Abberations in Cancer, in Sandberg AA, Progress and Topics in Cytogenetics, Vol 5, New York, Liss, (1985).
- Morgan G.J., PCR for Detection of Residual Leukemia, The Lancet, 928-930, (1989).
- Morris C.M., Reeve A.E, et al., Genomic Diversity Correlates with Clinical Varration 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 Blast 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).
- Opalka B., Wandl U., Beer U., Roggenbuck U., Kloke O., Niedele 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).

- Rabbitts T.H., Chromosomal Translocations in Human Cancer, Nature, 372, 143-149, (1994).
- Rabbitts T.H., Boettim T., Adv. Immun., 50, 119-146, (1991).
- 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., 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).
- Schaefer-Rego, K., Dudek, H., et al., CML Patients in Blast Crisis have Breakpoints Localized to a Specific Region of the bcr Blood 70, 448 (1987).
- Shtalrid, M, Talpaz, M, et al., Ph(-) CML with bcr Rearrangement S. Clin Oncol, 6, 1569, (1988).
- Shtivelman E., bcr-abl RNA in Patients with CML, Blood, 69, (1987).
- Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R.P., Canoani E., Fused Transcript of abl and bcr Genes in Chronic Myelogenous Leukemia, Nature, 315, 550, (1985).
- 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).
- Van der Plas, D.C, Hermans, A.B.C. et al., Cytogenetic, and Molecular Analysis in Ph(-) CML, Blood 73, 1938, (1989).
- Van der Plas D.C., bcr-abl mRNA Lacking abl Exon A2 Detected by PCR in CML, Leukemia, 5, 457-461, (1991).
- Yunis J.J., New Chromosomal banding techniques in the Study of Human Neoplasia, Human Patology, 12: 540, 1981.

Proje ile İlgili Yurtiçi Tebliğler:

- Eren, E., Aytaç, U. ve Gündüz, U., "Radyoaktif Problar ve Polimerazla Zincirleme Reaksiyon (PCR) Yöntemi ile Onkogen Mutasyonlarının 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 Patients by Molecular Biology Methods (2. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Eylül 1992, Ankara) Poster Özetleri, 1,71.

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: TAG-0760

2- Rapor Tarihi: 1.3.1994

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.9.1992-1.4.1994

4- Projenin Adı: Kronik Myeloid Lösemili Hastalarda DNA Düzeyindeki Değişikliklerin Tanımlanması

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof.Dr. Ufuk GÜNDÜZ (Yürütücü)
Arş.Gör. Uğur AYTAÇ (araştırmacı)
Arş.Gör. Emel EREN (araştırmacı)6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, İnönü Bulvarı,
Biyoloji Bölümü, 06531 ANKARA

7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK-Tıp Araştırma Grubu

ÖZ

Kronik Myeloid Lösemili (KML) hastaların %90'ında görülen Philadelphia kromozomu (Ph⁺) DNA'daki özel bir translokasyonun sonucudur. 9. ve 22. kromozomlar arasında oluşan translokasyon, c-abl protoonkogenini 22. kromozomun bcr denilen bölgesine taşıyarak "bcr-abl" adı verilen hibrit bir gen meydana getirmektedir. Bu hibrit genin, yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahip bir protein kodladığı bilinmektedir. Bu çalışmada, KML'nin patogeneğinde çok önem taşıyan değişikliklerin moleküler biyoloji teknikleri uygulanarak tanımlanması amaçlanmıştır. Klinik tanısı konulmuş KML'li hasta kanlarından yapılan DNA izolasyonundan sonra bu DNA'lar radyoaktif olarak işaretlenmiş prob DNA'lar ile hibridizasyona sokularak (Southern blot yöntemi) bcr/abl translokasyonunun 22. kromozomdaki kırılma bölgeleri belirlenmiştir. DNA'daki translokasyonların varlığı ve yerinin saptanmasında kullanılan Southern blot yöntemi, KML tanısı ve tedavi takibinde hassas ve güvenilir bir yöntem olduğu gibi, özel translokasyon gösteren diğer kanserlerde de yararlı olacak bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Philadelphia Kromozomu, Kronik Myeloid Lösemi, Translokasyon, Southern Blot Yöntemi,

9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler

1. Ulusal Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, Eylül 1994, Ankara, Poster Özetleri, 34.
8. KÜKEM Kongresi, Ekim 1993, Ankara, KÜKEM Dergisi, 16:2,3.
2. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Eylül 1992, Ankara, Poster Özetleri, 1,71.

10- Bilim Dalı: Moleküler Genetik

Doçentlik B. Dalı Kodu: 4010302

ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

11- Dağıtım (*): Sınırlı Sınırsız

12- Raporun Gizlilik Durumu :

 Gizli Gizli Değil

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