

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKUT VE KRONİK LÖSEMİLİ (AML,KML) ve
MYELODİSPLASTİK SENDROMLU (MDS)
HASTALARDA NUP98-HOX GENLERİNİN
OLUŞTURDUĞU KİMERİK GENLERİN mRNA
ÜRÜNLERİNİN SAPTANMASI**

GİZEM AYNA

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

İZMİR-2006

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

**AKUT VE KRONİK LÖSEMİLİ (AML,KML) ve
MYELODİSPLASTİK SENDROMLU (MDS)
HASTALARDA NUP98-HOX GENLERİNİN
OLUŞTURDUĞU KİMERİK GENLERİN mRNA
ÜRÜNLERİNİN SAPTANMASI**

GİZEM AYNA

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
YRD. DOÇ. DR. OGÜN SERCAN

Bu araştırma 2005.KD.SAG.017 nolu proje içerisinde desteklenmiştir.

Bu araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Şubesi tarafından 2005.KD.SAG.017 sayı ile desteklenmiştir.

“Akut ve Kronik Lösemili (AML,KML) ve Myelodisplastik Sendromlu (MDS) Hastalarda NUP98-HOX Genlerinin Oluşturduğu Kimerik Genlerin mRNA ürünlerinin Saptanması” isimli Yüksek Lisans Tezi, 24/08/2006 tarihinde değerlendirilerek kabul edilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Yrd.Doç.Dr. Ogün SERCAN

Jüri Başkanı

Yrd.Doç.Dr.Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU

Jüri Üyesi

Doç.Dr.Kemal KORKMAZ

Jüri Üyesi

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyim ve bilgilerini bana aktaran, emeğini ve zamanını harcayarak tez çalışmamın başarıyla sonuçlanmasında katkısı olan danışman hocam Yrd. Doç. Ogün Sercan'a, laboratuvar çalışmalarımnda desteğini ve yardımlarını hiç esirgemeyen Dr. Sefa Kızıldağ'a, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.'da görev yapan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma, manevi desteğini benden esirgemeyen yakın arkadaşlarıma, en zor zamanlarımda her an yanımda olan anneme, babama, ağabeyime, yengeme ve diğer aile yakınlarıma çok teşekkür ederim.

Gizem AYNA

2006

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER LİSTESİ	i-ii
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v-vi
ÖZET	1
SUMMARY	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3-4
2. GENEL BİLGİLER	5-24
2.1 Lösemiler	5-6
2.1.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)	6
2.1.2. Akut Myeloid Lösemi (AML)	6
2.1.3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)	6
2.1.4. Akut Lenfositik Lösemi (ALL)	7
2.1.5. Myelodisplastik Sendromlar (MDS)	7
2.1.6. Myeloproliferatif Hastalıklar (MPH)	7
2.2. Kök Hücreler ve Lösemik Transformasyon	7-8
2.3. Ökaryotik Hücre Çekirdeğinin Yapısı	8-9
2.4. Nükleer Por Kompleksleri (NPK)	9-12
2.5. Nükleoporin 98 (NUP98) Geni ve Proteini	12-13
2.6. Homeobox (HOX) Genleri ve Proteini	13-15
2.6.1. Sınıf 1 Genler	15
2.6.2. Sınıf 2 Genler	15
2.6.3. Hematopoezde HOX genleri	16
2.6.4. Homeobox Genlerinin Lösemik Transformasyondaki Etkileri	16
2.7. NUP98 Geni ile Translokasyon Sonucunda Biraraya Gelen Genler	16-17
2.7.1 NUP98 Geni ve Homeobox Olmayan Ortak Genler	17
2.7.1.1. NUP98 ve DDX10 Ortak Geni	18-19
2.7.2 NUP98 Geni ve Homeobox Ortak Genler	19
2.7.2.1. NUP98/HOXA Sınıfı Füzyon Genleri	19
2.7.2.1.1. NUP98 ve HOXA9 Ortak Geni	19-20
2.7.2.1.2. NUP98 ve HOXA11 Ortak Geni	20
2.7.2.1.3. NUP98 ve HOXA13 Ortak Geni	20-21

2.7.2.2. NUP98/HOXC Sınıfı Füzyon Genleri	21
2.7.2.2.1. NUP98 ve HOXC11 Ortak Geni	21-22
2.7.2.2.2. NUP98 ve HOXC13 Ortak Geni	22
2.7.2.3. NUP98/HOXD Sınıfı Füzyon Genleri	22
2.7.2.3.1 NUP98 ve HOXD11 Ortak Geni	23
2.7.2.3.2. NUP98 ve HOXD13 Ortak Geni	23-24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25-35
3.1. Örnekler	25-26
3.2. Yöntemler	27-35
3.2.1. Mononükleer Hücre Ayırımı	27
3.2.2. NUCLEOSPIN RNA® II Kiti ile Toplam RNA Saflaştırma Yöntemi	27-28
3.2.3. Saflaştırılan RNA Materyalinin Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Kalitesinin Belirlenmesi	28
3.2.4. Komplementer DNA (cDNA) Reaksiyonu	28-29
3.2.5. RT-PCR Reaksiyonları	29-30
3.2.5.1. RT- PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler ve Reaksiyon Koşulları	31-35
3.2.5.1.1. β -AKTİN	31
3.2.5.1.2. NUP98-HOXA9	31-32
3.2.5.1.3. NUP98-HOXA11, NUP98-HOXA13, NUP98-HOXC11, NUP98-HOXD11, NUP98-HOXD13	32-33
3.2.5.1.4. NUP98-HOXC13	33-34
3.2.5.1.5. NUP98-DDX10	34
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle Görüntüleme	34-35
4.BULGULAR	36-37
4.1. RT-PCR Sonuçları	36
4.1.1. β -Aktin Geninin Ürününün Çalışılan Hastalarda Saptanması	36
4.1.2. Kimerik Genlerin Ürünlerinin Çalışılan Hastalarda Saptanması	36-37
5. TARTIŞMA	38-41
6.KAYNAKÇA	42-46

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: NUP98'in Ortak Genleri ile Meydana Getirdiği Füzyon Genler ve Lösemi Tipleri ile İlişkisi	17
Tablo-2: Tez Çalışmasında Kullanılan Hastalar ve Lösemi Tanıları	25
Tablo-3: cDNA Reaksiyonunda Kullanılan Maddeler ve Son Konsantrasyonları	29
Tablo-4: İzlenen cDNA Reaksiyonu Koşulları	29
Tablo 5: RT-PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Maddeler ve Son Konsantrasyonları	30
Tablo 6: Tez Kapsamında Çalışılan Hastalarda NUP98-Ortak Gen Tayini	37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: Hematopoetik farklılaşma. Hematopoetik kök hücreler, lenfoid öncül, miyeoid öncül ve olgun kan hücreleri.	5
Şekil-2: Myeloid lösemi gelişimi	8
Şekil-3: Ökaryotik hücre çekirdeği yapısı	9
Şekil-4: <i>Xenopus</i> oositlerine ait nükleer por kompleks görüntüsü	10
Şekil-5: Nükleer eksport (çekirdekten sitozole taşınım) mekanizması	11
Şekil-6: Nükleer import (sitozolden çekirdek içine taşınım) mekanizması	12
Şekil- 7: Nükleoporin98 (NUP98) proteininin yapısı	13
Şekil-8: <i>Drosophila</i> ve insanda HOX genleri	14
Şekil-9: Homeobox (HOX) proteini ve geninin yapısı	15
Şekil-10: DDX10 proteini ve fonksiyonel alanları	18
Şekil-11: Çalışılan hastalarda rastlanan iki tip NUP98-DDX10 kimerik proteini	19
Şekil-12: NUP98-HOXA13 kimerik proteini	21
Şekil-13: NUP98-HOXC11 kimerik proteini	22
Şekil -14: NUP98-HOXC13 kimerik proteini	22
Şekil -15: NUP98-HOXD11 kimerik proteini	23
Şekil- 16: Çalışmamızın genel akış şeması	26
Şekil-17: Sırasıyla Tablo-4’de gösterilen hastaların β -Aktin bantları	36
Şekil-18: NUP98-DDX10 kimerik genine ait primerler ile elde edilen bantlar	40

KISALTMALAR

Ph:	Philadelphia Kromozomu
NUP98:	Nükleoporin 98
NPK:	Nükleer Por Kompleks
FG:	Fenilalanin-Glisin
GLE2:	mRNA Eksport Faktör
RNP:	Ribonükleoprotein (RNA+Protein kompleksi)
KML:	Kronik Myeloid Lösemi
KLL:	Kronik Myeloid Lösemi
AML:	Akut Myeloid Lösemi
ALL:	Akut Myeloid Lösemi
MDS:	Myelodisplastik Sendrom
MPH:	Myeloproliferatif Hastalıklar
HOX:	Homeobox
DDX10:	RNA Helikaz Enzimi
DEAD:	Asp-Glu-Ala-Asp
RT-PCR:	Ters-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
t-AML:	Terapiye Bağımlı (Sekonder) Akut Myeloid Lösemi
t-MDS:	Terapiye Bağımlı (Sekonder) Myelodisplastik Sendrom
FAB Sınıflandırması:	Fransız-Amerikan-İngiliz Sınıflandırması
ET:	Esansiyel Trombositoz
MF:	Myelofibroz
rRNA:	Ribozomal RNA
snoRNA:	Küçük Nükleolar RNA
NES:	Nükleer Eksport Sinyali
NLS:	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NUP:	Nükleoporin
GLFG:	Glisin-Lösin-Fenilalanin-Glisin
snRNA:	Küçük Nükleer RNA
TALE:	“three-aminoacid loop xtension”
CD34+:	“Cluster of Differentiation 34+”
TOP1:	Topoizomeraz 1 Enzimi

inv: Inversiyon
t: Translokasyon
aa: Aminoasit

ÖZET

AKUT VE KRONİK LÖSEMİLİ (AML,KML) VE MYELODİSPLASTİK SENDROMLU (MDS) HASTALARDA NUP98-HOX GENLERİNİN OLUŞTURDUĞU KİMERİK GENLERİN mRNA ÜRÜNLERİNİN SAPTANMASI

Gizem AYNA

İnsan lösemilerinde NUP98 geninin, translokasyonlar sonucunda kimerik gen oluşturduğu pekçok gen bulunmaktadır. Tez kapsamında Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Hastanesi, çevre iller ve İzmir içindeki diğer hastanelerden laboratuvarımıza gelen lösemi, myelodisplastik sendrom (MDS) ve myeloproliferatif hastalık (MPH) ön tanılı hastaların kemik iliği örneklerinde NUP98'in homeobox genleri (HOXA9, HOXA11, HOXA13, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13) ve RNA helikaz enzimini kodlayan (DDX10) geni ile birlikte meydana getirdiği füzyon ürünlerinin varlığı araştırıldı. Hastaların kemik iliği örneklerinden toplam RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra RNA'lar komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. β -aktin geni internal kontrol olarak kullanıldı. Hastaların cDNA örnekleri kullanılarak yapılan RT-PCR deneyleri sonucunda, çalışılan tüm hastalarda β -aktin gen ürünü saptandı. Hedeflenen genlerin varlığını araştırmak üzere literatürden araştırılarak 17 adet primer ısmarlandı ve bu primerler kullanılarak cDNA örnekleri RT-PCR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. NUP98-HOX genlerinin ürünlerinin tarandığı 34 hastada ve NUP98-DDX10 geninin ürününün tarandığı 30 hastada füzyon transkriptlerine rastlanmadı.

Anahtar Kelimer: Lösemi, translokasyon, NUP98, HOX, DDX10, kimerik gen, RT-PCR.

SUMMARY

DETECTION of mRNA PRODUCTS WHICH ARE PRODUCTS OF CHIMERIC GENES OCCURED BY TRANSLOCATION BETWEEN HOX AND NUP98 GENES IN PATIENTS DIAGNOSED AS HAVING ACUTE/CHRONIC LEUKEMIA (AML,CML,) and MYELODISPLASTIC SYNDROME (MDS)

Gizem AYNA

As a results of chromosomal translocations, NUP98 and various partner genes were shown to form fusion products in human leukemias. Bone marrow samples of leukemia, myelodysplastic sendrome (MDS), and myeloproliferative disease (MPD) patients , sent to our laboratuary from the Dokuz Eylul University hospital and other hospitals in İzmir, were used in this study. The presence of NUP98- HOX (HOXA9, HOXA11, HOXA13, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13) fusion products as well as NUP98-DDX10 fusion products were investigated. Cellular total RNA was extracted from the bone marrow mononuclear cells and complemener DNA reaction was set up to obtain double strand DNA. The β -actin gene product was used as internal control. The cDNA products were amplified by PCR using 17 different primer sets selected from medical literature.The β -actin internal control was found positive in all reactions.

In conclusion, NUP98-HOX fusion gene products were found to be negative in 34 patients tested while the NUP98-DDX10 products were negative in the total of 30 patients tested.

Key Words: Leukemia, translocation, NUP98, HOX, DDX10, chimeric gene, RT-PCR.

1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Genetik anomalileri açısından insan kanserleri içerisinde en yaygın çalışılan grup lösemilerdir ve günümüze kadar bir çok anomali rapor edilmiştir (1). Lösemilerde kromozomal yeniden düzenlemelere sıklıkla rastlanır. 1960 yılında ilk olarak kronik miyeloid lösemi (KML) olgularında, 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki translokasyon ile meydana gelen küçük akrosentrik bir kromozomun [Philadelphia kromozomu (Ph)] varlığı tanımlanmıştır (2). Lösemilerde yaygın olarak t(15;17)(q22;q21) (PML/RAR α), inv(8)(p11q13) (MOZ/TIF2) gibi anomalilere de rastlanır (2). Lösemilerde gözlenen anomalilerden bazıları da NUP98 geninin de katıldığı translokasyonlardır. NUP98 (nükleoporin 98) proteinini kodlayan gen; 11 numaralı kromozomun 11p15 bandında bulunur (3). NUP98 proteini; çekirdek çift zarında bulunan, sitozol ve çekirdek arasında molekül naklinde görevli nükleer por komplekslerinin (NPK) yapısındaki yaklaşık 30 proteinden bir tanesidir (4). Protein fenilalanin-glisin (FG) tekrar alanı, GLEBS motifleri, ribonükleoprotein (RNP) bağlama motifleri içerir (3, 5).

Tez çalışmasında, kronik miyeloid lösemi (KML), kronik lenfositik lösemi (KLL), akut miyeloid lösemi (AML), miyelodisplastik sendromlar (MDS), akut lenfositik lösemi (ALL) ve miyeloproliferatif hastalık (MPH) ön tanı hastaların kemik iliği örnekleri kullanıldı. Tez çalışmasına dahil edilen bu hastalarda, NUP98 geni ile ortak genleri arasındaki kimerik genlerin varlığı araştırıldı. NUP98 geninin tez kapsamında çalışılan ortak genleri; homeobox genleri (HOXA9, HOXA11, HOXA13, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13) ve homeobox olmayan genlerden DDX10'dur.

Omurgalılarda HOX genleri; vücut kısımlarının morfogenezinde görevli transkripsiyon faktörlerini kodlar. Bu transkripsiyon faktörlerinin embriyonik gelişim ve kan hücrelerinin oluşum sürecini (hematopoezi) düzenleme görevleri vardır (6). DDX10 proteini (RNA helikaz enzimi) ise Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) ve helikaz alanları içeren, ribozom parçalarının bir araya gelişinde işlevi olan bir RNA helikaz enzimidir (7, 8).

Bugüne kadar tez kapsamında çalışılmış olan translokasyonların varlığı, çeşitli lösemi olgularında incelenmiş fakat rutin olarak lösemi tanısında kullanıldığına dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Projede, hasta onamı alınmış ve klinik olarak AML, ALL, KLL, KML, MDS ve MPH öntanısı konulmuş hastalarda sözü geçen NUP98-HOX ve NUP98-DDX10

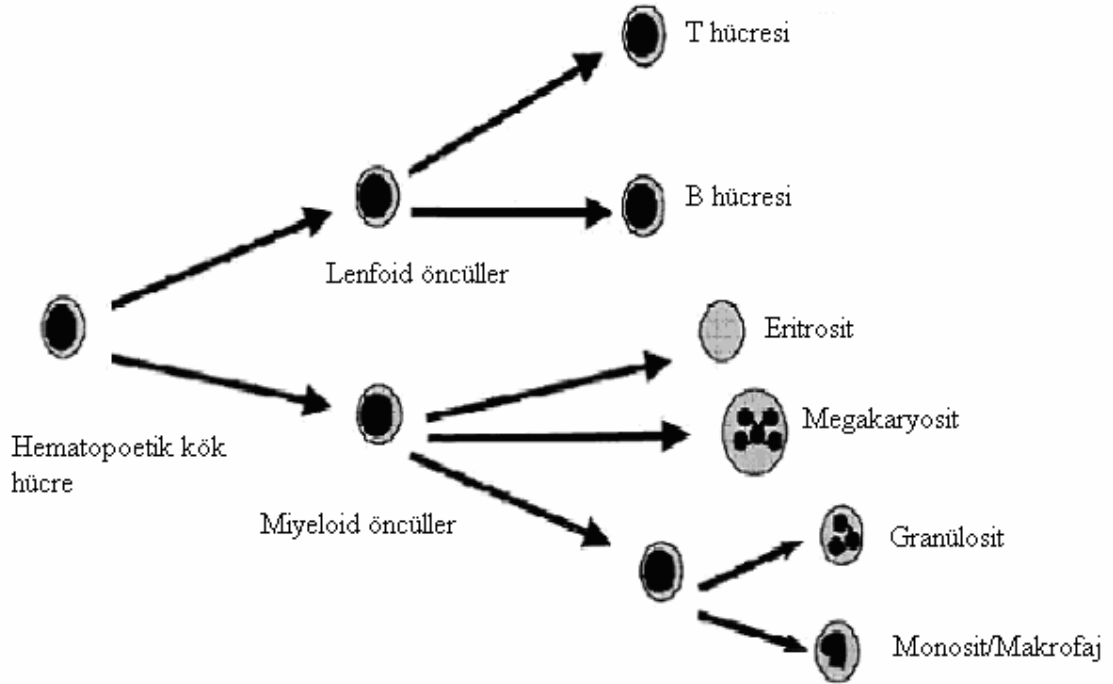
translokasyonları sonucunda oluşan kimerik genlere ait ürünlerin RT-PCR tekniği kullanılarak saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1 Lösemiler

Lösemi terimi, 1845 yılında ilk kez Virchow tarafından kullanıldı (9). Lösemiler; hematopoetik hücrelerin transformasyonu sonucu gelişen heterojen neoplastik hastalıklar grubudur (10, 11). Kemik iliğinde çoğalan miyeloid ve lenfoid seri hücrelerinden köken alır (1). Lösemi hücreleri birincil olarak kemik iliğinde ve lenfoid dokularda çoğalır, sonra periferik kana geçerek diğer dokulara yayılır (10, 11).

Hematopoetik kök hücreler; hematopoez süreci olması gerektiği gibi işlediğinde periferik kan hücrelerine (olgun lenfositler, granülositler, monositler, eritrositler ve megakaryositler/trombositler gibi) Şekil-1'deki gibi farklılaşır (12, 13, 14). Lösemilerde ise kemik iliği hücrelerinin gelişim aşamaları sırasında bir nesilde hücrelerin çoğalma hızının arttığı görülür, neoplastik klon kemik iliğinde çoğalır ve diğer kemik iliği hücrelerinin yerini almaya başlar. Hücre hatlarının sayısında periferik kandaki kan hücrelerinin yerini tutacak ölçüde bir artış görülür (15).



Şekil-1: Hematopoetik farklılaşma. Hematopoetik kök hücreler, lenfoid öncül, miyeloid öncül ve olgun kan hücreleri (14)

Diğer maliniteler gibi, lösemiler de her lösemi tipinin tek olarak ele alınabileceği

heterojen hastalıklar olarak düşünülebilir (8). Lösemiler; kemik iliğinden köken aldığı hücrenin çeşidine göre miyeloid veya lenfoid, etkilenen hücrelerin farklılaşma derecesine göre akut veya kronik olarak adlandırılır (1). Lösemiler genel olarak AML, ALL, KML, KLL, MDS ve MPH olarak gruplandırılır (16). Bazofilik, eozinofilik ve eritroid lösemiler gibi nadiren görülen tipleri de vardır (1). Sekonder lösemiler olarak da bilinen terapiye bağımlı lösemiler (örneğin terapiye bağımlı akut miyeloid lösemi (t-AML) ve terapiye bağımlı miyelodisplastik sendromlar (t-MDS)), kanser tedavisi sırasında tedavinin uzun süreli komplikasyonlarından bir tanesidir (17).

2.1.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

KML; kronik miyeloblastik lösemi ya da kronik granülositik lösemi olarak da bilinen bir lösemi tipidir (2). Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerin neoplastik bir hastalığıdır (12, 18) . KML üç fazlı bir hastalıktır; kronik faz ile başlar, miyeloid hücrelerin aşırı artışıyla ilerler ve blast kriz ile sona erer (19). Genellikle %90-95 olguda Ph kromozomuna rastlanır (12). Kronik miyeloid lösemi; sıklıkla 25-50 yaş arası insanlarda gözlenir (18).

2.1.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

AML; bir diğer adı ile akut nonlenfositik lösemiler, edinilmiş genetik değişiklikler sonucunda normal miyeloid seri hücrelerinin yerini farklılaşmamış blastların alması ile karakterizedir (16). Malin hücrelerin sürekli çoğalma yeteneği kazanmasıyla ve farklılaşma süreçlerinin bloklanması ya da normal mekanizmadan sapmasıyla birlikte gelişir (20). Akut miyeloid lösemiler, hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma durumlarına bağlı olarak yaygın kullanılan Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sınıflandırılmasına göre (M0, M1, M2, M3,....., M7) gruplandırılır. Örneğin; AML M1 olgunlaşmanın görülmediği miyeloblastik lösemi tipi iken; AML M6 olgunlaşmanın gözlemediği eritroblastik lösemi tipidir (16). AML; 15-39 yaşlar arasındaki kişileri etkiler (16).

2.1.3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

Tüm lösemiler içerisinde en sinsi ve yavaş gidişli lösemi tipi olan KLL; küçük, olgun gibi görünen lenfositlerin birikimi ile karakterizedir ve çoğunlukla B hücrelerinin, nadiren de olsa T hücrelerinin klonal hastalığıdır (12, 16). Özet olarak, KLL işlevsel olmayan B hücrelerinin birikmesi ve bunların kemik iliği, kan, lenf gangliyonları ve diğer dokulara sızması ile karakterizedir (16). Genellikle 50 yaş üstünde erkeklerde gözlenir (21).

2.1.4. Akut Lenfositik Lösemi (ALL)

ALL; kemik iliğinde bulunan lenfoid öncül hücrelerden kaynaklanan lösemi tipidir (12). Malin blast hücrelerin, periferik kanda ve kemik iliğinde çoğalması, birikimi ile karakterizedir (22). Kemik iliğinde çoğalan habis hücrelerden dolayı kemik iliği yetersizliği oluşur (23). Çocukluk dönemi hastalığı olarak kabul edilir ve sıklıkla 2-5 yaşları arasında, erkek çocuklarda ve beyaz ırkta görülür (22, 23).

2.1.5. Miyelodisplastik Sendromlar (MDS)

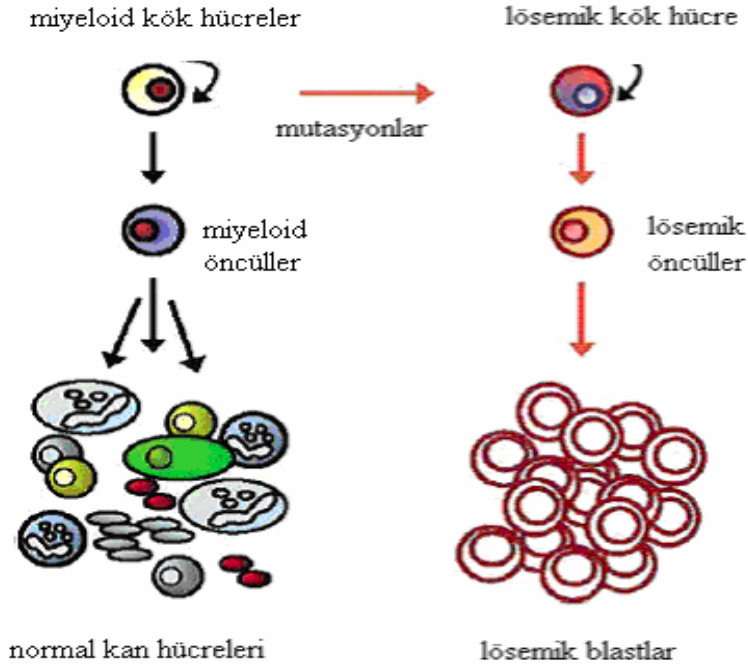
MDS; miyeloid öncül hücrelerden köken alır. Kemik iliğinde genellikle anormal klonun artışı gözlenir (14). Miyelodisplastik sendromların AML'ye dönüşme riski yüksektir (12). Hastaların %25'inde AML gelişir. Erkeklerde ve orta yaş üzerinde sıklıkla gözlenir (24).

2.1.6. Miyeloproliferatif Hastalıklar (MPH)

MPH; periferik kanda kan hücrelerinin aşırı artışıyla karakterizedir. FAB sınıflandırılmasına göre dört gruba ayrılır; granülosit hücrelerinin aşırı artışıyla karakterize olan KML, kırmızı kan hücrelerinin aşırı artışıyla karakterize olan "polycythemia vera" (PV), plateletlerin aşırı artışıyla karakterize olan esansiyel trombositoz (ET), kırmızı kan hücrelerinin ve granülositlerin gerektiği gibi olgunlaşmaması ile karakterize olan miyelofibroz (MF) (25).

2.2 Kök Hücreler ve Lösemik Transformasyon

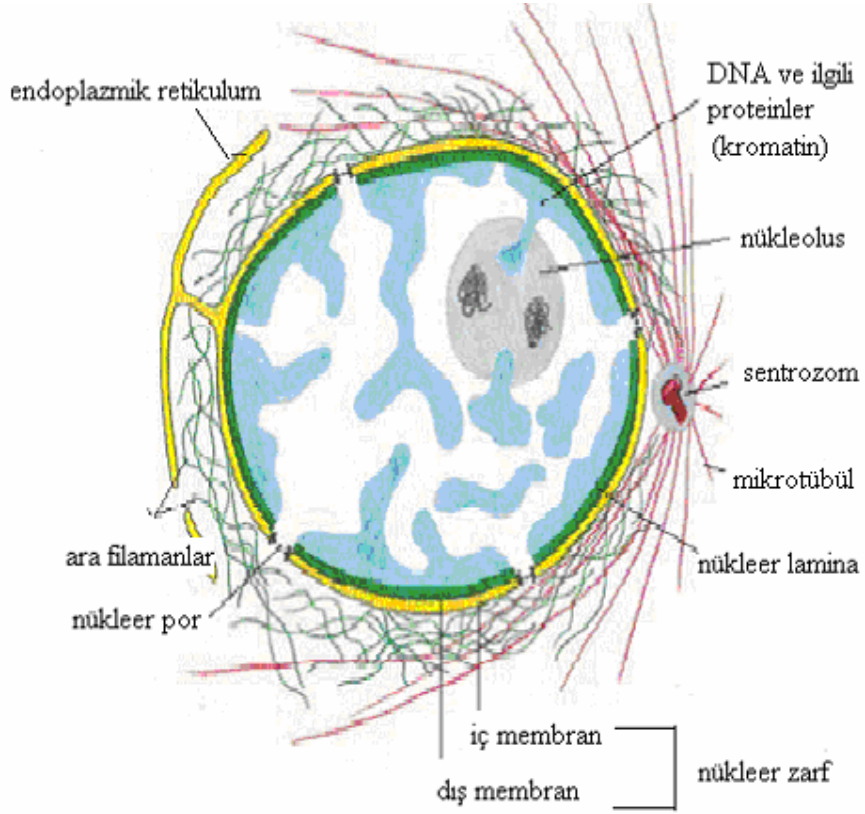
Bazı lösemi tipleri de dahil olmak üzere, kimi kanser türlerinin başlangıcında ve patogeneğinde kök hücreler rol oynar (26). Normal hematopoetik kök hücreler; kendini yenileme ve farklılaşma mekanizmalarını sergiler ve ilk olarak miyeloid ve lenfoid öncüllere farklılaşır ardından da çeşitli olgun kan hücrelerini oluştururlar (27). Kök hücre seviyesinde meydana gelen mutasyonlar lösemik kök hücrelerin oluşumuna neden olabilir. Bu hücreler de kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma özellikleri olan hücrelerdir (26). Lösemik kök hücrelerden köken alan miyeloid lösemi gelişimi şekil-2'de gösterilmiştir.



Şekil-2 Miyeloid lösemi gelişimi (27)

2.3. Ökaryotik Hücre Çekirdeğinin Yapısı

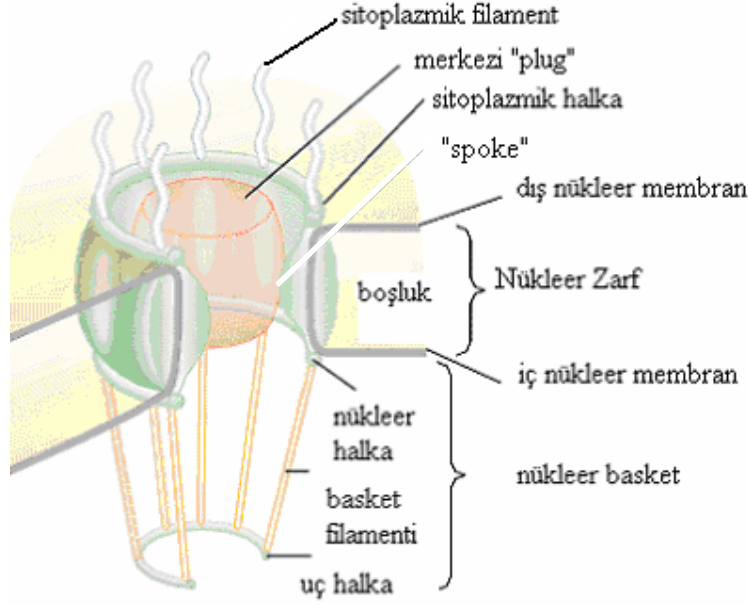
Hücre çekirdeği; ökaryotik hücrelerde genetik bilgiyi barındıran organeldir ve çift tabakalı lipid membranla çevrelenir. Çift tabakalı membrana nükleer zarf adı verilir. Nükleer zarf, çekirdek dışında endoplazmik retikulum ile kontak halindedir (28, 29, 30). Membran ayrıca ara filamanlar ile desteklenir. Ara filamanlardan bir tanesi, çekirdek içinde nükleer zarfı içten destekleyen nükleer laminadır; diğeri ise çekirdek dışında nükleer zarfı dıştan saran filamanlardır. Nükleer lamina; nükleer zarfa şekil kazandırır ve çekirdeğin stabil yapıda kalmasına neden olur. Çekirdek içinde ışık mikroskobu ile en belirgin gözlenen yapı membranla çevrili olmayan nükleolustur. Nükleolus ribozomal RNA'ların (rRNA) işlem gördüğü ve ribozom oluşumunda görevli olan bir yapıdır. rRNA genleri, olgun rRNA'lar, rRNA işleme enzimleri, küçük nükleer RNA'lar (snoRNA'lar) ve ribozom alt birimlerinden oluşur. Ayrıca nükleer zarf üzerinde, çekirdek ve sitozol arasında molekül naklinden sorumlu birçok nükleer por kompleksi vardır (29). Şekil-3'te ökaryotlarda bulunan tipik çekirdek yapısı gösterilmiştir.



Şekil-3 Ökaryotik hücre çekirdeği yapısı (29)

2.4. Nükleer Por Kompleksleri (NPK)

Nükleer por kompleksleri, ökaryotik hücrelerin çift katlı çekirdek membranı boyunca uzanan geniş protein yapılı moleküllerdir (4). Omurgalı NPK'ları en az 125 MDa ve bir ribozomun yaklaşık 30 katı büyüklüğündedir (8, 31). Nükleer halka ve sitoplazmik halka adı verilen eş eksenli halka benzeri iki yapı arasında yerleşmiş olan küresel alt üniteleri içerir. Nükleer kısma bakan halkanın devamında nükleer sepet adı verilen bir yapı bulunur (32). *Xenopus* oositlerine ait nükleer por kompleksleri yapısı Şekil- 4'te gösterilmiştir.

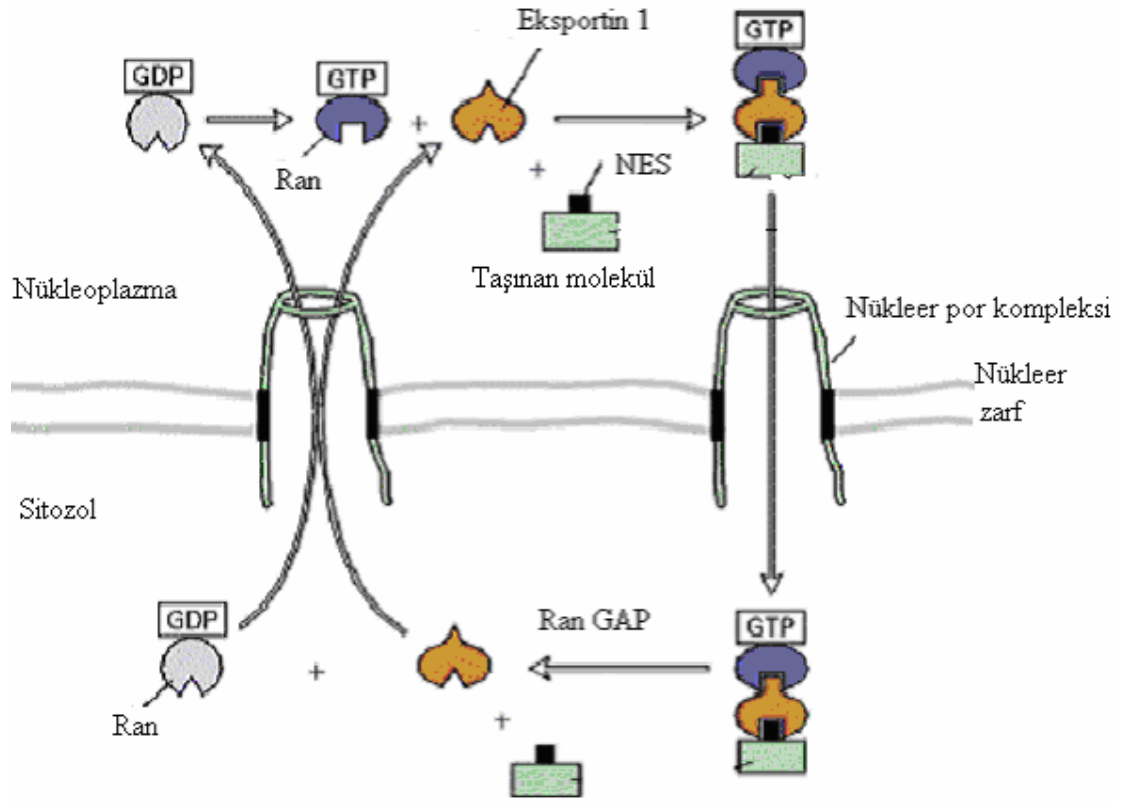


Şekil-4 *Xenopus* oositlerine ait NPK görüntüsü (28)

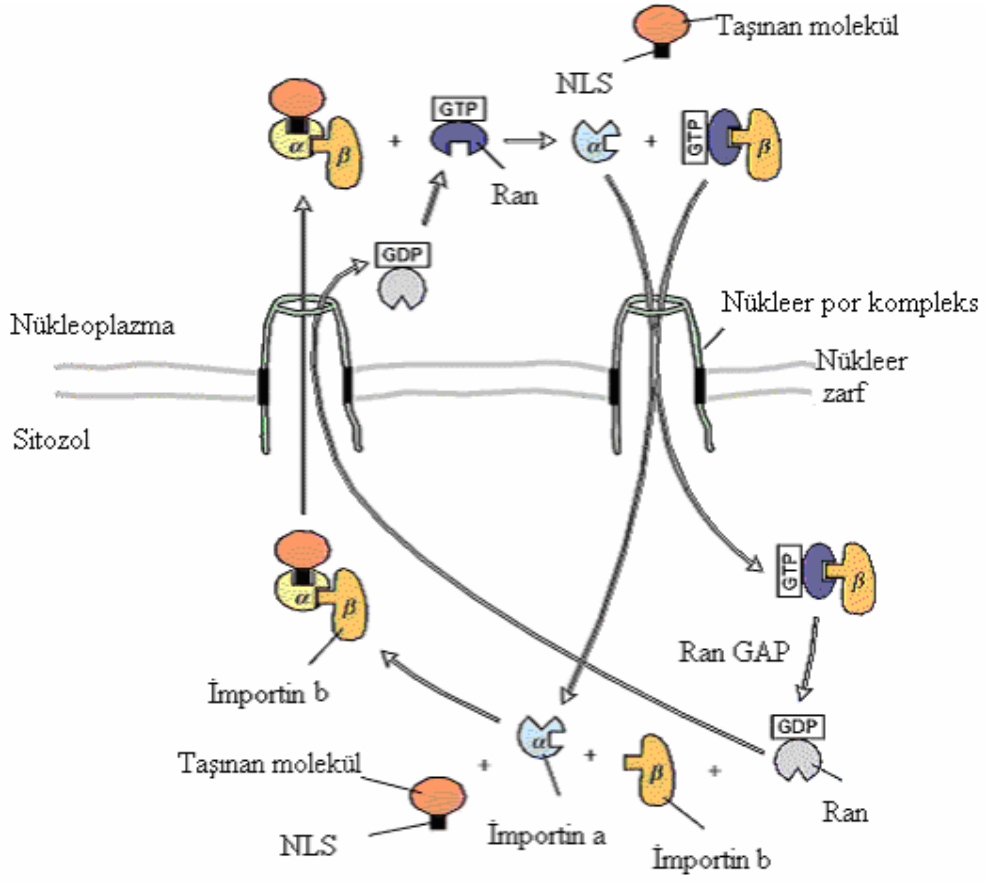
İyonlar, metabolitler ve küçük yapılı proteinler NPK'lerde bulunan nükleer porlardan rahatlıkla geçebilir (17, 28). Bu NPK'leri oldukça büyük olmalarına rağmen, RNA ve bir çok protein basit difüzyon ile geçemez (4). Büyüklükleri 60 kDA ve daha büyük olan makromoleküllerin taşınımı için ATP hidrolizine ve nükleer por komplekslerinde meydana gelecek yapısal değişikliklere ihtiyaç duyulur (28). Her iki yönlü nükleer taşınım karyoferin (importin/eksportin) adı verilen taşıyıcı reseptörler, taşınan molekül ve nükleoporinlerin Fenilalanin-Glisin (FG) tekrar alanları arasında meydana gelen etkileşimler sonucunda olur (4,30). Kompleksin merkezindeki kanal aracılığıyla gerçekleşen nakil, sıralı işlemler halindedir ve sıkıca denetlenir. NPK yapısı evrim süresince mayalardan omurgalılara kadar korunmuştur (4).

Nükleositoplazmik nakilde taşınacak protein özel amino asit dizileri içerir. Bu diziler nükleer eksport sinyali (NES) yada nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) olarak adlandırılır. Nükleus ve sitozol arasında mekik dokuyan proteinler, her iki sinyal diziyi de barındırır. Taşınan moleküldeki amino asit sinyali dizileri (NLS yada NES); naklin gerçekleşmesi için özgü nükleotransport reseptör (eksportin ve importin reseptörü) ile etkileşir ve molekülün gereken yönde taşınmasında rol oynar (28). Her iki nakil sürecinde de GDP veya GTP'ye bağlandığında farklı üç boyutlu yapıya sahip olan ve Ran adı verilen bir GTPase enziminin

varlığı gerekir (28, 31). Nakil işlemi enerji gerektirir ve bu nedenle de GTP-GDP dönüşümüne ihtiyaç duyulur. Bu işlem Ran enziminin görevidir. Taşınan molekül-reseptör kompleksi meydana geldiğinde, kompleksteki reseptörün nükleoporinler ile çoklu kontaklar kurduğu düşünülmektedir. Böylece kompleks pordan taşınır (28). Reseptör-kargo komplekslerinin oluşup, bileşenlerin tekrar bir araya gelmesini nükleer zarın her iki tarafındaki Ran gradienti belirler (31). Taşınan protein hedefe ulaştıktan sonra (sitoplazmaya yada nükleusa) diğer bileşenler ile birlikte serbest bırakılır ve aynı işlemi tekrarlamak üzere bileşenler eski yerlerine döner (28). Nakil süreci şekil-5 ve şekil- 6'te özetlenmiştir.



Şekil-5 Nükleer eksport (çekirdekten sitozole taşınım) mekanizması (28)



Şekil-6 Nükleer import (sitzozolde çekirdek içine taşınım) mekanizması (28)

2.5. Nükleoporin 98 (NUP98) Geni ve Proteini

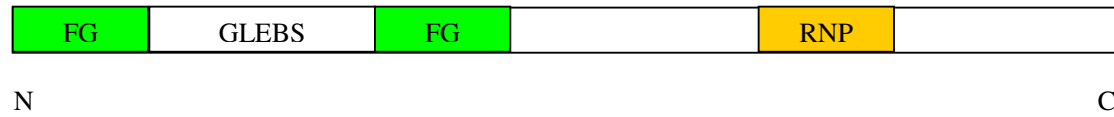
NPK'lerini meydana getiren proteinlerden olan nükleoporinlerin şimdiye kadar nükleoporin 93 (NUP93), nükleoporin 96 (NUP96), nükleoporin 98 (NUP98), nükleoporin 107 (NUP107), nükleoporin 153 (NUP153), nükleoporin 205 (NUP205) gibi çeşitleri tanımlanmıştır (32).

NUP98 geni 11p15.5'te lokalizedir (3, 5). NUP98 geninin mRNA ürününün alternatif splicing mekanizması sonucunda birçok farklı transkripti bulunur fakat şu ana kadar bütün farklı transkriptler tam olarak tanımlanamamıştır (5, 33). İnsan NUP98 proteininin 4 adet izoformu bulunur (34). En uzun transkript 1800 aminoasitlik bir ürün kodlarken, diğerleri de 920, 937 ve 1726 aa'lik ürünler kodlar (33).

NUP98 geni, 186 kDA büyüklüğündeki NUP98-NUP96 öncü proteinini kodlar. Öncü protein NUP98 ve NUP96 moleküllerini oluşturmak üzere proteolitik olarak kesilir. Bu

translasyon sonrası kesimde, ilave proteaza ihtiyaç duyulmadan oluşan otoproteoliz mekanizması ile nükleoplazmada meydana gelir (5). Söz konusu süreç *Saccharomyces cerevisiae*'dan insana kadar olan tüm türlerde evrimsel olarak korunmuştur (5, 8).

NUP98 proteini; amino ucunda FG (fenilalanin-glisin), FxFG (x: herhangi bir amino asit) ve diğer NUP moleküllerinden farklı olarak GLFG (glisin-lösin-fenilalanin-glisin) olarak adlandırılan sıralı olmayan aminoasit tekrarları içerir. FG tekrar alanı; NUP98 proteininin nükleer transport sinyal molekülleri olarak bilinen importin ve eksportinler için tutunma bölgesi olarak görev yapar. GLEBS motifleri; mRNA'nın naklinde görevli nükleer eksport sinyali içeren bir molekül olan RAE1 molekülü için bağlanma bölgesidir. Ribonükleoprotein bağlanma motifinin fonksiyonu tam olarak bilinmemesine karşın mRNA taşınımında görevli olduğu düşünülmektedir (3, 5, 30). NUP98 proteininin yapısı şekil-7'de gösterilmiştir.

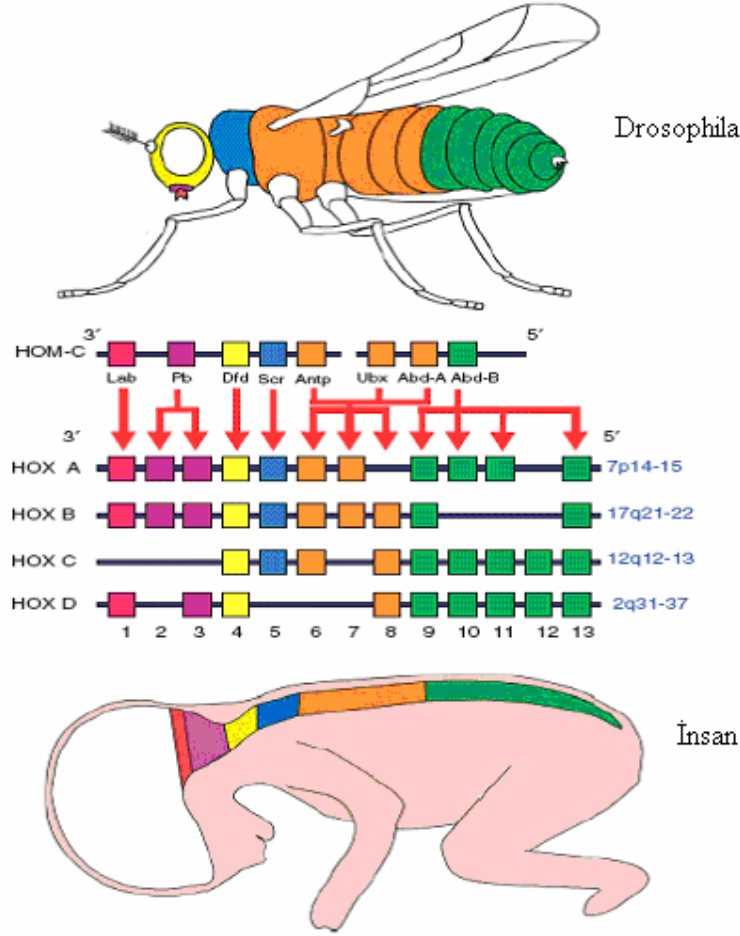


Şekil- 7 Nükleoporin98 (NUP98) proteininin yapısı (5)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar; omurgalı NUP98 molekülünün nükleer por kompleksinin hem nükleer, hem de sitoplazmik yüzünde yerleşik olduğunu göstermiştir (30).

2.6. Homeobox (HOX) Genleri ve Proteini

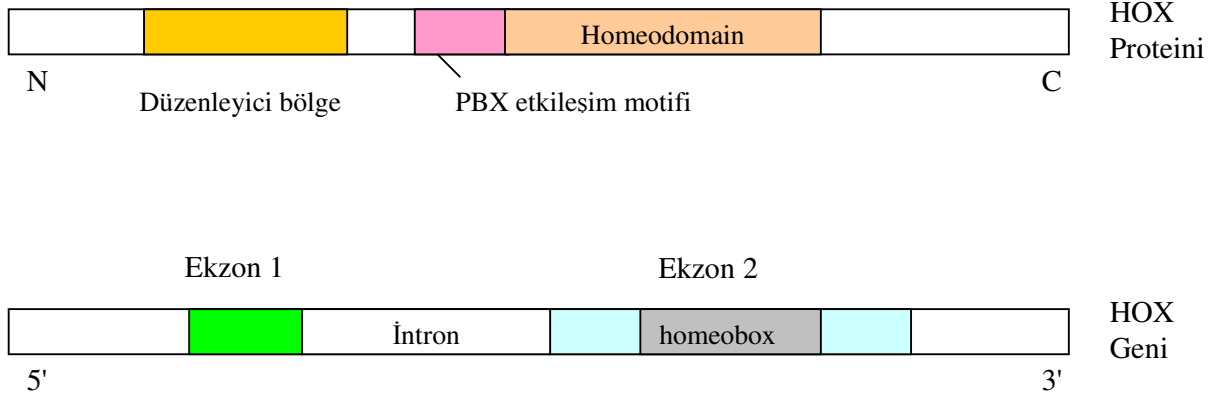
Homeobox genlerinin varlığı 1915 yılında Bridges tarafından *Drosophila melanogaster* olarak adlandırılan meyve sineğinde yapılan çalışmalar ile saptandı. *Drosophila* ile insan HOX genleri, kromozom ve nükleotid düzeyinde korunmuştur (şekil-8). Homeobox genleri embriyonik gelişimde görevli genlerdir ve bu genlerin her birinin vücudun farklı kısımlarında ayrı görevleri vardır. Genler sadece görevli oldukları bölgede ifade edilir ve genlerin ifadeleri vücudun ön kısmından başlayarak düşük numaralı HOX geninden (3' bölgesindeki genler) daha yüksek numaralı HOX genine (5' bölgesindeki genler) doğru (örneğin HOXA1'den HOXA13'e doğru sırasıyla) devam eder. Bu durum Lewis ve arkadaşları tarafından ilk olarak *Drosophila*'da gözlenmiştir ve insanda da durum aynıdır (6).



Şekil-8: Drosophila ve insanda HOX genleri (6)

HOX genleri iki ekzon ve bir intron içerir. Ekzon 2; 61 aminoasitlik DNA bağlanma alanı olan homeodomain “helix-turn-helix motifi” kısmını kodlar (6). Homeodomainin yanındaki aminoasit dizileri de TALE proteinleri için bağlanma bölgesi oluşturur (6).

HOX genlerindeki ekzon 1 de düzenleyici bölgeleri kodlar (3). HOX proteinin ve geninin yapısı şekil-9’da gösterilmiştir.



Şekil-9 Homeobox (HOX) proteini ve geninin yapısı (3, 6)

HOX genleri, sınıf-1 (homeobox genleri) ve sınıf-2 (homeobox olmayan genler) olarak ikiye ayrılır (8).

2.6.1. Sınıf 1 Genler

İnsanda sınıf 1 HOX genleri dört sınıfta (A-D) incelenir (8). Her bir sınıfa giren gen ailesi farklı kromozomda -sırasıyla 7p15, 17p21, 12q13 ve 2q31- yerleşiktir, 39 adet HOX geni vardır ve her bir sınıfta 9 ile 13 arasında değişen sayıda gen bulunur (5, 35).

2.6.2. Sınıf 2 Genler

Sınıf 2 genleri, sınıf 1 genleri ile amino asit yönünden düşük düzeyde bir benzerlik gösterirler buna rağmen benzer yapıları ve fonksiyonları vardır (8). HOX proteinlerinin hedef genlerini aktive etmesi için gerekli olan bu proteinler, transkripsiyonel koaktivatör olan ve TALE “three-amino-acid-loop-extension” olarak adlandırılan MEIS1 ve PBX1’dir. Bu proteinler sınıf-1 proteinlerin homeodomainin yanında bulunan kısa aminoasit dizilerine bağlanır (6, 8).

2.6.3. Hematopoezde HOX genleri

HOX genleri; embriyonik gelişimdeki görevlerine ek olarak hematopoez sürecinde de görevli olan transkripsiyon faktörlerini kodlar (4). Bütün hematopetik öncüller, soylarına ve farklılaşma aşamalarına bağlı olarak HOX genlerini ifade ederler. Örneğin; HOXA9 geni CD34+ (hematopoetik kök/öncül hücrelerin taşıdığı yüzey belirteci (36)) kemik iliği hücrelerinde ve gelişmekte olan lenfositlerde ifade edilir (6). Normal hematopoetik dokudaki CD34+ hücrelerde A, B ve C HOX genlerinin ifadesinin olduğu fakat D grubu HOX genlerinin ifadesinin gözlenmediği bildirilmiştir (8). HOXD13 ve HOXD11 “knock-out” farelerle yapılan çalışmalarda hematopoez sürecinde bozukluk gözlenmemiştir (5).

A ve B gen gruplarının 3' bölgesindeki genler, primitif hematopoetik hücrelerin gelişiminde yüksek düzeyde ifade edilir. Hücreler eritroid yada miyeloid yolda farklılaştıkça, 3' bölgesindeki genlerin (HOX1, HOX2, gibi) ifade seviyesinde düşüş gözlenirken eş zamanlı olarak 5' bölgesindeki genlerin (HOX11, HOX13 gibi) ifadesinde artış gözlenir (5, 6).

HOX genlerinin hematopoez sürecindeki fonksiyonları yapılan deneylerle tanımlanmıştır. Her bir HOX geninin gereğinden fazla ifade edilmesinin kök hücre davranışlarını ve farklılaşmayı bozduğu gözlenmekle beraber bu sürecin mekanizması henüz açıklanamamıştır (6) .

2.6.4. Homeobox Genlerinin Lösemik Transformasyondaki Etkileri

A, B ve C HOX genleri sınıfına ait olan genler normal hematopoezde görev yaptığı gibi lösemik transformasyonda da rol oynadığı yayınlanan bir derlemede belirtilmiştir (5). Ayna derlemede belirtilen bilgiye göre; lösemik hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu üç sınıfın üyesi olan genlerin soya özgü olarak ifade edildiği öne sürülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda; B ve C sınıfı genleri çoğunlukla eritroid hücre hatlarında ifade edilirken, A sınıfı genlerinin de miyeloid hücre hatlarında baskın olarak ifade edildiği görülmüştür (5).

2.7. NUP98 Geni ile Translokasyon Sonucunda Biraraya Gelen Genler

2001 yılında yayınlanan bir derlemeye göre; NUP98 geninin yer aldığı en az 8 farklı kromozomal yeniden düzenlenme saptanmıştır (5). İlerleyen yıllarda NUP98 ile translokasyonlar sonrası bir araya gelen gen sayısı giderek artmıştır. Bu sayı 2005 yılında yayınlanan bir derlemeye göre 15 olmuştur ve saptanan 15 ortak gen içerisinde HOX genleri

büyük bir çoğunluğu oluşturmaktadır (Tablo-1) (3, 37,38). Tablo-1’de de görüldüğü gibi, tek bir translokasyon HOX transkriptlerinin alternatif “splicing” mekanizmasından dolayı birden fazla füzyon geni meydana getirebilir. Örneğin; t(7;11)(p15; p15) sonucunda NUP98-HOXA11, NUP98-HOXA13 ve NUP98-HOXA9 füzyon genleri oluşabilir (3).

Yeniden Düzenlenim	Füzyon Geni	Fenotip
t(7;11)(p15; p15)	NUP98-HOXA9	MDS, AML, blastik KML
t(7;11)(p15; p15)	NUP98-HOXA11	KML
t(7;11)(p15; p15)	NUP98-HOXA13	AML,MDS
t(11;12)(p15; q13)	NUP98-HOXC11	AML
t(11;12)(p15; q13)	NUP98-HOXC13	AML
t(2;11)(q31; p15)	NUP98-HOXD11	AML
t(2;11)(q31; p15)	NUP98-HOXD13	AML, t-AML, MDS
inv11 (p15q22)	NUP98-DDX10	AML, t-AML, MDS
t(1;11)(q23; p15)	NUP98-PMX1	AML
t(9;11)(q34;p15)	NUP98-PMX2	tAMML
t(5;11)(q35;p15.5)	NUP98-NSD1	AML
t(8;11)(p11.2;p15)	NUP98-NSD3	AML
t(9;11)(p22;p15)	NUP98-LEDGF	AML, tMDS
t(11;20)(p15;q11)	NUP98-TOP1	AML, tMDS
t(4;11)(q21;p15)	NUP98-RAP1GDS1	t-ALL

Tablo-1 NUP98’in ortak genleri ile meydana getirdiği füzyon genler ve lösemi tipleri ile ilişkisi (38)

NUP98 molekülünün translokasyonda bir araya geldiği diğer genler, homeobox olmayan ve homeobox (HOX) genler olmak üzere iki sınıfa ayrılır (8).

2.7.1 NUP98 Geni ve Homeobox Olmayan Ortak Genler

DDX10 (RNA helikaz), TOP1 (DNA topoizomeraz I), RAPGDS1 (guanin nükleotit değişim faktörü), LEDGF (transkripsiyonel koaktivatör), NSD1/NSD3 (transkripsiyonel koaktivatör ve korepressör) ve ADD3 (ADUCCIN-3) gibi homeobox olmayan genler, bugüne kadar çalışmalarda tespit edilen NUP98 geninin ortak genleridir (4, 8).

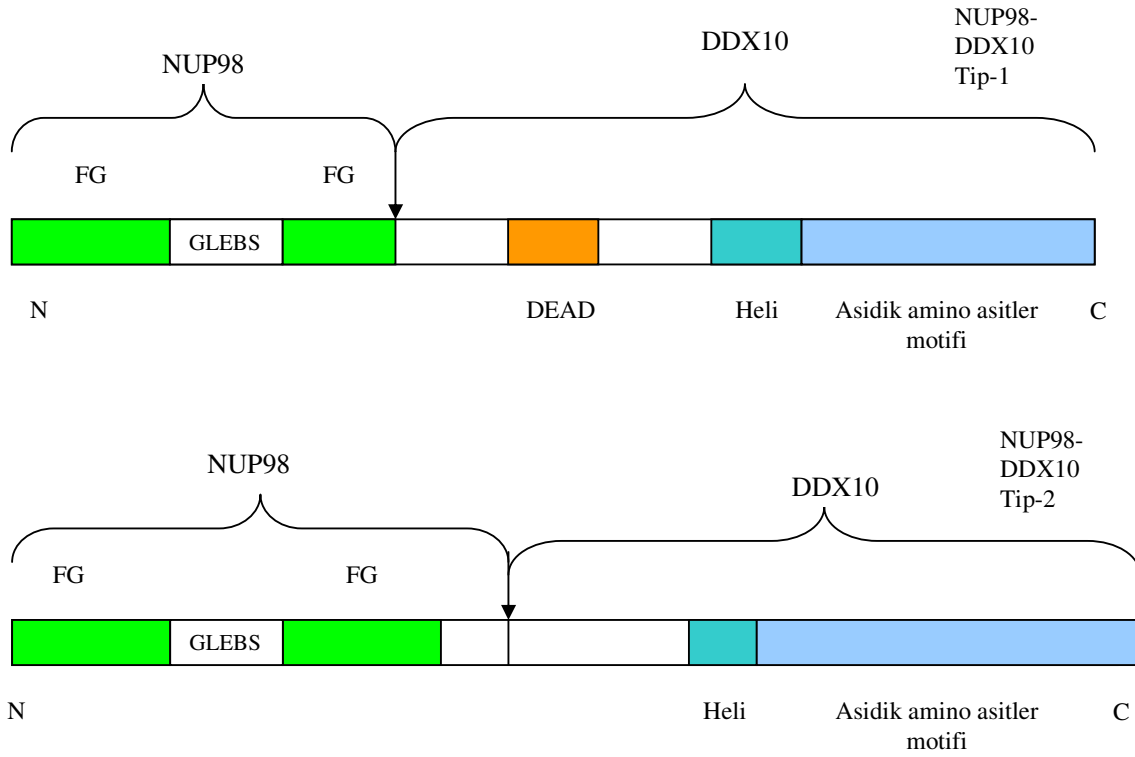
2.7.1.1. NUP98 ve DDX10 Ortak Geni

DDX10 geni 11q22’de lokalizedir ve şekil-10’da gösterildiği gibi bu genin ürünü olan DDX10 proteininin amino ucunda DEAD motifi ve RNA helikaz alanı, karboksil ucunda asidik amino asitler motifi bulunur (7, 17). DDX10 proteini; RNA helikaz enzimleri olan DEAD box proteinlerindedir ve DEAD box proteinleri RNA’nın ikincil yapısını değiştirerek translasyonun başlayışında, “splicing” mekanizmasında, ribozom ve splizozom yapılarının oluşumunda etkilidirler (39, 40). Asidik amino asitlerden meydana gelen motifin proteinin transkripsiyon aktivatörü alanı olduğu, proteinin de transkripsiyonel etkileşimde rol alabileceği ayrıca proteinin bu asidik amino asitlerden oluşan motiftan dolayı ribozom biyogenezinde görevli olduğu düşünülmektedir (7, 41).



Şekil-10 DDX10 proteini ve fonksiyonel alanları (7)

Dört ayrı grup tarafından çalışılan t-MDS, AML, t-AML, MDS ve KML tanılı hastalarda NUP98-DDX10 füzyon genine rastlanmıştır (7, 17, 42, 43). Çalışmalardan bir tanesinde; iki tip kimerik füzyon geni tespit edilmiştir (Şekil-11). Bu kimerik genlerden birinde DDX10 genindeki kırılma noktası genin 6. ekzonundayken, bir diğerinde ise 7. ekzonundadır (7). Bir diğer çalışmada ise; sekonder akut, kronik çocukluk lösemileri ve miyeloblastik sendrom tanılı 5 hastadan birinde, tAML-MDS hücrelerinde NUP98-DDX10 kimerik geninin varlığı tespit edilmiştir (44). Ayrıca inv11 (p15q22) sonucunda iki transkript meydana gelir (NUP98-DDX10 ve DDX10-NUP98) (7). Yapılan çalışmalarda sadece NUP98-DDX10 kimerik gen ürününün lösemi oluşumuyla ilişkilendirildiği saptanmıştır. NUP98-DDX10 füzyon proteininin bozulmuş nükleoplazmik taşıyımından yada ribozom oluşumundaki değişikliklerden dolayı lösemi oluşumuna neden olduğu ileri sürülmektedir (39).



Şekil-11: Çalışılan hastalarda rastlanan iki tip NUP98-DDX10 kimerik proteini; her ikisinde de DDX10 proteininde bulunan RNA helikaz alanı (Heli) ve asidik amino asitler motifi korunmuştur. Bir tanesinde DEAD motifi korunurken diğerinde kaybolmuştur. Oklar NUP98 ve DDX10'daki kırılma noktalarını göstermektedir. (7)

2.7.2 NUP98 Geni ve Homeobox Ortak Genler

Tez kapsamında, NUP98 geninin translokasyon sonrası kimerik gen oluşturduğu sınıf-1 (homeobox) genlerinden olan HOXA (HOXA9, HOXA11, HOXA13), HOXC (HOXC11, HOXC13) ve HOXD (HOXD11, HOXD13) genleri ile çalışıldı.

2.7.2.1. NUP98/HOXA Sınıfı Füzyon Genleri

2002 yılına kadar yapılan çalışmalar sonucunda, t(7;11)(p15;p15) translokasyonunu taşıyan AML, MDS, KML tanılı 40 hasta rapor edilmiş ve bunların 17'sinin NUP98-HOXA9 kimerik genini taşıdığı gösterilmiştir. (13 AML, 2 MDS, 2 KML) (45).

2.7.2.1.1. NUP98 ve HOXA9 Ortak Geni

AML olgularında t(7;11)(p15;p15) translokasyonun incelenmesi ilk defa Borrow ve arkadaşları tarafından 1996 yılında yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda; NUP98 geninin HOXA9 geni ile füzyon ürünü oluşturduğu bulundu. Oluşan resiprokal translokasyon ile

NUP98-HOXA9 (der(11)) ve HOXA9-NUP98 (der(7)) olmak üzere iki çeşit ürün meydana gelmektedir. Lösemi oluşumunda görevli olan kritik füzyon ürününü der(11)'in kodladığı savunulmuştur. Tespit edilen NUP98-HOXA9 kimerik proteininin yapısal olarak önemli olan FG tekrarları ve homeodomain kısımlarını yitirmediği gözlenmiştir (46).

t(7;11)(p15;p15) translokasyonun moleküler özelliklerini, klinik-patolojik ve prognostik önemini araştırmak üzere 1993-1998 tarihleri arasında Hong Kong'taki Queen Mary Hastanesi'ne gelen 30 AML tanılı Çinli hasta ile çalışılmış ve sadece 2 tanesinde NUP98-HOXA9 füzyon transkriptine rastlanmıştır (47). Diğer araştırmalarda çalışılan AML ve MDS tanılı bazı hastalarda da t(7;11)(p15;p15) translokasyonu sonucunda meydana gelen NUP98-HOXA9 kimerik genine rastlanmıştır (48, 49).

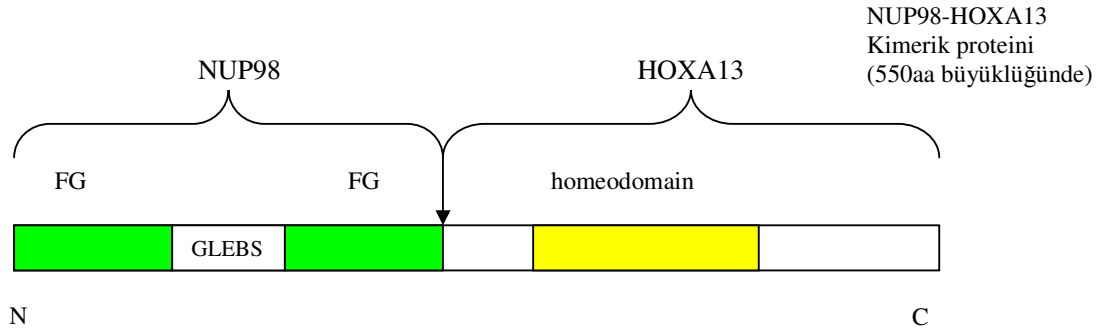
Ayrıca NUP98-HOXA9 kimerik proteini ifade eden kemik iliği hücreleri fareye aktarıldıktan sonra farede miyeloproliferatif hastalık gelişmiş ve ardından da AML oluşumu gözlenmiştir (50).

2.7.2.1.2. NUP98 ve HOXA11 Ortak Geni

2002 yılında yapılan bir çalışmada; ilk defa Ph negatif KML tanılı bir hastada hem kronik hem de akut fazda t(7;11)(p15;p15) translokasyonu tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, aynı translokasyonun miyeloid malignitelerde NUP98-HOXA9 füzyon transkriptini oluşturduğu gözlenmiş fakat bu çalışmada NUP98'in aynı kromozom lokusunda yerleşmiş olan bir başka ortak geninin de HOXA11 olduğu gösterilmiştir (51). Bir diğer çalışmada KML tanılı bir hasta ile çalışılmış ve bu hastada da NUP98-HOXA11 füzyon genine rastlanmıştır (52).

2.7.2.1.3. NUP98 ve HOXA13 Ortak Geni

AML ve MDS tanılı bazı hastalarda NUP98-HOXA13 füzyon geni gözlenmiştir (şekil-12) (45, 52) . NUP98-HOXA9 ile NUP98-HOXA13 kimerik proteinleri birbirlerine benzer proteinler olduklarından, NUP98-HOXA13 ürününün de onkogenik etkisi olduğu ileri sürülmüştür (45).



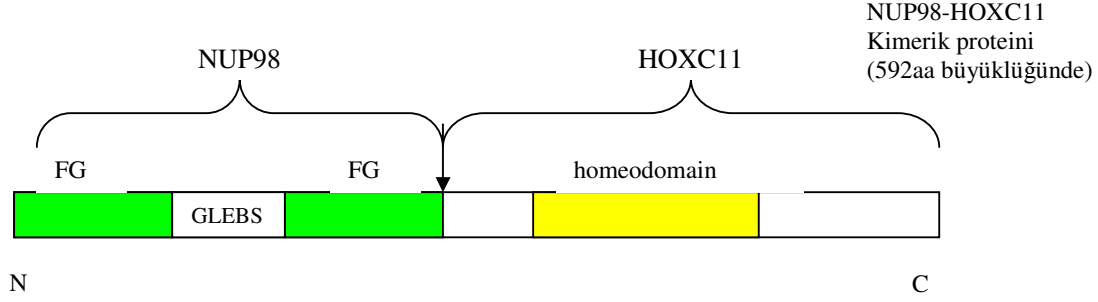
Şekil-12: NUP98-HOXA13 kimerik proteini; Ok, kırılma noktasını temsil etmektedir. Normalde NUP98 proteini 920 aminoasitlik (aa), HOXA13 proteini de 338 aa'lık proteinlerdir. Şekilde gösterilen protein ise NUP98 ve HOXA13 proteinlerinin gösterilen kısımlarını içeren kimerik proteindir (550 aa). (45)

2.7.2.2. NUP98/HOXC Sınıfı Füzyon Genleri

2002 yılına kadar NUP98 geninin HOXC genleri ile meydana getirdiği translokasyon hakkında bir çalışma mevcut değildi (53). 2004 yılında yayınlanan bir derlemedeki bilgilere göre; nadir gözlenen t(11;12)(p15; q13) translokasyonu ile meydana gelen NUP98-HOXC11 ve NUP98-HOXC13 füzyon genleri 6 AML tanıli hastada rapor edildi. Tüm hastalar arasında sadece 4 tanesinin AML alt tipi belirlendi (8). t(11;12)(p15;q13) translokasyonunda NUP98 geninin ortak geni HOXC11 ya da HOXC13 genidir (8).

2.7.2.2.1. NUP98 ve HOXC11 Ortak Geni

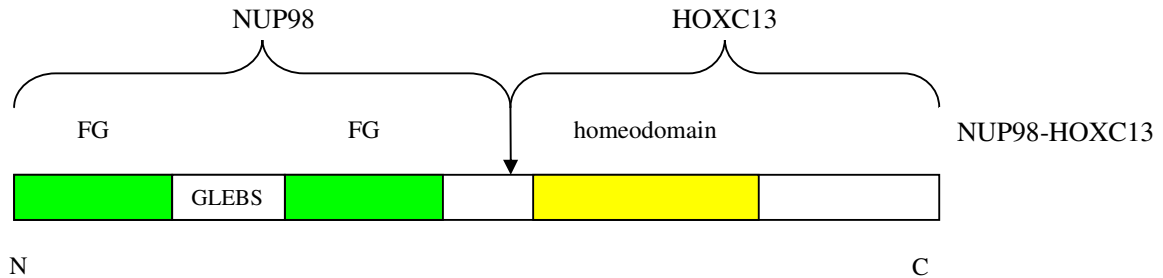
Japonya'da sekonder akut ve kronik çocukluk lösemileri ve miyeloblastik sendromların incelendiği bir çalışmada, t-AML/MDS tanıli 81 çocuktan 5'inde (6%) NUP98 geninin bir takım ortak genleri ile meydana getirdiği translokasyonların varlığı gösterilmiş ve t-AML/MDS tanıli bir hastada tAML hücrelerinde NUP98-HOXC11 kimerik geni tespit edilmiştir (44). Pediatrik AML tanıli bir hastada da NUP98-HOXC11 kimerik genine rastlanmış ve NUP98 genindeki kırılma noktasının 12. introndaki LINE tekrar dizilerinin içerisinde; HOXC11 genindeki kırılma noktasının ise 1. ekzonda olduğu tespit edilmiştir (şekil-13). Lösemik hücre hatlarında HOXC11 geninin ifadesi düşük olmasına rağmen, miyeloid lösemi hücre hatlarında lenfoid lösemi hücre hatlarına oranla daha sıklıkla ifade edildiği gözlenmiş, bu durumda da kimerik genin miyeloid lösemilerde rol oynadığı yorumu yapılmıştır (53).



Şekil-13: NUP98-HOXC11 kimerik proteini; Normalde NUP98 proteini 920 aa'lik, HOXC11 proteini de 304 aa'lik proteinlerdir. Şekilde gösterilen protein ise NUP98 ve HOXC11 proteinlerinin gösterilen kısımlarını içeren kimerik proteindir (592 aa). Ok, Kırılma noktasını temsil etmektedir. (53)

2.7.2.2.2. NUP98 ve HOXC13 Ortak Geni

AML tanılı bir hastada t(11;12)(p15;q13) translokasyonu sonucunda meydana gelen NUP98-HOXC13 kimerik geni tespit edilmiştir. Kimerik gen ürünüde kırılma noktaları NUP98 geninin 15. ve 16. ekzonları arasında, HOXC13 geninin ise 1. ve 2. ekzonları arasında olduğu gözlenmiştir (54). Bir başka çalışmada ise NUP98'in 16. ekzonunun HOXC13'ün 2. ekzonu ile birleştiği bir t(11;12)(p15;q13) translokasyonunu taşıyan AML olgusu rapor edilmiştir. NUP98/HOXC13 kimerik füzyon proteininin NUP98'in FG tekrarlarını ve GLEBS alanını, HOXC13'ün de homeodomain kısmını içerdiği gözlenmiştir (şekil-14) (55).



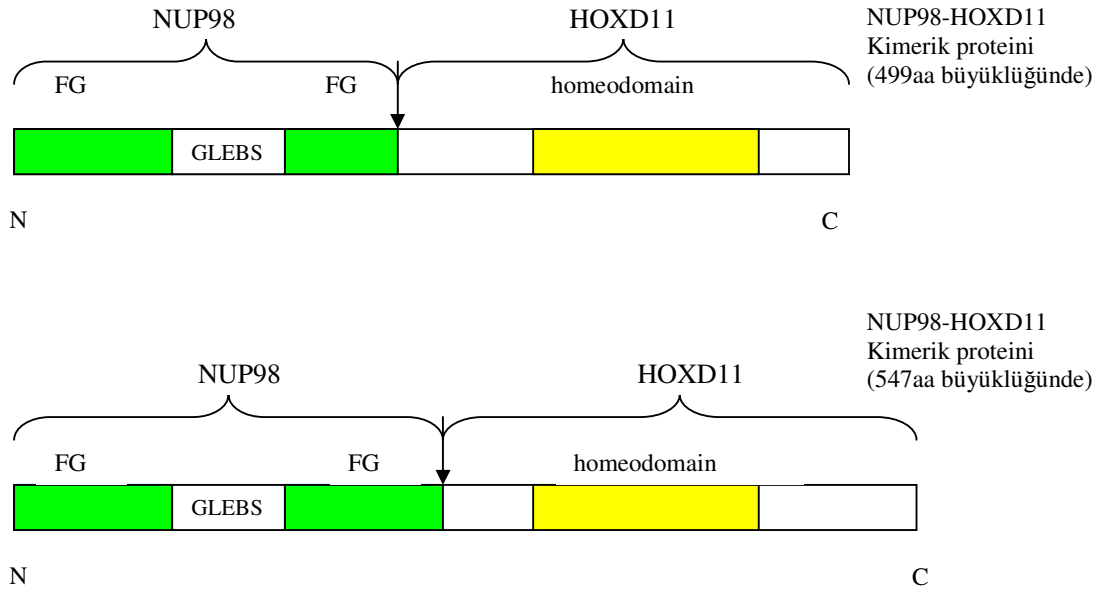
Şekil -14: NUP98-HOXC13 kimerik proteini (55)

2.7.2.3. NUP98/HOXD Sınıfı Füzyon Genleri

t(2;11)(q31;p15) translokasyonu ile NUP98-HOXD11 ve NUP98-HOXD13 füzyon genleri meydana gelir. Bu translokasyon nadir gözlenir ve saptanan tüm hastalar AML tanılıdır. 2004 yılında yayınlanan bir derlemeye göre; kimerik genin saptandığı hastalarda sadece 4 tanesinin AML alt tipi belirlenmiştir (8). Aynı translokasyona ayrıca KML tanılı bir diğer hasta da rastlanmıştır (3).

2.7.2.3.1 NUP98 ve HOXD11 Ortak Geni

t(2;11)(q31;p15) translokasyonunu taşıyan pediatrik akut miyelomonositik lösemili bir hastada, iki tip NUP98-HOXD11 kimerik gen ürünü belirlenmiştir. Bu ürünlerin kodladıkları 499 aa'lık ve 547 aa'lık iki tip NUP98-HOXD11 kimerik proteini şekil-15'te gösterilmiştir. Bu proteinleri meydana getiren genlerde kırılma noktaları farklıdır. Bir tipte NUP98 geninin 11. ekzonunun HOXD11 geninin 2. ekzonu ile birleştiği tespit edilirken; diğer kimerik gende ise NUP98 geninin 12. ekzonunun ile HOXD11 geninin 2. ekzonu ile birleştiği gözlenmiştir. Bu durumun alternatif "splicing" mekanizmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda onkogenik aktivitesi olduğu saptanan proteinleri kodlayan kimerik genler ile NUP98-HOXD11 kimerik geni arasındaki benzerlik sonucunda bu genin de lösemi oluşumunda rol oynadığı düşünülmüştür (56).



Şekil -15 NUP98-HOXD11 kimerik proteini; normalde NUP98 proteini 920 aa'lık, HOXD11 proteini de 338 aa'lık proteinlerdir. Şekilde gösterilen proteinler ise NUP98 ve HOXD11 proteinlerinin gösterilen kısımlarını içeren kimerik proteinlerdir (499 aa ve 547 aa). Ok, kırılma noktalarını temsil etmektedir. (56)

2.7.2.3.2. NUP98 ve HOXD13 Ortak Geni

AML tanılı bir hastada NUP98-HOXD13 füzyon geninin varlığı saptanmış ve bu hasta kullanılarak yapılan çalışma ile ilk defa çocukluk lösemisinde NUP98-HOXD13 füzyon geni tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonuçlarına göre; kimerik gende kırılma noktaları

NUP98'in 12. ekzonunda iken HOXD13'ün 2. ekzonundadır (57). KML tanılı bir hastada tespit edilen kimerik gende ise, NUP98 geninin 12. ekzonu ile HOXD13 geninin 2. ekzonu bir araya gelmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; HOXD13 geni 2. ekzonunda DNA bağlanma alanı içerirken 1. ekzonunda yer alan düzenleyici bölgeleri kaybetmiştir. NUP98 geninde ise FG tekrar alanı korunmuştur. Kimerik gen, hastada miyeloid blast kriz gelişmeden önce tespit edilmiştir ve bu durum da NUP98-HOXD13 kimerik geninin hastalığın ilerlemede etkili olduğunu düşündürmektedir (3). t-AML ve AML tanılı başka hastalarda da NUP98-HOXD13 kimerik gen ürününe rastlanmıştır (58, 59).

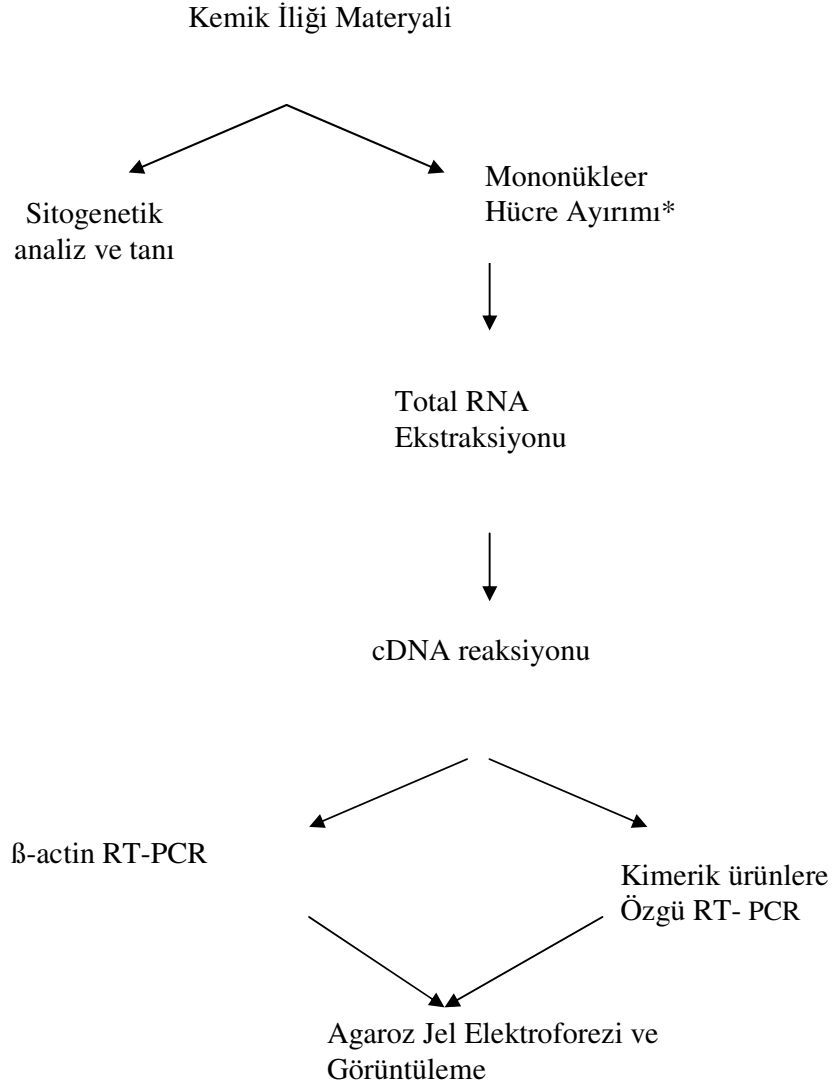
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Örnekler

Tez kapsamında; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik Rutin Laboratuvar'ına, Kasım 2005–Mart 2006 tarihleri arasında lösemi ön tanısı konularak gelen 34 adet hasta örneği ile çalışıldı (Tablo-2). Çalışmamızın genel akış şeması Şekil-16'da gösterilmiştir.

Hasta No	Hastaya Konulan Ön Tanı
1	AML
2	KML
3	KMPH
4	ALL
5	KML İzlemi
6	KML Tedavi İzlemi
7	KML Glivec Tedavi İzlemi
8	MDS
9	KMPH
10	KML
11	AML
12	ALL
13	MDS
14	KML Glivec Tedavi İzlemi
15	KML Glivec Tedavi İzlemi
16	MDS
17	AML
18	KMPH
19	MDS
20	KMPH
21	ALL
22	ALL
23	MDS
24	KML Glivec Tedavi İzlemi
25	AML
26	ALL
27	ALL
28	KMML
29	B hücreli KLL
30	ALL
31	KMPH
32	KML Tedavi İzlemi
33	KMPH
34	KMPH

Tablo-2: Tez çalışmasında kullanılan hastalar ve lösemi öntanıları



Şekil-16: Çalışmamızın genel akış şeması.

*: Kemik iliği materyalleri, laboratuvarımızda sitogenetik analizde kullanıldıktan sonra alınmıştır ve tez çalışmasında mononükleer hücre elde edilmek üzere kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Mononükleer Hücre Ayırımı

- 1) Kırmızı kapaklı santrifüj tüpüne 3.0 ml Histopaque®-1077 (Lot: 031K6111) eklendi.
- 2) Histopaque-1077 üzerine tabaka oluşturacak halde 3.0 ml kemik iliği materyali eklendi. Oda sıcaklığında 400*g hızda 30 dakika süreyle santrifüj (Hettich Universal) edildi.
- 3) Santrifügasyon işleminden sonra plasma kısmı ile histopaque solüsyonu arasında kalan mononükleer hücrelerin bulunduğu opak tabaka pastör pipeti ile alındı. Geri kalan kısım tüple beraber atıldı.
- 4) Mononükleer hücreler yeni bir konik santrifüj tüpüne aktarıldı. 10 ml izotonik Fosfat tuz Tamponu (PBS) eklendi ve nazikçe karıştırıldı. 250*g hızda 20 dakika santrifüj edildi.
- 5) 4. basamak üç kere tekrarlandı.
- 6) Elde edilen mononükleer hücre pelleti 0.5 ml PBS içerisinde süspansiyon edildi ve eppendorf tüpe alındı.

3.2.2. NUCLEOSPİN RNA® II Kiti ile Toplam RNA Saflaştırma Yöntemi

- 1) **Hücrelerin Parçalanması** - Elde edilen mononükleer hücre pelleti üzerine 3.5µl β - merkaptetanol eklendi 350 µl RA1 tamponu eklendi ve vortekslendi.
- 2) **Lizatin Filtrasyonu** - Nucleospin® filtreleri kullanılarak 11,000*g hızda 1 dakika süreyle santrifüj (Sorvall® MC12V) edildi.
- 3) **RNA Bağlanma Şartlarının Ayarlanması** – Nucleospin® filtresi atıldı ve filtre edilen kısma 350 µl % 70'lik etanol (Carlo Erba Reagent %95 etanol CAS N. 64-17-5) eklendi ve vortekslendi.
- 4) **RNA'nın Bağlanması** - Her bir örnek için Nucleospin® RNA II kolonu alındı ve toplama tüpüne yerleştirildi. 8,000*g hızda 30 saniye süreyle santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
- 5) **Silika Membranın Tuzunun Giderilmesi** - 350 µl “Membran Desalting Buffer” (MDB) eklendi ve 11,000*g hızda 1 dakika süreyle santrifüj edildi.
- 6) **Silika Membranın Yıkama ve Kurutulması** -
 1. Yıkama: Kolona 200 µl RA2 tamponu eklendi ve 8,000*g hızda 30 saniye süreyle santrifüj edildi ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.

2. Yıkama: Kolona 600 µl RA3 tamponu eklendi ve 8,000*g hızda 30 saniye süreyle santrifüj edildi ve toplama tüpündeki sıvı atıldı.
3. Yıkama: Kolona 250 µl RA3 tamponu eklendi ve 11,000*g hızda 2 dakika süreyle santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı.

7) **Yüksek Saflıkta RNA Eldesi** – Kolon eppendorf tüpe alındı ve 60 µl RNase içermeyen su eklendi. 11,000*g hızda 1 dakika süreyle santrifüj edildi.

3.2.3. Saflaştırılan RNA Materyalinin Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Kalitesinin Belirlenmesi

RNA konsantrasyonu spektrofotometre yardımı ile saptandı. OD260/280 oranı ile saflıkları değerlendirildi.

Ölçülen absorbans değeri * seyreltme oranı (25)* 40.0 µg /ml = RNA konsantrasyonu µg/ml
--

3.2.4. Komplementer DNA (cDNA) Reaksiyonu

Mononükleer hücrelerden elde edilen total RNA örnekleri çift zincirli komplementer DNA (cDNA) elde etmek üzere kalıp olarak kullanıldı. cDNA reaksiyonu iki basamaktan meydana gelir. Reaksiyonun ilk basamağında; dNTP, random hexamer primer, 5 µg total RNA kalıp ve 1.0 µl su kullanıldı. Tüpteki karışım 65 °C sıcaklıkta 5 dakika süreyle inkübe edildi ve böylece denatürasyon basamağı gerçekleştirilmiş oldu. Ardından karışımın bulunduğu tüp hızlıca buz dolu bir kaba aktarıldı ve bu şekilde 2 dakika süreyle bekletildi. Başka bir tüpte 5X tampon, ters transkriptaz enzimi ve toplam hacmi 25 µl'ye tamamlayacak kadar da su eklendi ve bu karışım buzda bekletilen tüpe aktarıldı. Tek bir örnek için hazırlanan 25 µl'lik karışım 1 saat boyunca 37 °C'de (PTC – 100™ Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc.) inkübe edildi ve ikinci basamak olan ikinci zincirin sentezlenmesi ve cDNA oluşumu sağlanmış oldu. Elde edilen cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı. cDNA reaksiyonunda kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları Tablo-3'te, cDNA reaksiyonu koşulları da Tablo-4'te gösterilmiştir.

Bileşenler	Açıklama	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
Ters Transkriptaz	M-MLV RT, 200 U/ µl	1,0	8 U/ µl
Primer	Random heksamer (0,5 µg/µl)	0,5	10 ng/µl
dNTP	dNTP mix	0,5	200 ng/µl (herbirinden)
Reaksiyon Tamponu	5X	5,0	1X

Tablo-3 : cDNA reaksiyonunda kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları. Toplam hacim 25 µl.

Sıcaklık	Süre
37 °C	1 saat
70 °C	15 dakika

Tablo-4 : İzlenen cDNA reaksiyonu koşulları

3.2.5. RT-PCR Reaksiyonları

Geri transkripsiyon-PCR olarak adlandırılan reaksiyon kullanılarak cDNA örnekleri standart PCR yoluyla çoğaltıldı. Çoğaltılan kimerik genler agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak jelde yürütüldü. İnternal kontrol olarak β -Aktin geni kullanıldı ve tez kapsamında kullanılan tüm cDNA örnekleri kontrol edildi. Negatif kontrol olarak su kullanıldı. RT-PCR reaksiyonlarında kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları Tablo-5'te gösterilmiştir.

Kullanılan Maddeler		25 µl reaksiyon için gerekli hacim (µl)	Son konsantrasyon
DNA polimeraz	Taq polimeraz, 500 U/µl	0,5	10 U/µl
Primer 5' (sens) (NUP98-DDX10 kimerik geni için)	10 pmol/µl	0,5	0.2 pmol/µl
Primer 3' (antisens) (NUP98-DDX10 kimerik geni için)	10 pmol/µl	0,5	0.2 pmol/µl
Primer 5' (sens) (Tezde kullanılan NUP98-HOX kimerik genleri için)	10µM	0.5	0.2 µM
Primer 3' (antisens) (Tezde kullanılan NUP98-HOX kimerik genleri için)	10µM	0.5	0.2 µM
Primer 5' (sens) (β-Aktin geni için)	10 µM(pmol/µl)	0.5	200 nM
Primer 3' (antisens) (β-Aktin geni için)	10 µM(pmol/µl)	0.5	200 nM
dNTP	dATP: 10 mM dTTP: 10 mM dGTP: 10 mM dCTP: 10 mM	0,5	200 ng/µl her birinden (yaklaşık)
Reaksiyon Tamponu	10X	2,5	1X
MgCl ₂	MgCl ₂ : 25 mM	1,5	1,5 mM

Tablo-5: RT-PCR reaksiyonlarında kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları (RT-PCR reaksiyonları 25 µl hacimde gerçekleştirildi ve sudan toplam hacme tamamlanacak kadar eklendi.)

3.2.5.1. RT-PCR'da Kullanılan Primerler ve Reaksiyon Koşulları

3.2.5.1.1. β -AKTİN

- Primerler:

Sens (F): 5' ATC ATG TTT GAG ACC TTC AA 3'

Antisens (R): 5' CAT CTC CTG CTC GAA GTC CA 3'

Primerler kullanılarak elde edilmesi gereken bantın büyüklüğü 318 bp'dir.

β -Aktin geni için kullanılan RT-PCR ısı profili:

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika	1
Amplifikasyon	95 °C	30 saniye	32
	58 °C	30 saniye	
	72 °C	30 saniye	
Son denatürasyon	72 °C	5 dakika	1

3.2.5.1.2. NUP98-HOXA9

NUP98-HOXA9 kimerik geninin saptanmasında nested PCR kullanılmıştır. Aşağıda (1) olarak adlandırılan sens primer eksternal primerdir ve diğer (2) olarak adlandırılan primer ise internal primerdir ve sırasıyla 258bp-168bp büyüklüğünde bantlar elde edilir (47).

- Primerler:

Sens (F): 5' CAC TCG TCT TTT GCT CGG TC3' (1)

5' GTC CCT GGT GAG GTA CAT GT3' (2)

Antisens (R): 5' ACT ACG ACA GCC ACT TTG GG3'

NUP98-HOXA9 kimerik geni için kullanılan RT-PCR ısı profili:

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika	1
Amplifikasyon	95 °C	30 saniye	32
	55 °C	30 saniye	
	72 °C	30 saniye	
Son denatürasyon	72 °C	5 dakika	1

3.2.5.1.3. NUP98-HOXA11, NUP98-HOXA13, NUP98-HOXC11, NUP98-HOXD11, NUP98-HOXD13

- NUP98-HOXA11 kimerik gen ürününün saptanması için kullanılan primerler:
Sens (F): 5'GCA CAA ATA CCA GTG GGA ATA G3'
Antisens (R): 5'TTC ATT CTC CTG TTC TGA AAC CAG 3'

Primerler kullanılarak elde edilmesi gereken bantın büyüklüğü 402 bp 'dir (51).

- NUP98-HOXA13 kimerik gen ürününün saptanması için kullanılan primerler:
Sens (F): 5'TTT GGT GCT GTT GGT TCG AC3'
Antisens (R): 5' CCT CCT ATA GGA GCT GGC AT3'

Primerler kullanılarak elde edilmesi gereken bantın büyüklüğü 221 bp 'dir (45).

- NUP98-HOXC11 kimerik gen ürününün saptanması için kullanılan primerler:
Sens (F): 5'ACT ACG ACA GCC ACT TTG GG3'
Antisens (R): 5'TGC AGC CGC TTC TCT TTG TT3'

Primerler kullanılarak elde edilmesi gereken bantın büyüklüğü 294 bp'dir (53).

- NUP98-HOXD11 kimerik gen ürününün saptanması için kullanılan primerler:
Sens (F): 5'TTT GGT GCT GTT GGT TCG AC3'
Antisens (R): 5'GGA ACC AGA TTT TGA CTT GCC G3'

Primerler kullanılarak elde edilmesi gereken bantın büyüklüğü 358 bp veya 495 bp'dir. Primerlerin kullanıldığı çalışmada iki farklı moleküler ağırlıkta ürün elde edilmiştir (56).

- NUP98-HOXD13 kimerik gen ürününün saptanması için kullanılan primerler:
Sens (F): 5'GCT GGA CAG GCA TCT TTG TT 3'
Antisens (R): 5'AAG CTG TCT GTG GCC AAC C3'

Primerler kullanılarak elde edilmesi gereken bantın büyüklüğü 424 bp'dir.(57).

NUP98-HOXA11, NUP98-HOXA13, NUP98-HOXC11, NUP98-HOXD11, NUP98-HOXD13 kimerik genleri için kullanılan RT-PCR ısı profili:

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika	1
Amplifikasyon	95 °C	30 saniye	32
	53 °C	30 saniye	
	72 °C	30 saniye	
Son denatürasyon	72 °C	5 dakika	1

3.2.5.1.4. NUP98-HOXC13

- Primerler:
Sens (F): 5'TTT GAC AGA TCC AAA TGC TTC TGC3'
Antisens (R): 5'AGG TGG AGT GGA GAT GAG GCG C 3'

Primerler kullanılarak elde edilmesi gereken bantın büyüklüğü 992 bp'dir (55).

NUP98-HOXC13 kimerik geni için kullanılan RT-PCR ısı profili:

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika	1
Amplifikasyon	95 °C	30 saniye	32
	58 °C	30 saniye	
	72 °C	30 saniye	
Son denatürasyon	72 °C	5 dakika	1

3.2.5.1.5. NUP98-DDX10

- Primerler:

Sens (F): 5'GCT GGA CAG GCA TCT TTG TT3'

Antisens (R): 5'TTT GCT GCA GCT CAC AGA CTA TGT3'

Primerler kullanılarak elde edilmesi gereken bantın büyüklüğü 373bp veya 505bp 'dir. Primerlerin kullanıldığı çalışmada iki farklı moleküler ağırlıkta ürün elde edilmiştir (17).

NUP98-DDX10 kimerik geni için kullanılan RT-PCR ısı profili:

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika	1
Amplifikasyon	94 °C	20 saniye	30
	60 °C	20 saniye	
	72 °C	20 saniye	
Son denatürasyon	72 °C	5 dakika	1

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle Görüntüleme

RT-PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütüldü. 50 ml'lik erlen içerisinde 0,6 gr agaroz ve 30 ml 0.5X TBE konulup mikrodalga fırında eritildi. Berraklaştıktan sonra jel içerisindeki konsantrasyon 0.33 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve hazırlanan jel kalıbına döküldü. Jel donduktan sonra üzerine 0.5X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Bir parça parafilm üzerinde 1 µl yükleme tamponu ve 5 µl PCR ürünü karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi. Çoğaltılan örneklerin baz olarak büyüklüğünün

kontrolü için ϕ X174/BsuRI (HaeIII) moleküler ağırlık marker'ı (0.5 mg DNA/ml, 0.05 mg; Lot: JK18) kullanıldı. Her denemede 10 volt/cm olacak şekilde 35 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde (Hofer Scientific Instruments Eagle Eye™ Stratagene) görüntüledi.

4.BULGULAR

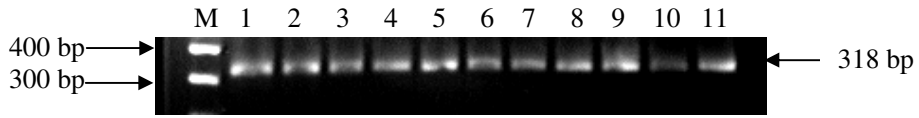
Çalışmamızda AML, ALL, KLL, KML, MDS ve MPH ön tanısı konulmuş hastalarda NUP98-HOXA9, HOXA11, HOXA13, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13 ve DDX10 kimerik transkriptlerinin varlığı tarandı. 5, 14, 21 ve 22 nolu hastalar, NUP98-DDX10 kimerik transkript ürününün saptanmasında cDNA örnekleri bittiğinden dolayı kullanılmadı.

4.1. RT-PCR Sonuçları

Tez çalışmasına dahil edilen 34 hastanın kemik iliklerinden elde edilen total RNA, cDNA'ya çevrildi. Elde edilen cDNA örnekleri belirtilen primerler kullanılarak RT-PCR yönetim ile β -Aktin geninin ve söz konusu diğer kimerik genlerin ürünlerinin var olup olmadığının saptanmasında kullanıldı. Toplam 34 hastanın hiçbirinde NUP98-HOXA9, HOXA11, HOXA13, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13 kimerik transkriptleri tespit edilemedi. Benzer olarak; 34 hastadan 30'unda aynı yöntemler kullanıldı ve NUP98-DDX10 kimerik gen transkriptine rastlanmadı. Negatif kontrol olarak su kullanıldı ve herhangi bir bant gözlenmedi.

4.1.1. β -Aktin Geninin Ürününün Çalışılan Hastalarda Saptanması

β -Aktin gen ürünü internal kontrol olarak kullanıldı ve RT-PCR yöntemi ile çalışılan 34 hastanın tümünde tespit edildi. Bir grup hastada gözlenen β -Aktin gen ürününe ait bantlar Şekil-17'te gösterildi.



Şekil-17: Sırasıyla Tablo-4'de gösterilen hastaların β -Aktin bantları

4.1.2. Kimerik Genlerin Ürünlerinin Çalışılan Hastalarda Saptanması

Kimerik gen ürünlerinden NUP98-HOXA9, NUP98-HOXA11, NUP98-HOXA13, NUP98-HOXC11, NUP98-HOXC13, NUP98-HOXD11 ve NUP98-HOXD13'ü saptama amacıyla RT-PCR yöntemi uygulandı (Tablo-6).

	NUP98- HOXA9	NUP98- HOXA11	NUP98- HOXA13	NUP98- HOXC11	NUP98- HOXC13	NUP98- HOXD11	NUP98- HOXD13	NUP98- DDX10
1	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
2	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
3	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
4	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
5	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	*
6	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
7	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
8	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
9	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
10	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
11	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
12	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
13	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
14	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	*
15	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
16	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
17	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
18	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
19	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
20	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
21	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	*
22	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	*
23	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
24	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
25	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
26	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
27	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
28	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
29	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
30	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
31	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
32	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
33	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok
34	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok

Tablo-6: Tez kapsamında çalışılan hastalarda NUP98-ortak gen tayini

*: NUP98-DDX10 kimerik gen ürününün saptanmasında söz konusu hastalar kullanılmamıştır.

5. TARTIŞMA

Akut miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom ve kronik miyeloid lösemi tanılı hastalarda, 100'den fazla farklı genin değişikliğe uğradığı kromozomal yeniden düzenlemelere rastlanmıştır (9). 2004 yılında yayınlanan bir derlemeye göre; tüm bu translokasyonlar arasında NUP98 geninin ortak genleri ile meydana getirdiği translokasyonların sayısı 15'tir (8).

Tez çalışmamızda, 4 AML, 7 kronik miyeloproliferatif hastalık (KMPH), 2 KML, 7 KML(tedavi izlemi), 7 ALL, 5 MDS, 1 B hücreli KLL ve 1 KMML öntanılı 34 hasta ile çalışılmıştır.

Teze dahil edilen hastalarda, tüm homeobox olmayan genlerden sadece DDX10 geni ile NUP98 geninin oluşturduğu kimerik gen ürününün var olup olmadığına bakıldı. Daha önce literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, NUP98-DDX10 kimerik geninin varlığının sekonder lösemiler ile ilişkilendirildiği görüldü. Tez kapsamında çalışılan diğer lösemi tanılı hastalar ve özellikle tedavi izleminde olan hastaların bu kimerik gen açısından taranması uygun görüldü.

1997 yılında yapılan bir çalışmada; de novo AML, tedaviye bağlı AML , MDS tanılı hastalar ile çalışılmıştır. Inv(11)(p15q22) ile meydana gelen füzyon transkriptlerden bir tanesinde DDX10 genindeki kırılma noktası genin 6. ekzonundayken, bir diğerinde ise 7. ekzonundadır (7, 17, 43). Tez çalışmasında kullanılan primerler ile elde edilecek üründe ise kırılma noktalarının NUP98'in 12. ekzonu ile DDX10'un 7. ekzonu arasında olması beklenmektedir. Kullanılan primerler pozitif kontrol ile test edilmesine ve primerlerin çalıştığına gösterimlerine rağmen tez çalışmasına dahil edilen 31 hastada NUP98-DDX10 kimerik transkriptine rastlanmadı. Dört farklı grubun çalışmalarına göre; çalışılan de novo AML, MDS tanılı hastalarda, topoizomeraz II inhibitörü kemoterapisi yapılan t-MDS, t-AML tanılı hastalarda ve BCR/ABL tirozin kinaz inhibitörü olarak imatinib kullanılan bir hastada da inv(11)(p15q22)'ye rastlanmıştır (7, 17, 42, 43). Tez çalışmamızda 9 hasta KML tanılı olup bu hastalardan 7'si tedavi izlemi uygulanan hastalardır ve hiçbirinde NUP98-DDX10 kimerik transkripti tespit edilememiştir.

1999 yılına kadar yapılan çalışmalarda, t(7;11)(p15;p15) translokasyonu %87 oranında AML tanılı Japon ve Çinli hastalarda tespit edilmiştir (47). Literatürdeki çalışmalarda, sıklıkla lösemi tanısı konmuş Japon, Çinli, Hong Kong'lu hastalar ile çalışıldığı görülmektedir ve literatürde Türk hasta ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Taketani ve arkadaşlarına göre 2002 yılına kadar AML, MDS, KML tanılı 40 hastada t(7;11)(p15;p15) translokasyonuna rastlanmış ve bu hastalardan 17 tanesinin NUP98-HOXA9 kimerik genini taşıyan hastalar olduğu belirlenmiştir (45). 1993-1998 tarihleri arasında bir grup araştırmacı tarafından yapılan bir çalışmada ise 30 AML tanılı Çinli hasta ile çalışılmış ve sadece 2 tanesinde NUP98-HOXA9 füzyon transkriptine rastlanmıştır (47). Diğer gruplarda yapılan çalışmalarda gözleendiği gibi NUP98-HOXA9 füzyon transkriptinin görülme sıklığı düşüktür. Tez çalışmamız kapsamındaki hastalarda NUP98-HOXA9 kimerik gen ürününe rastlanmamıştır.

Literatürde, birisi Ph negatif KML ve diğeri Ph pozitif KML tanılı 2 hastada t(7;11)(p15;p15) translokasyonunun varlığı tespit edilmiş, translokasyonun NUP98-HOX9 kimerik genini değil de NUP98-HOXA11 kimerik genini meydana getirdiği gösterilmiştir (51, 52). Tez çalışmasında ise ne KML hastalarında ne de diğeri lösemi tanılı hastalarda NUP98-HOXA11 kimerik gen ürünü saptanmamıştır.

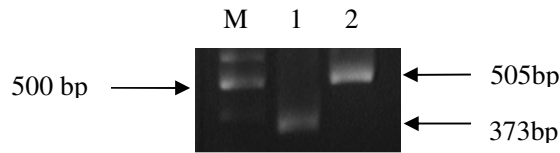
Taketani ve arkadaşlarının ve Fujino ve arkadaşlarının 2002 yılındaki çalışmalarında AML ve MDS tanılı hastalarda NUP98-HOXA13 kimerik geni tespit edilmiştir (45, 52). Tezde çalışılan hiçbir hastada NUP98-HOXA13 füzyon transkriptinin varlığı tespit edilmemiştir.

2004 yılında yayınlanan bir derlemeye göre; nadir gözlenen t(11;12)(p15;q13) translokasyonu 6 AML tanılı hastada rapor edilmiştir (8). Nishiyama ve arkadaşlarının 1999 yılındaki çalışmalarına göre; t-AML/MDS tanılı 81 çocuktan 5'inde (6%) 11p15 yeniden düzenlenmeleri tespit edilmiştir [t(11;17)(p15;q21), t(11;12)(p15;q13), t(7;11)(p15;p15), inv(11)(p15q22), ve add(11)(p15)]. Bu hastalardan t-AML/MDS tanılı bir hastada tAML hücrelerinde NUP98-HOXC11 kimerik geni tespit edildi (44). t(11;12)(p15;q13) translokasyonu ile ayrıca NUP98-HOXC13 kimerik geni de oluşur. Literatürde t(11;12)(p15;q13) translokasyonu gözlenen AML tanılı hastalarda NUP98-HOXC13 kimerik gen ürünü saptandığı belirtilmektedir (54,55) . Çalışmamızda NUP98-HOXC11 ve NUP98-

HOXC13 kimerik transkriptleri tez çalışmasına dahil edilen hiçbir hastada tespit edilememiştir.

t(2;11)(q31;p15) translokasyonu nadir gözlenir (8) . Pediyatrik akut miyelomonositik lösemili bir hastayla çalışan Taketani ve arkadaşları hastada iki tip NUP98-HOXD11 kimerik gen ürünü saptadı (56). Aynı translokasyonun bir başka ürünü olan NUP98-HOXD13 kimerik transkripti ise t-AML, de novo AML, KML tanılı hastalar ile yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (57,58,59). Tez kapsamında çalışılan hiçbir hastada NUP98-HOXD11 ve NUP98-HOXD13 kimerik transkriptleri saptanmamıştır.

Çalışmamızda kullanılan NUP98-HOX genlerine ait primerlerin alındığı çalışmaları yapan araştırmacılardan pozitif kontrol istendiği halde hiç birinden olumlu yanıt alınmadığı için primerler için pozitif kontrol kullanılmadı. Bu nedenle her ne kadar literatürde çalıştığı belirtilmiş primerler kullanmamıza rağmen pozitif kontrollerimizin olmaması yalnızca negatiflik durumunu uzaklaştıramamaktadır. Yalnızca NUP98-DDX10 kimerik genine ait primerlerin için pozitif kontroller primerlerin dizilerini aldığımız grup tarafından sağlanmıştır. Bu kimerik ürün transkripti için kullandığımız pozitif kontroller primerler kontrol edilebildi ve iki tip NUP98-DDX10 kimerik gen ürünü tespit edildi (Şekil-18).



Şekil-18: NUP98-DDX10 kimerik genine ait primerler ile elde edilen bantlar

NUP98-partner genlerinin ürünleri (NUP98-HOXA, HOXB, HOXC ve HOXD), Çin'de 2005 yılında yapılan bir çalışmada kullanılan hastalarda RT-PCR yöntemi kullanarak saptanmaya çalışılmıştır ve hiçbir hastada füzyon transkript tespit edilememiştir (60). Benzer bir şekilde; tez çalışması kapsamında da çalışılan hastaların hiçbirinde söz konusu kimerik gen ürünleri tespit edilememiştir. Ayrıca tez kapsamında çalışılan hastalar, laboratuvarımızın kemik iliği örneklerinden kromozom analizi yapan rutin grubunun hastaları olduğundan sitogenetik analiz sonuçları da değerlendirildi ve sitogenetik analiz açısından da NUP98-HOXA9, NUP98-HOXA11, NUP98-HOXA13, NUP98-HOXC11, NUP98-HOXC13,

NUP98-HOXD11, NUP98-HOXD13 ve NUP98-DDX10 kimerik genlerinin meydana gelmesine neden olan translokasyonlara rastlanmadığı gözlenmiştir.

6. KAYNAKÇA

1. Ruddon R. W. Cancer Biology, Third Edition. New York, Oxford University pres,1995; 78-79, 28-29
2. Czepulkowski B. Analysing Chromosomes, First Edition. UK, BIOS Scientific, 2001; 125-156.
3. Kobzev Y.N., Martinez-Climent J., Lee S., Chen J, et al. Analysis of Translocations That Involve the *NUP98* Gene in Patients with 11p15 Chromosomal Rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004; 41:339-352.
4. Cronshaw J.M., Matunis M.J. The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations. *Trends Endocrinol Metab*, 2004; 15: 34-39.
5. Lam DH., Aplan PD. Nup98 Gene Fusions in Hematologic Malignancies. *Leukemia*, 2001; 15:1689-1695.
6. Grier DG., Thompson A., Kwasniewska A., McGonigle Gj., et al. The pathophysiology of *HOX* genes and their role in cancer. *J Pathol*, 2005; 205: 154-171.
7. Arai Y., Hosoda F., Kobayashi H., Arai K., et al. The inv(11)(p15q22) Chromosome Translocation of De Novo and Therapy-Related Myeloid Malignancies Results in Fusion of the Nucleoporin Gene, *NUP98*, With the Putative RNA Helicase Gene, *DDX10*. *Blood*, 1997; 89: 3936-3944.
8. Slape C., Aplan P.D. The Role of NUP98 Gene Fusions in Hematologic Malignancy. *Leuk Lymphoma*, 2004; 45:1341-1350.
9. Devita V., Hellman Jr., Rosenberg S. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Fifth Edition. Philadelphia, New York, Lippincott-Raven, 1997; 2285-2296.
10. Wujcik D. Molecular Biology of Leukemia. *Semin Oncol Nurs*, 2003; 19(2): 83-89.
11. Devine H, DeMeyer E. Hematopoietic cell transplantation in the treatment of leukemia. *Semin Oncol Nurs*, 2003; 19(2):118-132.
12. Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III *Cancer Medicine*. Sixth Edition. Hamilton (Canada), BC Decker Inc; 2003. (e-kitap)
13. Speck N.A., Gilliland D.G. Core-binding Factors in Haematopoiesis and Leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2: 502-513.

14. Rosmarin G. A., Yang Z, Resendes K.K. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol*, 2005; 33: 131-143.
15. Finn W. G, Peterson L. C. Hematopathology in oncology, First Edition, New York, Boston, Cluwer Academic, 2004, 13-44
16. Cotran S. R., Kumar V., Collins T. Pathologic Basis of Disease, Sixth Edition, Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders Company, 1999; 645-696.
17. Nakao K., Nishino M., Takeuchi K., Iwata M., et al. Fusion of the Nucleoporin Gene, NUP98, and the Putative RNA Helicase Gene, DDX10, by Inversion 11 (p15q22) Chromosome Translocation in a Patient with Etoposide-related Myelodysplastic Syndrome. 2000, *Intern Med*; 39: 412-415.
18. Breed C.D. Diagnosis treatment and nursing care of patients with chronic leukemia. *Semin Oncol Nurs*, 2003; 19(2):109-117.
19. Sercan H.O., Eresen Ç., Yüksel E., Sercan Z., et al. Molecular Detection of BCR/ABL m-RNA and cytogenetic analysis in CML patients: Comparison of results and factors affecting the methodologies used. *Turkish Journal of Cancer*, 1998; 28: 166-173.
20. Scandura J.M., Boccuni P., Cammenga J., Nimer S.D. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. 2002, *Oncogene*; 21: 3422-3444.
21. Hallek M., Stahel R.A., Greil R. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Oncol*, 2005; 16:50-51.
22. Harrison C.J. Acute Lymphoblastic Leukemia. 2001, *Best Pract Res Clin Haematol.*; 14: 593-607.
23. De Oliveria B.M., Viana M.B., De Mattos Arruda L., Ybarra M.I., et al. Evolution of compliance through specific interviews: a prospective study of 73 children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr (Rio J)*, 2005; 81(3):245-250.
24. Niemeyer CM., Kratz CP., Halse H. Pediatric Myelodysplastic Syndromes. *Curr Treat Options Oncol*, 2005; 6(3):209-214.
25. http://cancerweb.ncl.ac.uk/cancernet/201983.html#1_DESCRIPTION
26. Jordan C.T., Guzman M.L. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene*, 2004; 23: 7178–7187.
27. Jordan C.T. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. *Curr Opin Cell Biol*, 2004; 16:708–712.

28. Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular Cell Biology. Fourth Edition. New York, W. H. Freeman and Company, 2000. (e-kitap)
29. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Molecular Biology of The Cell. Forth Edition. New York, Garland Science, 2002; 191-374.
30. Fahrenkrog B., Köser J., Aebi U. The nuclear pore complex: a jack of all trades? Trends Biochem Sci., 2004; 29:175-182.
31. Blevins M.B., Smith A.M., Philips E.M., Powers M.A. Complex Formation among the RNA Export Proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP. J Biol Chem, 2003; 278: 20979-20988.
32. Krull S., Thyberg J., Björkroth B., Rackwitz H.R., et al. Nucleoporins as Components of the Nuclear Pore Complex Core Structure and Tpr as the Architectural Element of the Nuclear Basket. Mol Biol Cell, 2004; 15: 4261- 4277.
33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=56550110>
34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&cmd=search&term=NUP98+homo+sapiens>
35. Boncinelli E. Homeobox Genes and Disease. 1997, Curr Opin Genet Dev.; 7: 331-337.
36. Huntly B.J.P., Gilliland D.G. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. Nat Rev Cancer., 2005; 5:311-321.
37. Lin Y.W., Slape C., Zhang Z., and Aplan P.D. *NUP98-HOXD13* transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. Blood, 2005; 106: 287-295.
38. Moore M.A.S. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. Exp Hematol., 2005; 33: 719-737
39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=601235>
40. Schmid SR., Linder P. D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. 1992, Mol Microbiol; 6: 283-292.
41. Savitsky K., Ziv Y., Bar-Shira A., Gilad S., et al. A human gene (DDX10) encoding a putative DEAD- box RNA helicase at 1 Iq22-q23. 1996, Genomics; 33: 199- 206.
42. Yamamoto M., Kakihana K., Kurosu T., Murakami N., Miura O. Clonal evolution with *inv(11)(p15q22)* and *NUP98/DDX10* fusion gene in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia. 2005, Cancer Genet Cytogenet; 157: 104-108.

43. Ikeda T., Ikeda K., Sasaki K., Kawakami K., Takahara J. The *inv(11)(p15q22)* chromosome translocation of therapy-related myelodysplasia with *NUP98-DDX10* and *DDX10-NUP98* fusion transcripts. *Int J Hematol*, 1999; 69:160-164.
44. Nishiyama M., Arai Y., Tsunematsu Y., Kobayashi H., et al. 11p15 Translocations Involving the *NUP98* Gene in Childhood Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndrome. 1999, *Genes Chromosomes Cancer*; 26: 215-220.
45. Taketani T., Taki T., Ono R., Kobayashi Y., et al. The Chromosome Translocation *t(7;11)(p15;p15)* in Acute Myeloid Leukemia Results in Fusion of the *NUP98* Gene With a *HOXA* Cluster Gene, *HOXA13*, but Not *HOXA9*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002; 34:437-443.
46. Borrow J., Shearman A.M., Stanton Jr.V.O. V, Becher R., et al. The *t(7;11)(p15;p15)* Translocation in Acute Myeloid Leukemia Fuses the Genes for Nucleoporin *NUP98* and Class I Homeoprotein *HOXA9*. *Nat Genet*, 1996; 12:59-167.
47. Kwong Y.L., Pang A. Low Frequency of Rearrangements of the Homeobox Gene *HOXA9/t(7;11)* in Adult Myeloid Leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999; 25:70-74.
48. Hatano Y., Miura I., Nakamura T., Yamazaki Y., et al. Molecular heterogeneity of the *NUP98/HOXA9* fusion transcript in myelodysplastic syndromes associated with *t(7;11)(p15;p15)*. 1999, *Br J Haematol*; 107: 600-604.
49. Lahortiga I., Belloni E., Va'zquez I., Agirre X., et al. *NUP98* is fused to *HOXA9* in a variant complex *t(7;11;13;17)* in a patient with AML-M2. 2005, *Cancer Genet Cytogenet*; 157: 151-156.
50. Kroon E., Thorsteinsdottir U., Mayotte N., Nakamura T., Sauvageau G. *NUP98-HOXA9* Ekspression in Hematopoietic Stem Cells Induces Chronic and Acute Myeloid Leukemias in Mice. *EMBO J*, 2001; 20: 350-361.
51. Suzuki A., Ito Y., Sashida G., Honda S., et al. *t(7;11)(p15;p15)* chronic myeloid leukaemia developed into blastic transformation showing a novel *NUP98/HOXA11* fusion. *Br J Haematol*, 2002; 116:170-172.
52. Fujino T., Suzuki A., Ito Y., Ohyashiki K., et al. Single-translocation and double-chimeric transcripts: detection of *NUP98-HOXA9* in myeloid leukemias with *HOXA11* or *HOXA13* breaks of the chromosomal translocation *t(7;11)(p15;p15)*. *Blood*, 2002; 99; 1428-1433.
53. Taketani T., Taki T., Shibuya N., Kikuchi A., et al. Novel *NUP98-HOXC11* Fusion Gene Resulted from a Chromosomal Break within Exon 1 of *HOXC11* in Acute Myeloid Leukemia with *t(11;12)(p15;q13)*. *Cancer Res*, 2002; 62:4571-4574.

54. La Starza R., Trubia M., Crescenzi B., Matteucci C., et al. Human Homeobox Gene HOXC13 is the Partner of NUP98 in Adult Myeloid Leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer*, 2003; 36:420-423.
55. Panagopoulos I., Isaksson M., Billström B., Strömbeck B., et al. Fusion of the NUP98 Gene and the Homeobox Gene HOXC13 in Acute Myeloid Leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer*, 2003; 36:107-112.
56. Taketani T., Taki T., Shibuya N., Ito E., et al. The *HOXD11* Gene Is Fused to the *NUP98* Gene in Acute Myeloid Leukemia with (2;11)(q31;p15). *Cancer Res*, 2002; 62:33-37.
57. Shimada H., Arai Y., Sekiguchi S., Ishii T., et al. Generation of the NUP98±HOXD13 fusion transcript by a rare translocation, t(2;11)(q31;p15), in a case of infant leukaemia. *Br J Haematol*, 2000; 110: 210-213.
58. Arai Y., Kyo T., Miwa H., Arai K., et al. Heterogenous fusion transcripts involving the NUP98 gene and HOXD13 gene activation in a case of acute myeloid leukemia with the t(2;11)(q31;p15) translocation. *Leukemia*, 2000; 14(9):1621-1629.
59. Raza-Egilmez SZ., Jani-Sait SN., Grossi M., Higgins MJ., et al. NUP98-HOXD13 gene fusion in therapy-related acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 1998; 58: 4269–4273.
60. Zhang Y., Li L., Wen BZ., Lin RY., et al. RT-PCR Detecting NUP98-HOX Fusion Gene in Leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2005; 13(1):83-87.