

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ/LENFOMA OLGULARINDA P53 EKSPRESYONUNUN VE
TP53 MUTASYON VARLIĞININ PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ**

Dr. İbrahim KULAÇ

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

**ANKARA
2013**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ/LENFOMA OLGULARINDA P53 EKSPRESYONUNUN VE
TP53 MUTASYON VARLIĞININ PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ**

Dr. İbrahim KULAÇ

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşegül ÜNER**

**ANKARA
2013**

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 012 D09 101 003 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Hematopatolojiye olan ilgimin gelişmesine neden olan, beni moleküler patolojide kullanılan yöntemlerle tanıştıran ve her türlü problemime akılcı ve samimi bir şekilde çözüm bulan, danışmanlığında tezimi yaptığım Prof. Dr. Ayşegül Üner'e,

Çalışmanın hazırlık sürecindeki yönlendirmeleri ve daha sonraki katkıları nedeniyle minnettar olduğum Prof. Dr. Yahya Büyükaşık'a ve İlaç Dirençliliği Laboratuvarı'nın tüm imkanlarından faydalanmama olanak veren, beni dışarıdan biri değil de o laboratuvarın bir çalışanı gibi gören Prof. Dr. Tezer Kutluk'a,

İlaç Dirençliliği Laboratuvarı'nda gerçekleştirdiğim deneylerimde gece gündüz demeden benden yardımını esirgemeyen, "o olmasaydı bu çalışma da olmazdı" dediğim Biyolog Çetin Demir'e,

Arşivden preparatların ve blokların teminini gerçekleştiren Lokman Kale'ye, kesitleri yapan Çiğdem Karakoç Günay'a, immünohistokimyasal boyamaları gerçekleştiren ve her sıkıştığımda yardımına koşan Murat Aytekin'e, sekans analizinde önemli yardımları dokunan Dr. Arda Çetinkaya'ya,

Çizim becerilerini benimle paylaşan ve figürlerimin bir kısmını büyük bir özveri ile hazırlayan dostum İbrahim Çavdaroğlu'na,

Çalışmanın istatistiksel analizlerini yapan Eda Öztürk'e ,

Patoloji hayatımın başından beri bana hep destek olan Prof. Dr. Dilek Ertoy-Baydar'a,

Asistanlığım boyunca iyi bir eğitim almamı önemseyen, geleceğe yönelik kaygılarımı bir nebze azaltan değerli hocalarıma ve birlikte çok güzel hatıralar biriktirdiğimiz asistan arkadaşlarıma

içtenlikle teşekkür ederim.

ÖZET

Kulaç İ, Kronik Lenfositik Lösemi/Lenfoma Olgularında p53 Ekspresyonunun ve TP53 Mutasyon Varlığının Prognoz ile İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi, Patoloji Tezi, Ankara, 2013. Kronik lenfositik lösemi/lenfoma (KLL) erişkin bireylerde en sık görülen lenfoproliferatif hastalıktır. Bu çalışmanın amacı KLL tanısı almış hastaların doku örneklerindeki p53 ekspresyonu ve TP53 mutasyon durumu ile prognozları arasında bağlantı olup olmadığını araştırmaktır. Bu çalışma kapsamında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2013 yılları arasında KLL tanısı almış 51 hastanın 54 biyopsi örneği yeniden değerlendirilmiştir. Hastaların klinik ve demografik verileri hasta veri tabanından elde edilmiştir. Yapılan incelemede biyopsi örneklerinde proliferasyon merkezlerinin tüm biyopsi alanına oranı yarı kantitatif olarak değerlendirilmiş ve seçilen temsili bloklardan elde edilen kesitlerde immünohistokimyasal yöntemle p53 ekspresyonuna bakılmıştır. Daha sonra p53 ekspresyonu %5 ve üzerinde olan örneklerden DNA izolasyonu yapılmış ve TP53 geninin 5-9. ekzonlarının dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Hastalar RAI evrelerine göre düşük ve yüksek olmak üzere iki gruba ayrıldığında düşük evreli hastaların genel sağkalım sürelerinin yüksek evreli hastalara göre daha uzun olduğu görülmüştür (p= 0,030). Ancak, proliferasyon merkezi oranı, p53 ekspresyon düzeyleri, kan lökosit, hemoglobin, mutlak lenfosit, trombosit düzeyleri ile hastaların genel sağkalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilememiştir. Çalışılan örneklerden 10 tanesinden sekans analizi elde edilebilmiştir. Bu 10 örneğin 2'sinde 154. kodonda 154GGC>GGT değişimi saptanmıştır. Sonuç olarak kısıtlı sayıda örneğin değerlendirildiği bu çalışmada immünohistokimya yöntemiyle gözlenen yüksek p53 ekspresyonu ve moleküler çalışmalarda saptanabilen TP53 mutasyonu arasında bağlantı tespit edilememiştir. Literatürde KLL seyrinde TP53 gen anomalilerinin önemine işaret eden çalışmaların artmasıyla p53 mutasyon analizinin rutin bir inceleme yöntemi haline gelebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: p53, immünohistokimya, Sanger sekanslama.

ABSTRACT

Kulaç İ, The Effect of p53 Expression and TP53 Mutations on the Prognosis of Chronic Lymphocytic Leukemia/Lymphoma, Hacettepe University, Thesis of Pathology, Ankara, 2013. Chronic lymphocytic leukemia/lymphoma (CLL) is the most common lymphoproliferative disease in adults. The aim of this study is to find out if the expression of p53 and/or p53 mutation status is related to disease prognosis. In the scope of this study, 54 biopsy specimens from 51 patients (50 of them are lymph node, others are spleen, tonsil, orbita and liver) diagnosed as CLL in Hacettepe University Department of Pathology in 2000-2013, were re-evaluated. The clinical and demographic data of patients were obtained from our patients' database. Biopsy samples were assessed semi-quantitatively for the percentage of proliferation center/total biopsy area (PM/TBA) and an immunohistochemical study was performed on representative blocks of tissues for p53 expression levels. DNA was isolated from samples with high ($\geq 5\%$) p53 expression and the sequence analysis was performed for exons 5, 6, 7, 8 and 9 of TP53 gene. When the patients are divided into two categories according to the RAI stages as high and low (stage 0, 1, 2 vs stage 3, 4) it was seen that patients with low RAI stage have a better prognosis than those with high stages ($p=0,030$). However there is no statistically significant correlation between overall survival and PM/TBA ratio, p53 expression levels, blood leukocyte, absolute lymphocyte, platelet and hemoglobin counts. P53 sequences could be obtained from 10 cases due to poor quality of DNA extracted from formalin fixed paraffin embedded samples. Among these 10 cases 2 had a GCC>GGT nucleotide change on codon 154. As a result, in this study where a limited number of cases could be assessed, no correlation could be shown between high expression levels of p53 observed with immunohistochemistry and presence of TP53 mutations. In the light of the studies emphasizing the importance of the effect of TP53 abnormalities on CLL prognosis, we foresee that TP53 mutation analysis may be a routine test with newly developed next generation sequencing techniques.

Keywords: p53, immunohistochemistry, Sanger sequencing.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
TABLULAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. KLL Tanısı	2
2.2. Richter Transformasyonu.....	5
2.3. KLL Patogenezi	7
2.4. Klinik Evreleme	14
2.5. Prognostik Parametreler	16
2.6. Tedavi	21
2.7. TP53.....	21
2.8. Sekanslama ve Kapiller Elektroforez	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. İmmünohistokimyasal Çalışma	29
3.2. Moleküler Çalışmalar	30
3.3. İstatistiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR	36
4.1. Klinik ve Laboratuvar Bulguları	36
4.2. Morfolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular	37
4.3. Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	41
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	49
7. KAYNAKLAR	50
EK (İncelenen Hastaların Biyopsi Numaraları)	64

KISALTMALAR

KLL	Kronik Lenfositik Lösemi/Lenfoma
DBBHL	Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma
IGHV	İmmüoglobulin ağır zincir değişken bölgesi
MBL	Monoklonal B hücreli lenfositoz
BCR	B- hücre reseptörü (İmmüoglobulin)
DLEU	Deleted in Leukemia
IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
ERIC	European Research on CLL
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
EBV	Epstein-Barr Virus
MHY11A	Non-muscle Myosin Heavy Chain IIA
SF3B1	Splicing Factor 3B1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
TLR	Toll-like Receptor
NF-κB	Nuclear Factor- κ B

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. H&E boyalı kesitlerde klasik KLL morfolojisi.....	3
Şekil 2.2. KLL'de immünohistokimyasal bulgular.....	5
Şekil 2.3. TP53 geninin temel yapısı	22
Şekil 2.4. Sanger sekanslama metodunun şematik olarak gösterilmesi.....	27
Şekil 3.1. TP53 geninin 5. ekzonun başından 9. ekzonun sonuna kadarki nükleotid dizisi ve kullanılan primerlerin bağlanma bölgeleri..	32
Şekil 3.2. İncelenen ekzonlara ait kontrol DNA örnekleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel fotoğrafı.....	33
Şekil 4.1. Hastaların RAI evrelerine göre sağkalım eğrileri.....	37
Şekil 4.2. Proliferasyon merkezlerinin yaygınlığını gösteren örnekler..	38
Şekil 4.3. İmmünohistokimyasal yöntemle saptanan p53 ekspresyonu.	39
Şekil 4.4. p53 ekspresyon yüzdelerine göre iki gruba (<%5 ve ≥%5) ayrılan hastaların sağkalım eğrileri	40
Şekil 4.5. Olgulardan birine ve kontrol örneğine ait 5. ekzon elektroferogramları... ..	41

TABLolar

Tablo 2.1 RAI Evreleme Sistemi.....	15
Tablo 3.1: PZR çalışmalarında kullanılan primerlerin temel zellikleri.....	33
Tablo 4.1: Hastaların evrelere göre dağılımları.....	36
Tablo 4.2: Biyopsi rneklarının p53 ekspresyon yüzdelerine göre dağılımları	39

1. GİRİŞ

Kronik lenfositik lösemi/lenfoma (KLL) batı ülkelerinde erişkin yaş grubunda en sık görülen lenfoproliferatif neoplazidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yıllık insidans 4,2/100.000 olup ortalama tanı yaşı 72'dir¹. KLL, özellikle ortalama yaşam süresinin 75 yılın üzerinde olduğu gelişmiş ülkelerde ciddi bir sağlık problemi olup, daha çok ileri yaşta görülmesi, hastaların kemoterapi ve hastane giderleri nedeniyle ciddi bir ekonomik yük oluşturmaktadır. 2008 yılında bildirilen rakamlara göre 65 yaş üstü hastalarda hasta başına toplam gider 33.000 Amerikan dolarıdır².

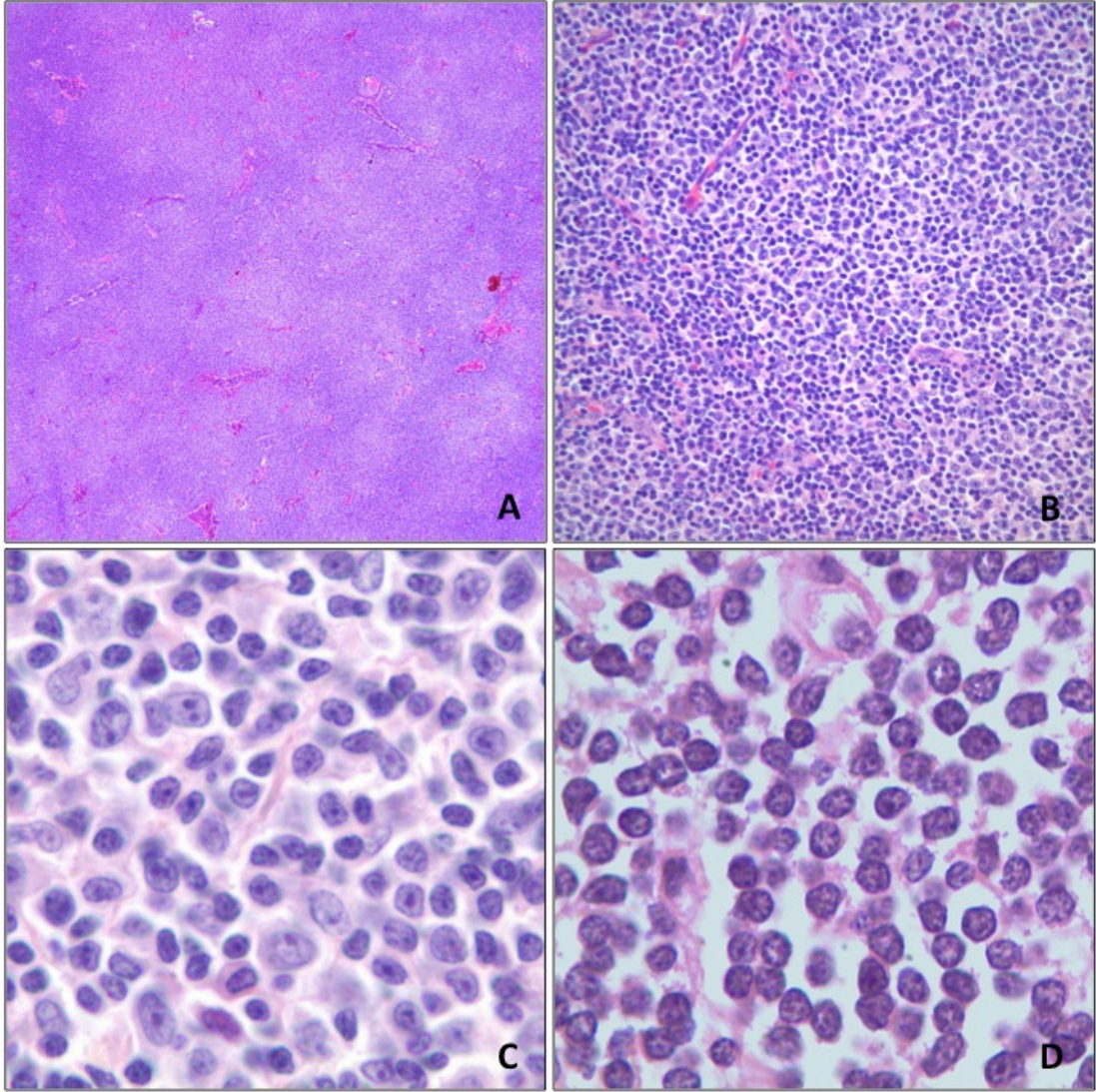
KLL, 2008 Dünya Sağlık Örgütü Hematopoyetik Neoplaziler Sınıflaması'nda "matür B hücreli lenfomalar" grubunda yer almakta olup klinik olarak çoğunlukla yavaş seyirli, düşük dereceli bir neoplazidir. KLL, kemik iliği, periferik kan, lenf nodülü ya da çeşitli solid organ tutulumlarıyla seyreden bir hastalıktır. Küçük lenfositik lenfoma tanımı lösemik olmayan olgular için kullanılır. Histolojik, immünofenotipik ve genetik özellikleriyle diğer düşük dereceli B hücreli tümörlerden ayrılır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar monoklonal B hücreli lenfositozun KLL'nin öncülü olduğunu ortaya koymuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KLL Tanısı

KLL tanısı, doku tutulumu olmadığı takdirde en az üç ay süre ile periferik kanda $\geq 5 \times 10^9/L$ KLL fenotipinde (CD19/CD5/CD23+) monoklonal lenfoid hücre varlığı ile konulur^{3,4}. Solid dokularda ise (başta lenf nodu olmak üzere, karaciğer, dalak vb.) monoton küçük lenfoid hücre infiltrasyonu şeklinde karşımıza çıkar. Lenf nodu yapısı genellikle bozulmuştur ve lenf nodu küçük lenfoid hücrelerle infiltridir. Reaktif lenf nodunda görülmesi beklenen follikül yapıları izlenmez. Bunun yerine proliferasyon merkezleri denilen daha açık renkli alanlar izlenir. Tarif edilen açık rengin sebebi bu alanların neoplastik prolenfosit ve paraimmünoblastlardan zengin olmasıdır. Prolenfositler, diğer küçük neoplastik lenfoid hücrelere nazaran daha iri görünümde, göreceli olarak geniş sitoplazmaya ve bir adet nükleol içeren nükleuslara sahip hücrelerdir. Paraimmünoblastlar ise veziküle kromatinli, santral yerleşimli eozinofilik nükleollü iri hücrelerdir; bu hücreler hafif bazofilik sitoplazmaya sahiptir. Küçük hücreler ise neoplastik olmayan lenfositlere göre biraz daha büyüktürler, kromatin kümelenmesi gösterirler ve yuvarlak nükleuslara sahiptirler (Şekil 2.1). Mitotik aktivite proliferasyon merkezleri dışında kalan alanlarda düşüktür.

Lenf nodu dışında kalan solid dokulardaki KLL tutulumunda proliferasyon merkezleri çoğu zaman izlenmez.



Şekil 2.1: H&E boyalı kesitlerde klasik KLL morfolojisi. Küçük büyütmede genel görünüm; açık renkli alanlar proliferasyon merkezlerini temsil etmektedir (A). Monoton görünümde lenfoid hücre popülasyonu (B). Prolenfosit ve paraimmünoblastlardan zengin proliferasyon merkezi (C). Proliferasyon merkezi dışındaki alanda küçük lenfoid hücre popülasyonu (D).

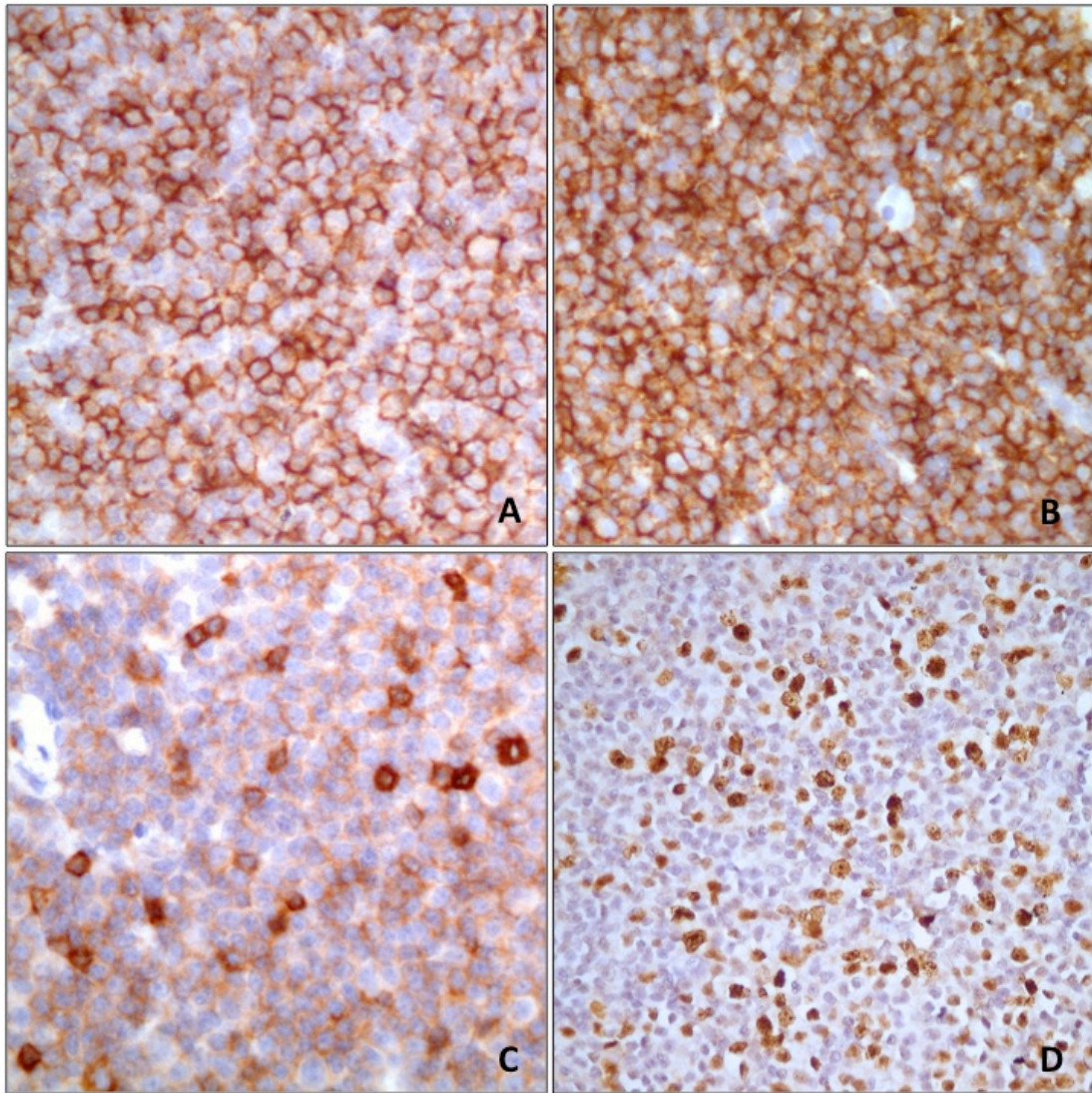
Biyopsi örnekleri arasında proliferasyon merkezlerinin boyutları ve yaygınlıkları değişkenlik gösterir. Daha önceki yıllarda araştırmacıların KLL'yi tipik ve atipik olmak üzere iki gruba ayırma önerileri olmuştur⁵. Bu iki grubun temel belirleyici özelliği proliferasyon merkezlerinin büyüklüğü ve yaygınlığı olarak belirtilmiştir. Günümüzde çok kabul görmemiş olsa da, bu ayırım, KLL'de yıllardır

proliferasyon merkezlerinin önemi üzerine düşünüldüğünün göstergesidir. Yüksek proliferatif aktivitesi nedeniyle proliferasyon merkezlerinden zengin görünüme sahip KLL olgularının daha agresif klinik gidiş ve daha kötü bir prognoza sahip olacağı düşünülmüştür. Bu konu üzerine yapılan çalışmaların çoğunda proliferasyon merkezi büyüklüğü/yaygınlığı ile klinik seyir arasında bir ilişki gösterilememişken, 2012 yılında yapılan bir çalışmada proliferasyon merkezlerinden zengin olguların daha kötü bir klinik seyre sahip oldukları ileri sürülmektedir⁶⁻⁸. Ayrıca yine bu çalışmada proliferasyon merkezlerinden zengin olguların 17p delesyonu, 14q32 translokasyonu ve trizomi 12 sıklığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁸.

Dalakta KLL tutulumu beyaz pulpanın genişlemesi ile karakterizedir. Bazı hastalarda kırmızı pulpa tutulumu da eşlik edebilir. Karaciğerde ise neoplastik hücreler hem sinüzoidlerde hem de portal alanlarda izlenir⁹.

Kemik iliği biyopsilerinde KLL infiltrasyonu dört farklı paterne sahip olabilir; nodüler, interstisyel, nodüler ve interstisyel, diffüz. Hakim olan neoplastik hücre popülasyonu küçük lenfoid hücrelerdir. Az sayıda prolenfosit ve paraimmünoblast izlenir. Kemik iliği aspirasyonlarında ise küçük, matür görünümde lenfoid hücreler izlenir. Daha önceleri tutulum kriteri olarak önerilen %30'dan fazla lenfoid hücre oranı yerine günümüzde kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan akım sitometri çalışmaları ile KLL fenotipindeki monoklonal lenfoid hücrelerin gösterilmesi tutulum için yeterli kabul edilmektedir⁹.

Kemik iliği biyopsi örneklerinde ya da solid organ biyopsilerinde immünohistokimyasal yöntemler ile KLL tanısı desteklenebilir. İmmünohistokimya ile lenfoid hücreler diffüz CD20 ekspresyonu yanı sıra değişken oranlarda CD5 ve CD23 ekspresyonu gösterirler (Şekil 2.2)³. Tipik olarak yüzeylelerinde CD20, IgD, IgM ekspresyonları normal B hücrelerine göre azalmıştır. Ayrıca ayırıcı tanıda neoplastik hücrelerin bcl-6, CD10 gibi germinal merkez ilişkili belirteçleri ve cyclinD1'i eksprese etmemeleri önemlidir.



Şekil 2.2: KLL'de immünohistokimyasal bulgular. Neoplastik hücrelerde diffüz CD20 ekspresyonu (A). Neoplastik hücrelerde diffüz CD23 ekspresyonu (B). CD5 ile dual boyanma paterni, zemindeki T lenfositlerde daha yoğun neoplastik hücrelerde daha zayıf ekspresyon (C). Bir proliferasyon merkezinde yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi (D).

2.2. Richter Transformasyonu (Richter Sendromu)

KLL, diğer tüm düşük dereceli B hücreli lenfoproliferatif hastalıklar gibi daha yüksek dereceli neoplazilere transformasyon riski taşımaktadır. KLL hastaları 5 yıl içerisinde %10, 10 yıl içerisinde ise %15 olasılıkla diffüz büyük B hücreli lenfomaya (DBBHL) transformasyon gösterebilir¹⁰. Bu transformasyon Richter sendromu olarak isimlendirilir. Ancak yıllar içerisinde KLL hastalarında DBBHL dışındaki

lenfoma/lösemi tiplerine de transformasyonun tanımlanması ile Richter sendromu kapsamı genişlemiştir; DBBHL yanı sıra KLL hastalarında B hücreli prolenfositik lösemi, Hodgkin lenfoma ve çok daha nadir olarak, lenfoblastik lösemi, "hairy cell" lösemi transformasyonu olabileceği de bilinmektedir¹¹. DBBHL'ya transformasyonun diğer lenfoma/lösemi tiplerine göre çok daha sık olması nedeniyle günümüzde Richter sendromu denilince akla öncelikle DBBHL'ya transformasyon gelmektedir.

Richter sendromu ilk olarak 1928 yılında bu antiteyi tanımlayan Maurice Richter nedeniyle bu isimle anılmaktadır¹². Richter sendromu tanısı ancak biyopsi örneğinden verilebilir. Merkezler arası klinik yaklaşım farklılığı olması nedeniyle gerçek sıklığını bilmek mümkün değildir. Rossi ve arkadaşları biyopsi alınmasını gerektirebilecek klinik durumları yaptıkları bir çalışmada belirtmişlerdir. Bu çalışmaya göre: 1- >5 cm lenf nodu varlığında, 2- 3 ay içine en büyük lenf nodu çapının iki katına çıkması halinde, 3- şüpheli ektranodal lezyon varlığında, 4- B semptomu gelişmesi durumunda, 5- Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyinde belirgin artım varlığında hastadan yeni biyopsi alınması tavsiye edilmektedir¹⁰.

Richter sendromu genellikle lenf nodüllerinde bulgu verir ancak daha nadir olarak diğer organlarda da tutulum izlenebilir. Lenf nodülünde tabakalar halinde büyük lenfoid hücrelerin varlığı Richter sendromu tanısı için yeterli bir bulgudur. Proliferasyon merkezlerinden zengin ancak net olarak DBBHL morfolojisine sahip olmayan vakalar Richter sendromu olarak isimlendirilmemelidir. İzlenen DBBHL sentroblastik ya da immünoblastik morfolojide olabilir. Ayrıca immünofenotipik olarak vakaların %80'i "germinal merkez dışı", %20'si ise "germinal merkez" fenotipindedir¹³.

Transformasyon patogenezi henüz netlik kazanmamıştır. Yapılan çalışmalarda gelişen DBBHL'ların %80'inin KLL ile benzer antijenik ekspresyon profiline sahip olduğu gösterilmiştir¹⁴. Bu bulgular ışığında KLL'de bulunan agresif bir alt klonu oluşturan hücrelerin DNA'larında zamanla biriken genetik ve/veya epigenetik lezyonların transformasyona neden olabileceği öne sürülmüştür. Ancak çoğu olguda gelişen DBBHL orijinal KLL klonundan köken alırken olguların daha az

bir kısmında ise mevcut KLL ile aynı klonla sahip olmayan bir lenfoid neoplazi geliştiği bilinmektedir¹⁵.

Transformasyona neden olabilecek genetik değişikliklerden birinin TP53 mutasyonu olduğu düşünülmektedir. TP53 mutasyonu ve 17p13 delesyonu KLL'nin DBBHL'ya transformasyonu ile ilişkilendirilen en sık genetik değişikliktir ancak KLL hastalarında TP53 mutasyon varlığının Richter sendromu riskini arttırmadığını söyleyen yayınlar da mevcuttur¹¹. 14q32 bölgesini içeren translokasyonlar ile Richter transformasyonu riski araştırılmış ancak bir ilişki bulunamamıştır¹⁶. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada KLL patogenezinde son yıllarda önemi artan NOTCH1 genindeki mutasyonların Richter transformasyonu riskinde 5,8 kat artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir¹⁷. Aynı çalışmada, KLL patogenezinde önemli olabileceği düşünülen SB3F1 genindeki mutasyonların Richter sendromu gelişiminde risk teşkil etmediği öne sürülmüştür¹⁷.

11, 13, ve 6. kromozomu ilgilendiren translokasyonlar, Trizomi 12 ve p16INK4A, p21, p27 gibi tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar ve Epstein-Barr virüsü (EBV) transformasyondan sorumlu tutulan diğer etkenlerdir¹³.

2.3. KLL Patogenezi

KLL gelişiminin özünde hücre çoğalmasıyla hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması yatmaktadır. KLL'nin B hücre gelişiminin hangi evresindeki hücrelerden köken aldığı bulunması altta yatan transformasyon mekanizmasının anlaşılabilmesi açısından çok önemlidir.

2.3.1. Monoklonal B Hücreli Lenfositöz Kavramı

KLL hastalarının birinci dereceden akrabaları olan sağlıklı bireylerin araştırılmasının öncülük ettiği bulgular ışığında KLL gelişiminde öncül bir antite olan "monoklonal B hücreli lenfositöz (MBL)" tanımlanmıştır¹⁸. 65 yaş üstü toplumda %6 oranında görülen bu durum bilinen bir otoimmün veya lenfoproliferatif hastalık yokluğunda, periferik kanda, KLL fenotipinde klonal B hücre popülasyonun gösterilmesi ve mutlak B hücre sayısının $5 \times 10^9 / L$ 'den az olmasıyla karakterizedir^{19,20}.

MBL sıklığı toplumda yaş grupları ile olduğu kadar aile bireylerinde KLL bulunması ile de ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda KLL hastalarının birinci dereceden yakınlarında MBL bulunma olasılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir²¹. Ancak günümüzde tıpkı RAI evre 0 KLL hastalarında olduğu gibi, MBL olgularında da klinik yaklaşımın nasıl olacağı tartışma konusudur. Önerilen ve uygulanan yol, aralıklı takiplerle hastalığın semptomatik hale gelmesi durumunda tedaviye başlanmasıdır⁴. MBL hastalarının yıl başına %1 oranında KLL'ye ilerleme riskleri vardır^{22,23}.

2.3.2. Hücre Kökeni

KLL'nin önceleri antijen ile karşılaşmış matür B hücre kökenli olduğu sanılmaktaydı ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla "immüoglobulin ağır zincir değişken bölge (IGHV)" genlerinde somatik hipermutasyon içermeyen vakaların saptanmasıyla günümüzde bu bilginin doğruluğu tartışılır hale gelmiştir²⁴. KLL hücreleri, CD20, CD23 ve CD5 eksprese eden, yüzelelerinde CD79a, IgD, IgM ekspresyonları azalmış matür, aktive B lenfosit fenotipindeki hücrelerdir²⁵.

B-hücre reseptörü (*B cell receptor - BCR*) üzerinde yapılan çalışmalarda KLL vakalarının %65'inin immüoglobulin değişken bölgelerinin (IGHV) somatik hipermutasyona uğramış olduğu gösterilmiştir. KLL olgularının %30-35'i ise bu somatik hipermutasyona sahip değildirler. Normal B hücreleri germinal merkezler içerisine girdikten sonra immüoglobulin değişken bölgeleri somatik hipermutasyona uğrar. Bu bulgular bazı KLL vakalarının germinal merkezden geçmiş B hücrelerinden, bazı vakaların ise germinal merkezden bağımsız diferansiasyona uğramış B hücrelerinden köken aldığı düşüncesini doğurmaktadır^{26,27,28,29}. Ancak tarif edilen iki grubun gen ekspresyon profilleri birkaç küçük farklılık dışında büyük benzerlik göstermektedir. Bu da her iki tipin de (mutasyona uğramış ya da uğramamış) antijenle karşılaşmış B hücrelerinden köken alabileceğini düşündürmektedir³⁰.

Birbiriyle ilişkisiz KLL hastalarından elde edilen örneklerin immüoglobulin ağır ve hafif zincirleri incelendiğinde şaşılacak düzeyde benzerlik gösterdikleri gözlenmiştir. *Stereotipi* de denilen bu durum KLL hücrelerini tetikleyen ortak "KLL

antijenlerinin” bulunduğunu desteklemektedir. Çalışmalar KLL antijenlerinin çoğunlukla apoptoza gitmekte olan hücrelerden açığa çıkan otoantijenler olduğunu desteklemektedir. Bu otoantijenlerdeki bazı epitoplara ise mikroorganizmaların antijenleri ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla KLL etiyojisinde antijenik uyarımın çok önemli bir rolü olduğu kabul edilmektedir.

Chiorazzi ve arkadaşlarının yayınlamış olduğu bir çalışmaya göre in-vitro deneylerde KLL hücrelerinden izole edilen monoklonal antikörlerin sitoplazma içerisinde *non-muscle myosin heavy chain IIA (MYHIIA)* antijenine yüksek oranda afinite gösterdiğini kanıtlanmıştır. KLL monoklonal antikörlerinin MYHIIA'ya bağlanmasının lösemik hücrelerin gelişimi, ve hayatta kalmalarında önemli role sahip olabileceği düşünülmektedir³¹.

2.3.3. Genetik Lezyonlar

Diğer B hücreli non-Hodgkin lenfomaların aksine dengeli kromozomal translokasyonlara KLL'de pek rastlanmaz. KLL'de genel olarak kromozomal bölgelerin delesyonu ve amplifikasyonu gözlenir. İmmüoglobulin ağır ve hafif zincir bölgelerini içeren translokasyonların sık olmaması KLL'nin germinal merkez sonrası veya germinal merkezden bağımsız gelişen B hücresi kökenli olmasıyla uyumludur.

2.3.3.1. Sitogenetik Anomaliler

KLL olgularının yaklaşık %80'inde genomik aberasyonlar saptanmaktadır³². KLL patogeneğinde önemli role sahip çok sayıda sitogenetik anomali tanımlanmıştır. En sık saptanan sitogenetik anomaliler 13, 11, 17, 6, 14 ve 12. kromozomları içerenlerdir.

2.3.3.1.1. del13q14

Sitogenetik anomalilerden KLL hastalarında en sık saptananı ve hastalığın pro-proliferatif ve anti-apoptotik doğasını da açıklayabilecek olanı 13q14 delesyonudur. 13q14 delesyonu KLL olgularının yarısından fazlasında görülür^{32,33}. Bu anomalinin MBL hastalarında da KLL ile benzer sıklıkta saptanmış olması 13q14

delesyonunun patogeneizde erken bir olay olduğunu düşündürmektedir³⁴. 13q14 delesyonu çoğunlukla monoallelilik olmakla birlikte az sayıda olguda biallelik delesyon da saptanmıştır³². Yapılan çalışmalarda 13. kromozomun kısa kolunda delesyona uğrayan “minimal delesyona uğramış bölge” olarak isimlendirilen bu bölgenin kodlanmayan *deleted in leukemia-1 (DLEU1)* ve *deleted in leukemia-2 (DLEU2)* genlerini içerdiği gösterilmiştir^{35,36}. DLEU-2 geninin 4. intronundan miR-15a ve miR-16-1 isimli iki mikroRNA eksprese olmaktadır³⁷. DLEU2 genini etkileyecek herhangi bir durum bu iki mikroRNA'nın da ekspresyonunu etkilemektedir. 13q14 delesyonu saptanmayan olguların bir kısmında DLEU2, miR-15a ve miR-16-1'in *down-regülasyonu* gösterilmiştir³⁷. DLEU2 komşuluğunda bulunan DLEU-1 ve bir takım diğer genlerin, normal B hücrelerinde ekspresyonlarının olmaması göz önüne alınarak KLL patogenezinde rol oynamadığı düşünülmektedir^{38,39}. DLEU-2 geninden kodlanmayan uzun bir mRNA transkripsiyonu gerçekleşir. Bu mRNA dizisi ise miR-15a ve miR16-1 eldesi için kullanılır. Bu genin tanımlanan miRNA'lara kaynak oluşturmak dışında bir fonksiyonu olup olmadığı ise bilinmemektedir. miR-15a ve miR-16-1'nin, tıpkı bir tümör süpresör gen gibi davrandığı, genomda birçok bölgeye afinitesinin olduğu ve bu bölgelere bağlanarak hedef genlerin ekspresyonlarında değişime yol açtığı gösterilmiştir. Bu genlerden en önemlileri: siklinler (CCND1, CCND3), siklin-bağımlı kinazlar ve apoptoz ilişkili genlerin en önemlilerinden biri olan BCL-2'dir. Yapılan çalışmalarda bir antiapoptotik gen olan BCL-2'nin ekspresyonunun miR-15a ve miR-16-1 ekspresyonu ile ters korelasyon gösterdiği saptanmıştır⁴⁰. 2007 yılında fare modelleri ile yapılan bir çalışmada KLL gelişiminin miRNA-16 lokusu anomalileri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁴¹. Bir diğer çalışmada 13q14'te delesyona uğrayan alanda, 221 aminoasitlik protein ekprese eden DLEU7 geni tanımlanmış olup bu genin bu bölgede protein kodlayan tek gen olduğu saptanmıştır⁴². Bu genin bir tümör süpresör gen olduğu ve miRNA15a ve 16-1 ile birlikte hareket ettiği ortaya konmuştur⁴³. Delesyon ya da başka anomaliler nedeniyle DLEU7 inaktivasyonu gerçekleştiğinde TRAF'lar (*TNF-receptor associated factor*) aracılığı ile TNF sinyal yolağı aktive olur. TNF yolağını etkileyen bu olay KLL gelişiminde önemli bir basamak olarak kabul edilmektedir⁴⁴.

2.3.3.1.2. 14q32 Anomalileri

14. kromozomda lokalize bir gen olan TCL-1'in (*T-cell leukemia-1*) KLL patogenezinde yer alabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda TCL-1'in, T lenfositlerdeki fonksiyonundan farklı olarak B hücrelerinde bir transkripsiyon regülatörü rolü gördüğü ve artmış aktivite durumunda NF- κ 'yı uyarıp, AP-1'i inhibe ederek apoptoz hatalarına yol açtığı gösterilmiştir⁴⁵.

2.3.3.1.3. Trizomi 12

Trizomi 12, KLL olgularının yaklaşık %15'inde izlenir. Trizomi 12'nin hastalığın patogenezindeki yeri henüz diğer genomik aberasyonlar kadar aydınlatılamamış olmakla birlikte bazı protoonkogenlerin düzeylerinde artışa yol açabileceği düşünülmektedir. Trizomi 12'nin prognozdaki yeri de henüz literatürde netlik kazanmamıştır^{46,47}. Ayrıca ileride daha detaylıca bahsedilecek olan NOTCH yoluğ anomalies ile trizomi 12 birlikteliğı de literatürde bildirilmiştir⁴⁸.

2.3.3.1.4. del11q22-23

11q22-23 delesyonları 325 KLL olgusundan oluşan geniş bir seride %18 oranında saptanmıştır³². 11. kromozomdaki bu bölge ATM genini içermektedir. 11q delesyonu ATM geninin fonksiyon görememesine neden olup genomda instabiliteye yol açar. Bu da yeni gelişecek mutasyonlara zemin hazırlamakta ve lenfoid maligniteler için yatkınlık oluşturmaktadır⁴⁹. Ayrıca 11. kromozomu içeren translokasyona sahip bir hastada gösterilen ve kırılma noktasında bulunan, hücre döngüsünün negatif düzenleyicisi olan POU2AF1 ve BTG4 genlerinin 11q delesyonu olan KLL olgularının patogenezinde rol oynayabileceğı de belirtilmiştir⁵⁰.

2.3.3.1.5. del6q

6q delesyonu diğer sitogenetik anomalilere göre daha az sıklıkta görülür (%3-10) ve genellikle diğer sitogenetik anomaliler ile birliktelik gösterir⁵¹. 6q delesyonunun KLL patogenezindeki yeri henüz açıklığa kavuşmamış olsa da diğer anomalilere göre daha nadir saptanması ve diğer sitogenetik anomalilerle birlikte görülmesi bu delesyonun patogeneizde geç bir olay olduğunu düşündürmektedir.

2.3.3.2. Somatik Mutasyonlar

Yukarıda bahsedilen sitogenetik anomaliler yanı sıra özellikle yeni jenerasyon sekanslama teknolojisinin araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanması sonucu KLL patogenezinde ve prognozunda etkili önemli yeni genler tanımlanmıştır. Daha önceki yıllardan beri bilinen TP53 ve ATM genleri yanı sıra günümüzde SF3B1, NOTCH ve MYD88 başta olmak üzere saptanan yeni genlerin önemi her geçen gün artmakta ve yeni yapılan araştırmalar bu genlerde saptanan mutasyonların patogenezdaki rolünü aydınlatmaya yardımcı olmaktadır⁵². KLL olgularında mutasyonu saptanan başlıca genler aşağıda daha ayrıntılı olarak yer almaktadır.

2.3.3.2.1. NOTCH (*Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1*)

KLL patogenezinde ve hastalığın seyrinde önemli olduğu düşünölen anomalilerden biri NOTCH yolağının mutasyon bağımlı aktivasyonudur. NOTCH1 dört adet trans-membran reseptör ve beş adet liganddan oluşan aileye mensuptur. NOTCH1 ligand aracılı aktivasyon ile fonksiyon gören bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre diferansiasyonu ve proliferasyonunda rol oynaması yanı sıra apoptotik süreçleri de etkiler⁵³. Mutasyonu halinde bu yolaklarda bozukluklar neticesinde lökomogenez indöklenebilir. NOTCH yolağı bozuklukları T hücreli lenfomalarda detaylı bir şekilde tanımlanmıştır ancak KLL ve MBL'deki yeri ise son yıllarda sayılarında belirgin artış görölen araştırmalar ile anlaşılmaya başlamıştır^{54,55}. KLL hastalarında tanı anında NOTCH1 mutasyonu görölme oranı çalışmalar arası farklılık göstermekle birlikte ortalama olarak %10 civarındadır ancak MBL olgularında oldukça seyrek^{56,57}. Bu da NOTCH1 mutasyonunun patogenetik yolakta geç bir olay olduğunu düşöndürmektedir. Ayrıca NOTCH1 mutasyonunun kötü klinik seyirle ilişkili olduğu gösterilmiştir⁵⁸.

2.3.3.2.2. SF3B1 (*Splicing Factor 3B1*)

SF3B1 geni prekürsör mRNA'ların oluşması sırasında intronik alanların kesilmesini sağlayan *splicing* mekanizmasında görev alan bir gendir. Yeni jenerasyon sekanslama yöntemlerinin geliştirilmesi bu genin KLL olgularında sıklıkla mutasyona

uğramış olduğunu göstermiştir. 128 vaka örneği üzerinde ekzom sekanslaması ile yapılan bir çalışmada KLL olgularının %9,7'sinde SF3B1 mutasyonu gösterilmiştir. 91 vakalık bir seride ise SF3B1 mutasyon sıklığı %15 olarak bulunmuştur⁵⁹. SF3B1 mutasyonu *splicing* yolaklarında bozulma sonucu hatalı protein oluşumuna neden olmaktadır⁶⁰. Henüz aralarındaki ilişkinin sebebi net olarak açıklanamamış olsa da SF3B1 mutasyonu ile 11q delesyonunun önemli ölçüde beraberlik göstermesi ATM geninin (ATM geni 11. kromozomda yer almaktadır) de bu patogenetik yolda önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. ATM gen kaybı durumunda SF3B1 mutasyonunun DNA hasarına karşı gelişen cevapta değişikliğe sebep olabileceği öngörülmektedir⁶⁰. Ayrıca BRAF ve PTEN gibi onkogenlerin SF3B1 bağımlı intronik alanlar içermesi de karsinogeneizde bu genler aracılı bir mekanizmaya işaret ediyor olabilir⁶¹.

2.3.3.2.3. ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*)

11. kromozomda yerleşim gösteren ATM geni kromozomal aberasyonlar nedeniyle olabileceği gibi çeşitli mutasyonlar nedeniyle de fonksiyon kaybına uğrayabilir. Wang ve arkadaşlarının yaptığı ve 2011 yılının sonunda yayınlanan bir çalışmaya göre ATM geni, KLL hastalarında en sık mutasyonu saptanan genlerden biridir. Bu çalışmada mutasyon sıklığı %9 olarak bulunmuştur⁵⁹. ATM geni DNA tamirinden sorumludur ve mutasyonu halinde genomda instabilite ve yeni mutasyonlar için uygun ortam şekillenmiş olacaktır.

2.3.3.2.4. MYD88

Tıpkı NOTCH ve SF3B1 gibi MYD88 geni de yeni jenerasyon sekanslama tekniklerinin gelişimi ile KLL patogeneizinde yeri gösterilmiş genlerden biridir. 363 hasta örneği üzerinde tüm genom sekanslama yöntemi ile yapılan çalışmalarda %2,9 oranında MYD88 mutasyonu saptanmıştır. MYD88 mutasyonunun hemen her zaman IGVH-mutant olgularda gözleendiği belirtilmiştir⁶². MYD88 geninin immün yanıt sırasında interlökin-1 ve "Toll-like" reseptör (TLR) arasındaki etkileşimde görev aldığı düşünülmektedir. MYD88 gen mutasyonu nedeniyle salınımı belirgin olarak

artan sitokinler KLL hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayan bir ortam oluşturur. Ayrıca aktive edici tipte MYD88 mutasyonunun hücrelerde TLR aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. KLL hücresinde TLR aktivitesinde meydana gelen artımın hücrelerde proliferasyon uyarımına neden olduğu ve hücrenin spontan apoptozdan korunmasını sağladığı belirtilmektedir⁶³.

2.3.3.2.5. BIRC3

BIRC3 geni apoptoz inhibitörü protein ailesinin üyesi olan bir proteini kodlar. Bu gen KLL için önemli bir kromozomal bölge olan 11q22 lokusunda bulunur. BIRC3 homologu olan BIRC2 ile birlikte NF- κ B'nin aktivasyonunu düzenler. Patogeneizde öngörülen mekanizma BIRC3 mutasyonunun NF- κ B aktivasyonunu arttırması ve böylece KLL hücrelerinin sağkalımını arttırması şeklindedir⁶⁴. Ayrıca yapılan bir çalışmada BIRC3 mutasyonlarının MBL, Richter sendromu hastalarında ya da fludarabine duyarlı hasta grubunda saptanmadığı üzerinde durulmaktadır. Bu da BIRC3 mutasyonunun bir hasta grubuna özgü olduğu inancını pekiştirmekte ve KLL patogenezinde geç olaylardan biri olduğunu düşündürmektedir⁶⁵.

2.3.3.2.6. TP53

TP53 mutasyonlarının patogenezdeki yeri ileride daha detaylı bir şekilde ele alınmaktadır.

2.4. Klinik Evreleme

KLL için temel olarak iki evreleme sistemi kullanılabilir. Her iki sistem de, aralarında küçük farklar olmakla birlikte lenf nodu tutulumu, hepatomegali, splenomegali ve hastanın kan parametreleri üzerinde şekillenmektedir.

RAI evrelemesi, KLL hastaları için ilk kez 1975 yılında Rai ve arkadaşları tarafından önerilmiştir⁶⁶. Bu evreleme sistemine göre hastalar beş gruba ayrılırlar (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 RAI Evreleme Sistemi

Evre	Laboratuvar ve/veya fizik muayene bulguları
0	Absolü lenfositoz (>15.000/mm ³). Lenfadenopati, hepatomegali, splenomegali, anemi veya trombositopeni yok.
1	Absolü lenfositoz ve lenfadenopati mevcut. Hepatomegali, splenomegali, anemi veya trombositopeni yok.
2	Absolü lenfositoz ve hepatomegali ya da splenomegali mevcut. Anemi ya da trombositopeni yok.
3	Absolü lenfositoz ve anemi (hemoglobün <11 g/dL) mevcut
4	Absolü lenfositoz ve trombositopeni (trombosit 100.000 / mm ³)mevcut.

Beşli bir sistem olan RAI evrelemede hastalar düşük risk (evre 0), orta derecede risk (evre 1 ve 2) ve yüksek risk (evre 3 ve 4) olarak düşünölebileceği söylenmektedir⁴. RAI evresi hastalığın prognozunu belirlemede en önemli kriterlerden biri olma özelliğini günümüzde de sürdürmektedir.

Binet evreleme sistemi RAI evrelemede benzerle birlikte küçük bazı farklar içermektedir. İlk kez Binet ve arkadaşları tarafından 1981 yılında önerilen bu sisteme göre A, B ve C olmak üzere üç farklı risk grubu tanımlanmıştır⁶⁷.

Binet evre A – Anemi ve trombositopeni yokluğunda üçten az bölgede hastalık tutulumu.

Binet evre B – Anemi ve trombositopeni yokluğunda üç veya daha fazla bölgede hastalık tutulumu.

Binet evre C – Tutulan bölge sayısından bağımsız olarak anemi ve/veya trombositopeni varlığı.

Binet evreleme sistemi tıpkı RAI sistemi gibi klinik verilere dayanmakta olup hastalığın seyrini belirlemede büyük öneme sahiptir. Binet sistemi Avrupa'da yaygın olarak kullanılmakta ve kabul görmekte olup dünyanın diğer bölgelerinde genellikle RAI evreleme sistemi kullanılmaktadır.

2.5. Prognostik Parametreler

KLL hastalarının büyük kısmı RAI Evre 0 ve Evre 1 olarak karşımıza çıkarlar ve çoğunlukla başka bir sebepten ötürü bakılan tam kan sayımında izlenen lenfositöz neticesinde tanı alırlar. Bu hastaların büyük kısmı uzun yıllar tedavisiz izlenebilir ve tedaviye gereksinim duymazlar^{4,68}.

KLL tamamen ortadan kaldırılamayan ancak hastaların büyük kısmının uygun tedavi seçenekleri ile uzun süreler tam remisyonda tutulabildiği bir hastalıktır. *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL)* grubunun 2008'de yayınladığı rehberde tam remisyon kriterleri net bir şekilde açıklanmıştır. Bir hastanın tam remisyonda olduğunu söyleyebilmek için aşağıdaki kriterlerin tamamını sağlaması gerekmektedir;

- 1- Periferik kan lenfosit sayısı $<4 \times 10^9/L$ olması,
- 2- Fizik muayene ile ele gelen lenfadenopatinin olmaması,
- 3- Fizik muayenede hepatomegali ya da splenomegali olmaması,
- 4- Hastalığa bağlı klinik semptomların olmaması,
- 5- Nötrofil sayısı $>1,5 \times 10^9/L$, Trombosit sayısı $>100 \times 10^9/L$, Hb >11 g/dL olması⁴.

Her ne kadar klinik evre, KLL prognozunda ve hastalığa müdahale kararında en önemli belirleyici faktör olsa da hastaların bir kısmı evreden bağımsız olarak progresif ve ölümcül bir klinik seyir göstermekte; hatta DBBHL başta olmak üzere yüksek dereceli lenfomalara transforme olabilmektedir. Progresif hastalık kriterleri de IWCLL grubu tarafından net olarak tanımlanmıştır. Buna göre hastaların progresif hastalık kategorisinde değerlendirilmesi için aşağıdaki kriterlerden birinin gerçekleşmesi gerekmektedir:

1. Hastada izlem veya tedavi sırasında yeni lenfadenopati ortaya çıkması,
2. Dalak veya karaciğer boyutunda artım,
3. Yapılan lenf nodu biyopsisinde agresif lenfomayı düşündürecek bulguların mevcut olması
4. KLL'ye bağlı sitopeni olması.

Hastalardaki klinik tablonun değişken durumu nedeniyle hastalık seyrini öngörebilecek, tedaviye yanıt ve tedavi seçimi hakkında fikir verebilecek çeşitli prognostik ve prediktif parametrelere ihtiyaç duyulmaktadır. Klinikte en çok kullanılan parametreler LDH düzeyi, albümin düzeyi, kreatinin düzeyi ve lenfosit ikilenme zamanıdır. Bununla beraber günümüzde akım sitometri ve diğer bazı analiz yöntemleri ile kolayca bakılabilen serum β 2M düzeyi, serum Timidin kinaz düzeyi, serum sCD23 düzeyi gibi parametrelerin de klinikte kullanımı artış göstermektedir.

Tarif edilen bu parametreler yanı sıra son yıllarda araştırmacılar, KLL hastalarında prognoz hakkında belirleyici yere sahip olduğunu düşündükleri moleküler belirteçlerin önemine değinmektedir. Moleküler belirteçler arasında en önemlileri ise şöyle sıralanabilir: IGHV mutasyon durumu, sitogenetik anomaliler (del17p13, del6q, del11q22-q23, del13q14, trizomi 12 ve 14q32'yi içeren translokasyonlar) ve TP53 mutasyon durumu.

2.5.1. Klinik ve Laboratuvar Verileri

Daha önce de bahsedildiği gibi RAI ve Binet, klinisyenler tarafından yaygın olarak kabul gören klinik evreleme sistemleridir. Klinik ve laboratuvar verileri baz alınarak yapılan değerlendirme ile hastaların risk grupları belirlenir. Kullanımının kolaylaştırılması amacıyla RAI evreleme sisteminde belirtilen 5 kategori günümüzde 3 ana grup olarak yeniden düzenlenmiştir. Buna göre RAI evre 0 ve 1 olanlar düşük risk, RAI evre 2 ve 3 olanlar orta derecede risk ve RAI evre 4 ve 5 olanlar yüksek risk grubu içerisinde değerlendirilirler. RAI ve Binet evrelemeleri hastalığın prognozunu öngörmede büyük fayda sağlamaktadır. IWCCCL grubunun 2008 yılında yayınladığı rehberde düşük risk grubundaki hastaların tedavisiz izleme alınması, yüksek risk grubundaki hastalarda ise kemoterapiye başlanması önerilmektedir⁴.

Serum β 2M, serum Timidin kinaz, serum CD23 ve serum LDH düzeyleri yüksek hücre döngüsü ve tümör yükü göstergeleri olarak hastalığın seyri açısından fikir vericidir. Bu belirteçlerin hastalığın seyri üzerinde önemli yere sahip olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir⁶⁹⁻⁷².

2.5.2. Moleküler Belirteçler, Sitogenetik Anomaliler ve Mutasyonlar

IGHV mutasyon durumu moleküler belirteçler arasında öne çıkmaktadır. Mutasyona uğramış klonal neoplastik hücrelerden oluşan KLL olgularının, mutasyonu olmayanlarla kıyasla daha yavaş klinik seyir gösterdiği gözlenmiştir.⁷³ 2000 yılında yayınlanan bir çalışmada diğer parametrelerden bağımsız olarak IGHV mutant olguların mutasyon içermeyen olgulara göre iki kat daha uzun sağkalım sürelerine sahip olduğu gösterilmiştir⁷⁴. Günümüzde mutasyon durumu belirlenmesi oldukça pahalı ve zahmetli olduğundan klinik kullanımı yaygın değildir. Bu nedenle mutasyon durumunu belirlemek için bazı dolaylı belirteçlerin kullanımı tartışılmaktadır. Özellikle ZAP70 ve CD38 ekspresyonunun IGHV mutasyon durumu ile yüksek güvenilirlikle ilişkili olduğu gösterilmiştir^{75,76}. Bu bulgulara ek olarak 2012 yılında yayınlanan bir çalışmada KLL hücrelerinde akım sitometrik analiz ile belirlenebilen aberan CD8 ekspresyonunun nadir bir bulgu olduğu (%1.1) ancak kötü klinik seyirle ilişkili olduğu belirtilmektedir⁷⁷.

KLL olgularında prognozu belirleyen önemli bir diğer değişken ise sık saptanan delesyonlar ve diğer nadir genomik aberasyonlardır. Hemen hepsi için ticari floresan in-situ hibridizasyon (FISH) problemleri geliştirilmiştir. Günlük pratikte rutin olarak bakılması önerilen sık görülen sitogenetik anomaliler şöyle sıralanabilir: del13q14, trizomi12, del11q22-q23, 14q32'yi içeren translokasyonlar, del17p13, del6q. KLL hastalarında herhangi bir sitogenetik anomali saptanma olasılığı yaklaşık %80'dir. Bu genetik anomaliler prognoz üzerinde kuvvetli etkiye sahiptir^{78,79}. Kompleks karyotipe sahip hastaların tek bir sitogenetik anomali saptanan hastalara göre daha kötü bir klinik seyir gösterdikleri belirtilmektedir⁸⁰.

En sık saptanan sitogenetik anomali, patogenezi başlığı altında detaylı bir şekilde ele alınan del13q14'tür ve iyi prognozla ilişkilendirilen tek sitogenetik anomalidir. Yapılan çalışmalarda del13q14'ün sağkalım üzerindeki etkisi çarpıcıdır. Yapılan bir çalışmada 13q14 delesyonu olan hastaların ortalama sağkalım süreleri 133 ay iken normal karyotipe sahip hastalarda bu süre 111 aydır³².

Trizomi 12'nin hastalığın prognozu üzerine etkisi tartışmalıdır. Literatürde birbirinden farklı ve çelişen sonuçlar bildirilmiştir. Bir çalışmada trizomi 12 içeren

hastaların 13q14 delesyonu olan hastalara göre sağkalım sürelerinde belirgin azalma gösterilmiştir ancak normal karyotipe sahip hastalarla kıyaslanınca istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gösterilememiştir³². 391 hasta üzerinde yapılan bir başka çalışmada, 67 hastada trizomi 12 saptanmıştır ve bu anomalinin prognoz üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir⁸⁰.

14q32'yi içeren translokasyonların KLL hastalarında kötü klinik seyir ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir^{80,81}.

del11q22-23'e sahip KLL hastaların gerek normal karyotip gerekse 13q14 delesyonu gösteren hastalara göre sağkalım süreleri belirgin olarak kısadır. Bir çalışmada bu süreler del11q22-q23 gösteren hastalarda 79 ay, normal karyotipli hastalarda 111 ay ve del13q14 gösteren hastalarda 133 ay olarak bulunmuştur³². Bir diğer çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmıştır⁷⁴.

17p13 delesyonu tedavi yaklaşımlarının değişmesini gerektirecek kadar önemli bir bulgudur. 17. kromozomun kısa kolunda TP53 geni yer almaktadır. 17p13 delesyonu tedavide kullanılan klasik ajanlara yanıtızsızlık ile ilişkilidir^{82,83}. Yapılan çalışmalarda, sitogenetik anomaliler arasında klinik olarak en kötü seyirle gidenin 17p13 delesyonu olduğu vurgulanmaktadır³². Bu olgularda tedavide anti-CD52 monoklonal antikoru ile yapılan tedavinin daha başarılı olduğu gösterilmiştir.⁸⁴ Buna göre KLL hastalarında 17p13 delesyonunun tedavide başlama anında belirlenmesi hastalığın tedavi protokollerinin düzenlenmesinde en önemli karar verici basamaklardan biri olacaktır.

KLL hastalarında sitogenetik anomalilerin saptanabilmesi için klasik kromozom bantlama (rutin sitogenetik) ya da FISH kullanılabilir. Ancak yapılan çalışmalar FISH yönteminin anomalileri saptamada daha duyarlı olduğunu göstermiştir^{32,85,86}.

Sitogenetik anomaliler yanı sıra yukarıda detaylı bir şekilde anlatılan ve KLL patogenezinde etkili olduğu belirtilen genlerdeki mutasyonların hastaların prognozu üzerine etkisi de araştırmacılar için umut vaat edici çalışma konulardan biridir.

NOTCH1 mutasyonu KLL olgularında %4-15 gibi bir sıklığa sahip olup mutasyon içermeyen IGHV geni, yüksek ZAP70 ve CD38 ekspresyonu ile pozitif

korelasyon göstermektedir. NOTCH1 genindeki mutasyonların kötü bir klinik seyir ve toplam sağkalım süresinde kısalma ile ilişkisi olduğu literatürde belirtilmektedir^{53,58,87}. Yapılan bir diğer çalışmada ise trizomi 12 ile NOTCH1 mutasyonu ilişkisi ve bu durumun prognoz üzerine etkisi araştırılmış, NOTCH1 mutasyonu ile trizomi 12 birlikteliğine sahip olguların sağkalım sürelerinde belirgin kısalma olduğu gösterilmiştir⁸⁸.

KLL olgularında ortalama %15 oranında saptanan SF3B1 mutasyonu patogeneze olduğu kadar hastalığın prognozunda da önemli rol oynamaktadır. SF3B1 geninde mutasyon varlığı diğer parametrelerden (klinik evre, olumsuz klinik etkiye sahip sitogenetik anomaliler, ZAP70 ve CD38 ekspresyonu...) bağımsız olarak belirgin prognostik etkiye sahiptir. Yapılan bir araştırmaya göre SF3B1 geninde mutasyonu olan vakaların sağkalım süreleri olmayan vakalara göre %30 daha kısa bulunmuştur⁸⁹.

MYD88 mutasyonu KLL hastalarında SF3B1, NOTCH1 ve TP53'e göre daha nadir (yapılan bir çalışmada MYD88 mutasyonu hastaların %2,9'unda saptanmıştır ve IGVH-mutant olgularda bu oran belirgin olarak daha yüksektir⁶²) olarak izlenir. Patogeneze yerini aydınlatma çalışmaları yanı sıra bu mutasyonun hastalık seyri üzerine etkisi de araştırılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar MYD88 mutasyonunun prognoz üzerine etkisinin olmadığı düşünülmektedir^{62,90}.

11q22 lokalizasyonunda bulunan BIRC3 geni, yukarıda tarif edilen mutasyonlar dışında KLL hastalarında prognoza dair fikir verebileceği düşünülen genlerden biridir. Daha önce detaylı bir şekilde yer verildiği üzere 11q22 bölgesindeki kayıp KLL hastalarında sık izlenen genetik bir anomalidir ve kötü prognoz ile ilişkilidir. 11q22 bölgesindeki kayıp hemen her zaman ATM genini içerir ancak BIRC3 geni ATM'den farklı olarak, delesyondan ziyade mutasyon bağımlı inaktivasyona uğrar. KLL hastalarında BIRC3 mutasyonu ilk kez 2011 yılında Fabbri ve arkadaşları tarafından gösterilmiş olup bu çalışma grubunda yer alan hastaların %5'inden azında saptanmıştır⁹¹. Bir başka çalışmada ise BIRC3 mutasyon sıklığının fludarabin tedavisine dirençli hastalarda %23 olduğu dikkati çekici bir bulgu olarak yer almaktadır⁶⁵.

TP53 mutasyonlarının ya da bu geni içeren delesyonların (del17p13) KLL patogenezi ve prognozundaki yeri üzerine yapılan araştırmalar son yıllarda belirgin artış göstermiştir. Tek başına bağımsız bir parametre olarak TP53 mutasyonu diğer bütün genetik anomalilere göre prognoz üzerinde daha çarpıcı bir etkiye sahiptir. Aşağıda TP53 geninin temel özellikleri, mutasyonlarının ve TP53'ü içeren kromozomal delesyonların KLL patogenezinde ve prognozundaki önemi detaylı bir şekilde ele alınacaktır.

2.6. Tedavi

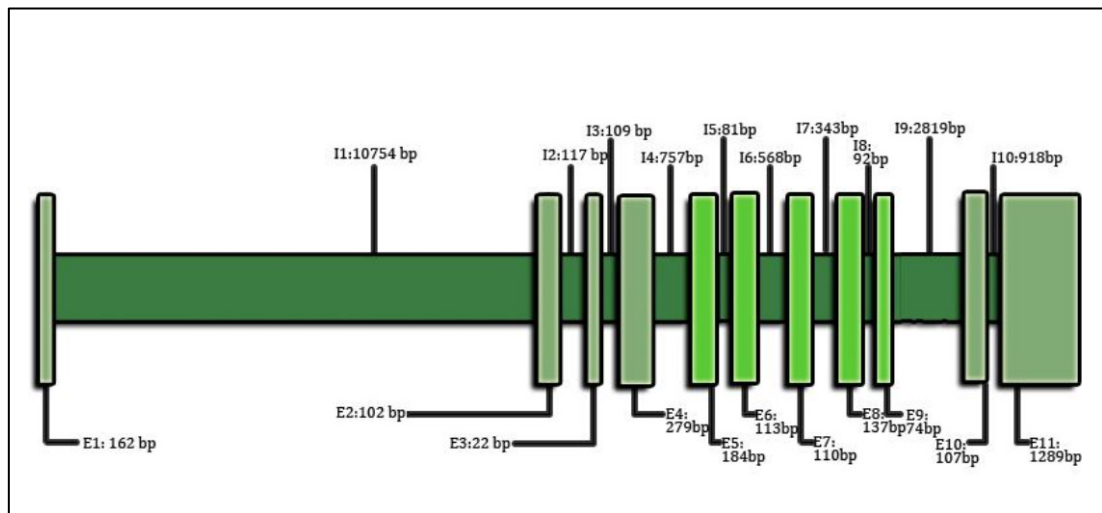
KLL hastalarında ilk basamak tedavide hasta eğer genç ise ya da genel durumu iyi ileri yaşta bir hasta ise fludarabin, siklofosamid ve ritüksimab kombinasyon tedavisi önerilmektedir. Ancak 24 ay içinde relaps gösteren ya da p53 mutasyonu ve/veya 17p13 delesyonu olan hastalarda allojenik kök hücre tedavisine geçilmesinin daha iyi sonuçlar vereceği vurgulanmaktadır⁹².

2.7. TP53

2.7.1. Genel Bilgiler

İlk kez 1979 yılında tanımlanan TP53 geni, 17p13.1 lokusunda bulunan tümör süpresör bir gendir⁹³. Genin ürünü olan p53 proteini bir transkripsiyon faktörü olup hücre döngüsü duraksaması, yaşlanma, apoptoz ve DNA tamiri gibi hücre içi önemli yollarda rol alır⁹⁴. p53 proteini bir tümör baskılayıcı protein olarak strese iki farklı şekilde yanıt verir: hücre döngüsünü durdurmak (hücre döngüsü duraklaması) ya da hücreyi apoptoza sürüklemek. *Wild-type* p53 proteini stres altında olmayan hücrelerde kısa (5-40 dk) bir yarı ömre sahip olup normal şartlar altında MDM2 (*murine double minute-2*) proteini tarafından yıkılır^{95,96}. Bu, MDM2 ve MDM4'ün oluşturduğu heterodimer yapısındaki proteinin p53'ü ubiquitimize ederek yıkım yollarına yönlendirmesiyle gerçekleşir. Eğer normalde hücre içindeki bu yıkım gerçekleşmezse p53 birikecek ve hücre stres altında olmasa bile fazla p53 hücre döngüsünü durduracak ve hücreyi apoptoza sürükleyecektir⁹⁷.

İnsan TP53 geni 11 ekzon ve bu ekzonların arasına dağılmış 10 introndan oluşur (Şekil 2.3). 1. ekzon kodlanmayan bir ekzondur ancak 2-11. ekzonlar 393 aminoasitlik bir proteini kodlarlar. p53 proteini 5 ana fonksiyonel kompartmandan meydana gelmektedir: N terminal amino asid dizisinden oluşan transaktivasyon bölgesi, diğer proteinlerle etkileşimi sağlayan prolinden zengin bölge, çeşitli proteinleri eksprese eden genlerin promoter bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu düzenleyen DNA'ya bağlanma bölgesi, tetramerizasyon bölgesi ve son olarak düzenleyici fonksiyon gören ve p53'ün yıkımını gerçekleştiren proteozomlara yönlendirilmeyi sağlayan ubiquitinizasyonun gerçekleştirildiği "C-ucu". Gerçekte TP53 geni alternatif *splicing* mekanizmaları sebebiyle 16 potansiyel transkriptte sahiptir. Ancak sentez edilen tüm proteinlerde DNA bağlanma bölgesi kalıcılığını korur.



Şekil 2.3: TP53 geninin temel yapısı; 11 ekzon ve 10 intron. Ekzonlar "E" harfi ile intronlar "İ" harfi ile temsil edilmekte ve her bölgenin baz uzunluğu verilmektedir. Mutasyonların %90'ını içeren 5, 6, 7, 8 ve 9. ekzonlar açık yeşil ile boyanarak işaretlenmiştir.

TP53 geni insanlarda izlenen kanserlerde mutasyonu en sık saptanan genidir^{93,98}. Kanserlerin %50'sinden fazlası TP53 mutasyonu içerir⁹⁹. Bu nedenle TP53 araştırmacılar için ilgi odağı olma özelliğini yıllardır sürdürmektedir. İnsan kanserlerinde TP53 mutasyonlarının önemli bir kısmı (>%95) DNA bağlanma bölgesini kodlayan dizide (ekzon 4, 5, 6, 7, 8, 9'da) yerleşim göstermektedir. Bu

alanda belirli *hot-spot* mutasyonlar tanımlanmıştır (kodon 175, kodon 245, kodon 248, kodon 249, kodon 273 ve kodon 282)¹⁰⁰. TP53 genindeki mutasyonların kabaca iki grupta sınıflandırılabilceği söylenmektedir¹⁰¹. Mutasyonların bir grubu DNA bağlanan bölgeyi ilgilendiren ve proteinin transkripsiyonel aktivitesinde değışikliklere neden olan mutasyonlar diğeri bir grubu ise proteinde konformasyonel değışikliklere yol açan mutasyonlardır.

Tümör süpresör genlerin genel kural olarak, biallelik kayıplar ya da mutasyonlar sonucu fonksiyonlarını kaybettiği ve karsinogeneze önyak oldukları bilinmektedir. Ancak TP53 geni diğeri tümör süpresör genlerden farklıdır. TP53'teki monoallelik kayıplar ya da *missense* mutasyonlar hücre içinde stabil bir protein birikimine yol açar. Mutant p53 proteini *wild-type* p53 proteininin inaktivasyonuna sebep olarak fonksiyon görmesini engeller¹⁰². Karsinogenezin ilerleyen safhalarında *wild-type* allelde heterozigosite kaybı meydana gelir. Tümörün büyümesi ve gelişimi için ikinci allelde de kayıp olması gereklidir. TP53 mutasyonları over kanseri ya da malign melanom gibi neoplazilerde karsinogeneze geç bir olayken kolon kanserlerinde karsinogenezin ilk aşamalarında meydana gelmektedir¹⁰³.

TP53 üzerine yapılan çalışmalar, mutasyonlar sonucu genin tümör baskılayıcı özelliğini kaybetmesinin yanı sıra onkogenik özellikler de kazanabileceğini göstermektedir¹⁰⁴. Bu mutasyonlara *gain-of-function* mutasyonlar denilmektedir. Çoğu *missense* karakterdeki bu mutasyonlar sonucu p53 çeşitli onkogenik özellikler kazanır:

- 1- Mutant p53 proteini MRN-ATM sinyal yolağı üzerinden genomik instabiliteye neden olur¹⁰⁵,
- 2- Tümör progresyonunu ve metastazı indükler,
- 3- MDR (*multi-drug resistance*) üzerinden kemoterapi direncine sebep olur,
- 4- FAS, kaspazlar ve NF- κ B üzerine etki ederek apoptozu inhibe eder,
- 5- p53 ailesi proteinlerinin (p63 ve p73) fonksiyonlarını baskılar¹⁰⁴.

TP53 mutasyonları genellikle *missense* mutasyonlardır⁹⁹. Bu mutasyonlar p53 proteininde konformasyonel değişikliklere yol açmaktadır. Bu sayede mutant p53 proteini nükleus içinde daha uzun süre kalabilme ve MDM2 aracılı yıkım yollarından kaçış özelliğine sahip olur. Bu nedenle immünohistokimyasal yöntemlerle anti-p53 antikoru kullanılarak saptanan nükleer pozitiflik mutant p53 varlığına yüksek güvenilirlikle işaret eder^{106,107}. Bir başka çalışmada ise TP53 geninin lokalize olduğu 17p lokusunun bir alleldeki delesyonu ile nükleer p53 ekspresyonu arasında kuvvetli korelasyon bulunmuştur¹⁰⁸.

2.7.2. KLL'de del17p ve TP53 Mutasyonları

KLL hastalarında TP53 mutasyonu ya da 17. kromozomun kısa kolunda kayıp sık saptanan bir genomik aberasyondur. del17p13'ün prognoz üzerindeki etkisinin araştırıldığı hemen tüm çalışmalarda del17p13 saptanan olguların sağkalım sürelerinin kısalmış olduğu sonucuna varılmıştır^{82,109,110}. Dohner ve arkadaşlarının 1995 yılında yayınladıkları 100 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada bu oran %17 olarak belirtilmiştir¹¹¹. 2000 yılında yapılan bir başka çalışmada ise bu oran %7'dir. Bu çalışmada 17p delesyonu olan hastaların sağkalım süreleri, normal karyotipe ya da diğer sitogenetik anomalilere sahip hastaların sağkalım sürelerinden belirgin olarak daha kısadır³². Yakın zamanda Çin'de yapılan bir çalışmada 17p delesyonu, batı ülkelerine kıyasla çok daha yüksek bir oranda (%33,5) bildirilmiştir¹¹². Bir başka çalışmada ise 17p13 delesyonu olan ve tedavisiz izlenen 99 hastanın %53'ünün üç yıl sonra tedavi gerektirecek KLL'ye progrese olduğu gözlenmiştir ve bu çalışmada 17p delesyonu olan hastalardaki klinik heterojeniteye değinilmiştir¹¹³.

Ancak tüm bu çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır ki; 17p delesyonunun (ve p53 mutasyonunun) hastalık üzerindeki en çarpıcı etkisi ilk basamak tedavide kullanılan ajanlara dirençliliklerdir. Bütün hastalar arasında TP53 anomali (delesyon ya da mutasyon) sıklığı %10 civarında iken birinci basamak tedavilere dirençli grupta bu oran %50'lere çıkmaktadır¹¹⁴.

TP53 mutasyonları sıklıkla del17p ile birlikte bulunmaktadır^{110,115}. Ancak del17p olmayan hastaların sağkalım süreleri karşılaştırıldığında TP53 mutasyon

varlığının del17p varlığından bağımsız olarak kötü prognostik bir faktör olduğu gösterilmiştir ve 17p delesyonu olmayıp TP53 mutasyonu olan hastalar ile 17p delesyonu olup TP53 mutasyonu olan vakaların sağkalım sürelerinin benzer olduğu dikkati çekmiştir^{82,110}. Bu çalışmaların birinde TP53 mutant ve *wild-type* olan grup arasındaki genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım sürelerindeki farklılık çok çarpıcıdır; mutasyonu olan hastalarda ortalama progresyonsuz sağkalım süresi 23,3 ay, genel sağkalım süresi 29,2 ay iken *wild-type* olan hastalarda sırasıyla 62,2 ve 84.6 aydır⁸².

Bir başka çalışmada ise 17p delesyonu varlığı ve yokluğu durumundaki TP53 mutasyon profilleri araştırılmış ve bu iki grup arasında mutasyon profilleri açısından fark bulunmamıştır¹¹⁵. Şimdiye kadar yapılan en kapsamlı çalışmalardan biri olan Zen ve arkadaşlarının 254 hasta üzerinde yaptığı bu çalışmada, toplamda 268 mutasyon belirlenmiş olup vakaların %74'ünde *missense* mutasyonlar, %20'sinde delesyon ve insersiyon, %4'ünde *nonsense* ve %2'sinde de *splice* bölgesi mutasyonları saptanmıştır. Yine bu çalışmada en sık mutasyon izlenen kodonlar 175, 179, 248 ve 273 olarak sıralanmaktadır¹¹⁵.

Kısaca, 17p delesyonları ve TP53 mutasyonları birbiriyle yakın ilişki içerisinde olup KLL hastalarında hem sağkalım sürelerini kısaltmakta hem de ilk basamak tedavilere yanıtızlıkla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle bu hastalar için ilk basamak tedavide alternatif tedavi seçeneklerinin kullanımı düşünülmelidir.

2000li yılların başından beri KLL üzerine araştırmaları destekleyen kolloberatif bir çalışma grubu olan *European Research on CLL (ERIC)* 2012 yılında KLL hastalarında TP53 mutasyon analizi için bir rehber yayınlamıştır. Bu rehber göre TP53 mutasyonunun tedavi gereksinimi olan hastalarda tedaviye başlamadan hemen önce bakılması önerilmektedir. Ayrıca tanımlanmış *hot spot*'ların varlığı nedeniyle sınırlı laboratuvar koşullarında –mutasyonların %95'ini kapsamaması nedeniyle- ekzon 4-9 arasının analiz edilmesi yeterli bulunmaktadır. Yöntem olarak ise Sanger sekanslama metodu altın standart olarak belirtmektedir¹⁰⁰.

2.8. Sekanslama ve Kapiller Elektroforez

2.8.1. Genel Bilgiler

Tanım olarak sekanslama genlerdeki (ya da genomdaki) nükleotid dizilerinin belirlenmesidir. Gen dizisinin ya da RNA dizisinin sekanslanabilmesi hastalıkların temelinde yatan genetik bozuklukları belirlemeyi sağlamış ve bu bozukluklara özgü (ve de hastalığa ve hastaya özgü) tedavi modalitelerinin geliştirilebilmesini olası kılmıştır.

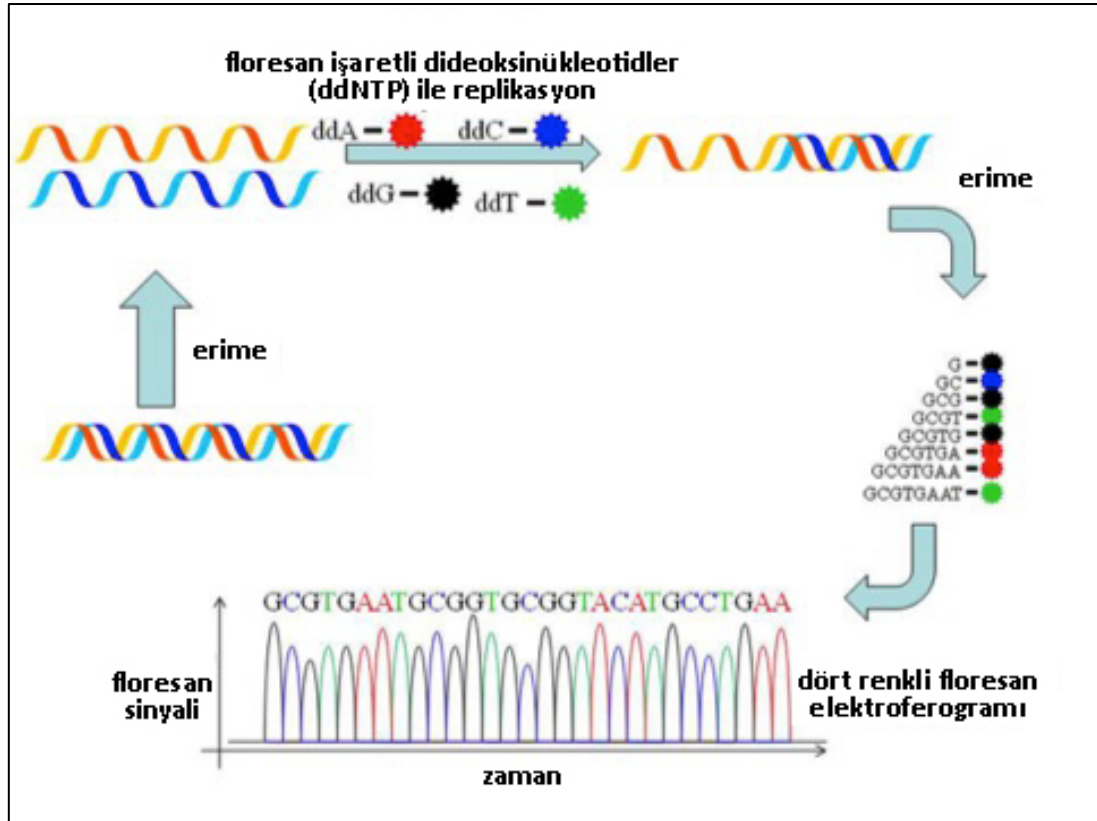
1953'te Watson ve Crick tarafından DNA'nın çift sarmal yapısı ortaya konduğundan çok uzun süre sonra DNA fragmanlarının nükleotid dizisi belirlenmeye başlanabilmiştir¹¹⁶. Genetik sekanslama ilk olarak RNA dizilerinin incelenmesi ile başlamış olup ilk DNA dizisi 1970'lerde elde edilebilmiştir. İlk tüm genom sekansı yapılan canlı bir bakteridir. Bu tarihlerde, Frederick Sanger, zincir uzamasını durdurma özelliğine sahip modifiye nükleotidler kullanarak ortaya koyduğu yöntem ile bu alanın öncülerinden biri olmuştur¹¹⁷. 1980'lerin sonuna doğru gelindiğinde ise artık sekanslama cihazları otomatik hale getirilmiş ve ticari olarak satılmaya başlanmıştır¹¹⁸. Bu zamandan sonra sekanslama teknolojisinde hızlı ve düşük maliyetli yöntemler geliştirmek en önemli hedef haline gelmiştir¹¹⁹.

2.8.2. Sekanslama Yöntemleri

2.8.2.1. Sanger Sekanslama Metodu ve Kapiller Elektroforez

Temelleri 1977'de atılan bu metot yıllar içerisinde otomatize hale getirilmiş ve örnek başına maliyeti çok aşağılara çekilmiştir. Yöntemin günümüzde kullanılan halinde temel mekanizma şöyledir: nükleotid dizisi belirlenmek istenen DNA fragmanı öncelikle uygun primerler kullanılarak klasik bir polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılır. PZR ürünü metodun temelini oluşturan floresan işaretli dideoksinükleotidler (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) kullanılarak ikinci bir PZR reaksiyonuna tabi tutulur. Reaksiyon boyunca uzayan hedef DNA zincirine bağlanan her dideoksinükleotid reaksiyonu o noktada durdurur ve böylelikle birinci bazdan sonuncu baza kadar her biri diğerinden bir baz fazla olacak şekilde farklı farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilmiş olur. Elde edilen bu ürün kapiller

elektroforez ile yürütülür. Bu yürüme sonucu her bir pozisyondaki dideoksinükleotidin ışınması ile zincirin dizisi belirlenir. Aşağıdaki şekilde Sanger sekanslama metodu özetlenmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Sanger sekanslama metodunun şematik olarak gösterilmesi.

2.8.2.2. Maxam-Gilbert Metodu

Maxam ve Gilbert bu metodu Sanger'den 2 yıl sonra tanıtmışlardır¹²⁰. Radyoaktif işaretleyiciler kullanılan bu metod baz alınarak geliştirilen ilk otomazite sistem 1994'te üretilmiştir¹²¹. Bu yöntem ile 5' ucu radyoaktif olarak işaretlenen DNA fragmanının çeşitli bölgelerden kırılması ve elde edilen ürünlerin jel elektroforezde yürütülmesi ile sekans bilgisi elde edilir.

2.8.2.3. Pyrosekanslama

1998'de yayınlanan bir makalede Ronaghi ve arkadaşları tarafından tanıtılan bu yöntem enzimatik bir yolla reaksiyon sırasında her bir nükleotid eklenmesinde

ortaya çıkan pirofosfattan elde edilen ATP'nin, lusiferazı katalizleyip, lusiferin'in oksilüsiferine dönüşümü reaksiyonu sırasında açığa çıkan ışımayı ölçerek, istenilen DNA fragmanındaki nükleotid sırasını belirlemeye yarayan bir yöntemdir¹²².

2.8.2.4. Yeni Nesil Dizi Analiz Yöntemleri (*Next Generation Sequencing*)

Sanger ve Maxam-Gilbert'in 1970'lerde bilim dünyasına sunduğu sekanslama yöntemleri ilk jenerasyon kabul edilmiş; 1990'ların sonu ve 2000'li yıllarda geliştirilen hızlı ve düşük maliyetli yöntemler "yeni jenerasyon sekanslama yöntemleri" ismi altında anılmaya başlanmıştır. Bir milyon baz başına bir dolardan düşük sekanslama maliyetine sahip bu yeni teknolojilerin günümüzdeki araştırmalarda kullanımı hızla artmaktadır. Pyrosekanslamaya benzer ancak çok daha hızlı ve düşük maliyetli bir sistem olan "454 Pyrosequencing", oligonükleotid dizileri ve DNA ligaz kullanan "SOLID Sequencing", Sanger metoduna benzer şekilde zincir sonlandırıcı nükleotidler kullanan "Solexa" yeni jenerasyon sekanslama yöntemlerinin başlıcalarıdır. Ayrıca halen geliştirilmekte olan "Nanopore", "Microfluid Sanger" ve *mass spectrometry* aracılı sekanslama yöntemleri de gelecek için umut vaat etmektedir¹²³.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2013 tarihleri arasında solid organ biyopsisi gerçekleştirilmiş KLL hastaları Patoloji Anabilim Dalı rapor arşivinden taranmıştır. 51 hastanın toplam 54 adet solid organ biyopsisine ulaşılmış ve çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin 50'si lenf nodu bir tanesi karaciğer, bir tanesi dalak, bir tanesi tonsil ve bir tanesi de orbita biyopsidir. 3 hastanın farklı zamanlarda alınmış olmak üzere iki adet solid organ biyopsisi mevcuttur.

Hastaların klinik özellikleri ve laboratuvar verilerine Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin hasta veri tabanı kullanılarak ulaşılmıştır. Veri tabanından, hastaların KLL tanısı aldıkları ve çalışmada kullandığımız biyopsi örneklerinin alındığı tarihler, halen hayatta ise son kontrol tarihleri, vefat ettiyse ölüm tarihleri, kan mutlak lenfosit, lökosit, trombosit, hemogloblin ve LDH değerleri kaydedilmiştir

Biyopsi örnekleri yeniden değerlendirilip KLL tanısı teyit edildikten sonra Hematoksilen&Eozin boyalı preparatlardan proliferasyon merkezlerinin tüm neoplastik alana oranı kaydedilmiştir. Bu değerlendirme için biyopsi örneğine ait en temsili preparat seçildikten sonra mikroskopun 4x ve 10x büyütme objektifleri kullanılarak yaklaşık olarak oran verilmiştir. Tamamıyla küçük matür görünümdeki lenfoid hücrelerden oluşan ve belirgin proliferasyon merkezi içermeyen biyopsilerde bu oran 0 olarak kaydedilmiştir. Dalak, karaciğer örneklerinde ve tru-cut biyopsilerde bu oran değerlendirilememiştir.

3.1. İmmünohistokimyasal Çalışma

İmmünohistokimyasal çalışma için temsili blok seçimi yapıldı. Tüm örneklerin immünohistokimyasal çalışmaları Ventana Benchmark XT cihazı ile aşağıdaki protokol ve ürünler kullanılarak otomatik sistemle gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan antikor: p53

Marka: ScyTek, Logan, UT, USA. Klon: DO-7. Lot: 23081.

Deteksiyon kiti: iVIEW™ DAB Detection Kit

Marka: Ventana, Tuscon, AZ, USA. Lot: B05879A

Anti-p53 antikoruna ile boyanan preparatlar nükleer pozitiflik açısından değerlendirilip 10 büyük büyütme alanında her alan başına en az 500 hücre sayılarak pozitif neoplastik hücrelerin tüm neoplastik hücrelere oranı kaydedilmiştir.

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1. DNA eldesi:

Giriş kısmında da belirtildiği üzere immünohistokimya ile gösterilen nükleer p53 ekspresyonunun TP53 gen mutasyonu ile korelasyon gösterdiği bilinmektedir^{124,125}. Bu bilgiye dayanarak maliyet-etkin olması açısından immünohistokimyasal çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre anti-p53 antikoruna ile $\geq 5\%$ oranında pozitif reaksiyon gösteren vakalar TP53 geni dizi analizi için ayrılmıştır.

Parafin bloklardan 5X10 µm'lik kesitler yapılmıştır. Bu kesitler yapılırken kontaminasyonun önlenmesi amacı ile kullanılan bıçak ve mikrotomun örneğe temas eden yerleri her örnek öncesinde alkol ve ksilol ile temizlenmiştir. Elde edilen kesitler 2 ml'lik *ependorf* tüplere alınmıştır. Kesitlerin deparafinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında öncelikle tüplere 600 µl ksilol koyulup vorteksle karıştırıldıktan sonra tüpler 14000 rpm hızında 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp işlem tekrarlanmıştır. İkinci aşamada tüplere 600 µl %100 ETOH (etil alkol) eklendi ve vorteksle karıştırılmıştır. Tüpler 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp bu işlem tekrarlanmıştır. Alkolün tamamen uzaklaştırılması amacıyla tüpler kapakları açık olarak 36 °C'ye ayarlanmış etüvde 10 dakika bekletilmiştir.

Bu aşamadan sonra, deparafinize olan örneklerden "QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)" DNA izolasyon kiti kullanılarak, DNA

izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kısaca: alkolün tamamen uzaklaştığına emin olunduktan sonra tüpler içerisine hücre lizisi için 30'ar µl Proteinaz K ve DNA izolasyon kiti içerisinde bulunan ATL tamponundan (*Tissue Lysis Buffer*) 200'er µl eklenmiştir. Vorteksle karıştırılan tüpler 56 °C'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi sabah örnekler 56 °C'den 90 °C'ye alındı. 90 °C'de bir saat bekleyen örnekler DNA izolasyon kitinde belirtilen basamaklar uygulanarak 50 µl hacme sahip DNA çözeltileri elde edilmiştir.

3.2.2. Dizi Analizi:

TP53 gen bilgileri *NCBI GeneBank*'tan elde edilmiştir. Bu kaynağa göre TP53 geni 11 ekzona sahip olup alternatif *splicing* yolları nedeniyle toplamda 16 farklı transkriptte sahiptir ve bu transkriptlerin bir kısmı normalde protein yapısına katılmayan intronik bölgelerin transkripsiyona dahil olmasıyla gerçekleşir.

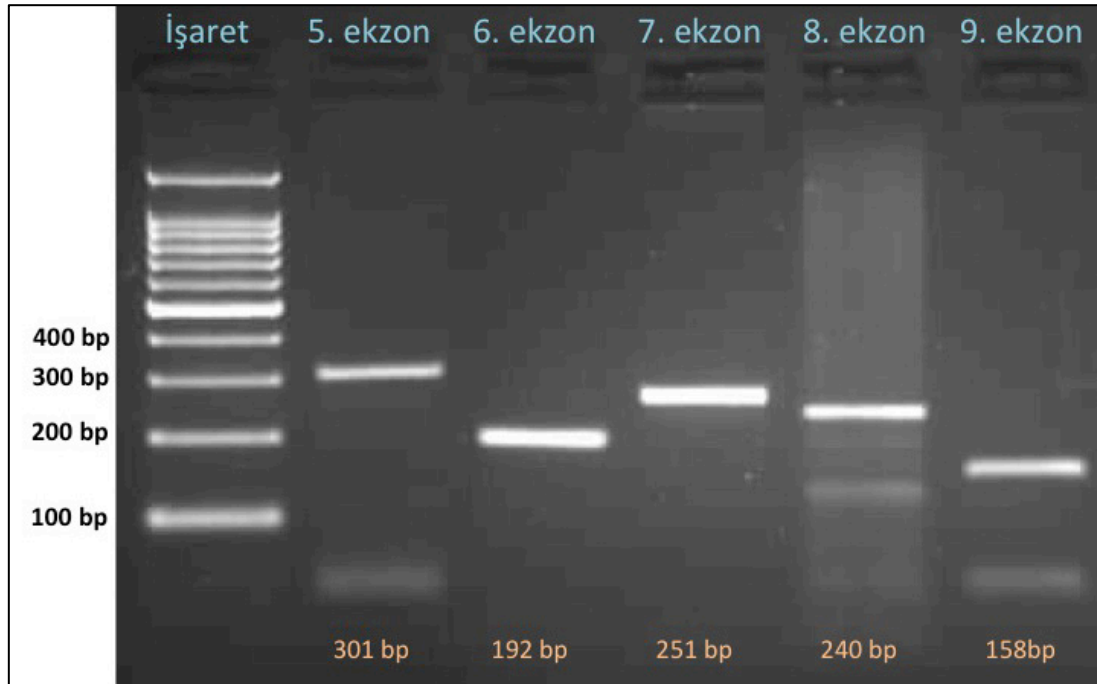
ERIC grubunun yayınladığı rehberde de belirtildiği üzere TP53 mutasyonları %95 oranında 4-9 ekzonlar arasında (DNA bağlanma bölgesini kodlayan ekzonlar) saptanmaktadır^{100,115}. 4. ekzon mutasyonları diğer ekzonlara göre çok daha nadirdir ve bu çalışmaya 4. ekzon dahil edilmemiştir. Bu çalışmada yalnızca 5, 6, 7, 8, ve 9. ekzonların dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Literatürde bu ekzonların tamamını kapsayabilecek primerler ile PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ürünleri elde edilebileceği belirtilmekle birlikte bu çalışmada kullanılan örneklerin formalinle tespit edilmiş parafine gömülü dokular olması bu büyüklükte bir bölgenin çoğaltılmasına olanak vermemektedir¹¹⁰. Bu nedenle istenilen bölge küçük fragmanlar halinde çoğaltılacak şekilde bu ekzonlar için toplam 5 çift (*forward* ve *reverse* olmak üzere) primer dizayn edildi (Şekil 3.1.). Primerlerin uygunluğu BLAST aracılığı ile kontrol edilmiştir¹²⁶.

Primerlerin optimizasyonu için kontrol DNA örneği ile PZR bileşenlerinin miktarları ve T_m sıcaklıkları değiştirilerek çok sayıda deneme gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Her primerin erime sıcaklığı (T_m) ve gerekli diğer bileşen ($MgCl_2$, primer, Taq, tampon ve distile su) miktarları optimize edilip, en uygun değerler kaydedilmiştir. Tablo 3.1'de primerlerin temel özellikleri (T_m , PZR ürün büyüklüğü, 25 µl'lik PZR karışımında kullanılan 50 mM $MgCl_2$ çözeltisi miktarı) özetlenmiştir.

Daha sonra vakalara ait DNA örnekleri ve her bölge için bir adet kontrol DNA örneği ile PZR çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen ürünlerin kalitesini kontrol etmek amacıyla her PZR çalışması sonunda ürünler %2,5'lük agaroz jel elektroforez ile yürütülmüştür.

<p>AAAAAAGAAAAGCTCCTGAGGTGTAGACGCCAACTCTCTAGCTCGCTAGTGGGTTGCA GGAGGTGCTTACGCATGTTTGTTCCTTTGCTGCCGTCTCCAGTTGCTTTATCTGTTCACTTGT GCCCTGA"CTTCAACTCTGTCTCTT"CTCTTCTACAGTACTCCCTGCCCTCAACAAGAT GTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGTTGATTCCACACCCCGCCC GGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTG AGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTGAGCAGCTGGGGCTGGA GAGACGACAGGGCTGTTGCCAGGGTCCCCAGGCCT"CTGATTCCTCACTGATTGCTCTTA GGTCT"GGCCCTCTCAGCATTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTG GATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTCTGG TTTGCAACTGGGGTCTCTGGGAGGAGGG"GTTAAGGGTGGTTGTCAGTG"GCCCTCAGG TGAGCAGTAGGGGGCTTTCTCTGCTGCTTATTTGACCTCCCTATAACCCCATGAGATGTG CAAAGTAAATGGGTTAACTATTGCACAGTTGAAAAACTGAAGCTTACAGAGGCTAAGGG CCTCCCCTGCTTGGCTGGGCGCAGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAA GGCAGGCGGATCACGAGGTTGGGAGATCGAGACCATCTGGCTAACGGTGAACCCCGTC TCTACTGAAAAATACAAAAAAAATTAGCCGGCGTGGTGTCTGGGCACCTGTAGTCCCAGC TACTCGGGAGGCTGAGGAAGGAGAATGGCGTGAACCTGGGCGGTGGAGCTTGCAGTGAG CTGAGATCACGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGATTCCATCTCAAAAAAAA AAAAAAAAGGCTCCCCTGCTTGCCACAGGTCTCCCAAGGCGCACTGGCCTCA"TCTTGGG CCTGTGTTATCTCT"AGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACATACATGTGTAA CAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGA CTCCAGGTGAGGCACTTGGCACCTGCACACTGGCCTGCTGTGCCAGCCTCTGCTTG CCTCTGACCCCTGGGCCACCTTTACCGATTTCTT"CCATACTACTACCCATCCACCTCT"A TCACATCCCCGGCGGGGAATCTCCTTACTGCTCCCACTCAGTTTTCTTTCTCTGGCTTTGGG ACCTCTAACCTGTGGCTTCTCCTCCACTACCTGGAGCTGGAGCTTAGGCTCCAGAAAGGA CAAGGGTGGTTGGGAGTAGATGGAGCCTGGTTTTTAAATGGGACAGGTAGGACCT"GATT TCCTTACTGCTCTT"CTTCTTTTTCTATCCTGAGTAGTGGTAATCTACTGGGACGGAAC AGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCCTGTCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAA TCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGGTA AGCAAGCAGGACAAGAAGCGGTGGAGGAGACCAAGG"GTGCAGTTATGCTCAGATTAC T"TTTATCACCTTTCTTGCCTTTTCTAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCAGC CAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATTTTACCCTTCAGGTAAGTCTTGGG"ACCT CTTATCAAGTGGAAAG"TTTCCAGTCTAACACTCAAATGCCGTTTTCTTCTGACTGTTTTA CTGCAATTGGGG&</p>	5.!Ekzon!
<p>6.!Ekzon!</p>	6.!Ekzon!
<p>7.!Ekzon!</p>	7.!Ekzon!
<p>8.!Ekzon!</p>	8.!Ekzon!
<p>9.!Ekzon!</p>	9.!Ekzon!

Şekil 3.1: TP53 geninin 5. ekzonun başından 9. ekzonun sonuna kadarki nükleotid dizisi ve kullanılan primerlerin bağlanma bölgeleri. Ekzonlar kalın ve altı çizili bölgelerdir. Her bir primer çiftinin (*forward* ve *reverse*) bağlanma bölgeleri farklı renklerle gösterilmiştir.



Şekil 3.2: İncelenen ekzonlara ait kontrol DNA örnekleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel fotoğrafı. Alt sırada elde edilen ürünlerin büyüklükleri gösterilmiştir.

Tablo 3.1: PZR çalışmalarında kullanılan primerlerin temel özellikleri (F: *Forward*, R: *Reverse*)

Bölge	Primer Dizisi	PZR Ürün Büyüklüğü	T _m (°C)	MgCl ₂ (µ l)
5. Exon	F: 5'-CTTTCAACTCTGTCTCCTTC-3'	301 bp	59	1
	R: 5'-AGACCTAAGAGCAATCAGTG-3'			
6. Exon	F: 5'-CTGATTCCTCACTGATTGCT-3'	192 bp	65	1
	R: 5'-CACTGACAACCACCCTTAAC-3'			
7. Exon	F: 5'-TCTTGGGCTGTGTTATCTCCT-3'	251 bp	60	2
	R: 5'-GAGAGGTGGATGGGTAGTAGTATGG-3'			
8. Exon	F: 5'-GATTCCTTACTGCCTCTTG-3'	240 bp	58	1
	R: 5'-AATCTGAGGCATAACTGCAC-3'			
9. Exon	F: 5'-AGTTATGCCTCAGATTCAC-3'	158 bp	54,5	1
	R: 5'-CTTCCACTTGATAAGAGGT-3'			

Elde edilen PZR ürünlerinden, dizi analizi öncesi “sekans PZR” çalışması yapıldı. Bu çalışmada klasik PZR’den farklı olarak deoksinükleotid (dNTP) ile birlikte işaretli dideoksinükleotidler ve tek bir primer (*forward*) kullanılmıştır. Bu PZR’de dideoksinükleotidlerin (ddNTP) kullanılma amacı ddNTP’nin, DNA polimeraz tarafından sentezlenen DNA zincirine bağlandıktan sonra yeni bir nükleotid bağlanmasını engellemesi ve farklı uzunluklara sahip ürünler oluşturmaktır. Böylelikle reaksiyon boyunca her son pozisyonunda ddNTP bağlı, analiz edilmesi istenen dizinin içerdiği nükleotid sayısı kadar farklı baz uzunluklarında DNA dizileri oluşmaktadır.

Reaksiyonda kullanılmayan fazlalık primer, nükleotid ve diğer kontamine edici faktörleri uzaklaştırmak amacıyla “sekans PZR” sonrası elde edilen ürünler kapiller elektroforez öncesi NaAC (sodyum asetat) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu işlemde öncelikle elde edilen PZR ürünü üzerine 2 µL. 3mM. pH: 4.6 olan NaAC eklenmiştir. Sonrasında üzerine 50 uL % 95’lik etil alkol eklendikten sonra karışım 1,5 ml’lik *ependorf* tüpüne aktarılmıştır, el ile hafifçe vurularak karıştırılmıştır (saflaştırmanın hiçbir aşamasında vorteks kullanılmadı). Tüpler buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda hiç bekletilmeden 13.000 rpm hızında 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp üzerine 250 µL %70’lik etil alkol eklenmiştir ve yine elle hafifçe karıştırılmıştır. Karışım 13.000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırılmıştır ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. İyice kurduğuna emin olunan örnekler üzerine 20 µL formamid eklenerek vorteksle karıştırıldıktan sonra 95 °C de 5 dakika denatüre edilip hızla buza alınmıştır. Buza alınan örnekler *ABI 3500 Genetic Analyser*’a yüklenmiştir.

ABI 3500 Genetic Analyser’dan elde edilen sekans çıktıları ekzonlarına ait sekans eğrileri (elektroferogram) manuel ve otomatik olarak “*National Library of Medicine*”e bağlı bir genetik veri tabanı olan “*Nucleotide BLAST*” yardımı ile kontrol edilmiştir.

Kullanılan dokulardan elde edilen DNA'nın fragmente olması ve zaman zaman PZR'yi inhibe etmesi nedeniyle yalnızca 10 adet örnekte dizi analizi gerçekleştirilebilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

Sayısal veriler ortanca, minimum-maksimum değerleriyle; kategorik veriler ise sayı ve yüzde ile özetlenmiştir. Sayısal değişkenlerin iki grup bakımından karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi, iki sayısal değişkenin karşılaştırılması için Spearman korelasyon katsayısı, kategorik verilerin analizi için ise ki-kare testi kullanılmıştır. Sağkalım sürelerinin hesaplanmasında Kaplan Meier eğrileri, eğrilerin karşılaştırılmasında ise log-rank testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için "SPSS 15.0 for Windows" programı kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

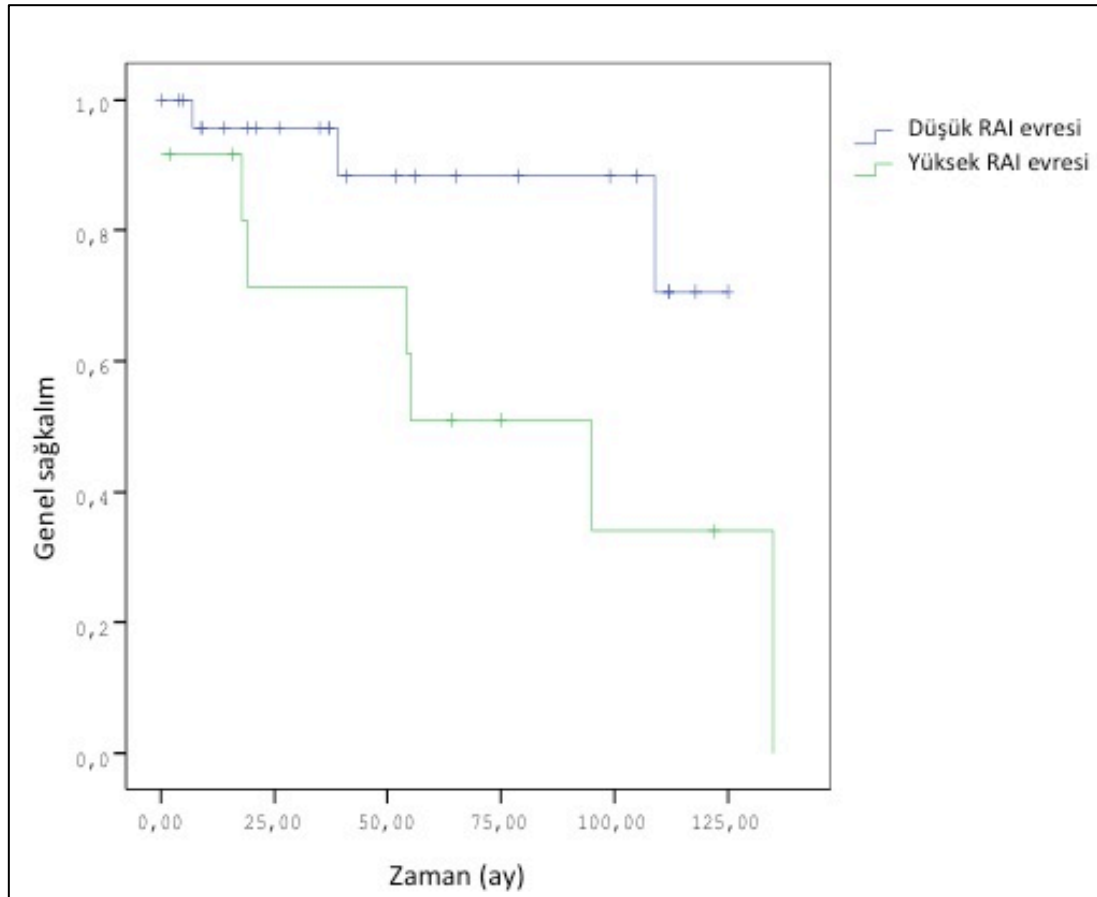
4.1. Klinik ve Laboratuvar Bulguları

Çalışmaya dahil edilen toplam 51 hastanın 35'i (%68,6) erkek, 16'sı (%31,4) kadındı. Hastaların ortalama tanı yaşı 60,3'tür (ortanca 60, 41-83). Ortalama genel sağkalım süresi 48,4 aydır. En kısa takip süresi 1 ay, en uzun takip süresi 135 aydır. Takip sürelerini sonunda 51 hastanın 40'ı hala hayatta iken 11 hasta –tamamı hastalığa bağlı sebeplerden olmak üzere- hayatını kaybetmiştir.

Tanı anında hastaların 4'ü RAI evre 0, 21'i evre I, 5'i evre 2, 2'si evre 3 ve 10'u evre 4'tür (Tablo 4.1). Kabaca 3 ana grupta toplandığında; 4 hasta düşük risk, 26 hasta orta derecede risk ve 12 hasta yüksek risk kategorisinde olacak şekilde evrelenebilir. 9 hastanın klinik ve laboratuvar bilgilerine ulaşamadığından RAI evresi belirlenememiştir. Evre 0 hasta sayısının çok az olması nedeniyle hastalar klinik evrelere göre iki gruba indirgenerek (Evre 0, 1 ve 2 düşük risk; evre 3 ve 4 yüksek risk olacak şekilde) yapılan genel sağkalım süreleri karşılaştırmasında yüksek evreye sahip hastaların daha kötü bir klinik seyir gösterdikleri izlenmiştir (p=0,030) (Şekil 4.1).

Tablo 4.1: Hastaların evrelere göre dağılımları

Evre	Hasta Sayısı (n)	Yüzde (%)
0	4	%7,8
1	21	%41,2
2	5	%9,8
3	2	%3,9
4	10	%19,6
Bilinmeyen	8	%17,6
Toplam	51	%100



Şekil 4.1: Hastaların RAI evrelerine göre sağkalım eğrileri.

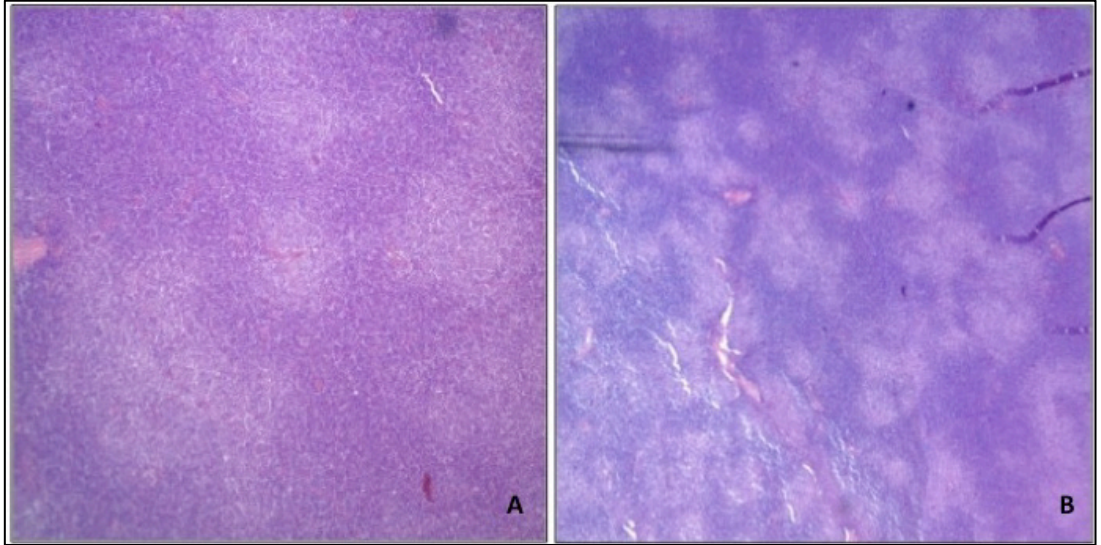
Yapılan korelasyon analizlerinde hastalığın tanı yaşı ile genel sağkalım süresi arasında ters korelasyon olduğu görülmüştür ($p < 0,05$, korelasyon katsayısı = $-0,667$). Bunun dışında genel sağkalım süresi ile hastaların cinsiyetleri, kan LDH, lökosit, trombosit, hemoglobin ve mutlak lenfosit değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır.

4.2. Morfolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

İncelenen 54 biyopsi örneğinin 50 tanesi lenf nodu geri kalan dört örnek ise dalak, karaciğer, tonsil ve orbita biyopsisidir. 2 örnek tru-cut biyopsidir.

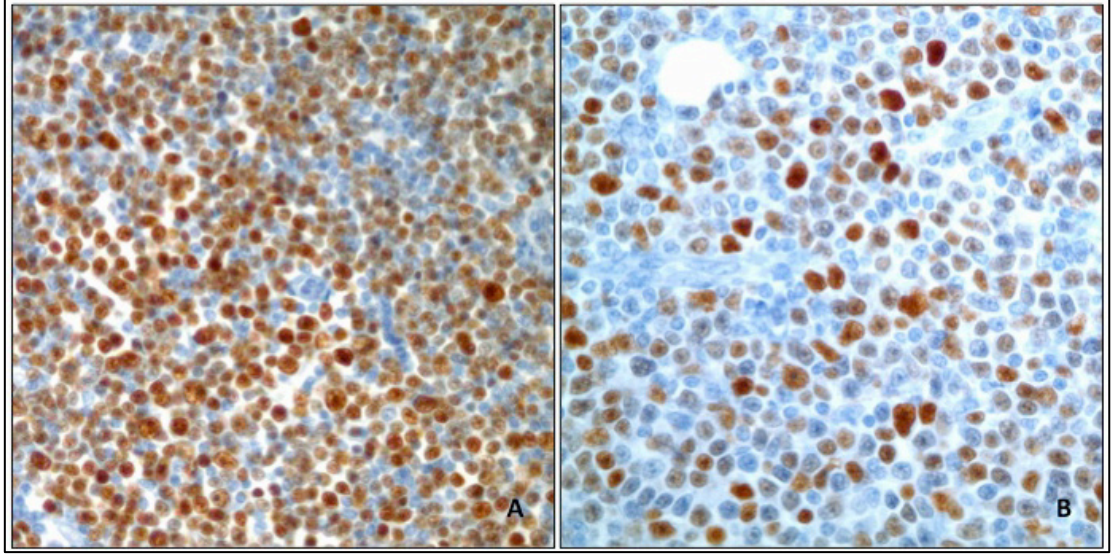
Örneklerin proliferasyon merkezi/toplam biyopsi alanı (PM/TBA) oranı en temsili preparat baz alınarak değerlendirilmiştir. Bir örneğin karaciğer, bir örneğin

dalak olması ve iki örneğin de tru-cut biyopsisi olması nedeniyle bu dört örnekte PM/TBA oranı değerlendirmesi yapılamamıştır. Ayrıca 5 örneğin doku tespit ve takip kalitesinin kötü olması ya da otolitik değişiklikler içermesi nedeniyle PM/TBA oranı değerlendirilememiştir. Genel olarak bakıldığında tanısal anlamda yardımcı bir morfolojik bulgu olan proliferasyon merkezlerinin olgular arasında belirginlik ve büyüklük bakımından büyük farklılıklar (PM/TBA %10-80) gösterdiği dikkati çekmiştir (Şekil 4.2). Bu bağlamda PM/TBA oranı ile genel sağkalım süreleri arasında korelasyon analizi yapılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterilememiştir ($p=0,133$, korelasyon katsayısı= $0,233$). Olgular PM/TBA oranlarına göre, <50 (PM'den fakir) ve ≥ 50 (PM'den zengin) olacak şekilde iki gruba ayrılarak yapılan genel sağkalım süreleri karşılaştırmasında da istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p=0,290$). Bu iki grup baz alınarak ölüm oranları arasındaki ilişki araştırılmış ancak PM/TBA oranı ile ölüm oranları arasında bir ilişki bulunamamıştır.



Şekil 4.2: Proliferasyon merkezlerinin yaygınlığını gösteren örnekler. Proliferasyon merkezleri daha az belirgin olan bir örnek (A). Proliferasyon merkezleri yaygın ve birleşme eğilimi gösteren bir örnek (B).

Anti-P53 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada p53 ekspresyon artışının özellikle proliferatif ve paraimmünoblastlardan zengin proliferasyon merkezlerinde daha yoğun olduğu ve bu hücrelerin diğer hücrelere göre daha koyu bir boyanma sergilediği dikkati çekmiştir (Şekil 4.3). Hastaların p53 ekspresyon yüzdelerine göre dağılımları Tablo 4.2’de gösterilmektedir.



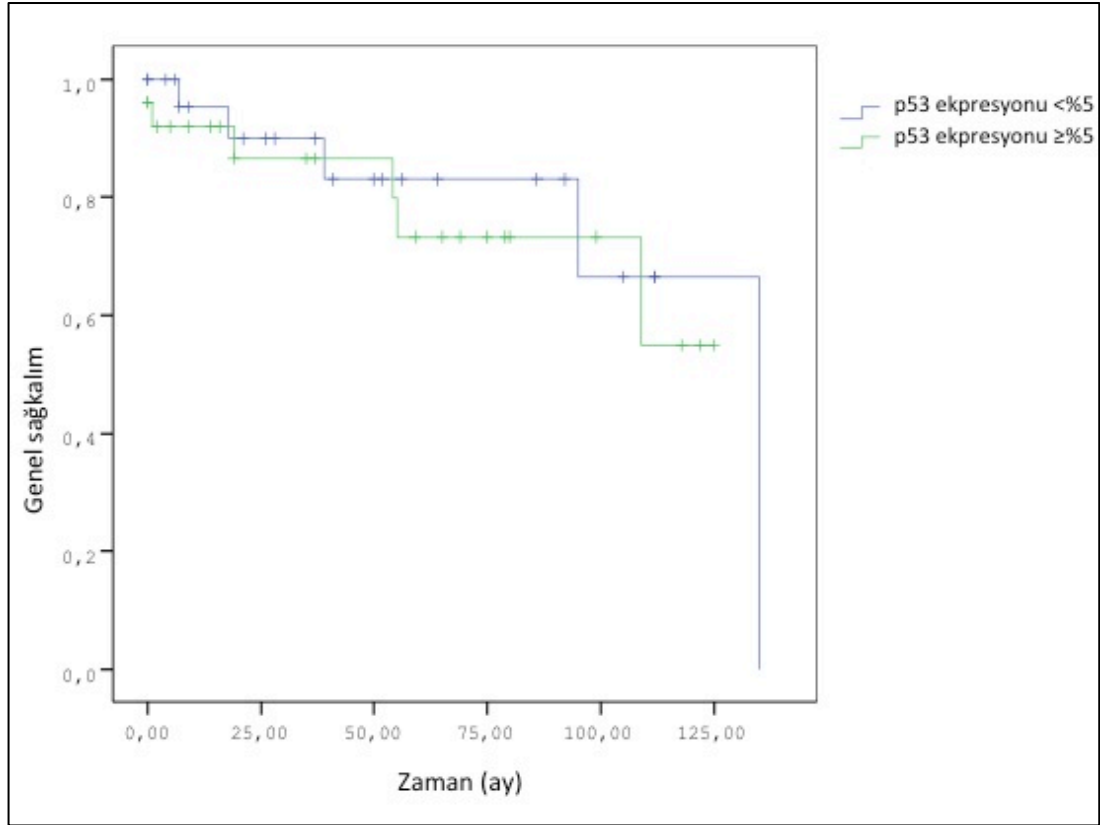
Şekil 4.3: İmmünohistokimyasal yöntemle saptanan p53 ekspresyonu. Yaygın p53 ekspresyonu gösteren bir örnek (A). Daha az sayıda hücrede p53 ekspresyonu izlenen bir örnek (B). Her iki olguda da iri hücrelerde daha yoğun boyanma dikkat çekmektedir.

Tablo 4.2: Biyopsi örneklerinin p53 ekspresyon yüzdelerine göre dağılımları

P53 boyanma yüzdesi	Hasta Sayısı (n)
0-5	30
6-50	20
51-100	4

Hastaların sağkalım süreleri ile p53 boyanma yüzdesi arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılan korelasyon analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p=0,701$ korelasyon katsayısı= $0,055$). Olgular p53 ekspresyon yüzdelerine göre 1- $<5\%$, 2- $\geq 5\%$ olarak şekilde 2 grupta toplanmış ve bu iki grup arasında sağkalım süreleri bakımından farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Kaplan-

Meier eğrisinde de görülebileceği üzere bu iki grup arasında sağkalım süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: p53 ekspresyon yüzdelere göre iki gruba (<5 ve ≥5) ayrılan hastaların sağkalım eğrileri

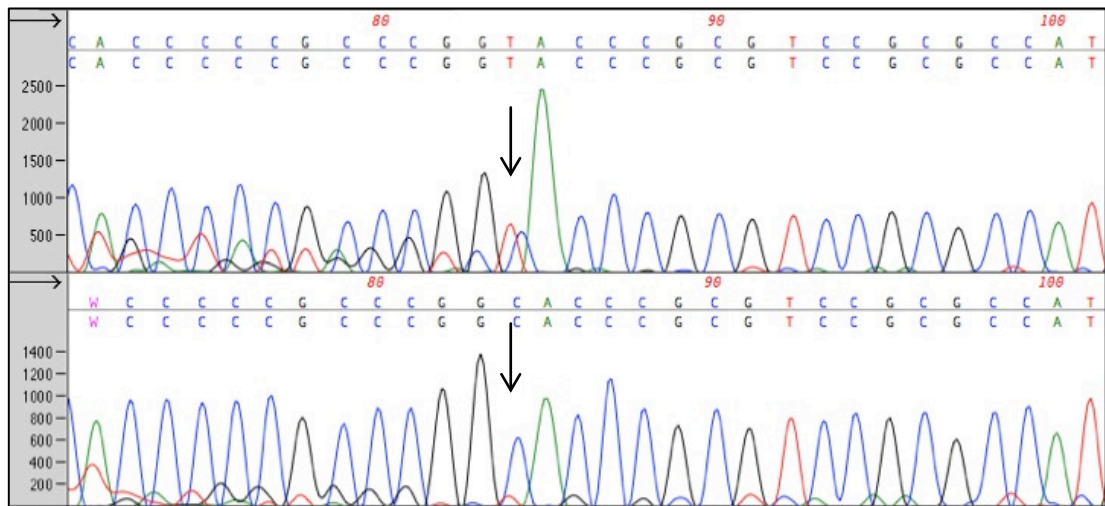
İncelenen örneklerin 5'inde fokal prolenfositik transformasyon mevcuttur. Bu örneklerin p53 ekspresyon yüzdeleri iki olguda %0, diğer olgularda %15, %80 ve %100 şeklindedir. Transformasyon izlenen hasta sayısının çok az olması nedeniyle transformasyon ve p53 ekspresyon yüzdesi arasındaki ilişki incelenememiştir.

3 hastanın ikişer biyopsi örneği bulunmakta olup bu hastalarda iki biyopsi arası p53 ekspresyon yüzdeleri arasındaki farklılığa bakılacak olursa; bir hastada değişim olmazken (%20→%20), diğer iki hastada ekspresyon yüzdesinde artım dikkati çekmiştir (%3→%15 ve %30→%70). Ancak hem ilk hem de sonraki biyopsi örneklerinde mutasyon analizi yapılan hasta olmadığından bu ekspresyon farklılığının yeni gelişmiş p53 mutasyonuna bağlı olup olmadığı incelenememiştir.

4.3. Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Dizi analizi gerçekleştirilebilen 10 vakanın 5., 6., 7., 8. ve 9. ekzonlarına ait sekans eğrileri (elektroferogram) manuel ve otomatik olarak “*National Library of Medicine*”e bağlı bir genetik veri tabanı olan “*Nucleotide BLAST*” yardımı ile kontrol edilmiştir¹²⁶. İncelenen olguların immünohistokimya ile elde edilen en yüksek p53 ekspresyon yüzdesi %90 iken en düşük değer %15’tir.

Yapılan inceleme sonucu iki olguda 5. ekzonda lokalize 154. kodonda 154GGC>GGT değişimi saptanmıştır (Şekil 4.5). 462. bazda gerçekleşen Sitozin’in Timin’e dönüşümü aminoasit değişimine neden olmamakta ve bu kodon halen Glisin’i kodlamaktadır. Bu değişim dışında hiçbir olguda nükleotid değişimi, delesyon ya da insersiyon tipi bir mutasyon izlenmemiştir.



Şekil 4.5: Olgulardan birine ve kontrol örneğine ait 5. ekzon elektroferogramları. Üstteki elektroferogram çalışma vakalarından birine aşağıdaki elektroferogram ise kontrol örneğine aittir. C>T değişimi oklarla gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

KLL özellikle yaşlı popülasyonu etkileyen, düşük dereceli B hücreli lenfoproliferatif hastalıktır. Başvuru sırasında düşük RAI evresine sahip olan bazı hastalarda, klinik seyrin hızlanarak kısa sürede hastanın yaşamını tehdit edecek boyuta ulaşabildiği bilinmektedir. Yıllardır hastalığın seyrini ve hastanın progresyon riskini öngörebilecek parametreler yanı sıra tedaviye yanıt hakkında fikir verebilecek prediktif faktörlere yönelik arayışlar sürmektedir. Son yıllarda sayılarında belirgin artım izlenen çalışmalar neticesinde bu prognostik ve prediktif faktörler arasında TP53'ü içeren anomaliler öne çıkmaktadır.

Hastalık evresinin bugüne kadar yapılan bütün araştırmalarda olduğu gibi bu çalışmada da genel sağkalım üzerinde belirleyici olduğu görülmüştür. Çalışmamızda ileri evreli olgu grubunun daha yüksek ölüm oranlarına sahip olduğu ve genel sağkalım sürelerinin daha kısa olduğu gözlenmiştir. Bir kısmı, hastaların evrelerini belirlemede kullanılan parametreler olmasına rağmen, çalışmamızda, kan hemoglobin, trombosit, lökosit ve mutlak lenfosit sayısı ile genel sağkalım süreleri ya da ölüm oranları arasında bir korelasyon gösterilememiştir. Literatürde hastanın evresinden bağımsız olarak düşük hemoglobin ve trombosit sayılarının kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir¹²⁷. Çalışmamızda bu ilişkinin gösterilememiş olmasının nedenleri hasta sayısının yetersiz olması ve bazı hastaların laboratuvar değerlerine ulaşamamış olması şeklinde sıralanabilir.

Uzun yıllardır, yüksek mitotik aktiviteye sahip olması nedeniyle proliferasyon merkezlerinin genişliğinin prognoz üzerine etkisi olabileceği düşünülmekte olup bu konuda literatürde önemli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bir çalışma haricinde yapılan araştırmalar proliferasyon merkezlerinin yaygınlığı ile hastalık prognozu veya sağkalım süreleri arasında bir ilişki gösterememiştir^{6,8,128}. 2012 yılında Ciccone ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada 183 hastanın lenf nodu eksizyonel biyopsileri incelenmiş olup proliferasyon merkezlerinden zengin ve fakir morfolojiye sahip örnekler olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Bu ayırım objektif kriterlere dayanarak değil küçük büyütmelerde proliferasyon merkezlerinin birbiriyle birleşen yapıda olup olmamasına dayanarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada proliferasyon

merkezlerinden zengin olguların ortalama sağkalım süreleri 11 ay, diğerlerinin ise 64 ay olarak belirlenmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur⁸. Çalışmamızda proliferasyon merkezlerinin yaygınlığı/büyüklüğü ile genel sağkalım süresi arasında bir korelasyon gösterilememiştir. Ancak hasta sayısının az olması ve proliferasyon merkezlerinin alan hesabının yarı kantitatif şekilde yapılmış olması bu sonucun güvenilirliğini düşüren faktörlerdir. Literatürdeki çalışmalar ile çalışmamızın sonuçları birlikte ele alındığında proliferasyon merkezlerinin sağkalım süresine etkisi konusunda kesin yorum yapmak mümkün olamamıştır^{6,8}. Daha geniş serilerle ve daha objektif kriterlerle yapılacak çalışmalar bu konuda aydınlatıcı nitelikte olacaktır.

Günümüzde mutasyon analizi için çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Tiroid papiller karsinom, pankreas karsinomu, kolon karsinomu gibi kanserler belirli genlerde (BRAF, KRAS...) literatürde detaylıca tanımlanmış belirli mutasyonlar içermektedir. Bu mutasyonların saptanması sırasında yüksek hassaslığa sahip pyrosekanslama, “*real-time PCR*” gibi yöntemlerin kullanımı yeterli bulunmaktadır. Bu yöntemlerin, yukarıda bahsedilen tümörlerde izlenen spesifik gen mutasyonlarını saptamada Sanger sekanslama ile benzer hassasiyete sahip olduğu gösterilmiştir^{129,130}. Ancak bu yöntemler çok küçük DNA bölgelerini analiz etmekte ve sadece bilinen mutasyonları saptayabilmektedir. KLL olgularındaki TP53 mutasyon profili yukarıda adı geçen genlerde izlenenler kadar dar bir spektruma sahip değildir. Her ne kadar analizinin yapılması tavsiye edilen bölge tüm TP53 geninin küçük bir kısmını içerse de çok sayıda farklı mutasyon saptanabilme ihtimalinin olması nedeniyle halen Sanger sekanslama yöntemi ile tüm bu bölgenin nükleotid dizisinin belirlenmesi altın standart olarak kabul edilmektedir¹⁰⁰.

Patoloji pratiğinde immünohistokimya ile p53 ekspresyonunun araştırılmasının altında yatan sebep yüksek p53 ekspresyonunun TP53 mutasyon varlığı ile korele olabileceği düşüncesidir. İmmünohistokimya ile saptanan p53 ekspresyonunun, KLL prognozu ile ilişkisi konusunda ise literatürde henüz sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ancak immünohistokimyanın TP53 mutasyonu varlığını yansıtmadaki yüksek başarısı, yöntemin kolay uygulanabilir ve maliyeti düşük olması

nedeniyle bu konudaki çalışmalarda artış izlenmesi beklenmektedir. Schlette ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan ve KLL tutulumu gösteren 222 adet kemik iliği biyopsi örneğinin incelendiği çalışmada, %40 ve üzeri yaygınlıkta p53 boyanması gösteren hastaların sağkalım sürelerinin belirgin olarak kısalmış olduğu gösterilmiştir¹³¹. İngilizce literatürde KLL hastalarının lenf nodu örneklerinde immünohistokimya ile p53 ekspresyonunun prognoz ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Çalışmamızda öncelikle p53 ekspresyonu yüzde değerleri ile sağkalım süreleri arasında korelasyon araştırılmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Daha sonra bir eşik değer belirlenmeye çalışılmıştır ancak p53 ekspresyonu ile sağkalım süreleri arasında korelasyonun zayıf olması nedeniyle Roc analizinden sonuç alınamamış ve bir eşik değer belirlenememiştir. Bu nedenle hastaları yaklaşık olarak eşit iki gruba ayıran %5 eşik değeri esas alınarak yapılan analizde, bu iki grubun sağkalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hasta grubuna literatürdeki diğer bazı çalışmalarda kullanılan %50 eşik değeri ile bakıldığı zaman bu eşik değer üzerinde p53 ekspresyonu gösterip yeterli klinik takibi olan çok az sayıda hastanın (n=3) bulunması nedeniyle sağlıklı yorum yapmak mümkün olamamıştır.

Çalışmamızın dizaynı sırasında p53 ekspresyonu %5 ve üzeri olan 28 olgunun TP53 genlerinin yukarıda belirtilen 5 ekzonunun dizi analizlerinde mutasyon taraması yapılması planlanmıştır. Ancak amplifikasyon çalışmalarına başlandığında kontrol örneğinin periferik kanından elde edilen DNA ile ürün elde edilmesine karşın birçok olguda formalinde tespitli parafine gömülü dokulardan elde edilen DNA ile, sekans çalışmalarında kullanılabilecek kalitede ürün elde edilememiştir. Takip ve tespit koşullarının ideal olmadığı durumlarda dokulardan elde edilen DNA'nın küçük fragmanlara ayrılması nedeniyle bu tür moleküler çalışmaların olumsuz etkilenebileceği bilinmektedir. Sonuç olarak çalışmamızda toplam on hastada sekans bilgisi elde edilebilmiştir.

TP53, 17. kromozomun kısa kolunda yer alan tümör süpresör bir gen olup hücre döngüsü duraklaması, apoptoz ve DNA tamiri gibi önemli hücre içi yollarda görev almaktadır. İnsan kanserlerinde en sık mutasyonu saptanan gen olan TP53,

KLL hastalarında da prognozda belirleyici role sahiptir. Yapılan çalışmalar TP53 genini içeren 17. kromozomdaki ilgili lokusun kaybının (del17p13) ya da TP53'ün mutasyonunun genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım üzerine negatif etkileri olduğunu göstermiştir^{82,109,110,114}. 17p13 delesyonu FISH ile gösterilebilirken TP53 mutasyonu için önerilen yöntem genin (en azından) en sık mutasyon izlenen bölgelerinin direkt sekanslanmasıdır¹⁰⁰. Literatürde hematopoyetik sistem ve hematopoyetik sistem dışı birçok neoplazide immünohistokimya ile saptanan yüksek p53 ekspresyonunun TP53 mutasyonu varlığı ile ilişkili olabileceğine işaret eden çalışmalar mevcuttur. Diffüz büyük B hücreli lenfomalar üzerinde yapılan bir çalışmada immünohistokimya ile >%50 hücrede p53 ekspresyonunun gösterilmesi, mutasyon analizi kadar sağlıklı olmasa da hastaların risk stratifikasyonu için kullanılabilir bir dolaylı belirteç olabilir denilmektedir¹³². Çalışmamızda olguların 5 tanesinde p53 ekspresyon oranı %50 ve üzeri olarak saptanmıştır. Bu olgulardan ancak bir tanesinde (p53 ekspresyonu %90) yukarıda belirtilen 5 ekzonunun mutasyon analizi yapılmış olup bu olguda aminoasit değişimine yol açan mutasyon saptanmamıştır. Ancak bir olguda 5. ekzon 154. kodonda *non-sense* (aminoasit değişimine yol açmayan) mutasyon veya tek nükleotid varyasyonu ile açıklanabilecek noktasal bir değişim saptanmıştır. Hastaların neoplastik olmayan doku örnekleri aynı zamanda sekanslanmadığı için bu nükleotid değişiminin bir *non-sense* mutasyon mu yoksa tek nükleotid varyasyonu mu olduğunu belirlemek mümkün değildir. Benzer şekilde immünohistokimyasal olarak %20 oranında p53 ekspresyonu gösteren ikinci olguda da aynı genetik değişiklik gözlenmiştir.

Hematopoyetik sistem dışındaki tümörlerde yapılan immünohistokimyasal p53 ekspresyonu ile ilgili çalışmalarda çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin over karsinomlarında yapılan bir çalışmada diffüz p53 pozitifliği ya da tamamıyla negatif bir görüntünün yüksek güvenilirlikle o tümörde bir TP53 mutasyonu varlığına işaret ettiği (bu çalışmada tarif edilen bu boyanma paternlerine sahip vakaların %94'ünde TP53 mutasyonu gösterilmiştir) söylenmektedir¹³³. Kolon tümörleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise diffüz p53 pozitifliğinin yüksek doğrulukta TP53 mutasyonunu öngördüğü ancak dağınık boyanma paterninin farklı nedenlerle aktive

olmuş mutant olmayan bir TP53 genini yansıttığı söylenmektedir¹³⁴. Ayrıca bir diğer çalışmada hepatoselüler karsinomda immünohistokimya ile gösterilen %5 ve üzerindeki yoğunluğa sahip p53 boyanmasının TP53 mutasyonu için güvenilir bir dolaylı belirteç olduğu yönünde bir sonuç öne sürülmektedir¹³⁵. Görüldüğü gibi immünohistokimya ile gösterilen p53 ekspresyonu farklı tümörlerde farklı sonuçları yansıtmaktadır.

Hem bizim çalışmamızda hem de diğer çalışmalarda gözlenen yüksek oranda p53 pozitifliği olduğu halde mutasyon saptanmamış olması durumu iki şekilde açıklanabilir; 1- olguda mutasyon vardır ancak bu çalışma ile gösterilememiştir, 2- olguda mutasyon yoktur ve immünohistokimya ile belirlenen p53 ekspresyonu, mutasyon varlığından ziyade p53'ün post-translasyonel modifikasyonuna bağlı proteinin ubiquitinizasyonun ve dolayısıyla yıkımının engelleniyor olmasına bağlıdır. Bu çalışmada, her ne kadar incelediğimiz bölge literatürde gösterilmiş mutasyonların %90'ını içeren bölgeyi kapsıyor da olsa, tüm p53 geninin sekansı analiz edilmemiştir. Olgunun TP53 geninde ekzon 5, 6, 7, 8, 9 dışındaki bir bölgede mutasyon olabilir. Ayrıca Sanger sekanslama metodunda heterozigot mutasyonların saptanmasında çeşitli sıkıntılar yaşanabileceği, yanlış negatif ya da yanlış pozitif sonuçlar elde edilebileceği bilinmektedir¹³⁰. Elde edilen analiz çıktılarının değerlendirilmesinin bilgisayar programları ile yapılması ya da bu değerlendirmenin manuel olarak yapılması sırasında heterozigot mutasyonlara ait piklerin dikkate alınmaması, bu yöntemin sensitivitesi üzerine yapılan çalışmalarda dile getirilen ihtimallerdir¹³⁶. Bu nedenlerle oluşabilecek hatalı değerlendirmelerden kaçınmak için çeşitli öneriler mevcut olup henüz genel kabul görmüş bir yöntem bulunmamaktadır. Ayrıca Sanger sekanslama yöntemi ile güvenilir sonuç elde edilmesi için diğer mutasyon analiz yöntemlerine göre daha yüksek miktarlarda neoplastik hücreye ihtiyaç duyulmaktadır¹²⁹. Kullandığımız örneklerin çok yüksek oranda neoplastik hücre içermesi nedeniyle bu ihtimal büyük oranda dışlanmıştır.

İkinci durum, yani aslında yüksek p53 ekspresyonu gösteren bir olguda TP53 geninin *wild-type* olması ve immünohistokimyasal yöntemle gösterilen yüksek p53 ekspresyonunun TP53 mutasyonu dışında bir nedene bağlı olması ihtimali de

bulunmaktadır. Hücre içi p53 fonksiyonu ve düzeyi transkripsiyon, translasyon, post-translasyonel modifikasyon gibi birçok basamakta kontrol edilmektedir. P53 proteini düzeylerinin yüksek olması yalnızca TP53 mutasyonuna bağlı olmayıp p53 proteininin yıkımını engelleyen ya da ekspresyonunun artmasına neden olan birçok farklı durumda da gerçekleşebilir. Akut myeloid lösemi olgularına ait neoplastik hücreler üzerine yapılan bir çalışmada, p53 protein fonksiyon bozukluğunun yalnızca mutasyonla ilişkili değil translasyonel ya da post-translasyonel mekanizmalarla meydana gelebileceği gösterilmiştir¹³⁷. Normal durumlarda hızlıca yıkım yollarına yönlendirilen p53 proteini hücre içi artmış stres durumunda (DNA hasarı, onkogen aktivasyonu...) birikerek hücrenin döngüsünün duraksaması ya da apoptoza doğru ilerlemesine katkıda bulunabilir^{138,139}. p53'ün stabilizasyonu ve hücre içi birikimi, fosforilasyon ya da asetilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar aracılığı ile olur ve bu modifikasyonlar p53'ün ubiquitinizasyonunu engeller. Bu gibi bir durum neticesinde de immünohistokimya ile yüksek oranda p53 ekspresyonu saptanabilir.

Çalışmamızda elde edilen ilk PZR ürünleri ile hem *forward* hem de *reverse* primerler kullanılarak sekans verisi elde edilebilirdi. Bu sayede çalışmanın güvenilirliği artmış olur ve olası yanlış negatif ya da yanlış pozitif sonuçların önüne geçilebilirdi. Ancak çalışmamızda kullanılan dokulardan elde edilen DNA'nın ve maddi imkanların kısıtlılığı nedeniyle bahsedilen bu detaylı analiz gerçekleştirilememiştir.

Son yıllarda kullanımı yaygınlaşan "derin" sekanslama yönteminde ilgilenilen DNA bölgesi, Sanger sekanslamada olduğu gibi yalnızca bir kez değil en az yedi kez okunmakta ve böylece analizin doğruluk oranı ve düşük frekanstaki değişikliklerin saptanma olasılığı belirgin olarak artmaktadır. Çalışmamızda Sanger sekanslama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile örnek içinde düşük frekanstaki değişiklikleri saptama olasılığı düşüktür. Örneğin bazı olgularda sadece proliferasyon merkezindeki hücrelerde gözlenen p53 boyanmasının gerçekten bir mutasyonu yansıtmadığı ve dolayısıyla proliferasyon merkezlerinin bu mutator fenotipin ortaya çıkmasında rolü olup olmadığı sorularını bu yöntemle cevaplayabilmek mümkün olamamıştır. Bunun için ya derin sekanslama

yöntemlerine başvurmak ya da boyanma gösteren hücreleri mikrodiseksiyon yöntemi ile ayırdıktan sonra dizi analizini gerçekleştirmek gereklidir.

Sonuç olarak, KLL hastalarının değişken klinik seyir göstermeleri nedeniyle hastaların risk durumunu tayin etmeye yarayacak prognostik parametrelere gereksinim vardır. Şimdiye kadar prognozla ilişkisi gösterilen değişkenler arasında TP53 mutasyonu öne çıkmaktadır. İmmünohistokimyasal yöntemlerle saptanan p53 ekspresyonu, genellikle TP53 mutasyonunu yansıtmakla birlikte uygun eşik değerlerin belirlenmesi önemlidir. Ayrıca p53 ekspresyonu TP53 mutasyonu dışında nedenlerle de izlenebilir. Bu nedenle günümüzde TP53 mutasyonunu saptamada altın standart olarak gösterilen yöntem Sanger sekanslama olup KLL hastalarında tedaviye başlamadan önce, en azından TP53 geninin 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. ekzonlarının dizi analizi yapılması önerilmektedir¹⁰⁰. Günümüzde, daha çok araştırmalarda kullanılan yeni jenerasyon sekanslama tekniklerinin rutin pratiğimize girmesi ile bu gibi işlemler çok daha kısa sürede ve düşük maliyetle gerçekleştirilebilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1- İleri evre KLL hastaları düşük evre KLL hastalarına göre daha kısa sağkalım süresine sahiptir.
- 2- Proliferasyon merkezlerinin yaygınlığı/genişliğinin prognoza etkisi halen tartışmalı bir konu olup çalışmamızda yaygın proliferasyon merkezleri içeren olgular ile içermeyen olgular arasında sağkalım süreleri açısından anlamlı bir fark gösterilememiştir.
- 3- İmmünohistokimya ile gösterilen p53 ekspresyonunun sağkalım üzerine etkisi gösterilememiştir.
- 4- Değerlendirilen on olgunun ikisinde 5. ekzonda kodon 154'te aminoasit değişimine yol açmayan GGC>GGT değişikliği gösterilmiştir. Ancak yüksek p53 ekspresyonunun TP53 mutasyon varlığı ile ilişkisi gösterilememiştir. Dolayısıyla immünohistokimyasal yöntemle saptanan p53 ekspresyonunun, TP53 geninin Sanger sekanslama yöntemi ile incelenen ekzon 5-9 arasındaki bölgedeki mutasyonlar dışında sebeplere bağlı olabileceği düşünülmüştür.
- 5- Sanger sekanslama ile gerçekleştirilecek dizi analizi için yüksek kalitede doku örneklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler yöntemlerin rutin patolojide giderek artan önemi göz önüne alındığında, patoloji bölümlerine iletilen dokuların takip ve tespit aşamalarının optimal kalitede DNA eldesine imkan verecek şekilde standardize edilmesi gereklidir. Buna alternatif olarak neoplastik doku örneklerinden taze doku ayırılarak doku bankalarının oluşturulması potansiyel moleküler çalışmalar açısından önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. SEER Stat Fact Sheets: Chronic Lymphocytic Leukemia. 2012. at <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>.)
2. M. Danese MG, C. Reyes, M. Pao, K. B. Knopf. Cost of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in Medicare patients. 2008 ASCO Annual Meeting Chicago, Illinois, ADB2008.
3. Steven H. Swerdlow EC, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Harald Stein, Jorgen Thiele, James W. Vardiman. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.
4. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446-56.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1989;42:567-84.
6. Asplund SL, McKenna RW, Howard MS, Kroft SH. Immunophenotype does not correlate with lymph node histology in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *The American journal of surgical pathology* 2002;26:624-9.
7. Ben-Ezra J, Burke JS, Swartz WG, et al. Small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic analysis of 268 cases. *Blood* 1989;73:579-87.
8. Ciccone M, Agostinelli C, Rigolin GM, et al. Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetic and clinicobiological features in consecutive patients analyzed on tissue microarrays. *Leukemia* 2012;26:499-508.
9. Porwit A, McCullough JJ, Erber WN. *Blood and bone marrow pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2011.

10. Rossi D, Cerri M, Capello D, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008;142:202-15.
11. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 2005;103:216-28.
12. Richter MN. Generalized Reticular Cell Sarcoma of Lymph Nodes Associated with Lymphatic Leukemia. *Am J Pathol* 1928;4:285-92 7.
13. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol* 2009;27:1-10.
14. Cherepakhin V, Baird SM, Meisenholder GW, Kipps TJ. Common clonal origin of chronic lymphocytic leukemia and high-grade lymphoma of Richter's syndrome. *Blood* 1993;82:3141-7.
15. Matolcsy A, Inghirami G, Knowles DM. Molecular genetic demonstration of the diverse evolution of Richter's syndrome (chronic lymphocytic leukemia and subsequent large cell lymphoma). *Blood* 1994;83:1363-72.
16. Deambrogi C, Cresta S, Cerri M, et al. 14q32 Translocations and risk of Richter transformation in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009;144:131-3.
17. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2012;158:426-9.
18. Han T, Ozer H, Gavigan M, et al. Benign monoclonal B cell lymphocytosis--a benign variant of CLL: clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic studies in 20 patients. *Blood* 1984;64:244-52.
19. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2005;130:325-32.
20. Mulligan CS, Thomas ME, Mulligan SP. Monoclonal B-lymphocytosis: demographics, nature and subclassification in 414 community patients. *Leuk Lymphoma* 2011;52:2293-8.

21. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002;100:2289-90.
22. Rossi D, Sozzi E, Puma A, et al. The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol* 2009;146:64-75.
23. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, et al. Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:3959-63.
24. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of clinical investigation* 1998;102:1515-25.
25. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 2005;352:804-15.
26. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011;117:1781-91.
27. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *The New England journal of medicine* 1999;341:1520-9.
28. Crowther-Swanepoel D, Wild R, Sellick G, et al. Insight into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) through analysis of IgVH gene usage and mutation status in familial CLL. *Blood* 2008;111:5691-3.
29. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2007;21:2442-51.

30. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-38.
31. Chu CC, CATERA R, HATZI K, et al. Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood* 2008;112:5122-9.
32. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 2000;343:1910-6.
33. Dohner H, Stilgenbauer S, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med (Berl)* 1999;77:266-81.
34. Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:430-9.
35. Liu Y, Corcoran M, Rasool O, et al. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 1997;15:2463-73.
36. Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97:2098-104.
37. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:15524-9.
38. Ivanov DV, Tyazhelova TV, Lemonnier L, et al. A new human gene KCNRG encoding potassium channel regulating protein is a cancer suppressor gene candidate located in 13q14.3. *FEBS letters* 2003;539:156-60.
39. Bullrich F, Fujii H, Calin G, et al. Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. *Cancer research* 2001;61:6640-8.

40. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:13944-9.
41. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood* 2007;109:5079-86.
42. Hammarsund M, Corcoran MM, Wilson W, et al. Characterization of a novel B-CLL candidate gene--DLEU7--located in the 13q14 tumor suppressor locus. *FEBS letters* 2004;556:75-80.
43. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, et al. 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood* 2010;115:3916-22.
44. Planelles L, Carvalho-Pinto CE, Hardenberg G, et al. APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer cell* 2004;6:399-408.
45. Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, et al. Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:19643-8.
46. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:799-804.
47. Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:230-9.
48. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012;119:329-31.
49. Schnaiter A, Mertens D, Stilgenbauer S. Genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Clinics in laboratory medicine* 2011;31:649-58, ix.

50. Auer RL, Starczynski J, McElwaine S, et al. Identification of a potential role for POU2AF1 and BTG4 in the deletion of 11q23 in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 2005;43:1-10.
51. Wang DM, Miao KR, Fan L, et al. Intermediate prognosis of 6q deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011;52:230-7.
52. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122:3432-8.
53. Balatti V, Lerner S, Rizzotto L, et al. Trisomy 12 CLLs progress through NOTCH1 mutations. *Leukemia* 2013;27:740-3.
54. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2012.
55. Aster JC, Blacklow SC, Pear WS. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *J Pathol* 2011;223:262-73.
56. Rasi S, Monti S, Spina V, Foa R, Gaidano G, Rossi D. Analysis of NOTCH1 mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2012;97:153-4.
57. Filip AA. New boys in town: prognostic role of SF3B1, NOTCH1 and other cryptic alterations in chronic lymphocytic leukemia and how it works. *Leuk Lymphoma* 2013. [Epub ahead of print]
58. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:521-9.
59. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 2011;365:2497-506.
60. Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013. [Epub ahead of print]
61. Levine A, Durbin R. A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic acids research* 2001;29:4006-13.

62. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101-5.
63. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MT, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2009;144:507-16.
64. Gardam S, Turner VM, Anderton H, et al. Deletion of cIAP1 and cIAP2 in murine B lymphocytes constitutively activates cell survival pathways and inactivates the germinal center response. *Blood* 2011;117:4041-51.
65. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:2854-62.
66. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-34.
67. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
68. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010;10:37-50.
69. Gentile M, Cutrona G, Neri A, Molica S, Ferrarini M, Morabito F. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica* 2009;94:887-8.
70. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;93:1732-7.
71. Reinisch W, Willheim M, Hilgarth M, et al. Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1994;12:2146-52.

72. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996;22:439-47.
73. Bulian P, Rossi D, Forconi F, et al. IGHV gene mutational status and 17p deletion are independent molecular predictors in a comprehensive clinical-biological prognostic model for overall survival prediction in chronic lymphocytic leukemia. *J Transl Med* 2012;10:18.
74. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177-84.
75. Kern W, Dicker F, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Correlation of flow cytometrically determined expression of ZAP-70 using the SBZAP antibody with IgVH mutation status and cytogenetics in 1,229 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76:385-93.
76. Kharfan-Dabaja MA, Chavez JC, Khorfan KA, Pinilla-Ibarz J. Clinical and therapeutic implications of the mutational status of IgVH in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2008;113:897-906.
77. Lopez C, Baumann T, Costa D, et al. A new genetic abnormality leading to TP53 gene deletion in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012;156:612-8.
78. Zenz T, Frohling S, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:71-84.
79. Dunphy CH. *Molecular Pathology of Hematolymphoid Diseases*. 1 ed. North Carolina: Springer; 2010.
80. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *The New England journal of medicine* 1990;323:720-4.

81. Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol* 2008;142:529-37.
82. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28:4473-9.
83. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:995-1004.
84. Badoux XC, Keating MJ, Wierda WG. What is the best frontline therapy for patients with CLL and 17p deletion? *Curr Hematol Malig Rep* 2011;6:36-46.
85. Flanagan MB, Sathanoori M, Surti U, Soma L, Swerdlow SH. Cytogenetic abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma lymphoid tissue biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2008;130:620-7.
86. Juliusson G, Oscier D, Gahrton G, et al. Cytogenetic Findings and Survival in B-Cell Chronic Lymphocytic-Leukemia - 2nd Iwccll Compilation of Data on 662 Patients. *Advances in Chronic Lymphocytic Leukemia* 1991:21-5.
87. Gunnarsson R, Mansouri L, Rosenquist R. Exploring the genetic landscape in chronic lymphocytic leukemia using high-resolution technologies. *Leuk Lymphoma* 2013. [Epub ahead of print]
88. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica* 2012;97:437-41.
89. Quesada V, Ramsay AJ, Lopez-Otin C. Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation. *The New England journal of medicine* 2012;366:2530.

90. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:1403-12.
91. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208:1389-401.
92. Mauro FR, Bandini G, Barosi G, et al. SIE, SIES, GITMO updated clinical recommendations for the management of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2012;36:459-66.
93. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development* 2012;26:1268-86.
94. Online Mendelian Inheritance in Man OM-NIoGM, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). TUMOR PROTEIN p53; TP53. 2013.
95. Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, et al. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes & development* 1998;12:2658-63.
96. Rogel A, Popliker M, Webb CG, Oren M. p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol Cell Biol* 1985;5:2851-5.
97. Ringshausen I, O'Shea CC, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell* 2006;10:501-14.
98. Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Advances in cancer research* 2011;110:107-39.
99. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human mutation* 2002;19:607-14.
100. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1458-61.

101. Inoue K, Kurabayashi A, Shuin T, Ohtsuki Y, Furihata M. Overexpression of p53 protein in human tumors. *Medical molecular morphology* 2012;45:115-23.
102. Milner J, Medcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991;65:765-74.
103. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology* 2011;6:479-507.
104. Kastan MB, Berkovich E. p53: a two-faced cancer gene. *Nature cell biology* 2007;9:489-91.
105. Song H, Hollstein M, Xu Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nature cell biology* 2007;9:573-80.
106. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990;9:1595-602.
107. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990;335:675-9.
108. Chang H, Jiang AM, Qi CX. Aberrant nuclear p53 expression predicts hemizygous 17p (TP53) deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2010;133:70-4.
109. Zenz T, Krober A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008;112:3322-9.
110. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:2223-9.
111. Dohner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995;85:1580-9.

112. Lai YY, Huang XJ. Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence in situ hybridization: a multicenter study. *Chinese medical journal* 2011;124:2417-22.
113. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009;114:957-64.
114. Zenz T, Habe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009;114:2589-97.
115. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;24:2072-9.
116. Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1953;18:123-31.
117. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.
118. Hood LE, Hunkapiller MW, Smith LM. Automated DNA sequencing and analysis of the human genome. *Genomics* 1987;1:201-12.
119. Chan EY. Advances in sequencing technology. *Mutation research* 2005;573:13-40.
120. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:560-4.
121. Boland EJ, Pillai A, Odom MW, Jagadeeswaran P. Automation of the Maxam-Gilbert chemical sequencing reactions. *Biotechniques* 1994;16:1088-92, 94-5.
122. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998;281:363, 5.
123. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:251364.

124. Karim S, Ali A. Correlation of p53 over-expression and alteration in p53 gene detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism in adenocarcinoma of gastric cancer patients from India. *World J Gastroenterol* 2009;15:1381-7.
125. Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 1994;172:5-12.
126. Basic Local Alignment Search Tool. 2012. at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.)
127. Karmiris T, Rohatiner AZ, Love S, et al. The management of chronic lymphocytic leukemia at a single centre over a 24-year period: prognostic factors for survival. *Hematol Oncol* 1994;12:29-39.
128. Garcia CF, Hunt KE, Kang H, et al. Most morphologic features in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) do not reliably predict underlying FISH genetics or immunoglobulin heavy chain variable region somatic mutational status. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:119-27.
129. Tol J, Dijkstra JR, Vink-Borger ME, et al. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *J Cell Mol Med* 2010;14:2122-31.
130. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* 2010;12:425-32.
131. Schlette EJ, Admirand J, Wierda W, et al. p53 expression by immunohistochemistry is an important determinant of survival in patients with chronic lymphocytic leukemia receiving frontline chemo-immunotherapy. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1597-605.
132. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2012;120:3986-96.

133. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2011;24:1248-53.
134. Kaserer K, Schmaus J, Bethge U, et al. Staining patterns of p53 immunohistochemistry and their biological significance in colorectal cancer. *J Pathol* 2000;190:450-6.
135. Lee SN, Park CK, Sung CO, et al. Correlation of mutation and immunohistochemistry of p53 in hepatocellular carcinomas in Korean people. *Journal of Korean medical science* 2002;17:801-5.
136. Davidson CJ, Zeringer E, Champion KJ, et al. Improving the limit of detection for Sanger sequencing: a comparison of methodologies for KRAS variant detection. *Biotechniques* 2012;53:182-8.
137. Fu L, Minden MD, Benchimol S. Translational regulation of human p53 gene expression. *EMBO J* 1996;15:4392-401.
138. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005;434:864-70.
139. Gorgoulis VG, Pratsinis H, Zacharatos P, et al. p53-dependent ICAM-1 overexpression in senescent human cells identified in atherosclerotic lesions. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2005;85:502-11.

EK (İncelenen Hastaların Biyopsi Numaraları)

	Biyopsi Numarası	Yılı
1	1104	2001
2	1203	2001
3	5401	2001
4	14569	2002
5	1109	2003
6	13986	2003
7	14236	2003
8	15323	2003
9	16113	2003
10	16341	2003
11	17945	2003
12	786	2004
13	1182	2004
14	9347	2004
15	9586	2004
16	2771	2006
17	7750	2006
18	8712	2006
19	14131	2006
20	14449	2006
21	19342	2006
22	19415	2006
23	21019	2006
24	757	2007
25	5023	2007
26	6921	2007
27	7932	2007
28	9566	2007
29	14439	2007
30	17482	2007
31	19776	2007
32	4538	2008
33	7541	2008
34	16897	2008
35	19567	2008
36	21515	2008
37	11282	2009
38	16489	2009
39	17918	2009
40	20705	2009
41	20991	2009
42	8714	2010
43	19429	2010
44	6878	2011
45	10642	2011
46	11507	2011
47	13451	2011
48	14061	2011
49	3530	2012
50	16259	2012
51	17551	2012
52	17849	2012
53	2232	2013
54	5623	2013

