

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE p53 YOLAĞINDAKİ GENLERİN HASTALIĞIN PROGNOZUNA OLAN ETKİSİ

Gözde Öztan, Şükrü Palanduz, Kıvanç Çefle

İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, İstanbul

ÖZET

Kronik lenfositik lösemi (KLL), çeşitli lenfoid dokularda, kemik iliği ve kanda küçük, bölünmeyen B lenfositlerin birikimiyle tanımlanan, batı dünyasında en yaygın görülen lösemidir. Hastalık seyri heterojendir. Klinik evreleme sistemleri (Rai ve Binet), hastalarda bireysel terapötik kararların alınmasında, prognoz ve tümör yükünü tahminde kullanılır. KLL hastalarının tanı sırasında prognozunun öngörülmesi, uzun dönemli sağkalım ve remisyon açısından önemlidir. Bu nedenle klasik evreleme yöntemlerinin dışında moleküler prognostik parametrelerin geliştirilmesi gündemdedir. KLL olgularında gen ekspresyonlarındaki farklılıkların belirlenmesi, bunların moleküler belirteç olarak kullanılmasında etkilidir.

Diğer yandan p53 tümör süpresör geni ve p53 yolağında yer alan birçok gen çeşitli malignitelerin gelişiminde rol oynamaktadır. p53 yolağı, DNA replikasyonu ve

hücre bölünmesini kontrol ederek streslere yanıt verir. Posttranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla stres sinyalleri (DNA hasarı, sıcak veya soğuk şok, hipoksi vb.) p53 proteinine iletilir. Hücre döngüsünün durması, hücre yaşlanması veya apoptoz programının başlamasında p53 proteininin aktivasyonu rol oynamaktadır.

p53 yolağında yer alan apoptotik genlerden BAX, BCL-2, p53 ve hücre döngüsü genlerinden mutasyona uğramış ataksi telanjiektazi (ATM), E2F1, PTEN ile hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasından sorumlu olan genlerden MCL1, MDM2, MDM4'ün KLL'nin prognozuna ve patogeneze olan etkisi çeşitli genetik çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu yazıda p53 yolağı ve bu yolaktaki anormalliklerin KLL gelişimindeki rolü gözden geçirilecektir.

Anahtar kelimeler: Lösemi, lenfositik, B-hücre, prognoz. Nobel Med 2018; 14(2): 5-16

THE PROGNOSTIC EFFECT OF GENES IN THE P53 PATHWAY IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the Western world, characterized by the accumulation of small, non-dividing B lymphocytes in various lymphoid tissues, bone marrow and blood. The disease prognosis is heterogenous. Clinical staging methods (Rai and Binet) are used to make individual therapeutic decisions in patients and to predict prognosis and tumor burden. The prognosis of patients with CLL during diagnosis is important in terms of long-term survival and remission of patients. Therefore, apart from classical staging methods, it is necessary to develop prognostic parameters that can predict the course of the disease genetically without predicting the prognosis of the disease. The determination of differences in gene expressions in CLL cases is effective in their use as molecular markers.

On the other hand, p53 tumor suppressor gene and many genes located in the p53 pathway play a role in the development of various malignancies. The p53 pathway responds to stress by controlling DNA replication and cell division. Stress signals (DNA damage, hot or cold shock, hypoxia, etc.) are transmitted to the p53 protein through post-translational modifications. Activation of the p53 protein plays a role in cell cycle arrest, cell senescence, or at the onset of the apoptosis.

Among the genes responsible for cell growth, proliferation and differentiation by MCL1, MDM2 and MDM4, and ATM, E2F1 and PTEN from cell cycle genes and BAX, BCL-2 and p53 from apoptotic genes located in the p53 pathway has been demonstrated by various genetic studies for the effect of CLL on prognosis and pathogenesis. This study reviews the p53 pathway and the anomalies in this pathway that effect of prognosis and pathogenesis on CLL.

Keywords: Leukemia, lymphocytic, B-cell, prognosis. Nobel Med 2018; 14(2): 5-16

GİRİŞ

Kronik lenfositik lösemi (KLL), bir CD5+ B hücresi neoplazisidir. Bu neoplastik hücreler periferik kanı, kemik iliğini, lenf düğümlerini ve diğer lenfoid dokuları infiltre ederler.¹ Batı toplumunda en sık karşılaşılan lösemi tipidir.² KLL tanısı konan hastalar ortalama 70 yaş civarındadır ve prognoz oldukça değişkendir.¹ KLL hücreleri monoklonal B lenfositlerinden oluşur. Yüzeylerinde, CD23, CD19, CD5 antijenlerine ek olarak, CD20, CD79b, FMC7 ve Ig antijenlerini de az miktarlarda ekspres ederler.²

KLL olgularının %50'sinden fazlasına erken hastalık döneminde, genellikle rutin kan taramasında karşılaşılan rastlantısal bir lenfositoz ile tanı konur. Binet veya Rai sınıflamaları, günlük klinik uygulamada kullanılan başlıca evreleme sistemlerdir. NOTCH1 ve SF3B1 gen mutasyonları, timidin kinaz (TK) veya serum β2-mikroglobülin düzeylerinde yükselme, immünoglobülin ağır zincir genlerinin (IGHV) mutasyon durumu gibi biyolojik belirteçler prognostik öneme sahiptir.³

KLL, sonradan edinilen bir hastalıktır. Ancak; KLL hastalarının birinci derece yakınlarının %13,5'inde, KLL fenotipinin az oranda görülmesi bu hastalığın kalıtsal faktörlere bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Otoimmün hastalıklarda, B-hücre malignitelerinde ve KLL'li hastaların akrabalarında, KLL sıklığında artış bulunmaktadır.⁴

B-kronik lenfositik lösemi (B-KLL)'nin nedeni belirsizdir. Spesifik genetik anormallikler tanımlanmamıştır. Hastalığı başlatan olaylar, ilerlemesine yol açan nedenlerden farklı olabilir. KLL ile radyasyona maruz kalma, kimyasallar ve alkileyici ajanlar arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır.⁴

Günümüzde, hastaları klinik ve laboratuvar özelliklerine dayalı olarak risk gruplarına göre sınıflandırmak için başlıca iki klinik evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu amaçla klinikopatolojik değerlendirme yapılmaktadır.⁵ Yaygın olarak kabul görmüş hematolojik temelli evreleme yöntemleri Rai ve Binet sistemleri, hem hastalarda hem de klinik araştırmalarda kullanılmıştır ve birbiriyle benzerlik taşımaktadır. Rai sınıflandırması, periferik lenfositoz, trombosit sayısı, hemoglobin (Hb) düzeyi ve lenfadenopatinin varlığı veya yokluğu üzerine kurulmuştur. Binet evreleme sistemi ise, 1 cm'den büyük lenf ganglionu varlığı saptanan lenfoid bölgelerin sayısı, organomegali, anemi ve trombositopeninin varlığına dayanır.⁶ İnterfaz Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH) kullanılarak, KLL vakalarının % 80'inden fazlasında, çoğunluğu kromozomal delesyonlardan oluşan kromozom anomalileri belirlenmektedir.⁷

En sık rastlanan anomaliler, P53 tümör supresör geninin bulunduğu 17p13 delesyonları (%8), trizomi 12 (%16), 11q22.3-q23.1(%19) delesyonları ve 13q14 (%53) delesyonlarıdır. 17p delesyonu (17p-) ve 11q delesyonu (11q-) taşıyan hastalarda kısa sağ kalım

süresiyle birlikte kötü prognoz ve hastalığın hızlı ilerlemesi söz konusudur. 13q delesyonu (13q-) hastalığın yavaş ilerleyen formu ve daha iyi prognozla ilişkilendirilir.⁸

P53 yolağı

P53 yolağı, G1 ve G2 kontrol noktalarını düzenler ve DNA hasarına veya diğer hücresel streslere yanıt olarak apoptozu başlatır. P53 yolağındaki pozitif ve negatif oto-düzenleyici mekanizmaların çoğu, Mdm2 proteini aracılığıyla etki etmektedir. TP53 geninin germline mutasyonu kansere yakınlıkla ilişkilidir ve bu genin işlevlerinin çoğu, tümör supresör rolünden kaynaklanmaktadır.

P53 mutasyonu, ilk kez Li-Fraumeni ailesel kanser sendromlu hasta grubunda tanımlanmıştır. Diğer yandan, somatik P53 mutasyonu, B hücreli lenfomalar dahil olmak üzere lenfoid malignitelerde ve diğer kanser türlerinde de sıklıkla saptanmaktadır. P53, strese karşı hücresel tepkinin koordinatörü olduğu için, inaktivasyonu daha agresif tümörlerin gelişimine yol açar. TP53 mutasyonuna uğramış agresif tümörleri olan hastalarda daha kötü prognoz ve daha kısa sağkalım görülmektedir.⁹

KLL'de p53 ekspresyonunu delesyon veya mutasyon yoluyla değiştiren genomik aberasyonlar genellikle agresif hastalıkla ilişkilidir ve diğer faktörlerden bağımsız olarak kötü prognostik göstergelerdir. 17p- delesyonlu hastalar, alkile edici ajanlara ve pürin analoglarına yüksek direnç gösterirler ve bunlarda sağkalım kötüdür. Birçok hücresel protein p53 ile etkileşir veya p53'ün kontrolü altındadır. Bu proteinlerin herhangi birindeki polimorfizm/mutasyonlar da kanser riskini etkileyebilir veya TP53 polimorfizm ve/veya mutasyonları ile sinerji oluşturabilir.⁹

B-KLL hücreleri zamanla genetik lezyonlar geliştirirler. B-KLL'de zamanla tek veya komplike genetik karyotipler ortaya çıkar. Spesifik DNA segmentleri (+12) ortaya çıksa da hastalık temel olarak DNA delesyonları ile karakterizedir. 13q14, 11q22-23, 17p13, 6q21 delesyonları en sık rastlanan değişikliklerdir. 17p13, p53 ile ilişkili iken 11q22, ATM ile ilişkilidir.¹⁰ p53 yolağıyla ilgili KLL'de görülen değişiklikler Tablo'da gösterilmektedir.^{9,11-16}

P53 yolağındaki bazı genler, klinik açıdan önemli olabilecek polimorfizmleri içerir. Bu genlerden biri olan MDM2 genindeki SNP309 polimorfizmi en iyi tanımlanmış MDM2 gen polimorfizmidir. Bu polimorfizm, genin birinci intronunda 309. nükleotitte T→G değişimi (rs2279744) olarak tanımlanmaktadır.⁹

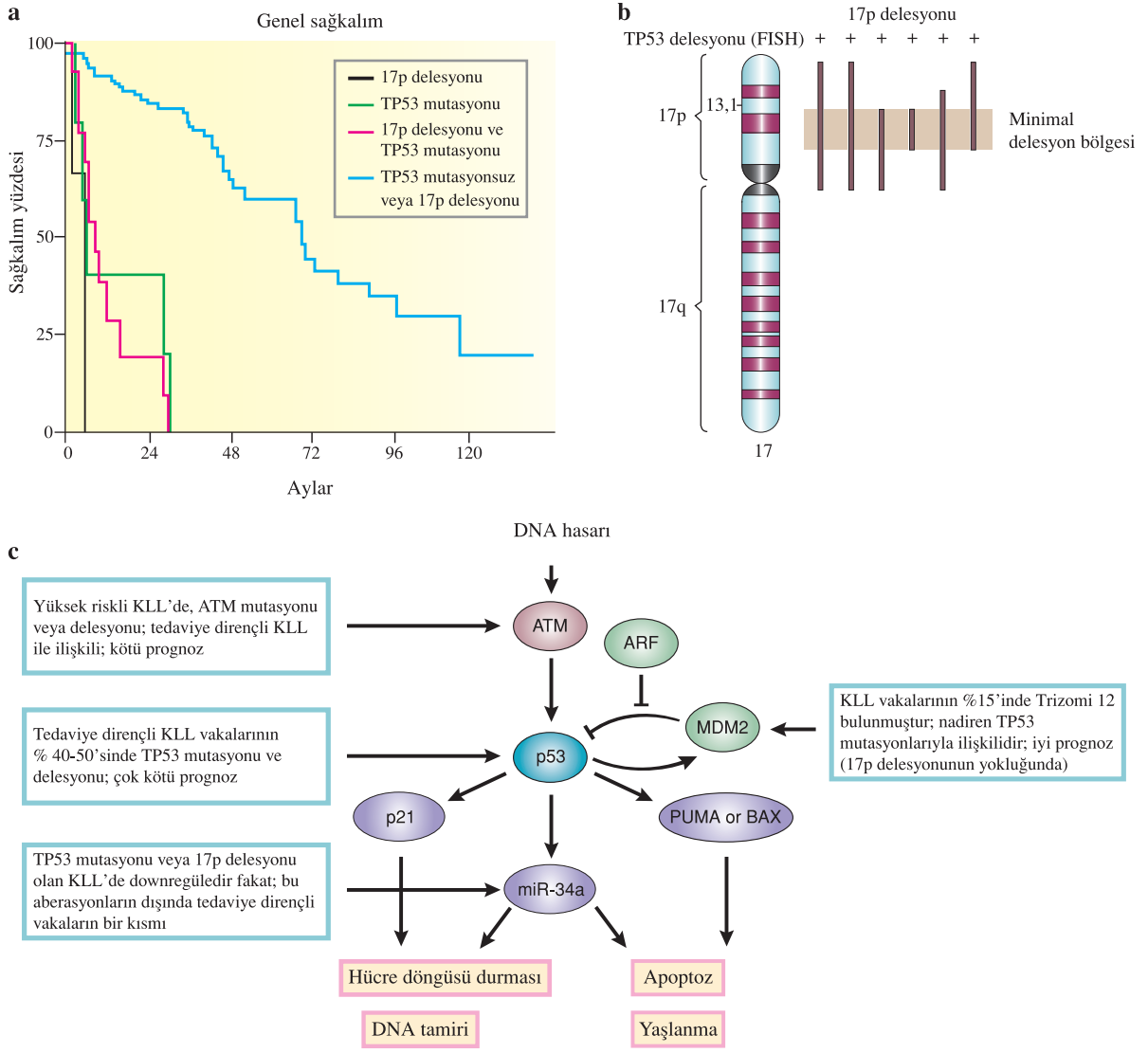
Tablo 1. p53 yolağıyla ilgili Kronik lenfositik lösemi (KLL)'de görülen değişiklikler	
Genler	Değişiklikler
TP53	Missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar Delesyonlar İnserasyonlar Nonsense (anlamsız) mutasyonlar Silent (sessiz) mutasyonlar Splicing (uç birleştirme) mutasyonlar İntronik mutasyonlar Ekzonik SNP Kodon 72 Polimorfizmi (rs1042522)
ATM	Delesyonlar Nokta mutasyonları (1435G>T)
BAX	BAX promotörünün 5' UTR (translasyona uğramayan bölgesinde) G(-248)A SNP
BCL2	BCL2 promotörünün inhibitör bölgesindeki -938A>C SNP
MCL1	MCL1 promotörünün insersiyonu
MDM2	SNP309 Polimorfizmi (rs2279744)
PTEN	miR-26a ve miR-214'ün azalmış ekspresyonu (ifadesi)
RB1	Delesyon (13q kaybı)
CDKN2A (p16 ^{INK4a})	İnaktivasyon (delesyonlar, nokta mutasyonları ve promotör hipermetilasyon)

SNP309 polimorfizmi, MDM2 geninin p53 yanıt elementinin yakınında lokalize olur ve transkripsiyon faktörü Sp1 için daha yüksek afiniteli bir DNA bağlama bölgesi oluşturarak, hücrelerde MDM2 mRNA'sında ve proteininde artışa neden olur. MDM2 SNP309 polimorfizmi saptanan KLL hastalarında SNP309 polimorfizmi ile genel sağkalım arasında anlamlı negatif korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Heterozigot SNP309 T/G genotipinin tedavisiz sağkalıma etkisinin, p53'ün delesyon ve/veya mutasyonlarla inaktivasyonunun, KLL'deki diğer bilinen prognostik belirteçlere bağlı olmadığı tespit edilmiştir.⁹

Bu bölümde, KLL hastalığında p53 yolağında yer alan ve hastalığın moleküler patogenezi ve prognozuna etkisi olan apoptoz, hücre döngüsü, hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşmasıyla ilişkili P53, ATM, BAX, BCL2, E2F1, MCL1, MDM2, MDM4, PTEN ve RB1 genleri hakkında bilgi verilecektir.

TP53: Tümör protein 53

p53, 53-kD'luk bir nükleer fosfoproteindir ve 17p13.1'de lokalize 20 kb'lık genin ürünüdür. p53, genomun stabilizasyonu, apoptoz indüksiyonu ve hücre döngüsü regülasyonundan oluşan işlevlere sahiptir. TP53 genindeki değişiklikler, çok aşamalı karsinogenezde önemli rol oynamaktadır ve çeşitli tümörlerin tedavisindeki yanıtta ve prognoza etki



Şekil 1. Kronik lenfositik lösemi (KLL)'de TP53 mutasyonları²⁰

17p13 delesyonlarının ve TP53 mutasyonlarının varlığı veya yokluğu ile sınıflandırılan genel sağkalımın karşılaştırılması (Şekil 1a). Kırmızı çubuklar, kromozom 17'nin kısa kolunun çoğunu içeren 17p13 delesyonunun boyutunu göstermektedir (Şekil 1b). p53 yolunun basitleştirilmiş şeması ve DNA hasarı yanıtı (Şekil 1c).

eder. Tümörlerin çoğunluğunda, TP53, mutasyonlar yoluyla inaktive edilir, bu durum kararlılığı artmış p53 proteinini üretimiyle sonuçlanır.¹⁷

TP53 geninde anormallikler taşıyan KLL'li hastalar, özellikle risk altındadır. B-KLL'li sporadik vakaların içinde, çoğunluğu mutasyona uğramamış IgVH lokusu taşıyan hastaların %10-15'inde TP53 aberasyonları görülür.¹⁸ KLL'li hastaların %10-20'sinde, P53 yolağı, genomik TP53 mutasyonları ve anormal mRNA uç birleştirmesi nedeniyle etkilenmiştir.¹⁹ KLL'deki TP53 mutasyonları Şekil 1'de gösterilmiştir.²⁰

TP53 mutasyonları/varyantları çeşitlidir ve p53 kodlama dizisinin büyük bölümünü etkilemektedir. TP53 mutasyonları/varyantlarının çoğunluğu inaktiftir, ancak bunların bazıları olağandışı özelliklere sahiptir (örneğin; sıcaklık hassasiyeti) veya anormal uç birleştirme izoformlarını içerebilir.¹⁹

17p13 delesyonu veya TP53 mutasyonuna sahip hastalar kötü prognoza sahiptir. 17p13 delesyonu, FISH ile konfirme edilebilirken p53 kaybıyla daima ilişkilidir (Şekil 1'de yer alan '+' işareti TP53 delesyonunu gösterir). Çoklu genomik aberasyonlar, kronik lenfositik lösemide p53 yolağını hedeflemektedir. Stres yokluğunda, MDM2 ubiquitin ligaz, p53'e bağlanarak parçalanmasını hızlandırdığı için p53 seviyeleri düşüktür. MDM2, kromozom 12'de lokalize olmuştur. Trizomi 12 olan KLL vakaları, düşük p53 seviyesine sahiptir.²⁰

Strese (DNA hasarı gibi) yanıt olarak, p53, ATM'yi de içeren çeşitli yollar üzerinden aktive edilir. Tedaviye dirençli KLL'de TP53 kaybı veya mutasyonu gözlenmektedir.²⁰ Hemizigot TP53 geni delesyonu, KLL'de en önemli olumsuz risk faktörüdür, ancak p53 protein ekspresyonu ile ilişkisi belirsizdir. Chang ve ark. KLL vakalarında TP53 geni delesyon

durumunun p53 proteininin çekirdekdeki immün reaktivitesiyle olan ilişkisini araştırmışlardır. FISH ile olguların %13,6'sında hemizigot TP53 delesyonları tespit edilmiş, immünohistokimyasal analizle, olguların %12,7'sinde hücre çekirdeğinde p53 protein ekspresyonu tespit edilmiştir. Çekirdekte p53 protein ekspresyonu olan tüm vakalar, hemizigot TP53 delesyonlarına sahiptir.²¹

TP53 genindeki nokta mutasyonları p53'ün yıkıma karşı stabilizasyonunu sağlamakta ve dolayısıyla tümörlerde mutant p53 proteini yukarı regüle olmaktadır.²² Halina ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada, B-KLL lenfositlerinde TP53 mRNA ekspresyonu ve hastalığın ilerlemesiyle olan ilişkisi incelenmiştir. Bu amaçla hastalar yüksek ve düşük p53 ekspresyon düzeyleri olan iki gruba ayrılmıştır. Sağlıklı gönüllülerin periferik kan lenfositlerinde normal p53 ekspresyonunun en yüksek değeri, ayırdedici bir değer olarak kabul edilmiştir. P53 mRNA ekspresyon düzeyleri yüksek olan hastaların, tedavi gerektirmeyen sağkalım oranı diğer gruba göre daha düşüktür.²³

Yüksek p53 ekspresyonu olan hastalar, yüksek hastalık aktivitesini yansıtan ve artmış Rai evreleri ile korelasyon gösteren anlamlı şekilde artmış β 2-mikroglobülin düzeyleri ile karakterize edilmiştir. Farklı Rai evrelerindeki B-KLL hastalarında TP53 ekspresyonunun korelasyonu, hastalığın ilerlemesinin p53 mRNA ekspresyonundaki artışlarla birlikte olduğunu ortaya koymuştur.²³

FISH analizi ile rutin olarak değerlendirilen P53 geninin delesyonu, kronik lenfositik lösemide kötü prognoz ile bağlantılıdır. İzole P53 mutasyonunun (delesyon olmaksızın) varlığı KLL hastalarında sağkalımın azalması ile ilişkilidir.²⁴ B-KLL'deki p53 delesyonları ve/veya mutasyonları hastaların % 10 ila % 15'iyle sınırlı olup, kemoterapötik tedavinin klinik direnci ve sağkalımı azaltmasıyla ilişkilidir. Nutlin-3, B-KLL'de apoptozu indükleyerek hem fludarabin hem de klorambusille sinerji oluşturmaktadır. B-KLL hücrelerini öldürmek için, p53/MDM2 etkileşiminin küçük bir molekül inhibitörü olan nutlin-3 kullanılarak p53'ün indüklenmesiyle, kaspaz bağımlı apoptotik yolağın aktivasyonu ve mitokondriyal değişiklikler meydana gelmektedir.²⁵

ATM: Mutasyona uğramış Ataksi Telanjiektazi

ATM, 11q22-23'te kodlanan ve p53'ün aktivasyonu ile ilişkilendirilmiş yüksek molekül ağırlıklı bir protein kinazdır. Proteinleri fosforile eden fosfoinositid 3-kinaz süper ailesinin bir üyesidir.²⁶



Şekil 2. Mitokondrial inserasyon için gerekli BAX yapısal düzenlemesinin mekanizması. Proapoptotik proteinlerden biri olan Bax, BH1, BH2 ve BH3 domainlerini ve C-terminal transmembran domaini (TM) içermektedir.

Teorik olarak P53 mutasyonu içermeyen mekanizmalar yoluyla da p53 disfonksiyonunun (işlev kaybı) ortaya çıkması mümkündür. P53 mutasyonu yokluğunda B-hücreli KLL'de p53 disfonksiyonunun meydana gelebileceği ve bu tür bir disfonksiyonun, p53 aktivasyonunda rol oynayan bir kinaz olan ATM'yi kodlayan genin mutasyonu ile ilişkili olduğu iddia edilmiştir. ATM geninin inaktivasyonu, KLL'de p53 disfonksiyonunun olası bir nedenidir. Serin 376'da p53 defosforilasyonu ve serin 15'de p53 fosforilasyonu, ATM ile ilişkilendirilebilmektedir; her iki durum p53 aktivasyonu ile ilişkilidir. KLL'li hastalarının %30-40'nın tümör hücrelerinde ATM proteininin düzeyinde azalma tespit edilmiş ve bu tür durumların önemli bir bölümünde de ATM mutasyonları gösterilmiştir. Ayrıca, KLL hastalarının %20'sinde 11q22-23'de delesyon saptanmaktadır ve vakaların bir kısmında ATM allelindeki mutasyonla ilişkilidir.²⁷

ATM geninin germline biallelik mutasyonları, özellikle lenfoid tümörler ve artan malignite insidansı ile ilişkili otozomal resesif bir hastalık olan ataksi-telanjiektaziye yol açmaktadır. 11q22-23'de heterozigozite kaybı ve ATM proteininin yokluğu, B-KLL'de kötü prognozla ilişkilidir.²⁸

Starostik ve ark. ATM geninde heterozigotluk kaybı (LOH) bulunan bir kısım vakada, Western blot analiziyle ATM protein ekspresyonunu araştırmış ve ATM proteininin bulunmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, B-KLL'li vakaların %34'ünde, ATM düzeylerinin normal lenfoid hücrelerde görülenin %50'sinden daha az olduğunu göstermişlerdir. ATM protein eksikliği, B-hücre kronik lenfositik lösemisinin agresif bir alt grubunu tanımlamaktadır. Normal ATM ekspresyonu olan vakalar ve ATM ekspresyonunun eksik olduğu B-KLL vakaları arasında morfolojik veya immünofenotipik bir fark gözlenmemiştir. KLL'li hastalardaki ATM eksikliğinin, kısa sağkalım süresi ve daha agresif hastalıkla ilişkili olduğunu ve ATM'nin B-KLL gelişiminde rol oynadığını belirlemişlerdir.²⁹

BAX: BCL-2 İlişkili X Proteini

KLL'de, malign B lenfositlerinin in vivo apoptotik direnci kısmen apoptotik mekanizmadaki bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bozukluklar, birçok apoptoz regülatörlerinin

(düzenleyiciler) anormal ekspresyonu ve genetik değişikliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu apoptoz regülatörleri arasında Bcl2 ailesi üyeleri merkezi bir rol oynar.³⁰

Proapoptotik proteinlerden biri olan Bax, BH1, BH2 ve BH3 domainlerini ve C-terminal transmembran domaini (TM) içermektedir (Şekil 2).³¹ Bak, Bok, Bik, Bad, Bid'den oluşan diğer Bax aile üyelerinin, hidrofobik membran domaini ve BH1 ve BH2 domainleri çoğunlukla olmamasına rağmen, hepsi BH3 domainlerini içerir. Bcl-2 ailesi üyelerinin aksine, Bax ailesi üyelerinin mitokondriyal membran içine dahil olması, sitokrom-c salınımına ve apoptotik hücre ölümünün indüksiyonuna neden olmaktadır.³¹

Bcl-2 ve Bax, yapay membranlarda iyon kanalları oluşturabilmesine karşın, Bcl-2, nötr pH'da (pH=7) Bax'ın aktivitesini inhibe eder. Bax protein ailesinin üyeleri, kaspazlar tarafından ayrılma, protein kinazların inhibisyonu ve/veya fosfatazların aktivasyonu ve hücre içi pH'daki artış ile aktive edilmektedir. Hidrofobik membran insersiyon dizisini içermeyen Bid, kaspaz 8 tarafından kesilerek aktive edilir. Bu kesim, Bcl-2 aktivitesini inhibe ederek ve Bax'ı uyararak, Bax ve Bcl-2 dimerizasyonunu sağlar ve BH3 domainini açığa çıkarır.³¹

Vucicevic ve ark. kronik lenfositik lösemili hastalarda Bax geni ve bcl-2/Bax oranının ekspresyonunu ve bunların prognostik göstergelerle ilişkisini analiz etmişlerdir. Bax mRNA'sının ve Bcl2/Bax oranının KLL örneklerinde kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde olduğu ortaya konulmuştur. Yazarlar, kontrolü bozulmuş Bcl-2 ve Bax ekspresyonunun KLL'nin patogenezi ve klinik gidişi üzerinde etkili olabileceğini belirtmişlerdir.³²

BCL-2: B hücre KLL/Lenfoma 2

B-KLL'li çoğu vakada gen yeniden düzenlenmesi olmadan Bcl-2 geninin aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Protoonkogen ürünü olan Bcl-2, apoptozu düzenleyici fonksiyona sahiptir. Bcl-2 protein aktivitesinin karşıtı Bax, hücre ölüm oranını hızlandıran homolog proteindir. B-KLL'de, B-lenfositlerinde Bcl-2 ve Bax protein seviyelerinde önemli değişiklikler olduğu tespit edilmiş ve normal kontrollere kıyasla hem tedavi alan hem de tedavi almayan hastalarda Bcl-2/Bax oranlarında artış gözlenmiştir.³³

Apoptozun yukarı regülatör gruplarından biri olan Bcl-2 ailesi, apoptotik sinyal yolunda çok önemli bir hücre içi kontrol noktası olarak rol oynamaktadır. BH 1-4 olmak üzere homoloji gösteren dört korunmuş

dizi motifi tanımlanmıştır. BCL-2 ailesi üç alt sınıfa ayrılmıştır: (a) anti-apoptotik olanlar (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, A1 ve Mcl-1) (b) multidomain'li ve pro-apoptotik olanlar (Bax, Bak ve Bok) ve (c) Yalnızca BH3 domaine sahip pro-apoptotik olanlar (Bad, Bid, Bim, Bik, Dp5/Hrk, Noxa ve Puma).³¹

Kaspaz aktivasyon yolağı Şekil 3'de gösterilmiştir.³⁵ Tip I hücrelerde (SKW6.4, H9 gibi kaspaz 8'in hızla kesildiği hücre soyları), aktif kaspaz-8 doğrudan prokaspaz-3'ü aktive edilebilir.³⁴ Aktif kaspaz-3, daha sonra kaspaz aktivasyon kaskadını başlatabilir. Tip II hücrelerde (Jurkat ve CEM gibi kaspaz 8'in kesilmesinin geç olduğu hücre soyları), aktif kaspaz-8'in düzeyi az olduğunda yalnızca BH3 domain'e sahip bir BCL-2 üyesi olan Bid'i böler.³⁴ Ortaya çıkan 15 kDa'luk tBid'in (truncated Bid), dış mitokondriyal membran içine insersiyonu ve Bax ve/veya Bak ile oligomerizasyonu üzerinden sitokrom-c salınımını stimüle etmesiyle mitokondriyal yolak aktive olur. Sitoplazmada sitokrom-c apoptozom oluşumunu teşvik eder ve böylece kaspazı aktiveleştirir (Şekil 3-A).³⁵

Hüresel stresin (DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar, sitokin yokluğu) çeşitli şekilleri, Bax ve/veya Bak gibi hücre ölümünü teşvik eden Bcl-2 aile üyelerinin dış mitokondriyal membran insersiyonu ve oligomerizasyonu aracılığıyla mitokondriden sitokrom-c salınımını tetikleyebilir. Mitokondriden sitokrom-c salınımı, Bcl-2 aile üyeleri olan Bcl-2 ve Bcl-xL gibi apoptoz inhibitörleri tarafından inhibe edilir (Şekil 3-B).³⁵

B-hücreli malignitelerde, antiapoptotik BCL2 onkogeni önemli rol oynar. BCL2, B-KLL'de sürekli olarak eksprese edilmektedir.³⁶ B-lenfosit Bcl-2 ve Bax protein düzeylerinin B-KLL'de anlamlı olarak değiştiği ve hem tedavi edilmiş hem de tedavi edilmemiş hastalarda normal kontrollerle karşılaştırıldığında artmış Bcl-2/Bax oranları gözlemlendiği yukarıda da ifade edilmiştir.³³

Vucicevic ve ark.'nın araştırmasındaki hasta kohortunda, Bcl-2 ve Bax ekspresyon seviyeleri pozitif korelasyon göstermektedir. Bcl-2 ve Bax mRNA ekspresyon (Bcl 2/Bax oranı) oranı sağlıklı kontrollere göre KLL örneklerinde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bcl 2/Bax oranı ve LDT (lenfosit ikiye katlama süresi) arasında anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır.³⁰

E2F1: E2 transkripsiyon faktör 1

E2F1 geninin kodladığı protein, E2F transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. E2F ailesi, tümör supresör

protein mekanizmalarında ve hücre döngüsü kontrolünde önemli bir rol oynar.³⁷

E2F1, hücre döngüsü kontrolünde, bazen tümör supresör ve bazen de onkogen olarak fonksiyon göstermektedir. E2F1, kontrol noktası ve DNA hasarı yanıtına katılarak apoptozu indükler ve hücre döngüsü üzerinde transkripsiyonel kontrol sağlar.³⁸

Møller ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, düşük E2F1 ekspresyonu tedavi başarısızlığı ile ilişkili bulunmuştur. Lenfomada E2F1'in tümör baskılayıcı gen olarak rol oynadığı tespit edilmiştir. Düşük E2F1 ekspresyonu ve CDKN2A inaktivasyonu, lenfomada prognostik belirteç olarak rol oynamaktadır.³⁹

MCL1: Myeloid Hücre Lösemi 1

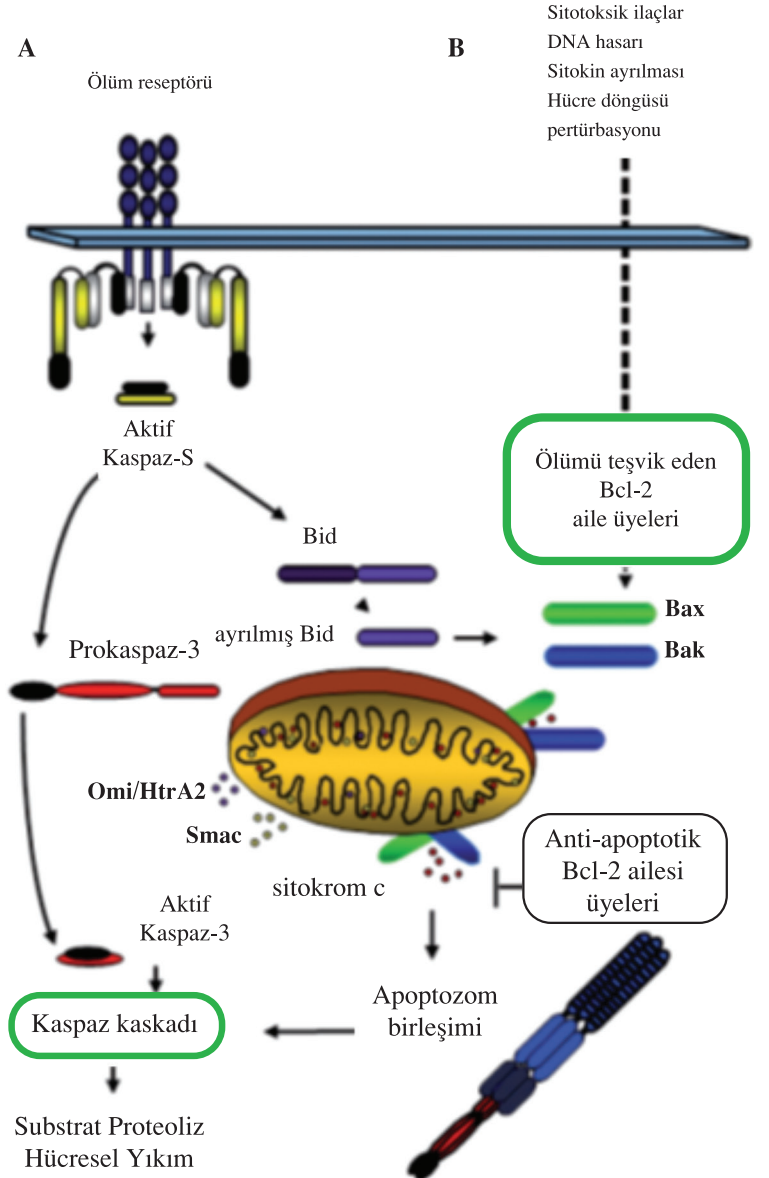
MCL-1, Bcl-2 gibi BCL-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerindedir ve bunların aşırı ekspresyonu B-KLL'de yaygın olarak saptanmaktadır. Düşük MCL-1 mRNA ekspresyonu, B-hücreli kronik lenfositik lösemide uzun süreli sağkalım ile ilişkilidir.³⁴

MCL-1'in yüksek seviyelerde ekspresyonu, tedaviye kötü yanıtla ilişkilidir. MCL-1 geninin RNA interferansı ile susturulmasının, B-KLL hücrelerinde apoptozu indüklediği bildirilmiştir ve MCL-1 geninin terapötik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.⁴⁰

Véronèse ve arkadaşları, B-KLL hastalarında, düşük MCL-1 mRNA ekspresyonunun, uzun süreli sağkalımla ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.⁴⁰

MCL-1 mRNA düzeyleri, IgV mutasyonel durumu, CD38 ekspresyonu, serum timidin kinaz ve β 2-mikroglobülin seviyeleri, lenfosit ikiye katlanma zamanı ve insan telomeraz ters transkriptaz mRNA ekspresyonu gibi B-KLL'nin bilinen biyolojik prognostik belirteçleri ve klinik evrelemeyle korelasyon göstermemiştir. Diğer yandan BCL-2 ve MCL-1 transkript düzeyleri arasında anlamlı korelasyon tespit edilmiştir. Düşük seviyelerdeki MCL-1 RNA ekspresyonunun, B-KLL'li hastaların tedavi sonrasında tam remisyona girebilmesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Progresyon riski düşük B-KLL hastalarında düşük MCL-1 ekspresyon seviyeleri tanımlanmış ve erken evre B-KLL'li olgularında yüksek tedaviye cevap verme olasılığı ile ilişkili bulunmuştur.⁴⁰

Johnston ve arkadaşları, KLL'de MCL-1'in rolünü değerlendirmişlerdir. Hastaların KLL hücrelerinde MCL-1 protein düzeyleri ölçülmüş ve bunun klinik değişkenler ve sağkalım ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, MCL-1 protein düzeyi ile



Şekil 3. Kaspaz aktivasyon yolağı

Salınan sitokrom-c apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (Apaf-1) bağlanır, böylece Apaf-1'in oligomerizasyonunu ve apoptozom oluşumunu indükler. (d)ATP'nin varlığında, başlatıcı prokaspaz-9, komplekse dahil edilir ve aktive edilir. Aktif kaspaz-9, hücre ölümüne neden olan kaspaz aracı bölünme tepkimelerine yol açan, kaspaz-3 ve -7'nin yürütücü kaspazlarının aktivasyonunu tetikler.

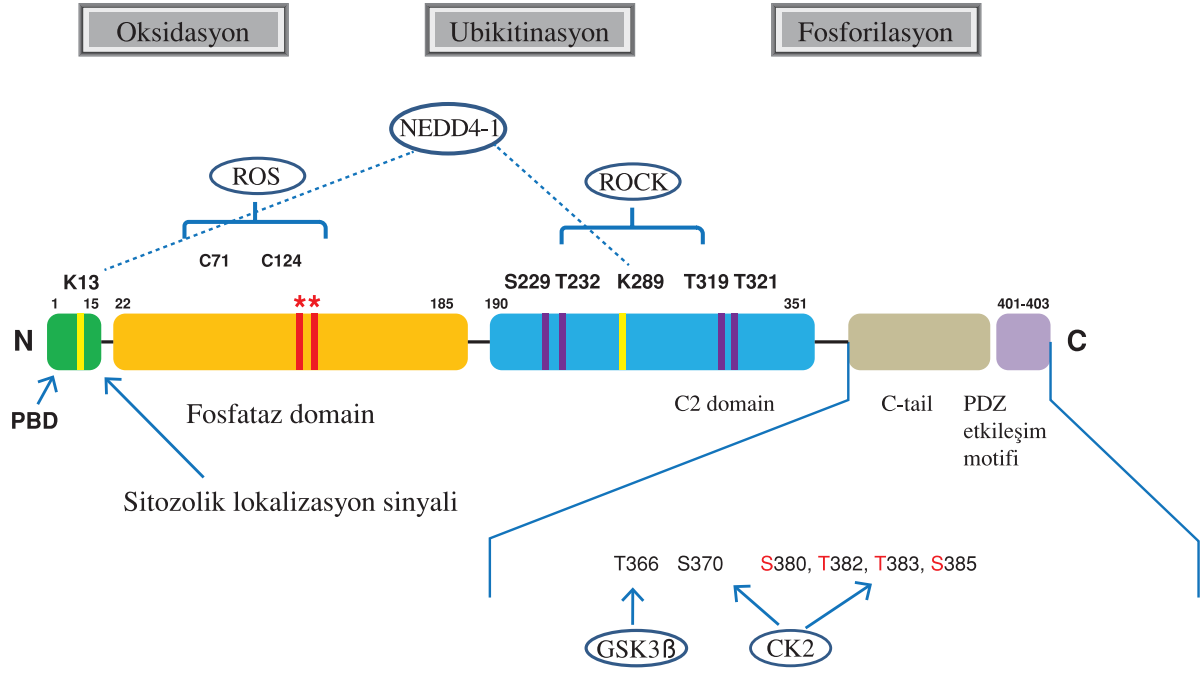
Rai evresi arasında negatif yönlü korelasyon tespit edilmiştir.⁴¹

MDM2: Mouse double minute 2 homolog

Hüresel bir fosfoprotein olan fare double minute-2 (MDM2) geninin ürünü p53 ile spesifik kompleksler oluşturmaktadır. MDM2 geni, NIH-3T3 fibroblast hücrelerinde klonlanmış ve tanımlanmıştır. MDM2 geni, transaktivatörlerde sıklıkla bulunan bir asidik domain içerir ve p53 geninde olduğu gibi evrimsel olarak korunmuştur.⁴²

İnsan MDM2 geni, kromozom 12q13-14'de lokalize olmuştur. MDM2 ürünü, fonksiyonel olarak p53'ün negatif düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır.

**KRONİK LENFOSİTİK
LÖSEMİDE p53
YOLAĞINDAKİ
GENLERİN HASTALIĞIN
PROGNOZUNA OLAN
ETKİSİ**



Şekil 4. PTEN geni ve protein yapıları

PTEN proteini, protein tirozin fosfataz ailesinin üyeleri içinde yüksek oranda korunan bir dizi motifini içerir. Yapısal olarak, PTEN proteini iki ana fonksiyonel domainden CKDD (alandan) (bir fosfataz domaini ve bir C2 domaini) ve üç yapısal bölgeden (kısa bir N-terminal fosfatidilinositol [4,5]-bisfosfat [PIP2] bağlayıcı domaininden, PDZ-etkileşim motifi ve prolin-glutamik asit-serin treanın dizilerini içeren C terminal kuyruk) oluşur.

MDM2 geni, p53'e bağlanan ve inaktif hale getiren bir hücrel fosfoprotein kodlamaktadır. MDM2'nin aşırı ekspresyonu, p53 geninin mutasyonel inaktivasyonunun getirdiği etkilere benzemektedir. Düşük dereceli lenfoma (%8-25) veya B-hücre kökenli kronik lenfositik lösemilerin bazılarında (%21-62) ve sarkomalı bir çok hastada kromozom 12 değişikliğe uğramış görünmektedir. MDM2 gen değişikliğinin ve aşırı ekspresyonunun B-hücreli lenfoproliferatif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.^{42,43}

MDM2'nin KLL'de CD8+ otolog T lenfositleri tarafından tümörle ilişkili bir antijen (TAA) olarak tanıdığı bildirilmiştir. Bu da artmış MDM2 ekspresyonundan KLL'de immünoterapi hedefi olarak yararlanılabileceğini akla getirmektedir.⁴⁴ MDM2, kronik lenfositik lösemi hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde normal B lenfositlerine göre aşırı miktarda eksprese olmaktadır. RT-PCR kullanarak, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında KLL vakalarının %85'inde MDM2'nin aşırı eksprese olduğu belirlenmiştir.⁴⁴

MDM4: Mouse double minute 4 homolog

MDM4 geni, p53 aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. MDM4'ün (S-MDM4) uç birleştirme varyantı, ekzon 6'nın delesyonuyla ortaya çıkmaktadır ve 68 bp'lik bir iç delesyonla sonuçlanmaktadır.⁴⁵ MDM4, MDM2'nin homoloğu olan bir proteindir ve o da MDM2 gibi p53'ün

transkripsiyonel aktivasyon bölgesine bağlanarak p53'ü inhibe etmektedir.⁴⁶ MDM4 ve MDM2, RING finger domainleri yoluyla kararlı heterodimerler oluştururlar. MDM4, MDM2'ye bağlanarak MDM2 otoubikitinasyonunu ve sonrasında degradasyonunu engeller. DNA hasarına yanıtta, MDM2, MDM4'ün ubikitinasyonunu ve degradasyonunu teşvik eder. MDM4'ün DNA hasarına bağlı degradasyonu fosforilasyonla düzenlenir ve in vivo tümör supresyonu ve p53 aracılı radyasyon yanıtlarında kritik önem taşır.⁴⁷

ATM ile aktive edilen bir kinaz olan CHK2, MDM4'de yer alan ek bölgeleri fosforilize ederek MDM4'ün 14-3-3 proteinleriyle olan ilişkisini kolaylaştırır. MDM2 tarafından ubikitinlenen MDM4 çekirdekte birikir. MDM4, CHK2 aracılığıyla fosforile olduğunda, deubikitinleyici bir enzim olan "herpes virüsü ilişkili ubikuitin-spesifik proteaz" (HAUSP)'ın MDM4 ile olan etkileşimi bozulur. Bu durum, MDM4'ün ubikitinasyonuna ve proteazomal degradasyona yol açar.⁴⁸

MDM4 geninin aşırı ekspresyonu, kötü prognozla ilişkilidir ve KLL'de potansiyel bir terapötik hedef olabileceği bildirilmiştir.⁴⁹ Liu ve ark. KLL'de MDM4 mRNA'sının ekspresyon düzeyini ve prognostik değerini araştırmayı amaçlamışlardır. Referans olarak β -aktin vasıtasıyla, RT-PCR ile MDM4 mRNA ekspresyon düzeyinin, P53 geni delesyonu olan hastalarda P53 geni delesyonu olmayan hastalardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş ve aynı zamanda P53 mutasyonu olan hastalarda

P53 mutasyonu olmayan hastalardakinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MDM4 ekspresyonunun, Binet evrelemesi ve ATM geninin delesyonuyla önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir. MDM4'ün, KLL'de önemli bir prognostik gösterge olduğu söylenebilir.⁵⁰

PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu

PTEN, sinyal fosfoproteinleri ve fosfatidilinositol ikinci habercilerinin defosforilasyonu ile hücre göçünü, büyümesini ve sağkalımını düzenler. Tümör supresör geni PTEN, hem protein substratlarına hem de lipid ikinci haberci olan fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata karşı enzimatik aktiviteye sahip bir fosfataz kodlar. PTEN proteini yapısal olarak, fosfolipid membranlara bağlanan C-terminal düzenleyici domain ve N-terminal çift spesifite fosfataz benzeri enzim domaininden oluşur.⁵¹

PTEN geni, kanserlerde en sık mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genlerden biridir. PTEN işlevinin kaybı, çeşitli kanser tiplerinde mutasyon, delesyon, transkripsiyonel susturma veya protein instabilitesi yoluyla meydana gelir. Kanserlerde PTEN eksikliği, kötü sağkalım, kemoterapi direnci ve ilerlemiş hastalıkla ilişkili bulunmuştur. PTEN fonksiyonunun bozulması, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) sinyalizasyonunu antogonize eder ve fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat birikimine neden olur. Böylece rapamisin'in memeli hedefi (mammalian Target of Rapamycin; mTOR) ve protein kinaz B (AKT) dahil olmak üzere PI3K yolağının downstream (aşağı akış) bileşenleri aktive olur. PTEN'in, lipid fosforilasyon aktivitesinin yanı sıra, hücre göçü, hücre yaşlanma, kök hücrenin kendini yenilemesi, DNA tamiri, genomik instabilitenin regülasyonunda kritik rolleri vardır.⁵²

PTEN proteini 403 amino asitten oluşur ve sonda yer alan bir PDZ etkileşim motifine, prolin-glutamik asit-serin-treonin dizilerini içeren C-terminal kuyruğuna, bir C2 ve fosfataz domainine (alanına), N-terminal PIP2 bağlayıcı domaine (PBD) sahiptir. PTEN'in fosfataz aktivitesini bozan fosfataz domainindeki mutasyonlar, C124S mutasyonu PTEN'in hem lipid hem de protein fosfataz aktivitesini, G129E mutasyonu ise PTEN'in sadece lipid fosfataz aktivitesini ortadan kaldırır. Kazein kinaz 2 (CK2) ve glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3β) tarafından fosforile C-terminal kuyruk rezidüleri Şekil 4'de gösterilmektedir.⁵²

S380, T382 ve T383 mutasyonları PTEN'i destabilize edebilir ve fosfataz aktivitesini artırır. PTEN'in ubiquitinasyonu K13 ve K289'da gerçekleşmektedir.⁵²

RBI: Retinoblastoma 1

Retinoblastoma, çocukluk çağına özgü malign bir intraoküler tümördür. Nadir görülen bir tümör türü olup, yeni doğan insidansı yaklaşık olarak 1/20.000 olarak belirtilmektedir.⁵³ Retinoblastoma, kalıtsal bir kanserdir. Hastalığın genetik ve epidemiyolojik analizi iki ayrı retinoblastoma sınıfı olduğunu göstermiştir. Sporadik retinoblastoma genellikle tek taraflı ve tek odaklıdır ve ortalama iki yaşında teşhis edilir. Bu sporadik vakaların da bir kısmı muhtemelen bir ebeveynden kalıtılan bir germ hücresi mutasyonuna bağlıdır ve bu nedenle kalıtsal olarak sınıflandırılır. Ailesel retinoblastoma genellikle 11 aydan daha erken yaşta teşhis edilir ve genellikle bilateral ve/veya multifokaldır.⁵⁴ Ailesel retinoblastoma RBI genindeki germline mutasyona, sporadik retinoblastoma ise gelişmekte olan retinada RBI genindeki somatik mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.⁵⁵

1971 yılında Knudson, retinoblastomanın temel genetik mekanizmasını açıklamak üzere "çift vuruş hipotezi"ni ortaya atmıştır.⁵⁶ Knudson, bilateral retinoblastomalı kişilerde dominant (Mendel) kalıtımda olduğu gibi, etkilenen çocukların oranının yaklaşık % 50'ye yaklaştığını ortaya koymuştur. Hastalığın dominant kalıtsal formunda, bir mutasyon germ hücreleri aracılığıyla kalıtılır; ikinci mutasyon ise retina hücrelerinde spontan olarak ortaya çıkar. Aksine, kalıtsal olmayan formunda, her iki mutasyon da somatik (retinal) hücrelerde ortaya çıkar. Retinoblastomanın, bir "tümör supresör geninin" her iki allelinin ardışık kaybına veya inaktivasyonuna bağlı kanser prototipini gösterdiği belirlenmiştir.⁵⁷

RBI, hücre bölünmesi, hücre stres yanıtları, farklılaşma, hücre yaşlanma ve programlanmış hücre ölümü gibi önemli bazı hücresel süreçlerde rol almaktadır. RBI kodlayıcı protein (pRb), hücre döngüsü regülatörü olarak bilinmektedir ve bu fonksiyonu, pRb aracılı tümör supresyonu için önemli etkiye sahiptir. E2F1 transkripsiyon faktörü, ilk tespit edilmiş hücresel pRb-bağlayıcı proteindir. Aktif, fosforile edilmemiş pRb formu tercihen E2F1'ye bağlıdır ve pRb/E2F1 kompleksinin bozulması, hücre döngüsünün deregülasyonuna neden olur. Rb1 proteini, E2F1-3 transkripsiyonel aktivatörlerine bağlanır. pRb, E2F1-3 ile kompleks oluşturduğunda, transkripsiyonu aktive etme yeteneklerini engellemektedir.⁵⁶

Hücre siklusunun düzenlenmesinde rol oynayan Rb proteini, fosforilasyon/defosforilasyon mekanizmasıyla fonksiyon göstermektedir. G0/G1 evresinde çoğunlukla tamamı fosforillenmemişken, S ve G2 evresinde

büyük ölçüde fosforillenmiştir. Fosforillenmemiş Rb, siklusun S fazına giriş ve DNA sentezi için gerekli olan E2F transkripsiyon faktörlerini baskılayarak hücre siklusunu durdurmaktadır. Hücre çoğalması için, geç G1 fazında hücre içi düzeyi artan cdk4 ve cdk6 siklin bağımlı kinazlar Rb proteinini fosforilleyerek S fazına girişi sağlamaktadırlar. Rb, hücre siklusunu G1 evresinde kontrol etmekte olup bu etkinin ortadan kalkması tümör oluşumuna yol açabilir.⁵⁸

KLL'de 13q14'deki hemizigot ve/veya homozigot kayıplar, olguların yarısından fazlasında ortaya çıkmaktadır ve KLL'de en sık görülen kromozom anomalisini oluşturmaktadır. 13q14 delesyonlarının KLL patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Delesyon boyutu, FISH analizinde saptanan tek değişiklik olarak prognostik önem taşır. RB1 geniyle ilişkili olmayan küçük delesyonlu hastalar, en iyi prognoza ve en uzun genel yaşam süresine sahiptir. RB1 genini içeren daha büyük delesyon bölgesine sahip hastalar, normal karyotipi olan hastalarda olduğu gibi orta prognoza sahiptir.⁵⁹

SONUÇ

KLL patogenezinde etkili olduğu belirtilen genlerdeki mutasyonların ya da ekspresyon değişikliklerinin hastalığın prognozu ile muhtemel ilişkisi mevcuttur.

TP53 yolağında yer alan sitogenetik aberasyon, mikroRNA, IGHV durumu vb. prognostik faktörler KLL'nin patogenezi ve prognozunda önemli role sahiptirler. 11q delesyonu, 13q delesyonu, 17p delesyonu ve trizomi 12 gibi sitogenetik anomaliler KLL'de en yaygın görülen anomaliler olup, KLL'de TP53 mutasyonunun 11q delesyonuyla güçlü bir ilişkili içinde olduğu bilinmektedir.⁶⁰ Bunlar arasında özellikle p53 mutasyonunun büyük prognostik önemi olduğu bilinmektedir. del (17p) yokluğunda da TP53 mutasyonlarının bulunduğu ve bu tür mutasyonların tek başına prognostik etkiye sahip oldukları yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir.⁶¹

Diğer yandan p53 yolağında yer alan P53, ATM, BAX, BCL2, E2F1, MCL1, MDM2, MDM4, PTEN ve RB1 genlerinin ekspresyon profillemeye çalışmalarından hastalığın moleküler patogenezinin ışık tutacak veriler elde edilmiştir. Böylelikle, KLL hastalarına daha etkin tedaviler sunulması, hastaların sağkalm sürelerinin uzatılması, hedefe yönelik yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve hastalığın prognozunun belirlenmesinde yeni göstergelerin saptanması mümkün olabilecektir.

*Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmiştir.

C	İLETİŞİM İÇİN: Gözde Öztan İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, 34093, İstanbul gozdeoztan@yahoo.com
✓	GÖNDERİLDİĞİ TARİH: 02 / 01 / 2018 • KABUL TARİHİ: 14 / 03 / 2018

KAYNAKLAR

1. Moreno C, Montserrat E. Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: what's ready for prime time use? *Haematologica* 2010; 95: 12-15.
2. Demir V, Kahraman S, Katgı A, et al. Kronik lenfositik lösemi hastalarının genel klinik değerlendirilmesi. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2012; 26: 9-19. Nisan 2012 <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/53540>.
3. Langerbeins P, Groß-Ophoff-Müller C, Herling CD. Risk-adapted therapy in early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Res Treat* 2016; 39: 18-24.
4. Hoffman R, Benz E, Silberstein L, et al. *Hematology: basic principles and practice*. Philadelphia, PA: Elsevier, Inc; 1991.
5. Amaya-Chanaga CI, Rassenti LZ. Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016; 29: 79-89.
6. Jones D. *Neoplastic hematopathology: experimental and clinical approaches*. Jones D. (eds.) Houston, TX: Humana Press 2010.
7. Dunphy CH. *Molecular pathology of hematolymphoid diseases*. Dunphy CH. (eds.) New York: Springer; 2010.
8. Bottoni A, Calin GA. MicroRNAs as main players in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Microna* 2013; 2: 158-164.
9. Zainuddin N. Molecular genetic analysis in B-cell lymphomas. A focus on the p53 pathway and p16^{INK4a}. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 525. 78 pp. Uppsala.2010. ISBN 978-91-554-7729-5.
10. Paydaş S. Kronik lenfositik lösemi (KLL), saçlı hücreli lösemi (SHL), Mantle hücreli lenfoma (MHL). Türk Hematoloji Derneği Klinisyen-Patolog Ortak Lenfoma Kursu: http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/kronik_lenfositik.pdf.
11. Guarini A, Marinelli M, Tavaloro S, et al. ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica* 2012; 97: 47-55.
12. Moshynska O, Sankaran K, Saxena A. Molecular detection of the G(-248)A BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Mol Pathol* 2003; 56: 205-209.
13. Majid A, Tsoulakis O, Walewska R, et al. BCL2 expression in chronic lymphocytic leukemia: lack of association with the BCL2 -938A>C promoter single nucleotide polymorphism. *Blood* 2008; 111: 874-877.
14. Moshynska O, Sankaran K, Pahwa P, Saxena A. Prognostic Significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *JNCI: J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 673-682.

15. Zou JZ, Fan L, Wang L, et al. miR-26a and miR-214 down-regulate expression of the PTEN gene in chronic lymphocytic leukemia, but not PTEN mutation or promoter methylation. *Oncotarget* 2015; 6: 1276-1285.
16. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic Abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: Where we are and where we go. *BioMed Research International* 2014; 13
17. Kamel MA, El-Sharkawy N, Zekri KZ, et al. The expression of p53 protein in chronic lymphocytic leukemia is associated with poor response to chemotherapy and short survival. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst* 2001; 13: 19-26.
18. Malcikova J, Smardova J, Pekova S, et al. Identification of somatic hypermutations in the TP53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Immunol* 2008; 45: 1525-1529.
19. Pekova S, Mazal O, Cmejla R, et al. A comprehensive study of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of 1287 diagnostic and 1148 follow-up CLL samples. *Leuk Res* 2011; 35: 889-898.
20. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 37-50.
21. 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: 70-74.
22. Guimaraes DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 2002; 84: 83-93.
23. Halina A, Artur P, Kotarska Barbara M, Joanna S, Anna D. Alterations in TP53, cyclin D2, c-Myc, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 expression associated with progression in B-CLL. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48: 534-541.
24. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009; 114: 5307-5314.
25. Secchiero P, Barbarotto E, Tiribelli M, et al. Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3 in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006; 107: 4122-4129.
26. Jones GG, Reaper PM, Pettitt AR, Sherrington PD. The ATR-p53 pathway is suppressed in noncycling normal and malignant lymphocytes. *Oncogene* 2004; 23: 1911-1921.
27. Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, et al. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* 2001; 98: 814-822.
28. Bullrich F, Rasio D, Kitada S, et al. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research* 1999; 59: 24-27.
29. Starostik P, Manshoury T, O'Brien S, et al. Deficiency of the ATM Protein Expression Defines an Aggressive Subgroup of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Research* 1998; 58: 4552-4557.
30. Vucicevic K, Jakovljevic V, Colovic N, et al. Association of Bax Expression and Bcl2/Bax Ratio with Clinical and Molecular Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Med Biochem* 2016; 35: 150-157.
31. Pawlowski J, Kraft SA. Bax-induced apoptotic cell death. *PNAS* 2000; 97: 529-531.
32. Vucicevic K, Jakovljevic V, Sretenovic, J et al. Expression of the Bcl2 gene in chronic lymphocytic leukaemia patients. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2015; 16: 187-191.
33. Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer*. 1997; 76: 935.
34. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* 1998; 17: 1675-1687.
35. Weyhenmeyer B, Murphy AC, Prehn JHM, Murphy BM. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol* 2012; 34: 192-199.
36. Korz C, Pscherer A, Benner A, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* 2002; 99: 4554-4561.
37. NCBI Gene. E2F1 E2F transcription factor 1. Gene ID: 1869, updated on 9-Mar-2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1869>.
38. Zachariadis M, Gorgoulis G. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. E2F1 (E2F transcription factor 1), 2008-12. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/E2F1ID40382ch20q11.html>
39. Møller MB, Kania PW, Ino Y. Frequent disruption of the RB1 pathway in diffuse large B cell lymphoma: prognostic significance of E2F-1 and p16INK4A. *Leukemia* 2000; 14: 898.
40. Veronese L, Tournilhae O, Verrelle P, et al. Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 1291-1294.
41. Johnston JB, Paul JT, Neufeld NJ, et al. Role of myeloid cell factor-1 (Mcl-1) in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* 2004; 45: 2017-2027.
42. Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A, et al. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 1994; 84: 3158-3165.
43. Watanabe T, Ichikawa A, Saito H, Hotta T. Overexpression of the MDM2 oncogene in leukemia and lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 1996; 21: 391-397.
44. Mayr C, Bund D, Schlee M, et al. MDM2 is recognized as a tumor-associated antigen in chronic lymphocytic leukemia by CD8+ autologous T lymphocytes. *Exp Hematol*. 2006; 34: 44-53.
45. Xu W, Liu L, Fan L, et al. A Splicing Variant of MDM4 Overexpression Plays an Indicator of p53 Aberrations and Marks a Potential Therapeutic Target in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 2012; 120: 4564.
46. Xiong S. Mouse models of Mdm2 and Mdm4 and their clinical implications. *Chin J Cancer*. 2013; 32: 371-375.
47. De Clercq S, Gembarska A, Denecker G, et al. Widespread overexpression of epitope-tagged Mdm4 does not accelerate tumor formation in vivo. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 5394-5405.
48. Perry ME. The Regulation of the p53-mediated Stress Response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a000968.
49. Liu L, Lei F, Cheng F, et al. S-MDM4 mRNA overexpression indicates a poor prognosis and marks a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer science* 2012; 103: 2056-2063.
50. Liu L, Fang C, Dong HJ, et al. mRNA levels detected by real-time quantitative RT-PCR in chronic lymphocytic leukemia and their clinical significance. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2011; 19: 1145-1149

51. Torres J, Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem*. 2001; 276: 993-998.
52. Wang X, Huang H, Young KH. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging (Albany NY)* 2015; 7: 1032.
53. Cassoux N, Lumbroso L, Levy-Gabriel C, et al. Retinoblastoma: update on current management. *Asia-Pac J Ophthalmol* 2017; 6: 290-295.
54. Goodrich DW, Lee WH. The molecular genetics of retinoblastoma. *Cancer Surv* 1990; 9: 529-554.
55. McEvoy JD, Dyer MA. Genetic and epigenetic discoveries in human retinoblastoma. *Crit Rev Oncog* 2015; 20: 217-225.
56. Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 2006; 25: 5233-5243.
57. Mastrangelo D, Hadjistilianou T, De Francesco S, Loré C. Retinoblastoma and the Genetic Theory of Cancer: An old paradigm trying to survive to the evidence. *Journal of Cancer Epidemiology* 2009; 5.
58. Cefle K. Parafin içinde saklanan malign melanom biyopsi örneklerinde P53 geninin DGGE ve dizi analizi; P16, Retinoblastoma ve CDK4 genlerinin FISH yöntemi ile incelenmesi. *Tıbbi Genetik Doktora Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genetik bölümü, 2002.*
59. Grygalewicz B, Woroniecka R, Rygier J, et al. Monoallelic and biallelic deletions of 13q14 in a group of 36 CLL patients investigated by CGH haematological cancer and SNP Array (8x60K). *Mol Cytogenet* 2016; 9: 1.
60. Wang C, Wang X. The role of TP53 network in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6: 1223-1229.
61. Trbusek M ve Malcikova J. TP53 Aberrations in chronic lymphocytic leukemia. Chapter 5. *Advances in chronic lymphocytic leukemia, Advances in experimental medicine and biology. Malek S. (eds.) New York: Springer; 2013.*