ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

149954

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ŞEKİLDE SAKLANAN DOKU ÖRNEKLERİNDE LENFOİD HÜCRE KLONALİTESİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Biyolog Yasemin ŞAHİN

194954

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Işınsu KUZU

ANKARA
2005

Prof. Dr. Işınsu KUZU danışmanlığında, Yasemin ŞAHİN tarafından hazırlanan bu çalışma 22/09/05 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Disiplinlerarası Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Selim Ertunç İmza :

Üye : Prof. Dr. Mihat Bozdoğan İmza :

Üye : Prof. Dr. Işınsu Kuzu İmza :

Üye : Doç. Dr. Mükerrem Soğuk İmza :

Üye : Doç. Dr. Mutlu Arat İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(imza)

Prof. Dr. Nejat AKAR
Enstitü Müdürü

Farklı Şekilde Saklanan Doku Örneklerinde Lenfoid Hücre Klonalitesinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

ÖZET

Rutin patoloji incelemelerinde farklı solüsyonlarla tesbit edilmiş, parafine gömülü arşiv materyalleri kullanılmaktadır. Şüpheli B lenfosit proliferasyonlarında reaktif-neoplastik ayırım için immünofenotipik incelemeler yetersiz kalabilmekte, bu durumda moleküler incelemelere gereksinim duyulmaktadır. Tanı amaçlı yapılan moleküler incelemelerde en sık PZR yöntemi tercih edilmektedir. İmmünoglobulin ağır zincir (IgH) genlerinin klonal olduğunun gösterilmesi tanısal yaklaşım için kullanılmaktadır. Bu çalışmada, klonal olduğundan emin olunulan çeşitli B hücreli lenfoma olgularında, multipleks PZR ve heteroduplex analiz yöntemi kullanılarak tesbit solusyonlarının, DNA kalitesi, miktarı ve saflığının, blok yaşının klonalite saptanmasına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla 59 B hücreli lenfoma hastasına ait biyopsi materyallerinden elde edilen DNA örnekleri incelenmiştir. Bu materyallerin 42'si formalin, 7'si AFA, 6'sı Holland, solusyonuyla tesbit edilmiş, 4'ü tesbit solüsyonu bilinmeyen konsültasyon hastasına aittir. Materyallerin 11'i 2005, 24'ü 2004, 12'si 2003, 6'sı 2002, 6'sı 2001 yılına ait parafin bloklardır.

BIOMED-2 kontrol primerleri kullanılarak yapılan multipleks PZR sonucunda, formalinle tesbit edilmiş hasta materyallerin %92.8'inden, AFA ile tesbit edilmiş materyallerin %100'ünden, holland ile tesbit edilmiş materyallerin %16.7'sinden olmak üzere tüm doku materyallerinin %84.8'inden iyi kalitede (≤400 bç) DNA molekülü elde edilmiştir. DNA örnekleri standart kit ile izole edildiğinden saflığın klonalitenin saptanmasında etkili olmadığı görülmüştür. Ancak, DNA miktarı ve kalitesi arttıkça klonalitenin saptanma oranının arttığı görülmüştür. BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 IgH (VH-JH) ve IgH (DH-JH) primerleri ile yapılan multipleks PZR ve heteroduplex analiz sonrasında, çalışılan B hücreli lenfomaların %81.4'ünde klonalite saptanmıştır. Formalinle tesbit edilmiş B hücreli lenfoma olgularında %90.5 oranında ve AFA ile tesbit edilmiş olgularda %100 oranında klonalite saptanırken, holland ile tesbit edilmiş olan B hücreli lenfoma olgularında klonalite saptanamamıştır. DNA iyi kalitede olmasına rağmen PZR analizi başarısız olan 4 (%8) olgu saptanmıştır. Bunlar klonal olması beklenen DBBHL, HCL, BL, FL şeklindeki farklı lenfoma tiplerine aittir.

Sonuç olarak, kullanılan multipleks PZR ve heteroduplex analiz yöntemi rutin patoloji laboratuvarlarında, şüpheli lenfoproliferatif olgulara tanı koymada yüksek duyarlılıkta ve güvenilirliktedir. Tesbit solüsyonlarının DNA kalitesi üzerine ve dolayısıyla da B hücreli lenfoma olgularında klonalite saptanması üzerine etkisi olmaktadır. Tesbit solüsyonları arasında en iyi sonuç sırasıyla AFA ve formalin ile elde edilmiştir. Holland solüsyonun moleküler analizlerde kullanılmaması gerekir. Beş yıllık periyodun bloklarda DNA kalitesine etkisi bulunmamaktadır. Parafine gömülü doku örnekleri kullanıldığında klonalite amaçlı PZR çalışılmadan önce tanımlanmış kontrol primerleri kullanılarak multipleks PZR ile DNA kalitesinin ölçülmesi gerekir.

Anahtar Kelimeler: B Hücre Klonalitesi, Heteroduplex Analiz, Multipleks PZR

The detection of the B lymphoid cell clonality with molecular methods on paraffin embedded materials fixed in different solutions

Summary

Paraffin embedded tissue samples are used for routine pathology practice. Routine histopathology and immunohistochemistry methods may not be enough to differentiate benign reactive proliferations and suspicuous neoplastic lymphoid proliferations.

In this occasion molecular methods are essential for differentiation. PCR is the most preferred molecular method for this purpose. Clonality of Ig heavy chain genes is used for diagnostic purposes in these occasions. In this study we used B-cell lymphoma cases which we know clonal Ig heavy chain gene rearrangements. We used multiplex PCR method with heteroduplex analysis. The effect of fixation solution type and block age on DNA quality, quantity and purity were analysed first at the beginning of the study.

The DNA samples obtained from paraffin embedded blocks of 59 B-cell lymphoma cases. 42 of them were fixed in formaline, 7 in AFA, 6 in Holland solutions. Four cases have consultation blocks where the fixation status was unknown. 11 blocks were less than one year old, 24 were one year old, 12 were two years old, 6 were three and 6 were four years old.

BIOMED-2 conrol primers were used for DNA quality PCR analysis. All the samples from AFA fixed tissues have high quality ($\leq$400 bp) DNA. However 92.8% of the formalin-fixed samples, 16.7% of Holland-fixed samples have high quality DNA. The success in determination of clonality results increased with the increase in DNA quantity and quality. Multiplex PCR method with heteroduplex analysis with BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 IgH (VH-JH) ve IgH (DH-JH) primers was performed.

81,4% of B-cell lymhomas were found clonal with this method. The clonality was detected in 90.5% of formalin-fixed cases and 100% of AFA-fixed cases whereas no success was seen in Holland-fixed cases. Four cases (8%) were failed to give clonality results although they have good quality DNA. These cases were diagnosed as DLBCL, HCL, BL, FL.

In conclusion, multiplex PCR method with heteroduplex analysis can reliably be used for the differentiation of suspicious lymphoid proliferations. This method is highly sensitive and specific. The most important point for the success of the method on paraffin embedded material is the fixative and the fixation status. AFA and formalin are suitable solutions for this purpose whereas Holland solution is not recommended. The block age up to five years does not seem to effect the DNA quality and the success of clonality analysis. Checking the quality of DNA samples before clonality analysis is essential for interpretation of the negative results.

Key Words: B-Cell Clonality, Heteroduplex Analysis, Multiplex PCR

TEŞEKKÜR

Farklı şekilde saklanan doku örneklerinde lenfoid hücre klonalitesinin multipleks PZR yöntemiyle belirlenmesini hedefleyen bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüş ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından 20.01.2004 tarihli 145.no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Bana araştırma olanağı sağlayan ve çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileriyle beni yönlendiren danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Işınsı KUZU (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı)'ya, yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Mithat BOZDAYI (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hepatoloji Enstitüsü)'ya, Sayın Biyolog Özlem ERKAN ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hepatoloji Enstitüsü laboratuvar çalışanlarına, Sayın Uzm. Dr. Fikret ŞAHİN (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)'e, Sayın Prof. Dr. Ongun ONARAN (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı)'a ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi çalışanlarına, Sayın Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU ve araştırma görevlisi Mehmet TAŞPINAR (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)'a ve sonsuz desteklerinden dolayı aileme teşekkürlerimi sunarım.

Yasemin ŞAHİN
Ankara, Eylül 2005

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....-
ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
TEŞEKKÜR.....iii
İÇİNDEKİLER.....iv
SİMGELER DİZİNİ.....v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....vii
1. GİRİŞ.....1
2. KURAMSAL TEMELLER.....4
2.1. Lenfositler.....4
2.1.1. B lenfositler.....4
2.1.2. B lenfosit maturasyonu (olgunlaşma).....5
2.1.3. B lenfosit immünoglobulin antijen reseptör molekülü.....7
2.1.3.1. Ig molekülünün yapısı.....7
2.1.3.2. Ig genlerinin germline organizasyonu.....8
2.1.3.3. Ig genlerinin rekombinasyonu ve ekspresyonu.....10
2.1.4. Ig moleküllerinin çeşitliliği ve oluşma mekanizmaları.....13
2.2. Lenfoma.....13
2.2.1. B hücreli lenfomalar (BHL).....13
2.3. B hücre klonalitesinin saptanması.....14
2.4. Kullanılan materyal ve DNA kalitesi.....16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....17
3.1. Materyal.....17
3.1.1. Çalışma materyali.....17
3.1.2. DNA izolasyon kiti.....18
3.1.3. Primerler.....18
3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan malzemeler.....21
3.1.5. Kimyasallar.....21
3.1.6. Marker.....21
3.1.7. Standart çözeltiler ve tamponlar.....22
3.1.8. Tespit solüsyonları ve içerikleri.....23
3.2. Yöntem.....23
3.2.1. DNA izolasyonu.....23
3.2.2. Spektrofotometrik ölçüm.....24
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....24
3.2.4. Heterodupleks analiz (HD Analiz).....25
3.2.5. Ajaroz jel elektroforezi.....25
3.2.6. Poliakrilamid jel elektroforozi (PAGE).....25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....26
4.1. DNA kalitesi.....26
4.2. B hücre klonalitesinin saptanması.....29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....37
KAYNAKLAR.....42
ÖZGEÇMİŞ.....45

SİMGELER DİZİNİ

AFA	Alkol Formalin Asetik Asit
APC	Antijen Sunan Hücre (Antigen Presenting Cell)
APS	Amonyum Persülfat
Bç	Baz Çifti
BL	Burkitt Lenfoma
C	Sabit (Constant)
CD 9	Başkalaşma Topluluğu (Cluster of Differantiation) 9
CD 10	Başkalaşma Topluluğu (Cluster of Differantiation) 10
CD 19	Başkalaşma Topluluğu (Cluster of Differantiation) 19
CD 20	Başkalaşma Topluluğu (Cluster of Differantiation) 20
CD 22	Başkalaşma Topluluğu (Cluster of Differantiation) 22
C 3b	Kompleman 3b
C 3d	Kompleman 3d
CR1	Kompleman Reseptörü 1
CR2	Kompleman Reseptörü 2
CDR1	Komplementer Tanıma Bölgesi (Complementary Determining Regions) 1
CDR2	Komplementer Tanıma Bölgesi (Complementary Determining Regions) 2
CDR3	Komplementer Tanıma Bölgesi (Complementary Determining Regions) 3
CLL	Kronik Lenfositik Lösemi
D	Çeşitlilik (Diversity)
DLBCL	Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
DGGE	Denatüre Edici Dereceli Jel Elektroforezi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dH2O	Distile su
EBV	Eiptein Barr Virüs
EtOH	Etil Alkol
FL	Foliküler Lenfoma
FR1	Framework 1
FR2	Framework 2
HCL	Hairy Cell Lösemi
HD	Heterodupleks Analiz
IgA	İmmünoglobulin A
IgD	İmmünoglobulin D
IgE	İmmünoglobulin E
IgG	İmmünoglobulin G
IgH	İmmünoglobulin Ağır zincir
IgK	İmmünoglobulin Kappa hafif zincir
Igλ	İmmünoglobulin Lambda hafif zincir
IgM	İmmünoglobulin M
Igα	İmmünoglobulin α
Igβ	İmmünoglobulin β
MCL	Mantle Cell Lenfoma
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
MHC II	Doku Uygunluk Molekülü Sınıf II (Major Histocompatibilty Class II)
mRNA	Mesajcı RNA
MZL	Marjinal Zon Lenfoma
NBF	Tamponlanmamış Formalin (Non-Buffered Formalin)
NK	Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer Cell)
Nt	Nükleotid
PETs	Parafine Gömülü Dokular (Parafin-Embedded Tissues)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SB	Southern Blot
SSCP	Tek- İplik Konformasyon Polimorfizmi (Single-Strand Conformation Polymorphism)
RSS	Rekombinasyon Sinyal Sekansı (Recombination Signal Sequence)
SLL	Küçük Lenfositik Lenfoma
TBE	Tris Borik Asit EDTA
TGGE	Sıcaklık Dereceli Jel Elektroforezi (Temperature Gradient Gel Electrophoresis
V	Değişken (Variable)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Olgun B lenfosit yüzey molekülleri.....5
Şekil 2.2. İmmünoglobulin molekülünün yapısı 7
Şekil 2.3. Ig lokusunun germline yerleşimi.....9
Şekil 2.4. Ig ağır zincir gen rekombinasyonu ve ekspresyonu 12
Şekil 3.1. IgH (VH-JH) primerleri ve yerleşimleri.....19
Şekil 3.2. IgH (DH-JH) primerleri ve yerleşimleri.....20
Şekil 3.3. Kontrol primerleri ve yerleşim yerleri.....20
Şekil 3.4. 50 bç DNA markerının bant açılımının gösterimi.....22
Şekil 4.1. Kontrol gen PZR reaksiyon sonuçlarının agaroz jelde gösterimi 1.....26
Şekil 4.2. Kontrol gen PZR reaksiyon sonuçlarının agaroz jelde gösterimi 2. 27
Şekil 4.3. Çalışılan hastaların IgH (VH-JH) ve (DH-JH) düzenlenmelerinin multipleks PZR analiz, HD analiz ve PAGE incelemesi sonrasındaki her bir tüp için (A,B,C,D ve E) ayrı ayrı jel görüntüleri.....32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. B lenfosit maturasyonu ve Ig gen düzenlenmeleri.....6
Çizelge 2.2. Tespit solüsyon tiplerine göre nükleik asit korunumu.....16
Çizelge 3.1. Çalışılan olgular ve sayısal dağılımları.....17
Çizelge 3.2. B hücreli lenfoma materyallerinin lenfoma tipleri ve tespit solüsyonlarına göre sayısal dağılımları.....17
Çizelge 3.3. B hücreli lenfoma materyallerinin lenfoma tipleri ve bloklama yıllarına göre sayısal dağılımları.....18
Çizelge 3.4. B hücreli lenfoma materyallerinin bloklama yılları ve tespit solüsyonlarına göre dağılımları.....18
Çizelge 3.5. IgH (VH-JH) primer dizileri.....19
Çizelge 3.6. IgH (DH-JH) primer dizileri.....20
Çizelge 3.7. Kontrol primerleri.....21
Çizelge 3.8. PZR döngü koşulları.....24
Çizelge 3.9. %6 denatüre edici olmayan poliakrilamid jel içeriği (100 ml).....25
Çizelge 4.1. Tespit solüsyonlarına göre biyopsi materyallerinden elde edilen DNA örneklerinin uzunluk dağılımları ve klonalitenin saptanma oranlarına göre yüzdeleri.....28
Çizelge 4.2. Çalışılan materyallerin bloklama yıllarına göre biyopsi materyallerinden elde edilen DNA örneklerinin uzunluk dağılımları ve klonalitenin saptanma oranlarına göre yüzdeleri.....28
Çizelge 4.3. Multipleks PZR analizi sonrasında elde edilen PZR ürünlerinin beklenen bant uzunlukları aralıkları.....29
Çizelge 4.4. Çalışılan primer setleri ve B hücreli lenfoma tiplerine göre klonalitenin saptanma oranları.....33
Çizelge 4.5. B hücreli lenfoma tiplerine göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları.....33
Çizelge 4.6. B hücreli lenfoma tiplerine ve tespit solüsyonlarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları.....34
Çizelge 4.7. Tespit solüsyonlarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları.....34
Çizelge 4.8. Bloklama yıllarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımı ve başarı oranları.....35
Çizelge 4.9. B hücre klonalitesinin saptanma oranlarının bloklama yıllarına ve tespit solüsyonlarına göre dağılımları ve başarı oranları.....35

1.GİRİŞ

Lenfomalar, lenfoid hücreden köken alarak, klonal çoğalma gösteren neoplazilerdir. Normal lenfoid hücre gelişiminin, çeşitli aşamalarındaki B ve T lenfositlerinden gelişirler (Medeiros ve Carr 1999). Lenfoid hücre tümörlerinin büyük çoğunluğu (%90-95) B lenfosit kökenlidir. Batı toplumlarında çok az bir kısmı da T lenfosit (%5-7) ya da doğal öldürücü (Natural Killer, NK) (<%2) lenfosit nesillerinden gelişir (van Dongen vd 1991, Jaffe vd 2001). T-NK hücreli lenfomalar daha çok uzak doğuda görülmektedir.

Lenfoid hücre tümörlerinin büyük çoğunluğu (>%98) klonal olarak düzenlenmiş, immmünoglobulin (Ig) genlerini içerirken, %25-30'u da, kromozom translokasyonlarını içerirler. Ig genleri ve kromozom translokasyonları, klonalite çalışmalarında belirleyici olarak kullanılırlar (van Dongen vd 1991, Jaffe vd 2001). Kromozom translokasyonlarını içeren B hücreli tümörlerin görülme sıklığı az olduğu için çoğunlukla, Ig gen düzenlenmelerinden belirleyici olarak yararlanılmaktadır (Voena vd 1997).

Klonal olarak düzenlenmiş Ig genlerini içeren olgun lenfoid hücre tümörleri, immünohistoloji ya da flow sitometrik immünofenotipleme (akım sitometrik immünofenotipleme) gibi yöntemlerle, protein seviyesinde belirlenebilirler. Ig molekülüne karşı oluşturulmuş spesifik antikorların kullanımı ile gerçekleştirilen bu yöntemlerde lenfoid hücre proliferasyonlarının belirlenmesi, hafif zincir molekülünün ekspresyonunun belirlenmesi ilkesine dayanır. İmmünoglobulin kappa (IgK) hafif zincir molekülünü eksprese eden B hücrelerinin, immünoglobulin lambda (Igλ) hafif zincir molekülünü eksprese eden B hücrelerine oranı, lenfoid proliferasyonun klonal olup olmadığını gösterir. Klonal lenfoid proliferasyonlarda, IgK molekülünün Igλ molekülüne oranı 4.0'den büyük ya da 0.5'den küçüktür (IgK/Igλ oranı: >4.0 ya da <0.5). Poliklonal (reaktif) lenfoproliferasyonlarda, IgK molekülünün Igλ molekülüne oranı 0.7-2.8 arasında bir değerdir (normal IgK/IgL oranı: 0.7-2.8) (Smith vd 1984, Letwin vd 1990, Fukishima vd 1996). İmmünohistokimyasal ya da flow sitometrik immünofenotipleme gibi yöntemlerle kesin tanı konulamayan (%5-10) lenfoproliferatif düzensizliklerde ek olarak Southern Blot (SB) veya PZR analiz yöntemleri uygulanır. SB ve PZR analiz yöntemleri, Ig gen düzenlenmelerinin moleküler düzeyde direkt olarak incelenmesine olanak sağlarlar (van Dongen vd 2003).

Uzun yılardır, bir çok çalışmada gold standart olarak kullanılan SB analiz yöntemi, karşılaşılan bazı dezavantajlar nedeniyle, günümüzde yerini PZR analiz yöntemine bırakmıştır. SB analiz yönteminde karşılaşılan dezavantajlar; duyarlılığının düşük olması (%5-10), fazla miktarda, yüksek kalitede DNA örneğine gereksinim duyması (10-20 μg) ve çok fazla emek ve zaman gerektirmesidir (van Dongen vd 1991, Medeiros ve Carr 1999).

SB analiz yöntemi, fazla miktarda, yüksek kalitede DNA örneğine ihtiyaç duyduğu için, taze doku ya da kan örneklerinden elde edilen DNA örnekleriyle çalışılması gerekir. Ancak birçok Avrupa ülkesinde olduğu gibi tüm dünyada da moleküler çalışmalarda kullanılmak amacıyla, taze dokuların sağlanması çok zordur. Taze doku kullanımının gerekliliği, klonalite çalışmalarında SB analiz yönteminin kullanılabilmesinde bir engel teşkil etmektedir (van Dongen vd 2003). Rutin histopatoloji laboratuvarlarında, özel bazı koşullar gerektirmediğinden ve çok daha pratik olduğundan, parafin blokların kullanılımı tercih edilmektedir. Rutin histopatoloji laboratuvarlarında, doku örnekleri, parafinle bloklama aşaması öncesinde çeşitli tesbit solüsyonlarıyla tespit edilmektedirler. Rutinde tesbit solusyonu olarak en sık kullanılan solüsyon %4 lük formaldehid soluyonudur. Bunun dışında lenfoid dokuda morfolojiyi iyi koruduğu bilinen diğer alternatif tesbit solusyonları da kullanılmaktadır (Hollande, AFA, Bouin, B5) (Doğan vd 2004). Örneğin Fransa'da Bouin solusyonu rutin olarak kullanılmaktadır. Tesbit solusyonları DNA molekülünde kırıklar meydana getirdikleri için, tespit solüsyonu ile tespit edilmiş dokulardan izole edilen DNA örneklerinin kalitesi düşük kaliteli olmaktadır. DNA kalitesinde, tespit solüsyonun tipi, miktarı, doku örneğinin solüsyonda bekleme süresi ve parafine gömüldükten sonra geçen süre (blok yaşı) etkili olmaktadır (van Dongen vd 2003). Parafine gömülü doku örnekleriyle yapılan moleküler çalışmalarda bazı güçlüklerle karşılaşıldığından bu doku örnekleriyle çalışmak zordur. Parafine gömülü biyopsi materyalleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, DNA miktarının ve kalitesinin belirlemesi gerekmektedir. DNA miktarının ve kalitesinin belirlemesi için kontrol primerleri kullanılır. Kontrol primerleri, genomik DNA'da devamlı olarak eksprese edilen genleri (housekeeping genler) çoğaltan primerlerdir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, genellikle, β-globin ve β-actin genleri kontrol olarak kullanılmıştır (Heler vd 1991, Meier vd 2001). Van Dongen ve arkadaşları, 2003

yılında yaptıkları çok kapsamlı çalışmada, DNA kalitesini ve parçalanma oranını belirlemek amacıyla, farklı uzunluklardaki genomik DNA ekzon bölgelerini çoğaltan primer seti tasarlamışlardır.

1990'lı yıllardan itibaren Ig gen düzenlenmeleri için düz PZR, nested-PZR yapılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda, variable (değişken, V), diversity (çeşitlilik, D) ve joining (birleşim, J) gen segmentlerinin bir araya getirilmesiyle oluşan gen düzenlenmelerinin, framework 2 ve/veya 3 (uygulama çerçevesi, FR2, FR3) bölgelerini çoğaltan, konsensus primer dizileri kullanlmıştır (Diss vd 1994, Lozano vd 1996, Chuang vd 2003, Amara vd 2005). Konsensus primerlerinin aynı etkinlikte bütün V gen segmentlerini çoğaltabilme özelliği yoktur. Bu yüzden bu primerlerin kullanıldığı çalışmalarda başarı oranı düşüktür.

PZR yöntemi, yüksek duyarlılığa sahip (%1-5, düzenlenmelerin bazı tiplerinde <%1) hızlı ve basit bir yöntemdir. PZR yöntemiyle klonalite belirlemelerinde, az miktarda düşük kaliteli DNA örnekleri ile çalışılabildiği için, düşük kalitede az miktarda DNA molekülünün izole edilebildiği parafine gömülü biyopsi materyalleri ya da düşük miktarlı DNA molekülünün izole edilebildiği iğne biyopsileri ile çalışılabilmektedir (van Dongen vd 2003). Bu özelliği ile PZR yöntemi SB analiz yöntemine üstünlük sağlar. PZR yöntemi hızlı ve duyarlı bir yöntem olmasına rağmen, klonalite çalışmalarında, önemli bazı güçlüklerle karşılaşılır. Bunlardan birincisi yanlış- negatif sonuç, ikincisi ise yanlış–pozitif sonuçtur (Garcia-Sanz vd 1999, Gonzalez vd 1999, van Dongen vd 2003).

PZR analiz yönteminde görülen yanlış-negatif sonuçlar, primerlerin yanlış gen bölgelerine bağlanmalarından ya da hedef gen bölgelerine bağlanamamalarından kaynaklanır (Macintyre ve Delabesse 1999, Medeiros ve Carr 1999, van Dongen vd 2003). Primerlerin bağlanamaması, germinal ve postgerminal B hücre tümörlerindeki Ig genlerinde oluşan somatik mutasyonlardan kaynaklanabileceği gibi, gen düzenlenmesine katılan tüm gen segmentlerine uygun primerlerin kullanılmamasından da kaynaklanabilir. V, D ve J gen segmentlerinin çoklu gen kopyalarından herhangi birinin, bir araya getirilmesiyle oluşturulan VDJ düzenlenmelerinin belirlenebilmesi için, düzenlenmeye katılabilecek gen kopyalarının çoğunu veya hepsini spesifik olarak tanıyıp bağlanabilen, çoklu primer setlerinin kullanılması gerekir. Somatik mutasyonlardan kaynaklı yanlış-negatif sonuçların ortadan kaldırılması için de farklı Ig lokus (Ig ağır , kappa ve lambda hafif zincir lokusu) genlerini tanıyıp çoğaltabilen primer setleri kullanılmalıdır (van Dongen vd 2003). Yanlış-negatif sonuç sorununu ortadan kaldırmak için van Dongen ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları kapsamlı çalışmada, üç ayrı zincir gen lokusunun her biri için, farklı aile gruplarının bütün üyelerini spesifik olarak çoğaltabilecek aile primer setlerini tasarlamışlardır.

PZR analiz yönteminde görülen ikinci önemli sorun, reaktif (poliklonal) B lenfosit Ig gen düzenlenmelerinin çoğaltılmasıyla oluşan, arka zemin kirlenmesinden kaynaklı, yanlış-pozitif sonuçlardır. Monoklonal PZR ürünlerini poliklonal PZR ürünlerinden ayırtedebilmek için, PZR sonrası, bazı analizlerin yapılması gerekmektedir. PZR sonrası analizler: PZR ürününün direkt analizi (Kneba vd 1995), tek-iplik konformasyon polimorfizmi (single-strand conformation polymorphism, SSCP) (Davis vd 1993), denatüre edici dereceli jel elektroforezi (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) (Bourguin vd 1990, Grenier vd 1995) sıcaklık dereceli jel elektroforezi (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) (Linke vd 1995), gen tarama (gene scanning) (Kneba vd 1995, Landman-Parker vd 1996, Linke vd 1997) ve heterodupleks analiz (HD) (Bottaro vd 1994, Langerak vd 1997) yöntemleridir. van Dongen ve arkadaşları, standart PZR protokolü oluşturdukları ve çoklu primerleri tasarladıkları çalışmalarında, gen tarama ve heterodupleks analiz yöntemini birlikte kullanmışlardır. Yapılan çoğu çalışmada ise basit, hızlı ve ucuz olması nedeniyle heterodupleks analiz yönteminin kullanımı tercih edilmiştir. Basit, hızlı ve ucuz bir yöntem olan heterodupleks analizinin, standardizasyonunun sağlanması (Langerak vd 1997) ve duyarlılığının araştırılması (Garcia-Sanz vd 1999) için bir dönem yoğun çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarla, monoklonal düzenlenmeleri, poliklonal düzenlenmelerden en etkili biçimde ayırarak doğru sonuç eldesini sağlayan HD analizi ve sonrası yöntem protokolleri yayınlanmıştır.

Yukarıda da değinildiği gibi klonalite çalışmalarında, taze doku biyopsilerinin elde edilme sorunlarından dolayı, parafine gömülü biyopsi materyallerinde güvenilir ve az hatalı olabilecek en uygun PZR yönteminin çalışılması gerekmektedir. Parafine gömülü doku örneklerinde, tesbit işlemi sırasında tespit solüsyonuna bağlı olarak yeterli miktarda, uygun kalitede DNA elde edilememesinden kaynaklanan yanlış sonuçların araştırılması ve uygun tesbit ve saklama koşullarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı tespit

solüsyonları ile tespit edilmiş örnekler ve farklı sürelerde arşivde beklemiş örnekler çalışılmıştır. Ayrıca Ig gen çeşitliliğinden ortaya çıkan yanlış pozitif ve negatif sonuçların engellenebilmesi için multipleks PZR yöntemi ve heterodupleks analiz yönteminin kullanılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Lenfositler

Lenfositler, farklı antijenleri spesifik olarak tanıyarak, immün yanıt olşturabilen, immün sistem hücreleridir (Abbas vd 2000). Lenfositler, kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerinden köken alırlar. Primer (merkez) lenfoid organlarda (timus ve erişkin kemik iliği) gelişimlerini tamamlayarak, periferal sirkülasyonla sekonder lenfoid organlara (dalak, lenf nodülleri, tonsil ve kapsülsüz lenfoid dokular) taşınırlar. (Roitt vd 2001). Lenf dokularındaki hücrelerin %99'unu lenfositler oluşturur (Tünger vd 1998).

Lenfositler, yüzeylerinde farklı tipte ve miktarda yüzey molekülleri eksprese ederler. Bu yüzey moleküllerinin bazıları, hücre farklılaşmasının belirli safhalarında eksprese edilirken bazıları da kısa süreleri olarak aktifleştirildikten sonra da inaktifleştirilirler. Lenfositlerin yüzeylerinde bulunan bu yüzey moleküllerinin bazıları da, farklı hücre nesillerine spesifik olarak eksprese edilirler. Hücre tipleri için karakteristik olan bu yüzey molekülleri farklı hücre populasyonlarını birbirinden ayırmada etkili olurlar. (Roitt vd 2001). Lenfositler yüzeylerindeki bu bileşenlere ve işlevlerine göre kabaca üç guruba ayrılırlar.

a. B Lenfositler
b. T Lenfositler
c. Doğal Öldürücü Lenfositler (Natural Killer Cells, NK hücreleri)
(Tünger vd 1998).

2.1.1. B Lenfositler

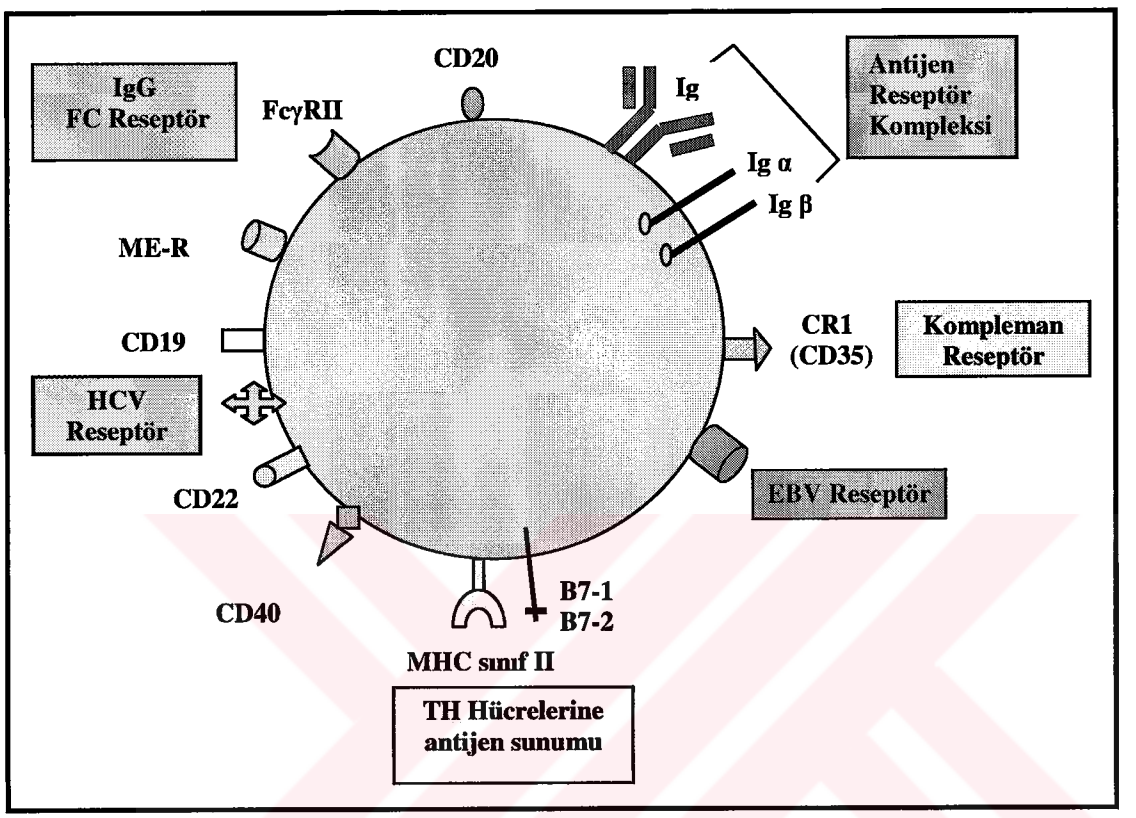
Antikor üretme yeteneğine sahip, hümoral bağışıktan sorumlu immün sistem hücreleridir. İmmün sistemde adaptif bağışıklıkta görev yaparlar. Vücuda giren antijenlere karşı spesifik immün yanıt oluşturarak, vücuttan elemine edilmelerini sağlarlar. Dolaşımdaki lenfositlerin %5–15 'ini oluştururlar. Normal yaşam süreleri 4-8 hafta arasında değişir. B lenfositler fetal karaciğerde, daha sonra da kemik iliğinde gelişirler. Kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerinden gelişip olgunlaşan B lenfositler periferal sirkülasyonla periferal lenfoid organlara göç ederek buralarda lokalize olurlar (Tünger vd 1998). Yüzeylerinde bulunan moleküllere bağlı olarak iki farklı fonksiyon gösterirler.

a. Antikor (immünoglobulin) ekspresyonunu gerçekleştirirler. Antikorlar, membrana bağlı formda ve salgı formunda olmak üzere iki farklı formda bulunurlar
b. T-yardımcı (T-helper) hücrelerine peptit antijen sunumu sağlarlar. Bu yüzden bu hücrelere, antijen sunan hücreler (Antigen-Presenting Cells, APCs) adı verilir.

B lenfositler tarafından membrana bağlı formda üretilen immünoglobulinler, antijenler için B hücre reseptörü olarak fonksiyon gösterirler. Antijenlerin spesifik olarak bu yüzey reseptörlerine bağlanması, B hücre yanıtını başlatır ve hümoral bağışıklığın tanıma fazını oluşturur. Antijen uyarımlı B hücreleri tarafından üretilen salgı formundaki immünoglobulinlerin antijenlere spesifik olarak bağlanması ise hümoral bağışıklığın efektör fazını oluşturur ve antijenlerin eleminasyonlarının başlatılması için birçok efektör mekanizmanın aktivasyonunu gerçekleştirir (Abbas vd 2000).

Olgun fakat uyarılmamış B lenfositlerin yüzeyinde monomerik IgM ve IgD antikorları, MHC sınıf II molekülleri, Epstein-Barr virüs (EBV), C3d (CR2, CD21) ve C3b (CR1, CD35) gibi kompleman reseptörleri, Fc reptörleri, CD19, CD20, CD22 ve mitojen reseptörler bulunur. B lenfosit yüzey molekülleri Şekil 2.1.'de verilmiştir. Bu yüzey moleküllerinin bazıları örneğin; CD19, CD20, CD22 ve immünoglobulin antijen reseptörü hücreye spesifik olarak eksprese edilirken, bazıları da örneğin; farklılaşmanın erken dönem hücrelerinden olan pre-B hücreleri yüzeyindeki CD9 ve CD10 belirleyicileri hücre farklılaşmasının farklı safhalarına spesifik olarak eksprese edilirler (Tokgöz vd 1997). Bu yüzey molekülleri B lenfosit kaynaklı

lenfoproliferasyonların belirlenmesinde, belirleyici olarak kullanılırlar. Bu şekilde, herhangi bir insanda gelişen tümörün, lenfoid hücre kaynaklı olup olmadığı, lenfoid hücre ise hangi farklılaşma aşamasında, hangi tip lenfositten geliştiği belirlenebilir. Lenfosit yüzeyinde bulunan bu belirleyiciler, hastalık tanısı için çok önemlidirler. Bu yüzden, B lenfoid hücre kaynaklı tümörlerin saptanmasında, özellikle immünglobulin antijen reseptörünün yapısının, bu molekülü kodlayan gen lokuslarının germline organizasyonunun, gen segmentlerinin rekombinasyonunun ve ekspresyonunun bilinmesi önem arzetmektedir.



Şekil 2.1. *Olgun B lenfosit yüzey molekülleri*
HCV, Hepatit C Virüs; EBV, Eipstein Barr Virüs; Ig,, İmmünoglobulin; TH, T yardımcı hücre

2.1.2. B Lenfosit Maturasyonu (Olgunlaşma)

B lenfositlerinin gelişimi olgunlaşma, aktivasyon ve farklılaşma olmak üzere üç evreye ayrılabilir. Olgunlaşma dönemi kemik iliğinde geçer ve bu dönemde antijenle karşılaşma yoktur (Tünger vd 1998). Aktivasyon ve faklılaşma aşamaları ise sekonder lenfoid organlarda, antijene bağlı olarak gerçekleşir. Olgunlaşma döneminde, immünoglobulin genlerinin düzenlenmesi ve ekspresyonu, immatür (olgunlaşmamış) B lenfositlerinin proliferasyonu ve matür (olgun) B lenfositlerinin repertuvar seçilimi olmak üzere üç temel olay görülür.

Kemik iliğindeki pluripotent kök hücreleri, B lenfositlerini oluşturmak üzere erken dönem hücreler olan pro-B lenfositlerine dönüşürler. Pro-B hücreleri Ig molekülü eksprese etmezler. Bu hücrelerde ilk olarak immünoglobulin ağır zincir (IgH) gen düzenlenmesi gerçekleştirilir. Fonksiyonel gen düzenlenmesinin gerçekleştiği hücreler, pre-B hücrelerine dönüşürler. Pre-B hücrelerde Ig gen düzenlenmesinden sonra sitoplazmik μ zincir oluşturulur, ancak hafif zincir oluşturulmaz. Bu hücreler, sitoplazmalarında bulunan μ ağır zincir polipeptitleri ile karakterize edilirler. Pre-B hücresindeki bazı μ ağır zincirleri vekil hafif zincir (surrogate light chain) adı verilen proteinle birleşirler. Bu molekül kappa ve lambda hafif zinciri ile homoloji gösterir. μ ve vekil hafif zincir kompleksi, pre-B hücre reseptörü olarak adlandırılır. Pre-B hücre reseptörü Igα ve Igβ adı verilen diğer proteinlerle birleşerek hücre içine sinyal iletimini sağlarlar. Pre-B hücre reseptörlerini eksprese edemeyen hücreler hücre içine sinyal iletimini gerçekleştiremediklerinden apoptozisle ortamdan elemine edilirler. Bu dönemlerdeki gelişimde antijene bağımlılık yoktur. Pre-B

reseptör ekspresyonunun başarıyla gerçekleştiği hücreler, immatür B lenfositlerine dönüşürler. İmmatür B lenfositlerinde, hafif zincir (kappa ya da lambda) ekspresyonu gerçekleşir. Hafif ve ağır zincir bir araya getirilerek IgM molekülü oluşturulur ve hücre yüzeyine eksprese edilir. Fonksiyonel IgM molekülünün ekspresyonu ile sinyal iletimi gerçekleşeceğinden bu hücreler, proliferasyonlarına ve maturasyonlarına devam ederler. Fonksiyonel olmayan IgM molekülü eksprese eden hücreler ise yine apoptozisle ortamdan elemine edilirler. Fonksiyonel IgM molekülünü eksprese eden immatür hücreler, ikinci bir kontrol mekanizmasından da geçerler. Bu mekanizma ile kemik iliğinde bulunan, kendi vücut (self) moleküllerine yüksek afinite ile bağlanan immatür B lenfositler apotozisle yok edilirler. Bu mekanizma ile vücut moleküllerine karşı immün yanıt oluşturulması engellenmiş olur. Bu olaya self tolerans adı verilir. Vücut moleküllerine düşük afiniteyle bağlanan ya da hiç bağlanmayan immatür hücreler, "isotype switching" adı verilen mekanizma ile IgD molekülünü de eksprese ederler. (Abbas vd 2000). IgM ve IgD moleküllerinin birlikte eksprese edilmesi ile hücreler fonksiyonel yetenek kazanırlar. Bu nedenle bu hücreler matür hücreler olarak adlandırılırlar. Artık bu hücreler antijenle karşılaşmaya hazırdırlar. Bu şekilde kemik iliğinde olgunlaşan B lenfositler, periferal dolaşımla sekonder lenfoid organlara göç ederler (Tünger vd 1998). İnsan periferal kanında bulunan B lenfositlerinini çok az bir kısmı IgM ve IgD dışında, normalde vücudun spesifik bölgelerinde salgı formunda bulunan IgG, IgA ya da IgE moleküllerini de yüzeylerinde taşırlar. Sekonder lenfoid organlara göç eden B lenfositler lenf nodüllerinde, kortekteki foliküler alanlarda, dalakta, beyaz pulpadaki folüküler alanlarda lokalize olurlar (Roitt vd 2001).

Sekonder lenfoid organlara göç eden B lenfositlerin, antijenle karşılaşmaları ile birlikte aktivasyonları ve farklılaşmaları gerçekleşir. Lenf nodüllerindeki foliküler dışı alanda, antijenlerle karşılaşan matür B lenfositler aktifleşerek kısa ömürlü plazma hücrelerine ve primer olarak uyarılmış B lenfositlerine farklılaşırlar. Uyarılmış B hücreleri sekonder foliküldeki germinal merkeze göç ederek çoğalırlar. Germinal merkezdeki bu hücrelere sentroblast adı verilir. Bu hücreler çoğalma yeteneğine sahiptirler ve apoptoza açık durumdadırlar. Ig antijen reseptör moleküllerinin V gen segmentlerinde somatik mutasyonlar gerçekleşir. Somatik mutasyonlar, Ig antijen reseptör moleküllerinin çeşitliliğinin artmasına neden olduğu gibi, foliküler dendritik hücreler tarafından sunulan antijenlere olan afinitenin de artmasına neden olurlar. Ig reseptör genleri mutasyona uğramış bu hücrelere, sentrosit adı verilir. Antijenlere yüksek afiniteyle bağlanan reseptörleri taşıyan bu sentrositler, antijenle karşılaştıklarında uzun ömürlü plazma hücrelerine ve bellek hücrelerine farklılaşırlar. Plazma hücreleri antijene spesifik antikorlar eksprese ederek antijenlerin eleminasyonlarını gerçekleştiriler (Abbas vd 2000).

B lenfosit maturasyonunun (olgunlaşma) temel olaylarından biri, Ig gen düzenlenmeleri ve ekspresyonudur. Maturasyonun farklı aşamalarında, farklı Ig lokusları düzenlenir. Maturasyon aşamalarına göre gen düzenlenmeleri çizelge 2.1.'de verilmiştir.

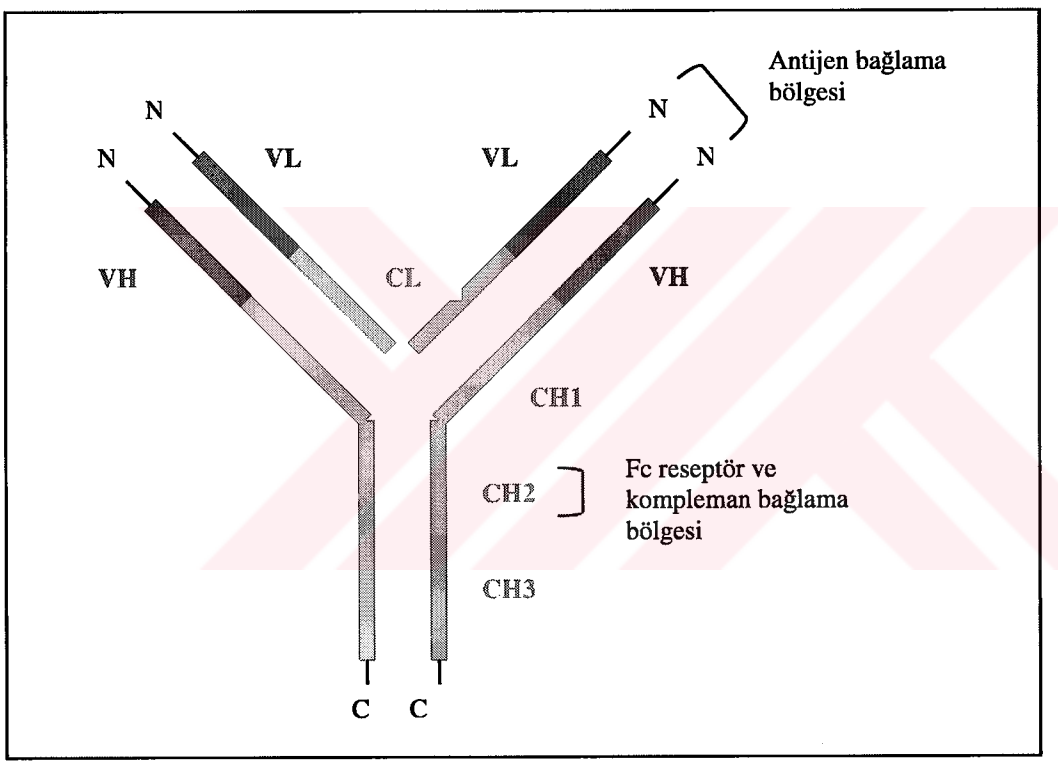
Çizelge 2.1. B lenfosit maturasyonu ve Ig gen düzenlenmeleri

	Kök hücre	**Erken pro-B hücre**	**Geç pro-B hücre**	**Büyük pre-B hücre**	**Küçük pre-B hücre**	**İmmatür B hücre**	**Matür B hücre**
Ağır Zincir geni	Germline	D-J düzenlenmesi	V-DJ düzenlenmesi	Düzenlenmiş VDJ	Düzenlenmiş VDJ	Düzenlenmiş VDJ	Düzenlenmiş VDJ
Hafif Zincir geni	Germline	Germline	Germline	Germline	V-J düzenlenmesi	V-J düzenlenmesi	V-J düzenlenmesi
Yüzey Ig	Yok	Yok	Yok	Pre-B reseptör	İntraselüler μ zincir	Yüzey IgM ekspresyonu	IgM ve IgD ekspresyonu

2.1.3. B Lenfosit İmmünoglobulin Antijen Reseptör Molekülü

2.1.3.1. Ig molekülünün yapısı

İmmunglobulinler, simetrik özellik gösteren multidimerik moleküllerdir. Her Ig molekülü, iki eşit hafif zincir (her biri 24 kD), iki eşit ağır zincir (her biri 55 ya da 70 kD) olmak üzere dört polipeptit zincirinden oluşur (Medeiros ve Carr 1999). Hafif ve ağır zincirler birbirlerine disülfit bağlarıyla kovalent olarak bağlanmışlardır. Hafif ve ağır zincirlerin her biri, 110 amino asit rezidüsü uzunluğunda, tekrar eden korunmuş bölgeler içerirler. Bu bölgeler bağımsız olarak katlanarak immunglobulin domainleri adı verilen yapıları oluştururlar. Hafif ve ağır zincirin N-terminalinde bulunan domainler, *variable* (*değişken, V*) bölgelerini oluştururken, C-terminalinde bulunan domainler de constant (sabit, C) bölgelerini oluştururlar. Ağır zincir polipeptidi, bir V domaini ve üç ya da dört C domaini içerirken, hafif zincir polipeptidi ise bir V ve bir C domaini içerir (Roitt vd 2001). Ig molekül yapısı şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. *İmmünoglobulin molekülünün yapısı. Hafif (VL) ve ağır (VH) zincirin değişken bölgelerindeki domainler, bir araya gelerek antijen bağlama bölgelerini oluştururlar. Fc reseptör ve kompleman bağlama bölgeleri, ağır zincirin sabit bölgelerinde yerleşmiştir.*

Variable bölgeler, yüksek çeşitlilikte amino asit rezidüsü içerdikleri için bu şekilde adlandırılmışlardır. Ağır zincir polipeptidinin VH bölgesi ile hafif zincir polipeptidinin VL bölgesi, antijen bağlama bölgesini oluşturmak üzere bir araya gelirler. Salgı formundaki IgM ve IgA molekülleri dışındaki diğer immünglobulinlerde iki eşit antijen bağlama bölgesi bulunur. Antijen bağlama bölgeleri V bölge çeşitliliğine bağlı olarak, farklı Ig moleküllerinde farklı spesifite gösterirler (Abbas vd 2000). Hafif ve ağır zincir polipeptitlerinin V segmentleri, hipervariable (yüksek değişken) adı verilen ve farklı Ig moleküllerinde farklı sekans özelliği gösteren, 10 amino asit rezidüsü uzunluğunda kısa segmentler içerirler. Bu segmentler, immünoglobulinlerin antijenlere spesifik olarak bağlanmasını sağlayan, yüksek çeşitlilik gösteren bölgelerdir. Bir V bölgesi, üç ayrı hipervariable ve dört ayrı framework bölgesi içerir. VL ve VH domainlerinin yüksek çeşitlilik gösteren üç hipervariable bölgesi, antijenin üç boyutlu yapısına komplementer yüzey oluşturmak üzere bir araya gelmişlerdir. Bu yüzden bu bölgelere *Complementerity-Determining Regions* (Tamamlayıcı-tanıma bölgeleri, CDRs) adı da verilir. Amino ucundan itibaren VH ve VL bölgelerinin hipervariable

bölgeleri CDR1, CDR2 ve CDR3 olarak adlandırılırlar. CDR3 bölgesi en fazla çeşitlilik gösteren hipervariable bölgesidir. CDR bölgelerindeki farklı sekanslar, farklı katlanmaların oluşmasına, dolayısıyla farklı antijen spesifitesine neden olurlar. CDR bölgeleri, framework adı verilen, yüksek derecede korunmuş dört bölge ile birbirinden ayrılırlar (van Dongen vd 2003). Bu bölgeler V segmentlerinin Ig domaini şeklinde katlanmalarını sağlarlar.

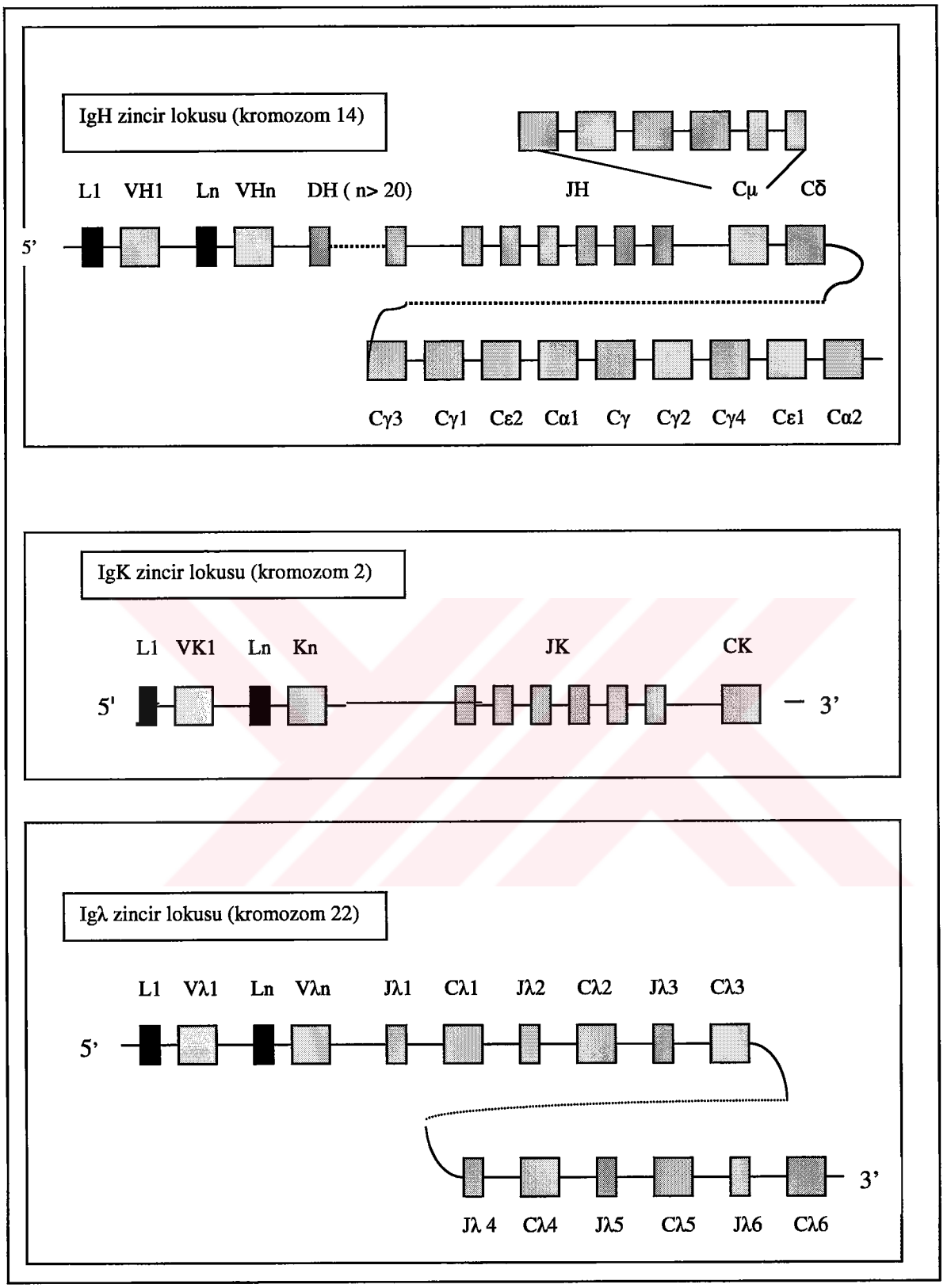
Hafif zincir polipeptitleri, constant (sabit) bölgelerindeki farklılıklara bağlı olarak, kappa ve lambda olmak üzere iki izotipe ayrılırlar. İnsanlardaki immünoglobulinlerin %60'ını kappa hafif zincir, %40'ını da lambda hafif zinciri oluşturur. Tümör hücre klonları, aynı tip hafif zincir polipeptitini içerdikleri için ve tümörde bu molekülleri içeren hücre yayılımının fazla olması nedeniyle, kappa ve lambda hafif zincir oranlarında değişiklikler gözlenir. Kappa hafif zincirini içeren hücrelerin, lambda hafif zincirini içeren hücrelere oranı, B hücre proliferasyonunun belirleyicisidir. Bu yüzden B hücre tümörlerinin tanısında kullanılırlar (Abbas vd 2000).

Ağır zincir polipeptitleri, C bölgesindeki yapısal farklılıklara bağlı olarak beş farklı sınıfa (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD) ve altsınıfa (IgG1, IgG2, IgA1 ve IgA2 gibi) ayrılırlar (Roitt vd 2001). Ig sınıf ve altsınıfları C bölgelerindeki farklılılıklara bağlı olarak, farklı biyolojik efektör fonksiyonlar gösterirler.

İmmünoglobulin molekülünün V segmentleri V,(D),J gen segmentleri tarafından kodlanırken C segmentleri, C gen segmentleri tarafından kodlanır (van Dongen vd 2003).

2.1.3.2. Ig genlerinin germline organizasyonu

Ig genlerinin germline (eşey hattı) organizasyonu ve ekspresyonu, diğer genlerin organizasyon ve ekspresyonundan farklılık gösterir. Bu şekilde olmasının nedeni, her bireyin çok farklı çeşitlilikte Ig antijen reseptörü eksprese etme ihtiyacından dolayıdır. Bu şekilde, vücuda giren herhangi bir antijene karşı yüksek spesifitede cevap oluşturulup, vücuttan eleminasyonu sağlanabilir. Ig lokuslarının germline yerleşimi şekil 2.3.'de verilmiştir.



Şekil 2.3. *Ig lokusunun germline yerleşimi. İnsan ağır zincir, K hafif zincir, λ hafif zincir lokusları gösterilmektedir.*

Ig molekülünün farklı polipeptit zincirlerini (ağır zincir ve kappa , lambda hafif zincir) kodlayan gen segmentleri farklı kromozomlar üzerinde lokalize olmuşlardır. İmmünoglobulin ağır zincir lokusu (IgH) 14. kromozomun q 32.3 kolunda yer alırken, kappa hafif (IgK) zincir lokusu 2. kromozomun p 11.2 kolunda, lambda (Igλ) hafif zincir lokusu da 22. kromozomun q 11.2 kolunda yer almaktadır (Matsuda vd 1998, Abbas

vd 2000, van Dongen vd 2003). Her Ig germline lokusu, en az üç farklı gen segmenti içerir. IgK ve Igλ hafif zincir lokusları, V (variable), J (joining), C (constant) gen segmentlerini içerirken, ağır zincir lokusu bu gen segmentlerine ek olarak D (diversity) gen segmentini de içerir (Medeiros ve Carr 1999, Abbas vd 2000). Her zincirin spesifik segmentlerini kodlayan gen segmentleri ardışık olarak tekrar eden çoklu kopyalardan oluşur (van Dongen vd 2003). Ig molekülünün V bölgelerini ağır zincirde V, D ve J gen segmentleri kodlarken, kappa ve lambda hafif zincirlerinde V ve J gen segmentleri kodlarlar (Abbas vd 2000).

V gen segmentleri, Ig gen lokuslarının 5' ucunda yer alırlar. Çoklu gen kopyaları mevcuttur. V gen segmentlerinin sayısı türler arasında ve farklı Ig lokuslarında farklılık gösterir. Örneğin ağır zincir lokusunda 46-52'si fonksiyonel olmak üzere 76-82 VH gen segmenti bulunurken, lambda hafif zincir lokusunda 30-33'ü fonksiyonel olmak üzere 73-74 Vλ gen segmenti bulunur. V gen segmentleri, sekans homololojilerine bağlı olarak ağır zincir lokusunda yedi alt gruba (aile) ayrılırken, lambda hafif zincir lokusunda onbir alt gruba ayrılırlar (van Dongen vd 2003). V gen segmentleri arasında farklı uzunluklarda, kodlanmayan DNA parçaları bulunur. Her ailenin nükleotid sekansı %70-80 oranında benzerlik gösterir. V gen segmenlerinin 5' ucundaki ekzonlar 20-30 amino asit rezidüsü uzunluğundaki sinyal peptidlerini kodlarlar Bu peptidler yeni sentezlenen polipeptitleri ribozomlardan endoplazmik retikuluma taşımada görev yaparlar.

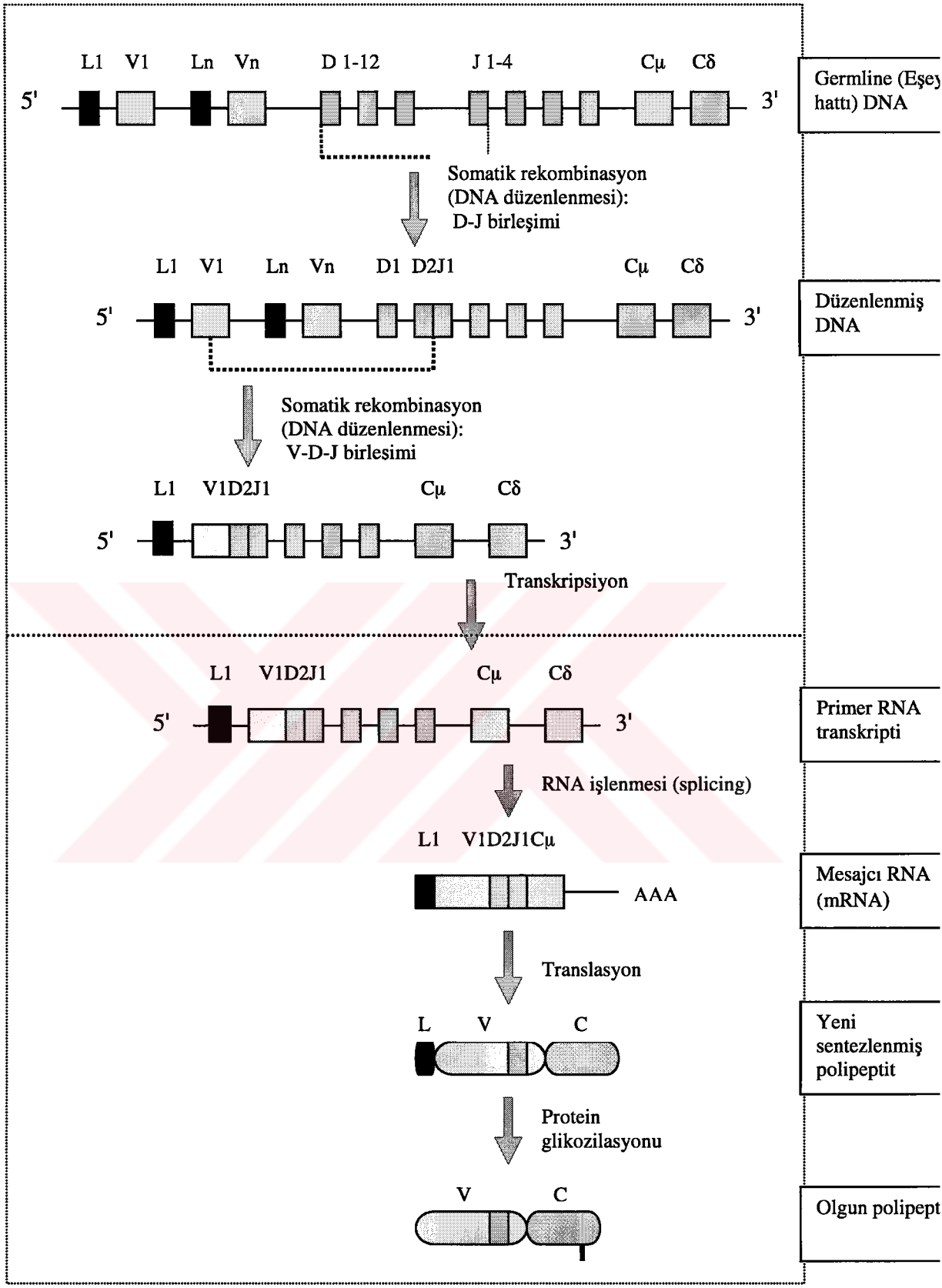
C gen segmentleri, V gen segmentlerinin 3' ucunda, farklı uzaklıklarda lokalize olmuşlardır. Her Ig lokusunda farklı düzen ve miktarda bulunurlar. Örneğin insanda kappa hafif zincir lokusunda bir tane, lambda hafif zincir lokusunda dört tane, ağır zincir lokusunda da dokuz tane C gen segmenti bulunur. Bu dokuz C gen segmenti, farklı ağır zincir izotip ve altizotiplerini kodlarlar. Kappa ve lambda C gen segmentleri tek bir ekzon içerir ve bu ekzon hafif zincirlerin ekstraselüler C bölgelerini kodlar. Ağır zincir lokusundaki her C gen segmenti, beş ya da altı ekzondan oluşur. Ekzonlardan üç ya da dördü ağır zincir izotiplerinin ekstraselüler C bölgelerini kodlarken, küçük ekzonlar da transmembran ve sitoplazmik domainlerini içeren C terminal uçlarını kodlarlar (Abbas vd 2000).
J gen segmentleri, V gen segmentleri ile C gen segmentleri arasında yeralırlar. 30-50 bç uzunlukta DNA sekanslarından oluşurlar. İnsanlarda IgH lokusunda altı, IgK lokusunda, beş, Igλ lokusunda altı fonksiyonel J gen segmenti bulunur. Bunlar IgH ve IgK lokusunda C segmentleri tümünün 5' ucunda yeralırken, Igλ lokusunda her C segmentinin 5' ucunda olacak şekilde yer almışlardır. D gen segmentleri, Igλ ve IgK hafif zincir lokuslarından farklı olarak sadece IgH zincir lokusunda bulunurlar. İnsanda yaklaşık 27 D gen segmenti bulunur. Sekanslarındaki homolojiye bağlı olarak yedi alt gruba ayrılmışlardır. J gen segmenti ile birlikte, Ig molekülünün V bölgesinde çeşitliliğin en fazla görüldüğü hipervariable bölgesini kodlarlar (van Dongen vd 2003).

2.1.3.3. Ig genlerinin rekombinasyonu ve ekspresyonu

Germline (eşey hattı) genleri, fonksiyonel antijen reseptörlerini oluşturacak mRNA'ya transkribe edilemezler. Fonksiyonel antijen reseptörünün eksprese edilebilmesi için germline Ig lokusu genlerinin, rekombinasyonla, ağır zincir lokusundan VDJ, hafif zincir lokusunda da VJ şeklinde yeniden düzenlenmesi gerekmektedir. Başlangıçta birbirinden farklı uzaklıklarda bulunan farklı gen segmentlerinin bir araya getirilerek yeniden düzenlenmesine somatik rekombinasyon adı verilir. Ig genlerinin somatik rekombinasyonu özel bir DNA rekombinasyonudur ve farklı gen segmentlerinin varlığını gerektirir. Her Ig lokusundaki gen segmentlerinin rekombinasyonu, kusursuz bir düzen içerisinde gerçekleşir. Gelişen B hücrelerinde, ilk olarak ağır zincir lokusu rekombinasyona uğrar. Bu yüzden Ig klonalite çalışmalarında hedef gen bölgesi olarak kullanılır (Macintyre ve Delabesse 1999). Ig ağır zincir lokusunun rekombinasyonu iki aşamada gerçekleşir. İlk olarak D gen segmentlerinden herhangi biri J gen segmentlerinden herhangi biriyle birleşir. Birleşen gen segmentlerinin arasında kalan DNA bölgesi kesip çıkarılır. Düzenlenmiş DJ bölgesinin 5' kısmındaki D gen segmentleri ile 3' kısmındaki J gen segmentleri bu rekombinasyondan etkilenmez. Rekombinasyonun ikinci aşamasında ise, Ig gen lokusunun 5' ucundaki V gen segmentlerinden herhangi biri, VDJ gen düzenlenmesini oluşturmak üzere DJ kompleksine katılır. Bu aşamada düzenlenmiş D gen segmentinin 5' kısmındaki bütün D gen segmentleri kesilip çıkartılır. VDJ düzenlenmesi sadece B lenfosit öncülerinde gerçekleşir ve Ig ekspresyonu için kritik kontrol noktasıdır (Medeiros ve Carr 1999). Bu şekilde VDJ düzenlenmesi gerçekleşmeyen gen transkribe edilemez. Ig gen lokusunun VDJ düzenlenmesinden sonra hafif zincir lokusunun VJ düzenlenmesi gerçekleşir. Hafif zincir lokusu D gen segmenti içermediği için rekombinasyon tek aşamada gerçekleşir (Medeiros ve Carr 1999, Abbas vd 2000).

Antijen reseptör genlerinin somatik rekombinasyonu, V(D)J rekombinaz adı verilen enzim kompleksi tarafından gerçeklekleştirilir. VDJ rekombinaz enzim kompleksi, lenfositlerde spesifik olarak eksprese edilen RAG1 ve RAG2 komponentleri ile diğer çoğu hücrede eksprese edilen DNA tamir komponentinden oluşur. RAG1 ve RAG2 komponentleri, rekombinasyon sinyal sekansları (Recombination Signal Sequence, RSS) adı verilen özel DNA sekanslarını spesifik olarak tanırlar. Bu sekanslar, V genlerinin 3'ucunda, J genlerinin 5'ucunda ve D genlerinin her iki ucunda bulunur. Tanıma sekansları, kodlama sekanslarına bitişik, yüksek derecede korunmuş yedi (heptamer), devamında korunmamış 12 ya da 23 ve devamında yüksek derecede korunmuş dokuz (nanomer) nükleotid dizisinden oluşur. Rekombinaz enzimi, *12/23 kuralına* bağlı olarak, yeniden düzenlenecek gen segmentlerinin RSS bölgelerini tanıyıp bağlanarak, DNA çift ipliğinde kırıklar meydana getirir. Kırıkların tekrar bir araya getirilmesiyle de rekombinasyon gerçekleştirilmiş olur (Abbas vd 2000, Macintyre ve Delabesse 1999).

Ig lokuslarının ardışık somatik rekombinasyonu, Ig proteinlerinin ekspresyonu ile kontrol edilir (Abbas vd 2000). B hücre maturasyonunda ilk olarak IgH zincir lokusu düzenlenir. Ağır zincir lokusundaki allellerden yalnızca biri yeniden düzenlenir. μ ağır zincir düzenlenmesinde veya ekspresyonunda başarısızlık olduğunda ağır zincir lokusunun ikinci allelinde düzenlenme gerçekleşir. Bu olay allellic exclusion (allelik dışlanma) olarak adlandırılır. Her ikisinde de düzenlenme başarısız olursa apoptozisle hücre ölümü gerçekleşir. μ proteinin ekspresyonu, Ig hafif zincir lokusunun somatik rekombinasyonunu aktifleştirir. İlk önce kappa lokusu düzenlenir. Kappa hafif zincirinin üretimi, lambda lokusunun rekombinasyonunu inhibe eder. Bu yüzden tek bir B hücre klonu hayatı boyunca iki hafif zincirden sadece birini eksprese eder. Bu light chain isotype exclusion (hafif zincir izotip dışlanma) olarak adlandırılır (Abbas vd 2000, Macintyre ve Delabesse 1999). V,D ve J segmentlerinin her kombinasyonu, çok az farklılık gösteren DNA sekanslarıyla sonuçlanır. Bu DNA sekansları özgül spesifiteye sahip, antijen reseptörlerinin ekspresyonuna olanak sağlarlar (Medeiros ve Carr 1999). Ig ağır ve hafif zincir gen segmentleri düzenlendikten sonra, düzenlenmiş VJ ve proksimal Cμ ve Cδ genlerini içeren VDJ kompleksi transkribe edilir. Primer mRNA işlenerek olgun mRNA haline dönüştürülür. Poliadenilasyon sonrası eksprese edilen ağır ve hafif zincir polipeptitler biraraya getirilerek IgM antijen reseptörü olarak membran yüzeyine eksprese edilirler (Abbas vd 2000). Ig gen rekombinasyonu ve ekspresyonu şekil 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2.4. *Ig ağır zincir gen rekombinasyonu ve ekspresyonu.*
Ig μ ağır zincir rekombinasyon ve ekspresyon olaylarının sırası. μ ağır zincirinin değişken bölgesi (V bölgesi) V1, D2, ve J1 ekzonları tarafından kodlanmaktadır. V, değişken D, çeşitlilik;J, birleşim gen segmentleri.

2.1.4. Ig Moleküllerinin Çeşitliliği ve Oluşma Mekanizmaları

Bir çok genetik mekanizmaların bu çeşitliliği yarattığı ortaya konulmuştur.Ig ağır ve hafif zincir gen lokuslarının çoklu V gen kopyalarını içermesi bunlardan biridir (Roitt vd 2001). Ig genlerinin VJ ve VDJ bölgelerinin somatik rekombinasyonu (kombinasyonal çeşitlilik) çeşitliliği yaratan önemli mekanizmalardan biridir (Macintyre ve Delabesse 1999, Abbas vd 2000, Roitt vd 2001, van Dongen vd 2003). Burada kastedilen herhangi bir V gen segmentinin herhangi bir D ya da J segmenti ile rastgele bir araya gelmesidir. Diğer bir mekanizma V,D ve J gen segmentlerinin birleşim bölgelerinin çeşitliliğidir. Bu çeşitlilik, birleşim bölgelerine rastgele nükleotit girişi veya nükleotit çıkışıyla oluşur (Medeiros ve Carr 1999, Macintyre ve Delabesse 1999, Abbas vd 2000, van Dongen vd 2003). Farklı kombinasyonlarla oluşturulmuş çeşitli ağır ve hafif zincirlerin, aynı şekilde farklı kombinasyonlarla bir araya getirilmesiyle çeşitlilik daha da artmaktadır (Roitt vd 1990). Sekonder lenfoid organlarda antijenlerle karşılaşan matür B lenfositlerinde gerçekleşen somatik mutasyonlar, antijene özgün antikor oluşturulmasına yardımcı olmaktadır (Macintyre ve Delabesse 1999,Medeiros ve Carr 1999 Roitt vd 2001). Bu mutasyonlar da diğer mekanizmalara ek olarak çeşitlilik oluşumunu sağlayan önemli faktörlerdendir. Bunun yanı sıra allelic exclusion (allelik dışlanma) da çeşitliliği oluşturan mekanizmalar arasında sayılabilir. (Macintyre ve Delabesse 1999, Abbas vd 2000).

2.2. Lenfoma

Lenfomalar, lenfoid hücreden köken alarak, klonal çoğalma gösteren neoplazilerdir. Normal lenfoid hücre gelişiminin, çeşitli aşamalarındaki B ve T lenfositlerinden gelişirler (Medeiros ve Carr 1999). Lenfoid hücre tümörlerinin büyük çoğunluğu (%90-95) B lenfosit kökenlidir. Batı toplumlarında çok az bir kısmı da T lenfosit (%5-7) ya da doğal öldürücü (Natural Killer, NK) (<%2) lenfosit nesillerinden gelişir. T-NK hücreli lenfomalar daha çok uzak doğuda görülmektedir

Lenfoid hücre tümörlerinin büyük çoğunluğu (>%98) klonal olarak düzenlenmiş, Ig genlerini içerirken, %25-30'u da, kromozom translokasyonlarını içerirler. Ig genleri ve kromozom translokasyonları, klonalite çalışmalarında belirleyici olarak kullanılırlar (van Dongen vd 2003). Kromozom translokasyonlarını içeren B hücreli tümörlerin görülme sıklığı az olduğu için çoğunlukla Ig gen düzenlenmeleri belirleyici olarak kullanılır (Voena vd 1997). B hücreli lenfoma tanısı, klonalite incelemeleriyle desteklenir. Klonalite incelemelerinin temelini, bütün neoplastik hücrelerin aynı klonal orijine sahip olmaları, oluşturur (Macintyre ve Delebesse 1999).

Reaktif lenfoid proliferasyonlar, poliklonal poliferasyonlardır. Her lenfoid hücre klonu farklı gen düzenlenmesi içerir. Dolayısıyla farklı antijenlere spesifik Ig antijen reseptörlerine sahiptirler. Lenfomalar, monoklonal poliferasyonlardır. Lenfomalarda bütün lenfoid hücreler, aynı gen düzenlenlenmelerine sahip oldukları için aynı antijene spesifik, Ig antijen reseptörlerini içerirler.

2.2.1.B Hücreli Lenfomalar (BHL)

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2000 yılında yayınlanmış lenfoma sınıflamasına göre, B hücreli lenfomalar, B lenfosit gelişme ve olgunlaşma basamakları içerisinde prekürsor (olgunlaşmamış) ve matür (olgunlaşmış) hücrelerden meydana gelmiş olmalarına göre iki ana gruba ayrılırlar (Jaffe vd 2001).

B lenfositlerinin kemik iliğindeki erken farklılaşma evrelerindeki formlarından gelişen lenfomalar prekürsör hücreli lenfomalar grubundadır. ***B*** hücreli akut lenfoblastik lösemileri oluştururlar. Bu evredeki olgunlaşmamış lenfoid hücrelerden daha seyrek olarak lenf nodülü tutulumuyla karakterli klinik prezentasyonlarda olgulara rastlanır. Bunlar kısa sürede lösemik form alabilen B hücreli lenfoblastik lenfomalardır.

B hücreli lenfomalar, kemik iliğini terk eden antijen tanıma yeteneğindeki B lenfositlerinin malign tümörleridir. Antijenlerle karşılaşmamış matür B hücrelerinin neoplastik karşılığı Kronik lenfositik lösemi (B-CLL) ve/veya Küçük lenfositik lenfoma (SLL) ile Mantle hücreli lenfomadır. Germinal merkezdeki en erken immatür Ig M+ sentroblastların neoplastik karşılığı Burkitt lenfoma, sentroblast ve sentrositlerin değişik oranlardaki karışımlarının neoplastik karşılıkları Foliküler lenfoma, dark zon sentroblastları ve light zonun büyük sentrositlerinin neoplastik karşılıkları Büyük B hücreli lenfomalardır. Germinal merkez dışındaki marginal zon lenfositlerine Nodal/Ekstranodal marginal zon lenfoma, monositoid B hücreli lenfoma, kemik iliği plazma hücrelerine de Multipl myelom karşılık gelmektedir. Foliküler dişı alandaki (parakorteks) Ig M segrete eden plazma hücrelerine dönüşen hücrelerin neoplastik karşılığı Plazmasitoid lenfositik lenfoma ve Waldeström makroglobulinemisidir (Jaffe vd 2001).

2.3. B Hücre Klonalitesinin Saptanması

B hücreli lenfomalar, normal lenfosit gelişimi aşamasındaki B hücrelerinin düzensiz olarak proliferasyonundan kaynaklanan neoplazilerdir (Medeiros ve Carr 1999). B hücre proliferasyonunlarında, klonal olarak bir araya gelmiş bütün tümör hücreleri aynı Ig gen düzenlenmesini içerirler. Reaktif B hücre proliferasyonları ise farklı Ig gen düzenlenmelerini içeren poliklonal B hücrelerinden oluşurlar. B hücreli lenfoproliferasyonların reaktif proliferasyonlardan ayrılmasında klonal gen düzenlenmelerinden yararlanılır.

Klonal olarak düzenlenmiş Ig genlerini içeren olgun lenfoid hücre tümörleri, immünohistoloji ya da flow sitometri (akım sitometri) ile yapılan immünofenotipleme gibi yöntemlerle, protein seviyesinde belirlenebilir. Ancak burada sensitivite, hücrelerin Ig yapımı miktarına göre değişmektedir. Bu yöntemlerin en başarılı olduğu lenfomalar plazma hücrelerini içeren tiplerdir. Southern Blot (SB) ve PZR analiz gibi yöntemlerle de moleküler seviyede belirlenebilirler. İmmünoglobulin molekülüne karşı oluşturulmuş spesifik antikorların kullanımı prensibine dayanan yöntemlerle lenfoproliferasyonların belirlenmesi, hafif zincir molekülünün ekspresyonunun saptanması ilkesine dayanır. IgK hafif zincir molekülünü eksprese eden B hücrelerinin, Igλ hafif zincir molekülünü eksprese eden B hücrelerine oranı, lenfoproliferasyonun klonal olup olmadığını gösterir. Klonal lenfoproliferasyonlarda, IgK molekülünün Igλ molekülüne oranı 4.0'den büyük ya da 0.5'den küçüktür (IgK/Igλ oranı: >4.0 ya da <0.5). Poliklonal (reaktif) lenfoproliferasyonlarda, IgK molekülünün Igλ molekülüne oranı 0.7-2.8 arasında bir değerdir (normal IgK/Igλ oranı: 0.7-2.8) (Smith vd 1984, Fukishima vd 1996). İmmünohistolojik ya da flow sitometrik immünofenotipleme yöntemlerinde karşılaşılan bazı olumsuzluklar nedeniyle lenfoproliferatif düzensizliklerin yaklaşık %5-10'una tanı konulamamaktadır. Bu olumsuzluklar, yüzey Ig ekspresyonunun gerçekleşmemesi, oligoklonalitenin varlığı, tümör hücre azlığı, normal (reaktif) lenfositlerle karıştırılabilme olasılığı ve düşük niteklikli örnek varlığı olarak sıralanabilir. Bu yöntemlerle klonalitenin saptanmasının mümkün olmadığı durumlarda moleküler yöntemler (SB ve PZR) uygulanır (van Dongen vd 2003).

Southern Blot (SB) analizi, moleküler klonalite çalışmalarında "gold standart" teknik olarak uzun yıllar uygulanmıştır. SB analizi restriksiyon enzim (RE) kesimiyle elde edilmiş düzenlenmiş (germline olmayan) DNA fragmentlerinin saptanması temeline dayanır. Uygun RE enziminin (2-15 kb uzunluğunda fragment eldesi) ve uygun yerleşimli DNA problarının (downstream J segment probları) seçilmesiyle hemen hemen bütün Ig gen düzenlenmeleri saptanabilir (Moreau vd 1999, Langerak vd 1999). SB analiz, Ig genlerinin kombinasyonel düzenlenmelerinin gösterilmesinde avantaj sağlar. Ig ağır ve kappa hafif zincir molekülleri, geniş kombinasyonel çeşitliliğe sahip oldukları için, SB analiz yöntemi ile klonalitenin belirlenmesinde, optimal sonuçlar elde edilebilir. Ig lambda hafif zincirinin gen lokusu kompleks olduğu için SB analiz yöntemi ile optimal sonuçlar elde edilemez (van Dongen vd 2003).

SB analizinde, fazla miktarda , yüksek kalitede DNA örneğine gereksinim duyulduğu için, SB analiz çalışmalarında kullanılan DNA örneğinin , taze doku biyopsilerinden ya da kan örneklerinden elde edilmiş olması gerekir. Bu gibi çalişma materyallerinden elde edilen DNA örnekleri, fazla miktarda ve yüksek kalitededir. Birçok Avrupa ülkesinde olduğu gibi tüm dünyada da moleküler tanı çalışmalarında kullanmak üzere taze biyopsinin sağlanması çok zordur. Her an hastadan biyopsi alınamaz. Bu gereklilik, klonalite çalışmalarında SB analiz yönteminin kullanılabilmesinde bir engel teşkil etmektedir

SB analiz yöntemi güvenilir bir yöntem olmasına rağmen, zaman alıcı, çok emek gerektiren, sınırlı duyarlılığa sahip ve fazla miktarda yüksek kalitede DNA örneğine ihtiyaç duyan bir yöntemdir. Bu dezavantajlarından dolayı yerini günümüzde PZR analiz yöntemine bırakmıştır (Medeiros ve Carr 1999, van Dongen vd 2003).

Polimeraz zincir reaksiyon (PZR) analiz yöntemi, Ig VDJ (Ig H lokusunda) ve VJ (Ig hafif zincir lokuslarında) gen düzenlenmelerinin yüksek çeşitlilik gösteren birleşim bölgelerinin, uygun 3' ve 5' primerleriyle çoğaltılması ilkesine dayanır. Yüksek duyarlılığa sahip (%1-5, düzenlenmelerin bazı tiplerinde <%1) ve hızlı, basit bir yöntemdir. PZR yöntemiyle klonalite saptamalarında, düşük nitelikli az miktarlı DNA örnekleri yeterli olduğu için, düşük kalitede az miktarda DNA molekülünün izole edilebildiği parafine gömülü biyopsi materyali ya da düşük miktarlı DNA molekülünün izole edilebildiği iğne biyopsileri ile çalışılabilir (van Dongen vd 2003). Bu özelliği ile SB analiz yöntemine üstünlük gösterir. PZR yöntemi, hızlı ve duyarlı bir yöntem olmasına rağmen klonalite çalışmalarında, önemli güçlüklerle karşılaşılır (Garcia-Sanz vd 1999, Gonzalez vd 1999, van Dongen vd 2003). Bunlardan birincisi yanlış- negatif sonuç, ikincisi ise yanlış - pozitif sonuçtur.

Yanlış-negatif sonuçlar, uygun J gen segment probları kullanıldığında, SB analiz yönteminde nadir olarak görülürler. PZR analiz yönteminde görülen yanlış negatif sonuçlar, primerlerin yanlış hedef gen bölgelerine bağlanmasından ya da düzenlenmiş gen segmentlerine bağlanamamasından kaynaklanır (Macintyre ve Delabesse 1999, Medeiros ve Carr 1999, van Dongen vd 2003). Primerlerin bağlanamaması, germinal ve postgerminal B hücre tümörlerindeki Ig genlerinde oluşan somatik mutasyonlardan kaynaklanabileceği gibi, gen düzenlenmesine katılan tüm gen segmentlerine uygun primerlerin kullanılmamasından da kaynaklanabilir. V, D ve J gen segmentlerinin çoklu gen kopyalarından herhangi birinin, bir araya getirilmesiyle oluşturulan VDJ düzenlenmelerinin belirlenebilmesi için, düzenlenmeye katılabilecek gen kopyalarının çoğunu veya hepsini spesifik olarak tanıyıp bağlanabilen, çoklu primer setlerinin kullanılması gerekir. Somatik mutasyonlardan kaynaklı yanlış-negatif sonuçların ortadan kaldırılması için de farklı Ig lokus (Ig ağır, kappa ve lambda hafif zincir lokusu) genlerini tanıyıp çoğaltabilen primer setleri kullanılmalıdır (van Dongen vd 2003).

Yanlış–pozitif sonuç, PZR analiz yöntemi sonrası, monoklonal ve poliklonal PZR ürünlerinin birbirinden ayırt edilememesi sonucu oluşur. Reaktif B lenfosit gen düzenlenmelerinin çoğaltılmasıyla poliklonal zemin oluşur. Bu da klonalitenin saptanmasını zorlaştırır. Uygun PZR ürün analiz yöntemleri kullanılarak bu sorun ortadan kaldırılabilir (Garcia-Sanz vd 1999, Gonzalez vd 1999, van Dongen vd 2003). Bunlar PZR ürününün direkt analizi (Kneba vd 1995), tek-iplik konformasyon polimorfizmi (single-strand conformation polymorphism, SSCP) (Davis vd 1993), denatüre edici dereceli jel elektroforezi (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) (Bourguin vd 1990, Grenier vd 1995) sıcaklık dereceli jel elektroforezi (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) (Linke vd 1995), gen tarama (gene scanning) (Kneba vd 1995, Landman-Parker vd 1996, Linke vd 1997) ve heterodupleks analiz (HD) (Bottaro vd 1994, Langerak vd 1997) yöntemleridir. Bu yöntemler arasından hızlı, basit ve ucuz olması nedeniyle en çok heterodupleks analiz kullanılmaktadır. Heterodupleks analiz yöntemi, normal olarak genetik hastalık mutasyonlarını taramak için geliştirimiş bir yöntemdir. Ayrıca klonalite analizlerinde de kullanılmaktadır.

Heterodupleks analiz yönteminde, PZR ürünlerinin yüksek ısıda denatürasyonu ve ardından da düşük ısıda renatürasyonu sağlanır. Bu şekilde yüksek ısıda tek iplik haline gelen DNA iplikleri, ani ısı değişimi ile dupleks oluşumuna zorlanır. Kullanılan örnekteki poliklonal ve monoklonal örneklere bağlı olarak homodupleks ve/veya heterodupleksler oluşur. Heterodupleks sonrası ürünler denatüre edici olmayan poliakrilamid jele yüklendiğinde, jelde bant ya da smear bir dağılım gözlenir. Bant oluşumu, homodupleksleri yani klonaliteyi gösterirken, smear dağılım, heterodupleksleri yani poliklonaliteyi gösterir. Jeldeki bu görüntüye bakılarak lenfoproliferasyonların malign mi yoksa reaktif mi olduğu anlaşılır. Bu şekilde şüpheli lenfoproliferasyon düzensizliklerine tanı konulmuş olur.

2.4. Kullanılan Materyal ve DNA Kalitesi

Moleküler genotipik incelemeler genellikle taze ve dondurulmuş dokularda çalışmak üzere geliştirilmiştir. Ancak rutin çalışmalarda kullanılmak üzere taze doku elde etmek kolay değildir. Bu yüzden parafine gömülü doku (PET) materyalleri ile çalışmaya olanak sağlayacak moleküler yöntemler ve protokoller geliştirilmeye çalışılmaktadır (van Dongen vd 2003). PET materyali kullanılarak yapılan moleküler klonalite çalışmalarında bazı sorunlarla karşılaşılaşılır. Bunlardan birincisi PET materyalinden yüksek derecede parçalanmış, düşük kaliteli DNA elde edilmesi, ikincisi ise PZR temelli klonalite çalışmalarını engelleyen PZR inhibitörlerinin DNA ile birlikte elde edilmesidir. Elde edilen DNA'nın bütünlüğü ve PZR ile amplifikasyonu, doku kalınlığı, tespit solüsyonunun tipi, tespit süresi, analiz öncesi bekleme süresi, DNA izolasyon prosedürü ve blok yaşı gibi faktörlerden etkilenmektedir (van Dongen vd 2003).

DNA kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri tespit solüsyonunun tipidir. İzole edilen DNA'nın kalitesi üzerine direkt etkisi vardır. Tespit solüsyonlarından biri olan formalin, çoğu patoloji laboratuvarlarında genel amaçlı olarak kullanılmaktadır. Uzun, lineer DNA, canlı sistemde histon adı verilen özel proteinlerle sarılmış durumdadır. Formalin DNA'yı proteinlere çapraz bağlarla bağlayarak, DNA molekülünün rijit hale gelmesine ve mekanik kırılmalara karşı hassasiyet kazanmasına neden olur. Bu yüzden formalin tespitli dokulardan elde edilen parça uzunlukları kısıtlıdır. Çoğu laboratuvarda rutin olarak kullanılmamasına rağmen, PZR ve moleküler düzeyde çalışmalar söz konusu olduğunda en elverişli DNA parçalarının eldesine olanak sağlayan dokular, etanol ile tespit edilmiş dokulardır. Bouin gibi asidik tespit solüsyonları ile tesbitli dokularda PZR'ın kullanımı, bazı yıkama tekniklerinin geliştirilmiş olmasına rağmen, oldukça sınırlıdır. Benzer şekilde inorganik asitlerde (nitrik asit, hidroklorik asit vb) dekalsifikasyon uygulanan dokularda da bu çalışmalar uygun olmamaktadır. B5 tespit solüsyonunun da DNA bütünlüğüne zararlı etkileri vardır (Mıes 1994). %10 NBF tespit solüsyonu yüksek oranda büyük fragmentlerinin eldesine olanak sağladığından PZR analizi çalışmaları için uygun bir tespit solüsyonuyken, Bouin en az uygun olan tespit solüsyonudur (van Dongen vd 2003). Tespit solüsyon tiplerine göre nükleik asit korunumları çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Tespit solüsyon tiplerine göre nükleik asit korunumu

Özellik	**Tamponlu formalin**	**Hollande**	**B5**	**Formalin zinc**	**Bouin**	**Alkol**	**AFA**
Nükleik asit korunumu	İyi	Kötü	Kötü	?	Kötü	İyi	İyi

DNA kaitesini etkileyen önemli faktörlerden biri de tespit süresidir. 12 ve 24 saatleri arasında etanol, aseton, omnifix ya da tamponlu formalin ile tespit edilmiş dokulardan çoğunlukla iyi kalitede DNA elde edilirken, B5, Zenker ya da Bouin solüsyonları ya da beş günden uzun tespit süresinde, kötü kalitede DNA elde edilir (Fan ve Gulley). Blok yaşı arttıkça PZR üretkenliği de azalır. Bloklama süresi iki yıldan az olan bloklarla yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar alınırken, bloklama süresi 15 yıldan fazla olan bloklarla yapılan çalışmalarda olumsuz sonuçlar elde edilir (van Dongen vd 2003). Bunun nedeni blok yaşının artmasına bağlı olarak parçalanmış fragment oluşumunun da artmasıdır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyali

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na başvurmuş ve uygulanan patolojik ve immünohistokimyasal teknikler ile değişik tiplerde B hücreli lenfoma tanısı almış 4'ü konsültasyon olgusu olan, toplam 45 adet parafine gömülü hasta biyopsi materyalleri ile İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, farklı tiplerde B hücreli lenfoma tanısı almış ve farklı tesbit solusyonlarında tesbit edilmiş, aynı hastaya ait 14 adet parafine gömülü biyopsi materyalleri olmak üzere, toplamda 59 hasta materyaliyle çalışılmıştır. 3 adet reaktif lenfoid hiperplazi tonsil materyali ile de poliklonal kontrol olarak çalışılmıştır. Bunların dışında B hücreli lenfoproliferatif hastalık şüphesi olan 2 adet biyopsi materyali de çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan olguların sayısal dağılımları çizelge 3.1.'de verilmiştir. Biyopsi materyallerinin lenfoma tiplerine ve tespit solüsyonlarına göre sayısal dağılımları çizelge 3.2.'de, lenfoma tiplerine ve bloklama yıllarına göre sayısal dağılımları çizelge 3.3.'de ve bloklama yılları ve tespit solüsyonlarına göre sayısal dağılımları da çizelge 3.4. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan olgular ve sayısal dağılımları

B Hücreli Lenfoma Tipi	Toplam Materyal Sayısı
Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DLBCL)	16
Burkitt Lenfoma (BL)	6
Hairy Cell Lösemi (HCL)	4
Foliküler Lenfoma (FL)	9
Kronik Lenfositik Lösemi/Küçük Lenfositik Lenfoma (CLL/ SLL)	9
Mantle Cell Lenfoma (MCL)	5
Marjinal Zon Lenfoma (MZL)	8
Prekürsör B Lenfoblastik Lenfoma (Prekürsör BLL)	2
Toplam hasta sayısı	**59**
Reaktif Lenfoid Hiperplazi	3
Şüpheli	2
Toplam	**64**

Çizelge 3.2. B hücreli lenfoma materyallerinin lenfoma tipleri ve tespit solüsyonlarına göre sayısal dağılımları

B Hücreli Lenfoma Tipi	Materyal Sayısı	Formalin	AFA	Holland	Bilinmeyen
DLBCL	16	7	4	4	1
BL	6	4	1	1	0
HCL	4	4	0	0	0
FL	9	7	1	0	1
CLL/SLL	9	9	0	0	0
MCL	5	4	0	0	1
MZL	8	6	1	1	0
prekürsör BLL	2	1	0	0	1
TOPLAM	**59**	**42**	**7**	**6**	**4**

Çizelge 3.3. B hücreli lenfoma materyallerinin lenfoma tipleri ve bloklama yıllarına göre sayısal dağılımları

B Hücreli Lenfoma Tipi	Materyal Sayısı	2005	2004	2003	2002	2001
DLBCL	16	0	10	4	0	2
BL	6	0	3	0	3	0
HCL	4	1	0	3	0	0
FL	9	4	3	2	0	0
CLL/SLL	9	1	3	2	2	1
MCL	5	2	2	0	0	1
MZL	8	1	3	1	1	2
Prekürsör BLL	2	2	0	0	0	0
TOPLAM	**59**	**11**	**24**	**12**	**6**	**6**

Çizelge 3.4. B hücreli lenfoma materyallerinin bloklama yılları ve tespit solüsyonlarına göre dağılımları

Bloklama Yılı	Materyal Sayısı	Formalin	AFA	Holland	Bilinmeyen
2005	11	9	0	0	2
2004	24	10	7	6	1
2003	12	12	0	0	0
2002	6	6	0	0	0
2001	6	5	0	0	1
TOPLAM	**59**	**42**	**7**	**6**	**4**

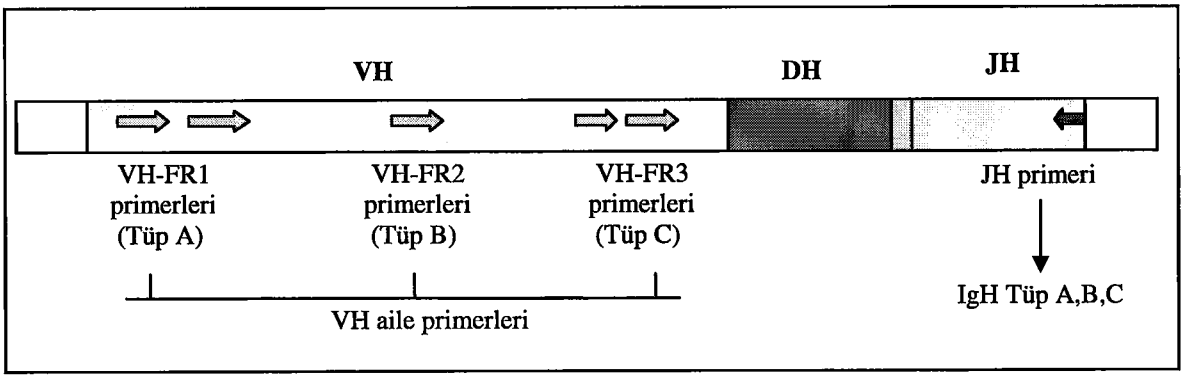
3.1.2. DNA İzolasyon Kiti

QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) kullanılarak parafine gömülü bloklardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
QIAamp® DNA Mini Kiti içinde aşağıda verilen solüsyonlar bulunmaktadır:

1- ATL solüsyonu
2- AL solüsyonu
3- AW1 solüsyonu. Konsantre halde bulunur. Kullanımdan önce belirli bir miktar saf etanolle dilüe edilir.
4- AW2 solüsyonu. Konsantre halde bulunur. Kullanımdan önce belirli bir miktar saf etanolle dilüe edilir.
5- AE solüsyonu
6-Proteinaz K

3.1.3. Primerler

Çalışmamızda multipleks halde, birden fazla tüpte biraraya getirilmiş BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 primerleri kullanıldı. Bu çalışmada, B hücre klonalitesinin saptanabilmesi için, immünoglobulin ağır zincir (IgH) gen bölgelerine uygun primerlerle çalışılmıştır. IgH polipeptit zincirinin çeşitlilik gösteren V bölgesinin farklı düzenlenmelerini (VH-JH ve DH-JH düzenlenmeleri) ve bu düzenlenmelere katılma olasılığı olan farklı sayılardaki gen segment kopyalarının belirlenebilmesini sağlayacak, birden fazla primer tüpü (A,B,C,D ve E primer miks tüpleri) kullanılmıştır. Her bir tüp içerisinde, farklı aile gen segmentlerinin her bir üyesine spesifik olan birden fazla primer ile her gen düzenlenmesinin JH gen bölgesini tanıyacak şekilde sentezlenmiş konsensus JH primeri bulunmaktadır. Klonalite primerlerin primer dizileri çizelge 3.5. ve 3.6.'da, çoğalttıkları bölgeler de şekil 3.1. ve 3.2. 'de verilmiştir.



Şekil 3.1. *IgH (VH-JH) primerleri ve yerleşimleri*

Çizelge 3.5. *IgH (VH-JH) primer dizileri*

Tüp A

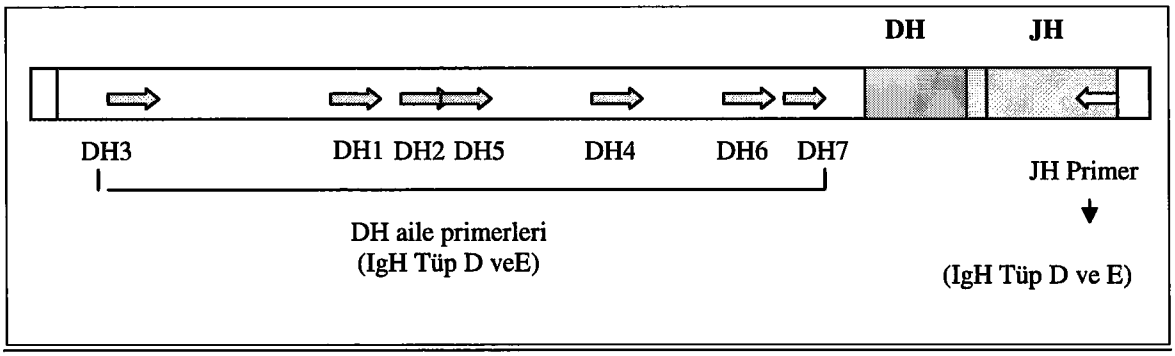
V_H1-FR1	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
V_H2-FR1	GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC
V_H3-FR1	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
V_H4-FR1	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG
V_H5-FR1	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
V_H6-FR1	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG
J_H	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC

Tüp B

V_H1-FR2	CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAA
V_H2-FR2	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGG
V_H3-FR2	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
V_H4-FR2	TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG
V_H5-FR2	GTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGG
V_H6-FR2	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG
V_H7-FR2	TTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAA
J_H	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC

Tüp C

V_H1-FR3	TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
V_H2-FR3	CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA
V_H3-FR3	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
V_H4-FR3	AGCTCTGTGACCGCCGCGGACACG
V_H5-FR3	CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC
V_H6-FR3	GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG
V_H7-FR3	CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG
J_H	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC



Şekil 3.2. *IgH (DH-JH) primerleri ve yerleşimleri*

Çizelge 3.6. *IgH (DH-JH)primer dizileri*

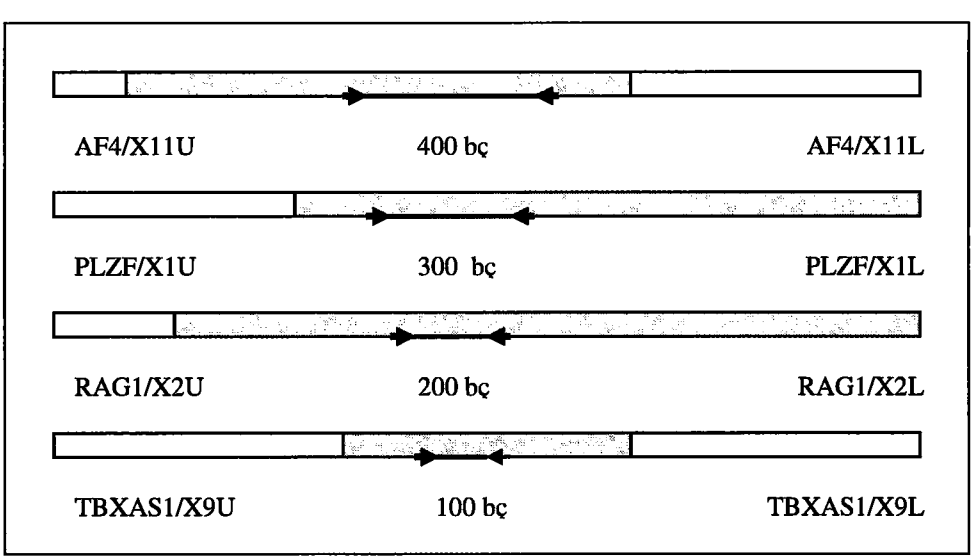
Tüp D

D_H1	GGCGGAATGTGTGCAGGC
D_H2	GCACTGGGCTCAGAGTCCTCT
D_H3	GTGGCCCTGGGAATATAAAA
D_H4	AGATCCCCAGGACGCAGCA
D_H5	CAGGGGGACACTGTGCATGT
D_H6	TGACCCCAGCAAGGGAAGG
J_H	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC

Tüp E

D_H7	CACAGGCCCCCTACCAGC
J_H	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC

Parafine gömülü materyallerden izole edilen DNA örneklerinin kalitesinin anlaşılabilmesi için ise yine BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 tarafından, spesifik olarak sentezlenmiş kontrol primerleri kullanıldı. Bu primerler genomik DNA üzerindeki, belirli gen segment ekzonlarını çoğaltan primerlerdir. Dört ayrı çift primer (her bir gen bölgesi için upstream ve downstream primerleri olmak üzere) tek bir tüp içinde birleştirilmiştir. Her bir primer çifti 100, 200, 300 ve 400 baz çift (bç) olmak üzere farklı uzunluklarda ürün oluşturmaktadırlar. Kontrol primerlerinin primer dizileri çizelge 3.7.'de, çoğalttıkları bölgeler de şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şeki 3.3. *Kontrol primerleri ve yerleşim yerleri*

Çizelge 3.7. Kontrol primerleri

İnsan AF4 geni (ekzon 11) :

AF4 /X11U:	CCGCAGCAAGCAACGAACC
AF4 /X11L:	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC

İnsan promyelositik lösemi zink finger geni (ekzon 1):

PLZF /X1U:	TGCGATGTGGTCATCATGGTG
PLZF / X1L:	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC

İnsan rekombinasyon aktifleştirici geni (ekzon 2):

RAG1 / X2U:	TGTTGACTCGATCCACCCCA
RAG1 / X2L:	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA

İnsan tromboksan sentaz geni (ekzon 9):

TBXAS1 / X9U:	GCCCGACATTCTGCAAGTCC
TBXAS1 / X9L:	GGTGTTGCCGGGAAGGGTT

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler

*DNA polimeraz enzimi: 5u/µl konsantrasyonunda, yüksek ısıda aktif olan *Thermus aquaticus* DNA polimeraz enzimi (Hot Start Taq DNA Polimeraz) (Fermentas Life Sciences).

*10X Hot Start PZR Tamponu [200mM Tris-HCL (25 °C'de PH 8.3), 200mM KCl, 50mM (NH4)2SO4)] (Fermentas Life Sciences).

*25mM MgCl2 (Fermentas Life Sciences)

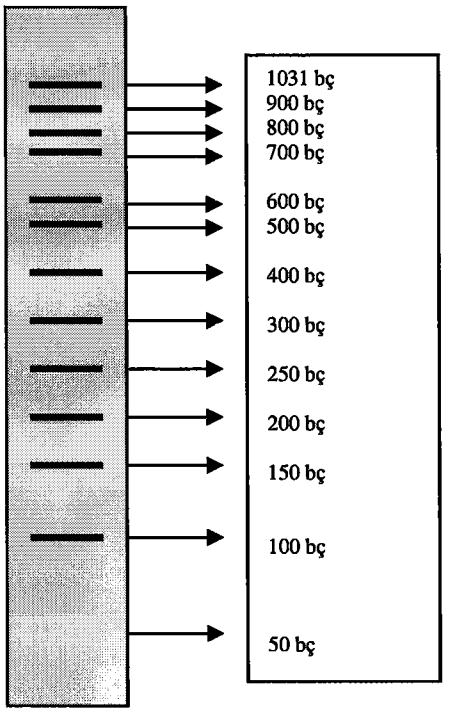
*dNTP (Her biri 100mM olan dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (Fermentas Life Sciences).

3.1.5. Kimyasallar

Agaroz	Prona
Akrilamid	Amresco
Amonyum persülfat	Amresco
Borik asit	Amresco
Bromofenol mavisi	Amresco
EDTA. disodyum, dihidrat	Amresco
Etidyum bromid	Amresco
Gliserol	Sigma
Fenol	Applichem
Kloroform	Applichem
Ksilen	J.T.Baker
Ksilen siyanol	Sigma
Mutlak Etil alkol (EtOH)	J.T.Baker
N,N'-Metilen–bis-Akrilamid	Amresco
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma
TEMED	Amresco
Tris	Amresco

3.1.6. Marker

50 bç DNA marker: 0.1 µg/µl konsantrasyonda (Fermentas Life Sciences). DNA markerının bant açılımı şekil 3.4.'de verilmiştir.



Şekil 3.4. *50 bç DNA markerının bant açılımının gösterimi*

3.1.7. Standart Çözeltiler ve Tamponlar

Akrilamid (%30 , 29:1)

Akrilamid	29 g
N,N'-Metilen–bis-Akrilamid	1g
dH2O ile	100 ml

Amonyum persülfat (%10, w/v)

Amonyum persülfat	1 g
dH2O ile	10 ml

EDTA (0.5 M, PH 8.0)

Disodyum EDTA.2H2O	186.1 g
dH2O	1000 ml

Etidyum Bromid (10 mg/ml)

Etidyum bromid	1 g
dH2O ile	100 ml

Tris-Borik asit-EDTA Tamponu (5X TBE)

Tris	54 g
Borik asit	27.5 g
0.5 M EDTA (PH 8.0)	20 ml

PH sodyum hidroksit (NaOH) peletleriyle 8.0'e ayarlanır.

Jel yükleme boyası (6X, Tip III)

Bromofenol mavisi	% 0.25
Ksilen siyanol	% 0.25
Gliserol	% 30

3.1.8. Tespit Solüsyonları ve İçerikleri

%10 Formalin (%4 formaldehit)

%37-400'lık formaldehit	100 ml
Distile su	900 ml

AFA Tespit solüsyonu

Absolu etanol veya metanol	750 ml
%37-40 formaldehit	200 ml
Glasiyal asetik asit	50 ml

Holland Tespit solüsyonu

Bakır asetat	25 gr
Pikrik asit	40 gr
%37-40 formaldehit	100 ml
Glasiyal asetik asit	5 ml
Distile su	1000 ml ye tamamla

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA İzolasyonu

Farklı tespit solüsyonlarıyla tespit edilip parafine gömülen biyopsi materyallerinden, dokuların büyüklüğüne bağlı olarak 3-6 adet, 10 mikro metre (µm) kalınlığında kesitler kesilerek, 1.5 ml'lik steril ependorf tüplere alındı. Doku kesitlerinin bulunduğu tüplere 1200 mikrolitre (µl) ksilen eklenerek vortekslendikten sonra yüksek hızda 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan peletlere dokunulmadan süpernatantlar pipetle uzaklaştırıldı. Bu şekilde parafinden arındırılan doku kesitleri 1200 µl mutlak etil alkol ilave edildikten sonra vortekslenerek yüksek hızda 5 dakika (dk) santrifüj yapılarak dehidratasyon uygulandı. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantlar, tekrar pipetle uzaklaştırıldı. Bu aşama bir kez daha tekrarlandı. Ependorflar ağzı açık şekilde 37°C etüvde etanol buharlaşana kadar bekletildi (10-15 dk). Parafinden arındırma işlemlerinden sonra QIAamp DNA izolasyon kiti ile dokudan DNA izolasyonuna devam edildi. Etanolü uzaklaştırılmış doku parçaları 180 µl ATL kit tamponuyla tekrar homojen hale getirildi. Dokulara 20 µl proteinaz K eklenerek 56°C sıcak su banyosunda dokular parçalanasıya kadar inkübe edildi (3-4 saat). Bu süre içerisinde parçalanmayan dokulara biraz daha proteinaz K eklenerek gece inkübasyonuna bırakıldı. Tüpler her 20 dk da bir vortekslenerek dokuların daha çabuk parçalanmasına çalışıldı. İnkübasyon sonrası tüpler yüksek hızda kısa süreli olarak santrifüj edilerek kapaktaki bulaşıların çöktürülmesi sağlandı. Santrifüj sonrası 200 µl AL solüsyonu eklenerek 70°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kısa süreli santrifüj edildikten sonra 200 µl mutlak etanol örneklere eklendi. 15 saniye (sn) vortekslendikten sonra tekrar kısa süreli santrifüj yapıldı. Ependorflardaki karışım pipetle QIAamp spin kolonuna aktarıldıktan sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süzüntüyü içeren 2 ml'lik ependorf tüpleri atılarak DNA örneklerini içeren kolonlar yeni efendorflara alındı. QIAamp spin kolonuna 500 µl kit AW1 yıkama solüsyonu eklenip 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Birinci yıkama solüsyonundan sonra II. yıkama solüsyonundan (AW2 solüsyonu) da aynı miktarda eklenip 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek yıkandı. Bu aşamalar sonucunda oluşan süzüntüyü içeren 2 ml'lik ependorflar atılarak yenileri kullanıldı. Son aşama olarak, 100 µl AE kit solüsyonu eklenelek, 5 dk beklendikten sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşama aynı şekilde bir kez daha tekrar edildi. İzolasyon sonrası DNA örnekleri uzun süreli saklanmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

Parafine gömülü hasta doku örnekleri gruplar halinde çalışıldı. İlk çalışılan hasta gruplarında DNA'lar, kit AE solüsyonuyla dilüe edilirken, son hasta gruplarında steril ddH2O ile dilüe edildi. Kit AE solüsyonu kullanılan DNA örneklerine daha sonra fenol-kloroform ekstraksiyonu uygulandı. Bunun için, 100 µl DNA örneğine, 100 µl fenol konulup tüpler alt üst edildi. Aynı miktarda kloroform eklenip alt üst edilen örnekler 8000 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. İki fazdan üst taraftaki süpernatant pipetle alınarak steril ependorf tüplerine aktarıldı.

3.2.2. Spektrofotometrik Ölçüm

DNA izolasyonu sonrasında elde edilen örneklerden 10 µl kullanılarak spektrofotometrede 260 ve 280 dalga boyunda okuma yapıldı (Spectra Max Plus). Elde edilen sonuçlara göre DNA saflığı ve konsantrasyonu hesaplandı.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Farklı tespit solüsyonlarıyla tespit edilmiş, parafine gömülü biyopsi materyallerinden izole edilen DNA'lar, kontrol primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda, 0.2 ml'lik PZR tüplerine, 5 µl 10X Hot Start tamponu (son konsantrasyonu 1X olacak şekilde), 5 µl 2mM dNTP karışımı (son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde), 4 µl 25 mM MgCI2 (son konsantrasyonu 2mM olacak şekilde), 100, 200, 300, 400 bç'lik bölgeyi çoğaltan primerler, son konsantrasyonu 2.5 pmol/µl olacak şekilde eklendi. Son olarak, 0.25 µl [son konsantrasyonu 1.25 ünite (U) olacak şekilde] ve 100 ng DNA eklendikten sonra, steril dH2O eklenerek PZR karışımı 50 µl'ye tamamlandı. PZR örnekleri termocycler ile çoğaltıldı (Perkin Elmer). PZR döngü koşuları çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. PZR döngü koşulları

Primerler	Sıcaklık koşulları	Döngü sayısı
Kontrol primerleri	94°C 2 dk 94°C 45 sn 56°C 45 sn 72°C 45 sn 72°C 10 dk	40
IgH (VH-JH, DH-JH) primerleri	94°C 10 dk 94°C 45 sn 62°C 45 sn 72°C 45 sn 72°C 10 dk	40

Parafine gömülü materyallerden izole edilip kontrol primerleri kullanılarak DNA kalitesi ve çoğaltılabilirliği analiz edilen DNA örnekleri, klonalitenin incelenmesi amacıyla, IgH (VH-JH, DH-JH) klonalite primerleri kullanılarak PZR ile tekrar analiz edildi. Polimeraz zincir reaksiyonunda, 0.2 ml'lik beş ayrı PZR tüpüne, 5 µl 10X Hot Start tamponu (son konsantrasyonu 1X olacak şekilde), 5 µl 2mM dNTP karışımı (son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde), 3 µl 25 mM MgCI2 (son konsantrasyonu 1.5 mM olacak şekilde), 0.25 µl Hot Start Taq DNA polimeraz enzimi (son konsantrasyonu 1.25 U olacak şekilde) eklendi. A, B, C, D ve E olarak adlandırılan PZR tüplerine sırasıyla tüp A, B, C, D ve E primer miksleri ve 100 ng DNA eklenip 50 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan PZR karışımları, uygun sıcaklık koşullarında termocycler ile çoğaltıldı (Perkin Emler). Çoğaltılan PCR ürünleri incelenmek üzere +4°C' ye kaldırıldı.

3.2.4. Heterodupleks Analiz (HD analiz)

Klonalite analiz primerleri [IgH (VH-JH, DH-JH)] ile çoğaltılan PZR ürünleri, 94°C 5 dk Perkin Elmer termocycler'da tutulduktan sonra hemen +4 °C'ye alındı. 60 dk bekletildikten sonra buz üstüne alınarak poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) uygulandı.

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi bu çalışmada iki ayrı amaçla kullanıldı:

1- DNA büyüklüğünü ölçmek: DNA örnekleri %0.8'lik agaroz jele yüklendi. Hassas tartıda uygun miktarda tartılan agaroz, 1X TBE tanponu içinde çözdürüldükten sonra, eritilmek üzere mikrodalga fırında ısıtıldı. Hazırlanan jel miktarına yeterli olan miktarda etidyum bromid eklenip soğutulduktan sonra, önceden hazır edilen jel tankına döküldü. Jel donduktan sonra, 10 µl miktarındaki DNA örnekleri, yaklaşık 2 µl yükleme boyasıyla (6X tip III) ile karıştırılarak jelin kuyucuklarına yüklendi. 100 voltta (V) 30-45 dk yürütüldükten sonra ultra viyole ışık altında görüntülendi (Raytest, Almanya).

2- Kontrol primerleri ile çoğaltılan PZR ürüntülerini incelemek: Yukarıda anlatıldığı üzere, %2' lik agaroz jel hazırlandı. Kontrol primerleriyle çoğaltılan PZR ürünleri 10 µl halinde yaklaşık 2 µl yükleme boyasıyla (6X tip III) birlikte karıştırılarak jelin kuyucuklarına yüklendi. 100 V' da 45-60 dk yürütüldükten sonra ultra viyole ışık altında görüntülendi (Raytest, Almanya).

3.2.6. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

IgH (VH-JH, DH-JH) klonalite primerleri ile çoğaltılmış ve heterodupleks analiz uygulanmış, PZR ürünleri %6 'lık denatüre edici olmayan poliakrilamid jele (non- denaturing poliacrylamide gel) yüklendi.

Camlar, speacerlar ve tarak %70'lik etanolle silinip havada kurutuldu. PAGE tankı hazırlandı (Hoefer, mini dikey jel tankı). Tankın hazırlanmasının ardından, %6'lık denatüre edici olmayan poliakrilamid jel hazırlanarak iki cam arasına sızdırıldı. Denatüre edici olmayan %6'lık poliakrilamid jel içeriği çizelge 3.9.'da verilmiştir. Yaklaşık 1-1.5 saat kurumaya bırakıldı. Jel kuruduktan sonra, 10 µl PZR ürünü, 2 µl 6X tip III jel yükleme boyasıyla karıştırıldıktan sonra jelin kuyucuklarına yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklüklerinin anlaşılabilmesi için, karşılaştırmak amacıyla jele ayrıca, 3,5µl DNA markeri yüklendi. Yükleme sonrası PZR ürünleri 50V'da, 1X TBE tamponu içinde, 2-2.20 saat yürütüldü. Sonrasında iki cam arasındaki jel çıkarılarak, 5 µl Etidyum bromid (10 mg/ml konsantrasyondaki) içeren 50 µl 1X TBE tamponu içine alınarak, 20 dk çalkalayıcı üzerinde çalkalandı. Etidyum bromid ile boyanan jel, sonrasında distile su içinde 5-10 dakika yıkandıktan sonra ultra viyole ışık altında incelenerek, görüntülendi (Raytest, Almanya).

Çizelge 3.9. *%6 denatüre edici olmayan poliakrilamid jel içeriği (100 ml)*

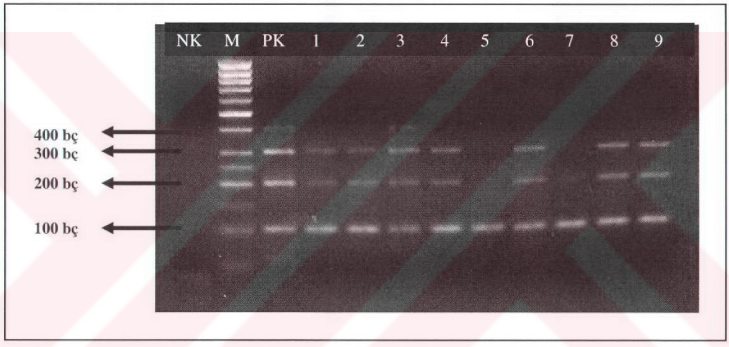
dH2O	59.3 ml
5X TBE Tamponu	20 ml
% 30 Akrilamid	20 ml
%10 Amanyum persülfat (APS)	0.7 ml
TEMED	3.5µl

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

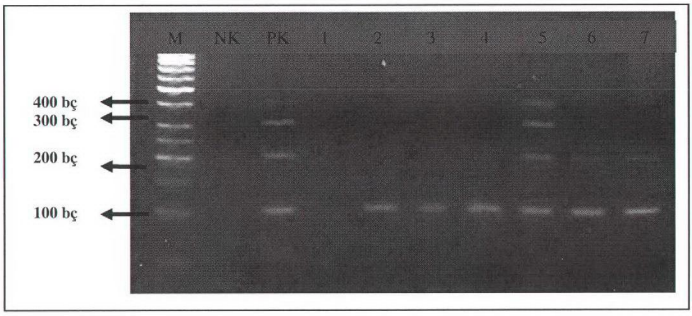
4.1. DNA Kalitesi

Çeşitli tespit solüsyonları ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş biyopsi materyallerinden izole edilen DNA örneklerinin spektrofotometrede konsantrasyon ve saflığının ölçülmesi ile sırasıyla 116 ile 4340 µg/ml arasında değişen DNA konsantrasyon değerleriyle, 1.5 ile 2.5 arasında değişen saflık değerleri elde edildi. DNA saflığı ile B hücre klonalitesinin saptanması arasında önemli bir ilişki görülmedi.

Farklı tespit solüsyonları ile tespit edilmiş 59'u B hücreli lenfoma, 3'ü reaktif lenfoid hiperplazi ve 2'si B hücreli lenfoproliferatif hastalık şüpheli, toplam 64 biyopsi materyalinden elde edilen DNA örnekleri, BIOMED-2 kontrol primerleri (100-400 bç) kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Kontrol PZR sonrası, PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde incelenmesiyle farklı materyal DNA'larında, farklı uzunluklarda (100,200,300 ve 400 bç) bantlar saptandı. Kontrol genlerinin PZR reaksiyon sonuçlarının jel resimleri şekil 4.1. ve 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Kontrol gen PZR reaksiyon sonuçlarının agaroz jelde gösterimi 1. 1-8. kuyucuklardaki hasta biyopsi materyalleri, formalin solüsyonuyla tespit edilmiştir. 9. kuyucuktaki ise AFA solüsyonuyla tespit edilmiştir. NK: Negatif kontrol, PK Pozitif kontrol. %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. (M: 50 bç DNA marker).*



Şekil 4.2. *Kontrol gen PZR reaksiyon sonuçlarının agaroz jelde gösterimi 2. 1-4. ve 6. kuyucuklardaki hasta biyopsi materyalleri holland solüsyonu ile, 5 ve 7. kuyucuklardakiler formalin solüsyonu ile tespit edilmiştir. NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol .%2'lik agaroz jel kullanılmıştır. (M: 50 bç DNA marker).*

Kontrol genlerinin PZR reaksiyonu ile çoğaltılması sonucu, 64 olgunun 54'ünde ≤400 bç, 6'sında ≤200 bç uzunluklarda DNA elde edilirken, 4'ünde hiçbir bant elde edilemedi.
Toplam 59 B hücreli lenfoma biyopsi materyallerinin kontrol primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda, 50'sinde (%84.8) ≤400 bç, 6'sında (%10.2) ≤200 bç uzunluklarda DNA elde edilirken, 3'ünde (%5) hiçbir bant elde edilemedi. ≤400 bç'lik DNA fragmenti elde edilen biyopsi materyallerinin 46'sında (%92) klonalite saptanırken, 4'ünde (%8) klonalite saptanamadı. ≤200 bç uzunlukta DNA elde edilen biyopsi materyallerinde ise, 5'inde (%83,3) klonalite saptanamazken 1'inde (%16,7) klonalite saptandı. Kontrol gen PZR reaksiyonu sonucu bant gözlenemeyen biyopsi materyallerinin 2'sinde (%66,7) klonalite saptanamazken, 1'inde (%33,3) klonalite saptandı.

Tespit solüsyonlarının DNA kalitesi üzerine etkisi incelendiğinde, formalinle tespit edilmiş toplam 42 hasta materyalinin kontrol primerleri ile çoğaltılması sonucunda, 39'unda (%92.8) ≤400 bç'lik, 2'sinde (%4,8) ≤200 bç'lik uzunlukta DNA elde edilirken, 1'inde (%2,4) hiçbir bant elde edilemedi. AFA ile tespit edilmiş toplam 7 hasta materyalinin tamamından B hücre klonalitesinin saptanabileceği kalitede DNA örneği elde edildi ve bu tespit solüsyonu ile tespit edilen materyallerin tamamında klonalite saptandı. Holland solüsyonu ile tespit edilmiş toplam 6 hasta materyalinin 3'ünde kontrol primerleriyle (%50) ≤200 bç'lik DNA edilirken, 2'sinde (%33,3) hiç bant elde edilemedi, buna karşılık 1'inde (%16,7) ≤400 bç'lik DNA elde edildi. Tespit solüsyonlarına göre biyopsi materyallerinden elde edilen DNA örneklerinin uzunluk dağılımları ve klonalitenin saptanma oranlarına göre yüzdeleri çizelge 4.1.'de verilmiştir. Çalışılan materyallerin bloklama yıllarına göre biyopsi materyallerinden elde edilen DNA örneklerinin uzunluk dağılımları ve klonalitenin saptanma oranlarına göre yüzdeleri çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Tespit solüsyonlarına göre biyopsi materyallerinden elde edilen DNA örneklerinin uzunluk dağılımları ve klonalitenin saptanma oranlarına göre yüzdeleri*

		≤400 bç			≤200 bç			Bant yok		
Tespit solüsyonu	**Toplam**	**P**	**N**	**T**	**P**	**N**	**T**	**P**	**N**	**T**
Formalin	**42**	36/42 (%85,7)	3/42 (%7,1)	39/42 (%92.8)	1/42 (%2,4)	1/42 (%2,4)	2/42 (%4,8)	1/42 (%2,4)	0/42 (%0)	1/42 (%2,4
AFA	**7**	7/7 (%100)	0/7 (%0)	7/7 (%100)	0/7 (%0)	0/7 (%0)	0 (%0)	0/7 (%0)	0/7 (%0)	0 (%0
Holland	**6**	0/6 (%0)	1/6 (%16,7)	1/6 (%16,7)	0/6 (%0)	3/6 (%50)	3/6 (%50)	0/6 (%0)	2/6 (%33,3)	2/6 (%33,
Bilinmeyen	**4**	3/4 (%75)	0/4 (%0)	3/4 (%75)	0/4 (%0)	1/4 (%25)	1/4 (%25)	0/4 (%0)	0/4 (%0)	0 (%0
Toplam	**59**	46/50 **(%92)**	4/50 **(%8)**	50/59 **(%84,8)**	1/6 **(%16,7)**	5/6 **(%83,3)**	6/59 **(%10,2)**	1/3 **(%33,3)**	2/3 **(%66,7)**	3/59 **(%5**

P: Pozitif sonuç. BIOMED-2 klonalite primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda klonalite saptananlar
N: Negatif sonuç. BIOMED-2 klonalite primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda klonalite saptanamayanlar
T: Toplam sayı

Çizelge 4.2. *Çalışılan materyallerin bloklama yıllarına göre biyopsi materyallerinden elde edilen DNA örneklerinin uzunluk dağılımları ve klonalitenin saptanma oranlarına göre yüzdeleri*

		≤400 bç			≤200 bç			Bant yok		
Blok yılı	**Toplam**	**P**	**N**	**T**	**P**	**N**	**T**	**P**	**N**	**T**
2005	**11**	9/9 (%100)	0/0 (%0)	9/11 (%81,8)	0/0 (%0)	1/1 (%100)	1/11 (%9,05)	1/1 (%100)	0/0 (%0)	1/11 (%9,05)
2004	**24**	18/19 (%94,7)	1/19 (%5,3)	19/24 (%79,2)	0/0 (%0)	3/3 (%100)	3/24 (%12,5)	0/0 (%0)	2/2 (%100)	2/24 (%8,3)
2003	**12**	8/11 (%72,7)	3/11 (%27,3)	11/12 (%91,7)	0/0 (%0)	1/1 (%100)	1/12 (%8,3)	0/0 (%0)	0/0 (%0)	0/12 (%0)
2002	**6**	6/6 (%100)	0/0 (%0)	6/6 (%100)	0/0 (%0)	0/0 (%0)	0/6 (%0)	0/0 (%0)	0/0 (%0)	0/6 (%0)
2001	**6**	5/5 (%100)	0/0 (%0)	5/6 (%83,3)	0/0 (%0)	1/1 (%100)	1/6 (%16,7)	0/0 (%0)	0/0 (%0)	0/6 (%0)

P: Pozitif sonuç. BIOMED-2 klonalite primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda klonalite saptananlar
N: Negatif sonuç. BIOMED-2 klonalite primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda klonalite saptanamayanlar
T: Toplam sayı

4.2. B Hücre Klonalitesinin Saptanması

59'u B hücreli lenfoma, 3'ü reaktif hiperplazi ve 2'si B hücreli lenfoproliferatif şüpheli olmak üzere toplam 64 materyal, klonal IgH gen düzenlenmelerinin saptanabilmesi için, multipleks PZR ve takiben heterodubleks analiz (HD) ile incelendi. Multipleks PZR analizi ile tamamlanmış IgH (VH-JH) gen düzenlenmelerinin klonalitesinin saptanabilmesi için VH-FR1 (Tüp A), VH-FR2 (Tüp B), VH-FR3 (Tüp C) aile primerleri ile JH konsensus primeri kullanılarak, tamamlanmamış IgH (DH-JH) gen düzenlenmelerinin klonalitesinin saptanabilmesi için de DH(1-6) (Tüp D) ve DH7 (Tüp E) primerleri ile JH konsensus primeri kullanılarak, farklı tespit solüsyonları ile tespit edilip, parafine gömülmüş materyallerden izole edilen DNA örnekleri çalışıldı. HD analiz sonrasında denatüre edici olmayan PAGE ile inceleme sonucunda, beklenen aralıklarda, açık olarak gözlenen, bir ya da iki bant monoklonal olarak değerlendirilirken, smear görünümler poliklonal olarak değerlendirildi. Beş ayrı multipleks PZR tüpü için beklenen bant büyüklükleri çizelge 4.3.'de verilmiştir.

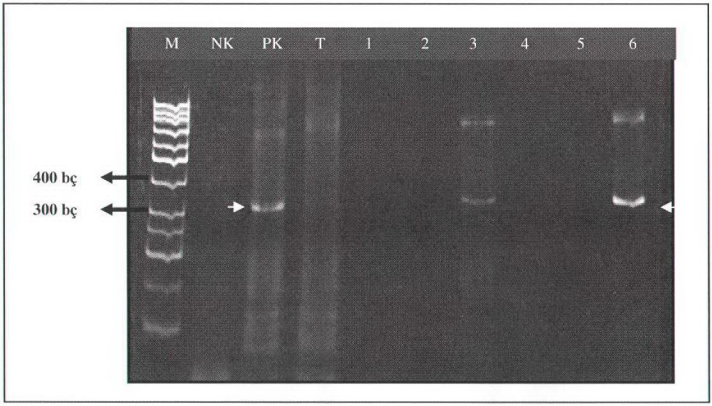
Çizelge 4.3. Multipleks PZR analizi sonrasında elde edilen PZR ürünlerinin beklenen bant uzunlukları aralıkları

Multipleks PZR	**Büyüklük aralığı (nt)**
IgH VH-JH	Tüp A: 310-350
	Tüp B: 250-295
	Tüp C: 100-170
IgH DH-JH	Tüp D: 110-290 (DH1/2/4/5/6-JH) +390-420 (DH3-JH)
	Tüp E: 100-130

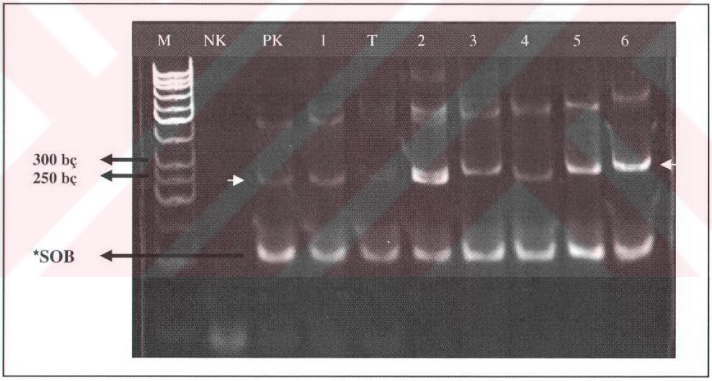
nt: nükleotid

Her bir hasta için A,B,C,D ve E olmak üzere toplam beş ayrı tüpte multipleks PZR çalışması yapıldı ve ardından da PZR ürünlerine HD analiz yöntemi uygulandı. 59 B hücreli lenfoma hastasının VH-FR1/JH primer setlerini içeren A tüpünün 33'ünde (%55,9), VH-FR2/JH primer setlerini içeren B tüpünün 27'sinde (%45,8), VH-FR3/JH primer setlerini içeren C tüpünün 23'ünde (%39), DH(1-6)/JH primer setlerini içeren D tüpünün 26'sında (%44,1) klonal IgH düzenlenmesi saptanırken, DH7/JH primerini içeren E tüpünde hiçbir klonal IgH düzenlenmesi saptanamadı. PZR ürünlerinin HD analizi sonucunda, çalışılan her bir tüpde beklenen aralıklarda bantlar gözlendi. Çalışılan hastaların çoğunluğunun E tüpünde ise beklenen aralık dışında, 211 baz çifti uzunluğunda, düzenlenmemiş germline gen bölgesinin çoğaltılmasından kaynaklanan ve spesifik olmayan bantlar saptandı. A,B,C,D ve E tüpleri için multipleks PZR ve HD analiz sonuçlarının jel resimleri şekil 4.3.'de verilmiştir.

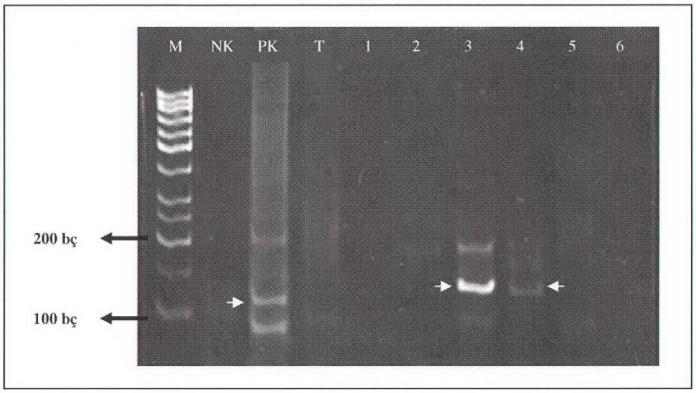
a. IgH tüp A (VH FR1/JH)



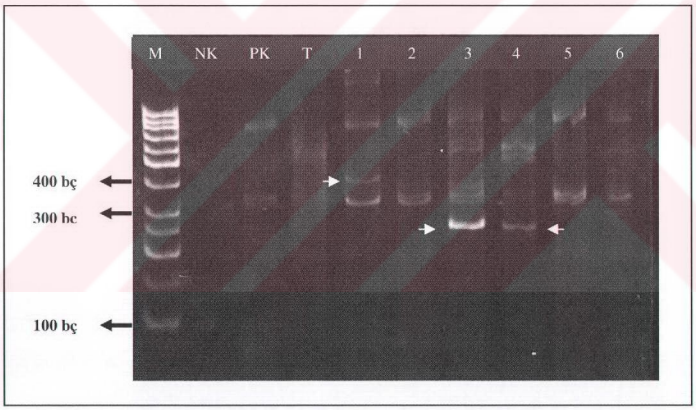
c. IgH tüp B(VH FR2/JH)



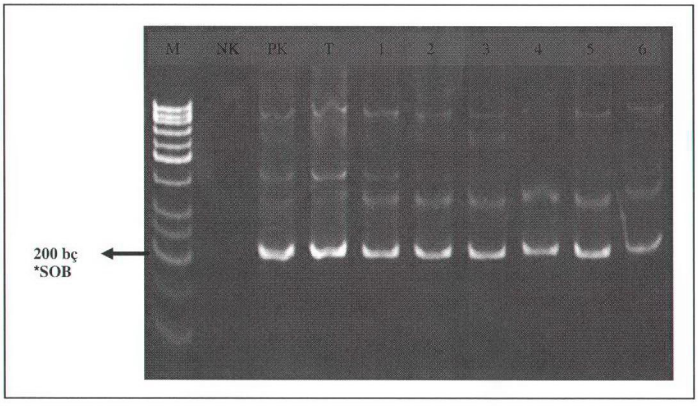
c. IgH tüp C (VH FR3/JH)



c. IgH tüp D [DH(1-6)/JH]



e. IgH tüp E (DH7/JH)



Şekil 4.3. *Çalışılan hastaların IgH (VH-JH) ve (DH-JH) düzenlenmelerinin multipleks PZR analiz, HD analiz ve PAGE incelemesi sonrasındaki, her bir tüp için (A,B,C,D ve E) ayrı ayrı jel görüntüleri.* ***a.*** *IgH tüp A (VH FR1/JH). PK (pozitif kontrol) ile 3 nolu ve 6 (310-360 bç) nolu hastalarda pozitif monoklonal bantlar elde edildi.* ***b.*** *IgH tüp B (VH FR2/JH). PK (pozitif kontrol) ile 1, 2, 3, 4, 5, 6 (250-295 bç) nolu hastalarda pozitif monoklonal bantlar elde edildi.* ***c.*** *IgH tüp C (VH FR3/JH). PK (pozitif kontrol) ile 3 ve 4 (100-170 bç) nolu hastalarda monoklonal bantlar elde edildi.* ***d.*** *tüp D [DH(1-6)/JH]. 1 nolu (390-420), 3 ve 4 (110-290) nolu hastalarda pozitif monoklonal bantlar elde edildi.* ***e.*** *Hiçbir hastada E tüpünde pozitif monoklonaliteye saptanamadı. Tüm tüplerdeki T (tonsil) örneklerinde poliklonal sonuç elde edildi (poliklonal kontrol). NK: DNA içermeyen negatif kontrol. *SOB: Spesifik olmayan bant (~110 bç, B tüpü için;(211 bç, E tüpü için). %6'lık denatüre edici olmayan poliakrilamid jel kullanılmıştır. (M: 50 bç DNA marker).*

Multipleks PZR analizinde kullanılan primer setlerine ve B hücreli lenfoma tiplerine göre klonalitenin saptanma oranları çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışılan primer setleri ve B hücreli lenfoma tiplerine göre klonalitenin saptanma oranları

		FR1/JH Primerleri		FR2/JH Primerleri		FR3/JH Primerleri		DH(1-6)/JH Primerleri		DH7/JH Primerleri	
B Hücreli Lenfoma	**Hasta Sayısı**	**P**	**N**	**P**	**N**	**P**	**N**	**P**	**N**	**P**	**N**
DLBCL	**16**	6	10	5	11	4	12	9	7	0	16
BL	**6**	2	4	1	5	3	3	2	4	0	6
HCL	**4**	2	2	2	2	2	2	1	3	0	4
FL	**9**	5	4	2	7	4	5	2	7	0	9
CLL/ SLL	**9**	6	3	6	3	4	5	5	4	0	9
MCL	**5**	4	1	3	2	1	4	2	3	0	5
MZL	**8**	6	2	7	1	4	4	4	4	0	8
Prekürsör BL	**2**	2	0	1	1	1	1	1	1	0	2
Toplam	**59**	33/59	26/59	27/59	32/59	23/59	36/59	26/59	33/59	0/59	**59/59**
Başarı oranı	**%81,4**	**(%55,9)**	**(%44,1)**	**(%45,8)**	**(%54,2)**	**(%39)**	**(%61)**	**(%44,1)**	**(%55,9)**	**(%0)**	**(%100)**

Multipleks PZR sonucunda, beş tüpte saptanan toplam sonuca göre, 59 B hücreli lenfoma hasta materyalinin 48'inde (%81,4) klonalite saptanırken, 11'inde saptanamadı. Kontrol olarak kullanılan 3 reaktif hiperplazi materyalinin tamamı poliklonal olarak saptandı. Yanlış-pozitif sonuç elde edilmedi. B hücreli lenfoproliferatif hastalık şüphesi olan ve immünohistokimyasal ve in-situ teknikleriyle klonal olup olmadığı kesin olarak belirlenemeyen iki hastadan birinde klonalite saptanırken, diğerinde klonalite saptanmadı. B hücreli lenfoma tiplerine göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları çizelge 4.5.'de, B hücreli lenfoma tiplerine ve tespit solüsyonlarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları ise çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. B hücreli lenfoma tiplerine göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları

B Hücreli Lenfoma	**Hasta Sayısı**	**Klonalite Saptanan Hasta Sayısı**	**Klonalite Saptanamayan Hasta Sayısı**	**Başarı Oranı**
Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DLBCL)	16	11	5	**%68,8**
Burkitt Lenfoma (BL)	6	5	1	**%83**
Hairy Cell Lösemi (HCL)	4	2	2	**%50**
Foliküler Lenfoma (FL)	9	8	1	**%88,9**
Kronik Lenfositik Lösemi / Küçük Lenfositik Lenfoma (CLL/ SLL)	9	9	0	**%100**
Mantle Cell Lenfoma (MCL)	5	4	1	**%80**
Marjinal Zon Lenfoma (MZL)	8	7	1	**%87,5**
Prekürsör B Lenfoblastik Lenfoma	2	2	0	**%100**
Toplam	**59**	**48**	**11**	**%81,4**

Çizelge 4.6. B hücreli lenfoma tiplerine ve tespit solüsyonlarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları

B Hücreli Lenfoma	Hasta Sayısı	Formalin		AFA		Holland		Bilinmeyen		Başarı Oranı
		P	N	P	N	P	N	P	N	
DLBCL	16	6/7 (%85,7)	1/7 (%14,3)	4/4 (%100)	0/0 (%0)	0/0 (%0)	4/4 (%100)	1/1 (%100)	0/0 (%0)	**%68,8**
BL	6	4/4 (%100)	0/4 (%0)	1/1 (%100)	0/0 (%0)	0/0 (%0)	1/1 (%100)	-	-	**%83**
HCL	4	2/4 (%50)	2/4 (%50)	-	-	-	-	-	-	**%50**
FL	9	6/7 (%85,7)	1/7 (%14,3)	1/1 (%100)	0/0 (%0)	-	-	1/1 (%100)	0/0 (%0)	**%88,9**
CLL/SLL	9	9/9 (%100)	0/9 (%0)	-	-	-	-	-	-	**%100**
MCL	5	4/4 (%100)	0/4 (%0)	-	-	-	-	0/0 (%0)	1/1 (%100)	**%80**
MZL	8	6/6 (%100)	0/6 (%0)	1/1 (%100)	0/0 (%0)	0/0 (%0)	1/1 (%100)	-	-	**%87,5**
İmmatür BL	2	1/1 (%100)	0/1 (%0)	-	-	-	-	1/1 (%100)	0/0 (%0)	**%100**
TOPLAM	**59**	38/42 **(%90,5)**	4/42 **(%9,5)**	7/7 **(%100)**	0/7 **(%0)**	0/0 **(%0)**	6/6 **(%100)**	3/4 **(%75)**	1/4 **(%25)**	**%81,4**

P: Pozitif sonuç. BIOMED-2 klonalite primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda klonalite saptananlar
N: Negatif sonuç. BIOMED-2 klonalite primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda klonalite saptanamayanlar

Çalışmada, farklı tespit solüsyonlarıyla tespit edilmiş 59 B hücreli lenfoma hasta biyopsi materyali ile çalışıldı. Bu materyallerin 42'si formalin, 7'si AFA 6'sı holland tespit solüsyonları ile tespit edilmişti. Çalışılan materyallerin 4'ü konsültasyon vakası olduğu için hangi tip tespit solüsyonu ile tespit edildiği bilinmemekteydi. Multipleks PZR reaksiyonuyla beş ayrı tüpte saptanan toplam sonuçlara göre klonalite, formalin ile tespit edilmiş materyallerde % 90,5 oranında saptanırken, AFA ile tespit edilmiş materyallerde %100 oranında saptandı. Holland tespit solüsyonuyla tespit edilmiş materyallerin ise hiçbirinde klonalite saptanamadı. Tespit solüsyonlarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları çizelge 4.7.'da verilmiştir.

Çizelge 4.7. Tespit solüsyonlarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımları ve başarı oranları

Tespit Solüsyonu	Hasta Sayısı	Klonalite Saptanan Hasta Sayısı	Klonalite Saptanamayan Hasta Sayısı	Başarı Oranı
Formalin	42	38	4	**%90,5**
AFA	7	7	0	**%100**
Holland	6	0	6	**%0**
Bilinmeyen	4	3	1	**%75**
Toplam	**59**	**48**	**11**	**%81,4**

Çalışmada, 2001-2005 yılları arasında, farklı tespit solüsyonlarıyla tespit edilip, parafine gömülmüş doku örnekleriyle çalışıldı. Büyük çoğunluğu formalinle tespit edilmiş 2001, 2002, 2003 ve 2005 yıllı biyopsi materyallerinde klonalite, sırasıyla %100, %100, %66,7 ve %90,9 oranlarında saptanırken, formalin, AFA ve

Holland ile tespit edilmiş materyalleri içeren 2004 yıllı biyopsi materyallerinde ise %75 oranında klonalite saptandı. Bloklama yıllarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımı ve başarı oranları çizelge 4.8.'de, bloklama yıllarına ve tespit solüsyonlarına göre sayısal dağılımları ve başarı oranları ise çizelge 4.9.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Bloklama yıllarına göre klonalite saptanan ve saptanamayan hastaların sayısal dağılımı ve başarı oranları

Yıllar	Hasta Sayısı	Klonalite Saptanan Hasta Sayısı	Klonalite Saptanamayan Hasta Sayısı	Başarı Oranı
2005	11	10	1	**%90,9**
2004	24	18	6	**%75**
2003	12	8	4	**%66,7**
2002	6	6	0	**%100**
2001	6	6	0	**%100**
Toplam	**59**	**48**	**11**	**%81,4**

Çizelge 4.9. B hücre klonalitesinin saptanma oranlarının bloklama yıllarına ve tespit solüsyonlarına göre dağılımları ve başarı oranları

		Formalin		AFA		Holland		Bilinmeyen		
Yıllar	**Hasta Sayısı**	**P**	**N**	**P**	**N**	**P**	**N**	**P**	**N**	**Başarı Oranı**
2005	1	9/9 (%100)	0/0 (%0)	-	-	-	-	1/2 (%50)	1/2 (%50)	**%90,9**
2004	24	10/10 (%100)	0/0 (%0)	7/7 (%100)	0/0 (%0)	0/0 (%0)	**6/6** (%100)	1/1 (%100)	0/0 (%0)	**%75**
2003	12	8/12 (%66,7)	4/12 (%33,3)	-	-	-	-	-	-	**%66,7**
2002	6	6/6 (%100)	0/0 (%0)	-	-	-	-	-	-	**%100**
2001	6	5/5 (%100)	0/0 (%0)	-	-	-	-	1/1 (%100	0/0 (%0)	**%100**
Toplam	**59**	38/42 **(%90,5)**	4/42 **(%9,5)**	7/7 **(%100)**	0/0 (%0)	0/0 **(%0)**	6/6 **(%100)**	3/4 **(%75**	1/4 **(%25)**	**%81,4**

P: Pozitif sonuç. BIOMED-2 klonalite primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda klonalite saptananlar
N: Negatif sonuç. BIOMED-2 klonalite primerleri ile PZR reaksiyonu sonucunda klonalite saptanamayanlar

DNA klonalitesi saptanan blokların saflık ortalaması 1,85 (SD= 0,097) ortancası 1,85 (IQR =0,175) bulundu. Klonalitesi saptanamayan blokların saflık ortalaması 1,87 (SD= 0,238) ortancası 1,85 (IQR =0,28) bulundu. DNA miktarı incelendiğinde klonalite saptanan bloklarda ortalama miktar 455,3 ng/µl (SD = 299,5), median 392 ng/µl (IQR =360,5) saptandı. Klonalite saptanamayan bloklarda ortalama miktar 252 ng/µl (SD = 105,6), median 253 ng/µl (IQR =177) saptandı.

DNA kalitesi incelendiğinde klonalite saptanan olgularda ortalama 351 bç (SD = 0,779) uzunluğunda DNA bulunduğu , (Median 400 bç (IQR =100 bç)) görüldü. Klonalite saptanamayan olgularda DNA kalitesi ortalaması 200 bç (SD =154,9) ortanca 200 bç (IQR 300) bulundu. Vaka sayısı nedeniyle net bir eşik değer saptama amaçlı istatistik test yapılamadı.

DNA eldesi ile ilgili faktörler ve doku özelliklerinin klonalite saptanması ile ilişkisi incelendiğinde, DNA saflığının tüm olgularda dağılımının normal olduğu görüldü. Saflıkla klonalite saptanabilme arasında bir ilişki bulunmadı (p=0,737 Student t).

DNA miktarı ve kalitesi ile klonalite saptanması arasındaki ilişki incelendiğinde, DNA miktarının (p=0,015, Mann Whitney) ve DNA kalitesinin (p=0,002 Mann Whitney) klonalite saptanabilme olasılığını arttırdığı görüldü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Rutin olarak tesbit edilmiş ve parafine gömülmüş doku örneklerinden DNA molekülünün izolasyonu, moleküler analizlerin çalışılmasında arşiv materyallerinin kullanımına imkan sağlamaktadır. Bu materyallerle çalışılan moleküler analizlerde karşılaşılan en büyük sorun nükleik asit parçalanmasına bağlı yanlış-negatif sonuçlardır (Zsikla vd 2005).

Parafine gömülü biyopsi materyallerinden elde edilen DNA örneklerinin kalitesi ve çoğaltılabilme özellikleri, biyopsi materyalinin kalınlığı, tesbit solüsyonunun tipi, tesbit solüsyonunda bekleme süresi, analiz öncesi bekletilme süresi, blok yaşı, DNA izolasyon prosedürü ve PZR inhibitörlerinin izolasyonu gibi bazı faktörlerden etkilenmektedir (van Dongen vd 2003).

Yapılan çoğu çalışmada, tesbit solüsyon tiplerinin DNA kalitesi üzerine olan etkileri gösterilmiştir (Tbakhi vd 1999, van Dongen vd 2003). Farklı tesbit solüsyonlarında tesbit edilmiş, parafine gömülü biyopsi materyallerinde, BIOMED-2 kontrol primerleri ile yaptığımız çalışma sonucunda, biyopsi materyallerinin 50/59'unda (%84,8) B hücre lenfomalarının gösterilebileceği, iyi kalitede çoğaltılabilir DNA elde edilmiştir. %10'luk tamponlanmamış formalinle tesbit edilmiş biyopsi materyallerinin %92,8'inde , AFA ile tesbit edilmiş olanların %100'ünde, Holland ile tesbit edilmiş olanların ise %16,7'sinde iyi kalitede, çoğaltılabilir DNA elde edilmiştir. Elde edilen bu oranlar, kullanılan tesbit solüsyon tiplerinin DNA kalitesi üzerine olan farklı etkilerini göstermektedir. Bu sonuçlara göre DNA kalitesi tesbit solüsyonlarının tipinden etkilenmektedir. Tamponlu formalin ve AFA içinde nükleik asit korunumunun iyi olduğu bildirilirken, holland solüsyonu için kötü olduğu bildirilmektedir (Doğan vd 2004). Çalışmamızda 100, 200, 300 ve 400 bç uzunlukta gen bölgelerini çoğaltan kontrol primerleri kullanarak elde ettiğimiz bu bulgular yapılan diğer birçok çalışmalarla uyum göstermektedir. Ancak Tbakhi ve arkadaşlarının 1999'da yaptığı çalışmada holland solüsyonuyla tesbit edilmiş olgularda % 94 başarı elde edilmiştir. Çalışmamızda ise holland solüsyonuyla tesbit edilmiş materyallerde %0 başarı sağlanmıştır.

Tamponlanmamış formalinle tesbitli dokuların 2/42'sinde (%4.8) düşük kaliteli DNA elde edilirken, 1/42'sinde (%2,4) spektrofotometrik ölçüm ile DNA varlığı gösterildiği halde kontrol primer ile çalışma sonrasında bant görülememiştir. Bu, dokuların tesbit solüsyonlarındaki tesbit işlem süresinin uzun olmasından da kaynaklanabilir. Tamponlanmamış formalin solüsyonlarının stabil olmadığı ve zamanla formik asite okside olarak asidik ortam oluşturduğu bilinmektedir. Asidik çevre de nükleik asit parçalanmalarına neden olmaktadır. Formalinle tesbit edilmiş dokularda başta tesbit süresi olmak üzere pH, tuz konsantrasyonu ve ısı gibi birçok faktör DNA'nın parçalanmasını etkilemektedir (Doğan vd 2004). Moleküler analizler için, tesbit süresinin formalin tesbitli dokularda DNA'nın korunmasında en etkili faktör olduğu çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir (Zsicla vd 2005). Tesbit süresinin uzaması dokunun sertleşip kırılmasına ve DNA parçalanmasına neden olmaktadır.

Rutin histopatolojik inceleme amaçlı takiplerde nükleik asitlerin tesbiti dokunun genel tesbiti çerçevesinde gerçekleşmektedir. Formalin, elde edilmesi kolay, düşük toksiteye sahip , ucuz ve iyi nitelikli morfoloji sağlaması gibi nedenlerle histopatolojik rutinde en çok kullanılan tesbit solüsyonu olmasına rağmen, DNA molekülünün yüksek kalitede elde edilmesi üzerine olumsuz etkileri vardır. Dokuların formalin solüsyonuyla tesbitinde, sıcaklık artırıldığında DNA zincirlerinin sarmal yapısı çözülmeye başlar ve 65°C'den sonra DNA ile formaldehit arasında etkileşme gündeme gelir. Normal takip işlemlerinin uygulandığı oda sıcaklığında (20-25°C) formaldehit ile DNA'nın denatürasyonu gerçekleşmez. Ancak takip işleminin ileri aşamalarında (parafinizasyon) sıcaklık yükseldiği için doku içinde kalıntı halinde az miktarda bulunabilen formaldehitin etkisi söz konusu olabilir. Özetle formaldehit ile tesbit edilmiş parafin takipli dokuda, başka zarar verici etkenler söz konusu değilse, DNA korunmuş vaziyettedir. Ancak bu çok büyük moleküllerin %30 kadarı tesbit sırasında kaybedilir. Formalin ile tesbit edilmiş dokulardan elde edilebilen DNA parça uzunlukları kısıtlıdır. (Doğan vd 2004). Tamponlanmış formalin ile tesbit edilmiş dokulardan, tamponlanmamış formalinle tesbit edilmiş dokulara göre daha iyi kalitede ve çoğaltılabilir özellikte DNA elde edilmektedir. Moleküler patoloji laboratuvarlarında kullanılmak üzere, rutin biyopsi materyallerinde tamponlanmış tesbit solüsyonunun kullanılması önerilmektedir (Zsicla vd 2005).

PZR ve moleküler düzeyde çalışmalar söz konusu olduğunda en elverişli DNA parçaları etanol tesbitli dokulardan elde edilmektedir. Alkoller dokularda belirgin bir kimyasal değişiklik meydana getirmezler. DNA, alkoller içinde kollabe olur. Alkolde denatüre olmuş DNA rehidratasyon sonucunda orijinal şekline kısmen döner. Alkolde tesbit edilmiş nükleik asitlerin çöktürülerek elde edilmesinde tuzların varlığı ve konsantrasyonu belirleyici rol oynamaktadır (Doğan vd 2004). Çalışmamızda buna benzer şekilde AFA tesbit solüsyonuyla tesbit edilmiş doku parçalarının tamamında (%100) iyi kalitede DNA elde edilmiştir. AFA tesbit solüsyonun %75'ini saf etanol veya metanol oluşturmktadır. Bu nedenle DNA molekülünün korunmasında ve iyi kalitede DNA elde edilmesinde, formalin solüsyonundan üstün olduğu görülmektedir.

Parafine gömülü biyopsi materyallerinden izole edilen DNA moleküllerinin kalitesi, blok saklama süresinin uzunluğuna da bağlıdır. En iyi sonuçlar çoğunlukla iki yıllık yada daha az yaşta bloklardan elde edilirken, 15 yıllık ve üzeri olanlarda DNA parçalanmasının fazla olduğu bildirilmiştir. (Goelz vd 1985). Yaptığımız çalışmada, 2001-2005 yılları arasında tesbit edildikten sonra parafine gömülerek bloklanmış, arşiv materyalleri ile çalışılmıştır. Bu materyallerden 2005 yılına ait olanların %81,8'inde, 2004 olanların %79,2'sinde, 2003 olanların %91,7'sinde, 2002 yılına ait olanların %100'ünde, 2001 olanların %83,3'ünde iyi kalitede DNA elde edilmiştir. Bu oranlar tesbit solüsyonları dikkate alınmadan elde edilen oranlardır. En büyük grubu oluşturan ve en sık kullanılan formalin ile tespit edilen olgular değerlendirildiğinde 2003 yıllı bloklardan elde edilen DNA örneklerinde %67 oranında klonalite saptanırken, diğer tüm yıllarda tesbit edilmiş dokuların %100'ünde klonalite saptanmıştır. Bu durum beş yıllık zaman periyodunun DNA kalitesini etkilemediğini göstermektedir. 2003 yılında başarısız olan olgularda yukarıda belirtilen diğer faktörlerin etkisinin olduğu düşünülmektedir. Diss ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları çalışmada, 30 yıla kadar olan bloklarda bile amplifikasyonu başarıyla gerçekleştirmişlerdir. Buna göre elde edilen sonuçlar diğer çalışmalarla uyum göstermektedir.

Çalışma sonuçlarımızda klonalite saptanabilmesinin DNA saflığı ile ilişkili olmadığı görülmüştür (p=0,737)(Student t). Bu sonuç kullanılan kitin yüksek saflıkta DNA eldesini sağlayacak nitelikte olduğunu göstermektedir. Bu çalışma verilerine göre DNA miktarı (p=0,015, Mann Whitney) ve kalitesinin (p=0,002, Mann Whitney) klonalite saptanabilmeyi önemli ölçüde etkileyen parametreler olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar parafinden elde edilen DNA örneklerinde klonalite çalışılmadan önce tanımlanan kontrol primerleri ile DNA parçalarının boyutlarının ölçümünün yapılması gerektiğni göstermektedir.

Farklı tesbit solüsyonlarında tesbit edilmiş, parafine gömülü biyopsi materyallerinin multipleks PZR analiz, ardından HD analiz incelemesi sonucunda, 59 B hücreli lenfoma hastasının 48'inde (%81,4) klonal IgH düzenlenmesi saptanırken, 11'inde klonal düzenlenme saptanmamıştır. IgH düzenlenmesi saptanamayan olguların formalinle tesbit edilmiş olanlarında, kontrol primerleri ile belirlenen düşük kaliteli DNA'dan kaynaklı yanlış-negatif sonuç elde edilmiştir. Formalin tesbit solüsyonunda dokuların uzun süre bekletilmesi DNA parçalanmasını arttırmakta yani DNA kalitesini ve PZR başarısını azaltmaktadır. Yanlış-negatif sonuç elde etme olasılığı, DNA kalitesi dışında, IgH gen düzenlenmesine katılması olası olan çoğu ya da tüm gen segmentlerinin saptanmasına olanak sağlayacak yeterli miktarda ve uygun primerlerin kullanılmamasından da kaynaklanabilmektedir. Uzun yıllardır yapılan PZR klonalite çalışmalarında, VH gen segmentlerinin FR2/JH ya da FR3/JH bölgelerinin korunmuş ve yüksek homoloji gösteren bölgelerine uygun olarak tasarlanmış konsensus primerleri ile çalışılmıştır ve genellikle nested veya semi-nested PZR metodu kullanılmıştır. (Diss vd 1994, Lozano vd 1996, Chuang vd 2003, Amara vd 2005). Kullanılan bu konsensus primerlerin, IgH düzenlenmelerine katılması olası tüm VH gen segmentlerini tanıyamamasından ya da bağlanacağı bölgede somatik mutasyon meydana gelmesinden kaynaklı olarak primer, DNA segmentini yakalayamamakta bu durum da başarısızlığa yol açmaktadır. Yüksek moleküler ağırlıklı iyi kalitede, saf DNA'nın elde edildiği taze doku materyallerinin kullanıldığı bazı çalışmalardaki negatif sonuçların sebebi konsensus primerlerinin somatik mutasyonlar nedeniyle başarısızlığıdır. (Lozano vd 1996). Formalinle tesbit edilmiş, parafine gömülü materyallerden elde edilen DNA örnekleriyle, FR2/JH ve FR3/JH konsensus primerlerinin kullanıldığı semi-nested PZR çalışmaları sonucunda, klonalite saptanma başarısı %88 (Diss vd 1994) ve %87 (Chuang vd 2003) oranlarında bulunmuştur. Aile spesifik primerlerin kullanılmasıyla ve multipleks PZR yöntemi ile klonalitenin saptanma oranı artmaktadır. Somatik mutasyonlardan kaynaklı negatif sonuç elde edilme olasılığı minimuma indirilmektedir. Multipleks PZR ve ardından uygulanacak uygun analiz yöntemleri ile klonalite saptama oranı artırılabilmektedir. Çalışmamızda yüksek sensitiviteye sahip ve yanlış-negatif sonuç olasılığı minumuma inmiş multipleks PZR ve ardından HD analiz yöntemini uygulanmıştır. Multipleks PZR ve ardından uyguladığımız ve tüm hücreler arasında %5 oranındaki neoplastik klonu bile tesbit edebilecek derecede yüksek sensitivitesi olan HD analiz sonrasında, tüm olgular

arasında %81,4 oranında klonalite saptanmıştır. Formalinle tesbit edilmiş materyallerde bu oran %90,5, AFA ile tespit edilmiş materyallerde %100, hollande ile tespit edilmiş materyallerde ise % 0 bulunmuştur. Önceki çalışmalardan (Diss vd 1994), (Chuang vd 2003) daha yüksek oranda başarılı sonuç alınması, kullanılan multipleks PZR ve HD analizi ile somatik mutasyonlardan kaynaklı negatif sonuçların minumuma indirilmesinden kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Gonzalez ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada, B hücreli non-Hodgkin lenfomalarında, düzenlenmiş IgH'den çoğaltılmış VDJ segmentlerini farklı stratejilerle çalışarak karşılaştırmışlardır. Yapılan bu çalışmaya göre yanlış-negatif ve yanlış-pozitif sonucun %0 olduğu PZR sonrası analiz uygulamaları, PZR ürünlerinin HD analizi ardından PAGE uygulaması ve gümüş nitrat ile boyanarak incelemesidir. Gonzalez ve arkadaşlarının gümüş nitratla ile etidyum bromid ile boyama sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmada, çalışılan 45 B hücreli lenfoma hastasının 7'sinde yanlış-negatif sonuç elde edilmiştir. Doğru sonucun elde edilmesinde PZR ürünlerinin uygun yöntemlerle incelenmesi de büyük önem taşımaktadır. HD analiz ve PAGE sonrasında gümüş nitrat ile boyama ile klonalitenin saptanma oranı artırılabilmektedir. Ancak bizim çalışmamızda gümüş nitrat boyama yöntemi kullanılmamıştır. Klonalitenin saptanma oranını artırmak için PZR ürünleri, duyarlılığı daha yüksek olan (%0,5-1) gen tarama yöntemi (gene scanning) uygulanarak da incelenebilir. HD analiz gibi hızlı ve basit olan bu yöntem pahalı olması nedeniyle tercih edilmemektedir (van Dongen vd 2003).

Klonal IgH düzenlenmesinin saptanamadığı olguların 6'sı holland tesbit solüsyonu ile tesbit edilmiş olup, bir tanesi de konsültasyon hastası olup tespit solüsyon tipi bilinmemektedir. Holland solüsyonu ile tesbit edilmiş materyallerden birinde iyi kalitede DNA elde edilmesine rağmen klonalite saptanmamıştır. Bu da yanlış-negatif sonucun %0 olduğu gümüş nitrat yerine etidyum bromid ile boyamadan dolayı bantların görünememesinden kaynaklı olabilir. Holland ile tesbit edilen ve klonalitenin saptanamadığı materyallerin 3'ünde düşük kaliteli DNA elde edilirken, 2'sinde spektrofotometrik ölçümle yerterli miktarda DNA bulunduğu gösterilmesine rağmen, materyallerin kontrol primerleri ile çalışılması sonucunda hiçbir bant görülememiştir. Bu materyallerde de DNA kalitesine bağlı olarak klonal IgH düzenlenmesi saptanamamıştır.

A tüpünde, FR1/JH primerleri ile klonalite çalışılması sonucunda, 59 B hücreli lenfoma olgusunun 33'ünde (%55,9) klonal IgH düzenlenmesi saptanırken, 26'sında saptanamamıştır. Saptanamayanların 5 tanesinde düşük kalitede DNA örneği ile çalışılmıştır (≤200 baz çift). Bu olguların çalışmamasının nedeni çoğaltılmak istenen bölge için (310-360 bç) uygun kalitede DNA örneğinin bulunmayışı olduğu düşünülmüştür. BIOMED-2 kontrol primerleri ile yapılan analiz sonrasında DNA kalitesinin iyi olduğu saptanan olgularda klonalitenin saptanamaması, DNA kalitesi ile açıklanamamaktadır. DNA kalitesi iyi olan olgularda klonalitenin saptanamaması, düzenlenmiş Ig gen bölgelerinde meydana gelen somatik mutasyonlardan ileri gelebileceği belirtilmektedir (van Dongen vd 2003). DNA kalitesi iyi olan olguların 5'i DLBCL, 3'ü BL, 1'i HCL, 4'ü FL, 3'ü CLL , 1'i MZL'dan oluşmaktadır. Bu lenfomalar klonal olduğu kesin proliferasyonlardır. Bu nedenle, bu tüpte bulunan negatif sonuçlar lenfoma tipiyle direkt ilişkili değildir.

B tüpünde, FR2/JH primerleri ile klonalite çalışılması sonucunda, 59 B hücreli lenfoma olgusunun 27'sinde (%45,8) klonal IgH düzenlenmesi saptanırken, 32'sinde saptanamamıştır. Saptanamayanların 6'sında düşük kalitede DNA örneği ile çalışılmıştır (≤200 baz çift). Bu olguların çalışmamasının nedeni çoğaltılmak istenen bölge için (250-295 bç) uygun kalitede DNA örneğinin bulunmayışı olduğu düşünülmüştür. DNA kalitesinin iyi olduğu gösterilen olgularda klonalitenin saptanamaması, DNA kalitesi ile açıklanamamaktadır. DNA kalitesi iyi olan olguların 7'si DLBCL, 5'i BL, 1'i HCL, 8'i FL, 3'ü CLL/SLL, 1'i prekürsör BL'dan oluşmaktadır. Bu lenfomalar klonal olduğu kesin proliferasyonlardır. Bu nedenle, bu tüpte bulunan negatif sonuçlar lenfoma tipiyle direkt ilişkili değildir.

FR3/JH primerleri ile klonalite çalışılması sonucunda, 59 B hücreli lenfoma olgusunun 23'ünde (%39), klonal IgH düzenlenmesi saptanırken, 36'sında (%61) saptanamamıştır. Saptanamayanların 3'ünde kontrol primerleri ile çalışma sonrasında 100 baz çiftlik bantlar elde edilmiştir. Çoğaltılmak istenen bölge 100-170 bç uzunluğunda olduğu için bu olgularda klonalite saptanamamıştır. DNA kalitesi iyi olan olgularda IgH düzenlenmesinin saptanamaması DNA kalitesi ile açıklanamamaktadır. DNA kalitesi iyi olan olguların 8'i DLBCL, 3'ü BL,2'si HCL, 5'i FL, 5'i CLL/SLL , 4'ü MCL, 7'si MCL, 1'i prekürsör BL'dan oluşmaktadır. Bu lenfomalar klonal olduğu kesin proliferasyonlardır. Bu nedenle, bu tüpte bulunan negatif sonuçlar lenfoma tipiyle direkt ilişkili değildir.

FR1/JH primerleri ile çoğaltılan düzenlenmiş gen bölgeleri 310-360 bç, FR2/JH primerleri ile çoğaltılan gen bölgeleri 250-295 bç, FR3/JH çoğaltılan gen bölgeleri ise 100-170 bç uzunluğundadır. DNA kalitesine bağlı olarak alınan yanlış sonuçların A tüpünde en fazla, C tüpünde ise en az olması beklenirken yaptığımız çalışmada bunun tersi gözlenmiştir. Diss ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları çalışmada, formalinle tespit edilmiş, parafine gömülü materyallerden elde ettikleri DNA örneklerinde FR2/JH ve FR3/JH konsensus primerlerini kullanarak klonalite çalışmışlardır. Çalışmaları sonucunda, FR2 primeri ile klonaliteyi %67 oranında saptarken, FR3/JH primerleri ile %81oranında saptamışlardır. Bu oran her iki primerle %88'e yükselmiştir. Bizim çalışmamızda, tesbit solüsyonuna bağlı olmaksızın FR2/JH ve FR3/JH aile spesifik, multipleks primer setleri kullanılarak yapılan multipleks PZR sonucunda bu oran, %62,7 bulunmuştur. Formalinle tespit edilmiş, parafine gömülü materyallerde ise bu oran % 73,8'dir. Ancak bu oran A,B ve C tüplerinin tümünün çalışılması sonucunda %83,3'e yükselmektedir. Kullanılan primerlerin spesifik olarak tasarlandığı bu üç FR bölgesinde somatik mutasyonların gerçekleştiği bilinmektedir. IgK, Igλ hafif zincir gen düzenlenmelerinin, Bcl-1 ve bcl-2 translokasyonlarının gösterilmesi ile de B hücreli lenfomalarda, klonalitenin saptanma oranı artacağı bildirilmektedir. (van Dongen vd 2003).

DH(1-6)/JH primer seti kullanılarak gerçekleştirilen multipleks PZR sonrasında, 59 olgunun 26'sında (%44,1) klonal IgH düzenlenmesi saptanırken, 33'ünde (%55,9) klonalite saptanamamıştır. DH-JH gen düzenlenmelerinin çoğunlukla görüldüğü B-ALL olgularının çalışmamızda yer almaması nedeniyle , D tüpünde yüksek değerde klonalite saptanma oranı beklenmemektedir. Tamamlanmamış gen düzenlenmeleri, B hücreli akut lenfoblastik lösemilerde (B-ALL) görülür. Multiple myeloma gibi en matür olan lenfoma tipinde de olduğu gibi diğer matür lösemi ve lenfomalarda da nadir olarak görülmektedir. Matür lenfomalarda tamamlanmamış gen düzenlenmelerine nadir olarak rastlanmasına rağmen, tamamlanmamış DH-JH düzenlenmelerinde somatik mutasyonların oluşmaması nedeniyle, klonalite saptanma oranını artırmak amacıyla ek bir basamak olarak kullanılmaktadır.

DH7/JH primerleri ile yapılan multipleks PZR analiz sonucunda, klonalite saptanamamıştır. Çalışılan olguların çoğunluğunda, düzenlenmeye katılmayan germline gen bölgelerinin çoğaltılmasından kaynaklı, 211 bç uzunluğunda, spesifik olmayan bantlar gözlenmiştir. Bu sonuçlar van Dongen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçları ile de uyumludur (çalıştıkları olguların sadece 3'ünde bu primer ile klonaliteyi saptamışlardır). Bunun nedeni, DH7 gen segmentinin, fetal B hücrelerinde sık düzenlenen, erişkin B hücrelerinde ise nadir olarak düzenlenen gen segmenti olmasıdır. FR1-3/JH primerleri ile saptanamayan klonal IgH düzenlenmeleri, bazı olgularda sadece DH/JH primerleri ile saptanmıştır. Bu da klonalite saptanma oranını artırdığını göstermektedir.

Her bir hasta için A,B,C,D ve E olmak üzere toplam beş ayrı multipleks PZR çalışması yapılmış ve ardından da PZR ürünlerine HD analiz uygulanmıştır. Bunların sonucunda, 59 B hücreli lenfoma hastasının VH-FR1/JH primer setlerini içeren A tüpünün 33'ünde (%55,9), VH-FR2/JH primer setlerini içeren B tüpünün 27'sinde (%45,8), VH-FR3/JH primer setlerini içeren C tüpünün 23'ünde (%39), DH(1-6)/JH primer setlerini içeren D tüpünün 26'sında (%44,1) klonalite saptanırken, DH7/JH primerini içeren E tüpünde ise hiçbir klonal IgH düzenlenmesi saptanmamıştır. Çalışılan bütün tüplerin toplamında, olguların 48'inde (%81,4) klonalite saptanmıştır. Sadece formalinle tespit edilmiş parafine gömülü biyopsi materyallerinde bu oran %90,5'dir.

B hücreli lenfomalarda, IgH gen düzenlenmelerinin moleküler düzeyde gösterilmesine ek olarak IgK ,Igλ ve bcl-1 ve bcl-2 translokasyonlarının gösterilmesi de klonalitenin saptanma oranını yükselteceği bilinmektedir (van Dongen vd 2003). Ancak bu çalışmada bu basamaklar kullanılmamıştır. IgH ile başarısız bulunan olgularda hafif zincir açısından immunhistokimyasal yöntemlerle de saptanamaması halinde sözü geçen basamakların PZR ile denenmesi yapılabilinir. Yanlış-negatif sonuçlarının minimuma indirilmesi için ayrıca PZR ürünlerinin HD analiz ve PAGE yöntemine ek olarak gümüş nitratla boyanması önerilmektedir (Gonzalez vd 1999). Ancak bizim serimizde bu denenmemiştir.

Sonuçta, tesbit solüsyon tipi ve tesbit süresinin B hücreli lenfoma olgularında klonalitenin saptanması üzerine büyük etkisi vardır. Yaptığımız çalışma sonrasında moleküler teknikler için kullanılacak materyalin tesbitinde AFA ve formalin tesbit solüsyonunun Holland tesbit solüsyonuna göre daha uygun olduğu görülmüştür. Beş yaş ve altı bloklarda blok yaşının B hücre klonalitesinin saptanması üzerine fazla bir

etkisinin olmadığı görülmüştür. B hücreli lenfoproliperatif hastalıkların rutin arşiv materyalleri kullanılarak PZR yöntemi ile yüksek güvenilirlikte saptanması için, moleküler tanı için kullanılacak materyalin DNA parçalanmasına en az etkisi olan tesbit solüsyonları ile tesbit edilmesi gerekmektedir. Bizim çalışmamızda B hücreli lenfomaların saptanmasında en iyi sonuç alkol içeren AFA solüsyonuyla tesbit edilmiş materyallerden elde edilmiştir. Rutin tanı çalışmalarında AFA solüsyonu kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Abbas, AK., Lichtman, AH., Pober, JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. A Harcourt Health Sciences Company, 41, 125, USA.

Amara, K., Trimeche, M., Baccouche, D., Zaidi, S., Sriha, B., Korbi, S. 2005. Analysis of immunoglobulin heavy chain genes rearrangement by PCR from paraffin-embedded tissue in B-cell lymphomas in Tunisia. Ann Biol Clin, 63(1); 75-81.

Bottara, M., Berti, E., Biondi, A., Migone, N., Crosti, L. 1994. Heteroduplex analysis of T cell receptor gamma gene rearrangementsfor diagnosis and monitoringof cutaneous T cell lymphomas. Blood, 83; 3271-3278.

Bourguin, A., Tung, R., Galili, N., Sklar, J. 1990. Rapid nonradiactive detection of clonal T cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasm. Prog Natl Acad Sci USA, 87; 8536-8540.

Chen, YT., Whitney, KD., Chen, Y. 1994. Clonality analysis of B-cell lymphoma in fresh-frozen and paraffin-embedded tissues: the effects of variable polymerase chain reaction parameters. Mod Pathol, 7(4); 429-434.

Chuang, SS., Lin, CN., Shen, FC., Liao, PJ., Liao, YL., Chang, JH., Tsai, YC., Cho, CY., Huang, W., 2003. Detecting clonal rearragement in non-Hodgkin's Iymphomas in Twain by polimerase chain reaction. Leukemia and Lymphoma, 44(1); 117-121.

Coura, R., Prolla, JC., Meurer, L., Ashton-Prolla, P. 2005. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol, 58(8); 894-895.

Davis, TH., Yockey, CE., Balk, SP. 1993. Detection of clonal immunoglobulin gene rearrangements by polymerase chain reaction amplification and single-strand conformational polimorphism analysis. Am J Pathol, 142; 1841-1847.

Diss, TC., Liu, Hx., Isaacson, P6. 2002. Improvements to B cell clonality analysis using PCR amplification of immunoglobulin light chain genes. J Clin Pathol, 55;98-101.

Diss, TC., Pan, L., Peng, H., Wothwespoon, AC., Isaacson, PG. 1994. Sources of DNA for detecting B cell monoclonality using PCR. J Clin Pathol, 47; 493-496

Diss, TC., Peng, H., Wotherspoon, AC., Isaacson, PG., Pan , L. 1993. Detection of monoclonality in low-grade B-cell Iymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and Iymphoma type. J Pathol, 169; 291-295.

Doğan, Ö., Ahıskalı, R., Çakalağaoğlu, F., Özkan, N., Ekicioğlu, G., Şalva, E., Safalı, M., Mete, Ö. 2004. Patolojide temel histopatolojik laboratuvar teknikleri. Türk hematoloji derneği meslek içi eğitim kursu, 13, İstanbul.

Dolcetti, R. ve Boiocchi, M., 1996. Cellular and moleculer bases of B-cell clonal expansions. Clin and Exp Rheumatology, 14; 3-13.

Fon, H. Ve Gulley ML. DNA extraction from paraffin-embedded tissues. Methods in Molecular Medicine, 49; 1-91. Totowa

Födinger, M., Winkler, K., Mannhalter, C., Chott, A. 1999. Combined polymerase chain reaction approach for clonality detection in Iymphoid neoplasms. Diagn Mol Pathol, 8(2); 80-91.

Fuksuhima, PI., Nguyen, PK., O'Grady, P., Stetler-Stevenson, M. 1996. Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia. Cytometry, 26; 243-252.

Garcia-Sanz, R., Lopez-Peraz, R., Langerak AW., Gonzalez, D., Carmen Chillon, MC., Valanza tegui, A., Mateos, MV., Alaejos, I., Honzalez, M., van Dangen, JJM., san Miguel, Jf. 1999. Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assesment in multiple myeloma. Haematologica, 84; 328-335

Goelz, SE., Hamilton, SR., Vogelsitein, B. 1985. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Commun, 130; 118-126.

Gonzalez, D., Balanzategui, A., Garcia-Sanz, R., Gutierrez, N., Seabra, C., van Dongen, JJM., Gonzalez, M., san Miguel, JF. 2003. Incomplete DJH rearrangements of the IgH gene are frequent in multiple myeloma patients: 17; 1398-1403.

Gonzalez, M., Gonzalez, D., Lopez-Peraz, R., Garcia-Sanz, R., Chillon, Mc., Balanzategui, A., Mateos, Mc., Alejos, I., Langerak, AW., Orfao, A., van Dongen, JJM., San Miguel, JF. 1999. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assesments in B cell non-Hodgkin's Iymphoma. A comparison between different strategies. Haematologica, 84; 779-784.

Greiner, TC., Raffeld, M., Lutz, C., Dick, F., Jaffe, EF. 1995. Analysis of T cell receptor γ gene rearrangements by denaturing gradient gel elecrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. Am J Pathol, 146; 46-55.

Hayashi, Y., Fulcayama, M., Funata, N., Hishima, T., Oba, T., Koike, M. 1999. Polymerase chain reaction screening of immunoglobulin heavy chain and T cell receptor γ gene rearrangements: A practical approach to molecular DNA analysis of non-Hodgkin's Iymhoma in a surgical pathology laboratory. Pathology International, 49; 110-117.

Heller, MJ., Burgart, LJ., Ten Eyck, CJ., Anderson, ME., Greiner, TC., Robinson, RA. 1991. An efficient method for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by sonication. BioTechnigues, 11(3); 372-377.

Hoeve, MA., Krol, ADG., Philippo, K., Derksen PWB., Veenendaal, RA., Schuring, E., Kluin, Phm., van Krieken, JHJM. 2000. Limitation of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. J Clin Pathol, 53; 197-200.

Inghirami, G., Corradini, P., Ceserman, E., Knowles, DM. 1993. Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell non-Hodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polimerase chain reaction. Lab Invest., 68(6); 746-57.

Jaffe, ES., Haris, NL., Stein, H., Vardiman, JW (eds). 2001. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Pres, Lyon.

Klug, WS. 2002. Genetik Kavramlar (Çeviri : C. Öner) 6. baskı, Palme Yayıncılık, 567.

Kneba, M., Bolz, I., Linke, B., Hiddemann, W. 1995. Analysis of rearranged T cell receptor beta-chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA seguencing and automated high resolution PCR fragment analysis. Blood, 86; 3930-3937.

Küppers, E., Willenbrock, K., Rajewsky, K.,Hansmann, ML. 1995. Light chain gene rearrangements in frozen and paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. Am J Pathol, 147(3); 806-814.

Landman-Parker, J., Aubin, J., Delabesse, E., et all. 1996. Simplified strategies for minimal residual disease detection in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Br J Haematol, 95; 281-290.

Langerak, AW., Szezeponski, T., Wan der Bars, M. Wolver-Tettero, ILM., van Dongen, JJM. 1997. Heteroduplex PCR analysis of rearrangemed T cell receptor genes for clonality, Leukemia, 11; 2192-2199.

Leal. E., Flores, MAE., Lopez-Guido, B., Aguilar-Luna, C., Aguilar-Lopez, L., Jaloma-Cruze, AR., Medina, C., Barros-Nunez, P. 2003. Detection and monitoring of clonality in perypheral blood and bone marrow of patients with B-cell lymphoproliferative disorders. Hematological Oncology, 21; 25-31.

Letvin, BW., Wallace, PK., Muirhead, KA., Hensler, GL., Kashatus, WH., Horan, PK. 1990. An improved clonal excess assay using flow cytometry and B-cell gating. Blood, 75; 1178-1185.

Linke, B., Bolz, I., Fayyazi, A., von Hofen, M., Pott, C., Bertram, J et al. 1997. Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobin heavy chain genes. Leukemia, 11; 1055-1062.

Linke, B., Pyttlich, J., Tiemann, M., et all. 1995. Identification and structural analysis of rearranged immunoglobin heavy chain genes in lymphomas and leukemias. Leukemia, 9; 840-847.

Lorenzen, J., Hansmann, ML., Fischer, R. 1994. Determination of clonality in lymphoproliferative diseases using polymerase chain reaction. Pathologe, 15(2); 96-102.

Lozano, MD., Tierens, A., greiner, TC., Wickert, RS., Weisenburger, DD., Chan, WC. 1996. Clonality analysis of B-Lymphoid proliferations using the polymerase chain reaction. Cancer, 77;1349-1355.

Macintyre EA., ve Delabesse, E. 1999. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of Iymphoid malignancies, Seminars in Hematology 36(4); 373-389.

Matsuda, F., Ishii, K., Bourvagnet, P., Kuma, K., Hayashido, H., Miyata, T., Honjo, T. 1998. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobin heavy chain variable region locus. J Exp Med, 188(11); 2151-2162.

Medeiros, LJ. Ve Carr, J. 1999. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas, Arch Pathol Lab Med, 123; 1189-1207

Mitha, N. ve McGlennen, RC. Methods to detect clonal gene rearrangements in lymphomas and leukemias. Methods in Molecular Medicine, 49; 189-209

Müler-Hermelink, Hk. ve Greiner, A. 1998. Molecular analysis of human immunoglobulin heavy chain variable genes (IgH) in normal and malignant B cells. Am J Pathol, 153(5); 1341-1346.

Provan, AB., Hodges, E., Smith, AG., Smith, JL. 1997. Use of paraffin wax embedded bone marrov trephine biopsy specimens as a source of archival DNA. J Clin Pathol, 45(9); 163-165.

Reed, TJ., Reid, A., Wallberg, K., O'Leary, TJ., Frizzera, G. 1993. Determination of B-cell clonality in paraffin-embedded lymph nodes using the polymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol, 2(1);42-49.

Roitt, V., Brostof, J., Male, D. 2001.Immunology, Mosby, 30-83, Edinburg

Sandberg, Y., Heule, I., Lam, K., Lugtenburg, PJ., Wolvers-Fettero, ILM., van Dongen, JJM. 2003. Molecular immunoglobulin / T-cell receptor clonality analysis in cutaneous lymphoproliferations. Experience with BIOMED-2 standardized polymerase chain reaction protocol. Haematologea, 88; 659-670.

Segal, GH., Jorgensen, T., Masih, AS., Braylan, RC. 1994. Optimal primer selection for clonality assesment by polymerase chain reaction analysis: Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type. Human Pathol., 25(12); 1269-1275.

Shi, SR., Datar, R., Liu, C., Wu, L., Zhang, Z., Cote, RJ., Taylor, CR. 2004. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrival in alkaline solution. Histochem Cell Biol, 122; 211-218.

Smith, BR., Weinberg, DS., Robert, NJ., Towle, M., Luther, E., Pinkus , GS. 1984. Circulating monoclonal B lymphocytes in non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med , 311; 1476-1481

Stefanoff, CG., Hassan, R., Gonzalez, AC., Andrade, LA., Tabak, DG., Romano, S., Zalcberg, IR. 2003. Laboratory strategies for efficient handling of paraffin-embedded tissues for molecular detection of clonality in non-hodgkin lymphomas. Diagn Mol Pathol, 12(2); 79-87.

Tbakhi, A., Totos, G., Pettay, JD., Myles, J., Tubbs, RR. 1999. The effect of fixation on detection of B-cell clonality by polymerase chain reaction. Mod Pathol, 12(3); 272-278.

Tewari, D. 2000. Clonal analysis of the human B-cell repertoire using a heteromobility assay. Clin Diagn Lab Immunol, 7(3); 507-509.

Tokgöz, G.1997. Klinik immünopatoloji. ANTIP A.Ş Yayınları, 7-24, Ankara

Tünger. A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M. 1998. Mikrobiyoloji 2000. Asya Tıp yayımcılık, 493, İzmir.

van Dongen, JJM., Langerak AW., Brüggemann, M., Evans, PAS., Hummel, M., Lavender, FL., Delabesse, E., Davi, F., Schuuring, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, JHJM., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, He., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, JL., Morgan, GJ., Kneba, M., ve Macintyre, AE. 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia, 17(12); 2257-23-17.

van Dongen, JJM., Wolwers-Tettero, ILM. 1991. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: basic and technical aspect . Clin Chim Acta, 198; 1-91.

van Dongen, JJM.,Wolwers-Tettero, ILM. 1991. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II : possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. Clin Chim Acta, 198; 93-174.

Voena, C., Latetto, M., Astolfi, M., Provan, D., Gribben, JG., Boccadora, M., Pileri, A., Corradini, P. 1997. A novel nested-PCR strategy for detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. Leukemia, 11; 1793-1798.

Zsikla, V., Baumann, M., Cathomas, G. 2004. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. J Clin Pathol., 57; 654-656.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Çankırı'da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Ankara'da tamamladı.1997 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden 2001 yılında yüksek derece alarak, Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 2002 yılında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji anabilim dalında yüksek lisansını tamamladı.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Moleküler Patoloji Ünitesinde 2002 yılından bu yana Biyolog olarak görev yapmaktadır.