T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE NOTCH1 VE XPO1 GENLERİNDEKİ VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

ELİF TUNALI ÖZEN

Referans no: 10072019

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE NOTCH1 VE XPO1 GENLERİNDEKİ VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

ELİF TUNALI ÖZEN

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi

Proje No: 2016/290

EDİRNE – 2019

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Hilmi TOZKIR danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Elif TUNALI ÖZEN tarafından tez başlığı "Kronik Lenfositik Lösemide NOTCH1 ve XPO1 Genlerindeki Varyasyonların Araştırılması" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 27/06/2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

JÜRİ BAŞKANI

Ünvanı Adı Soyadı

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

Ünvanı Adı Soyadı

Doç. Dr. Çiğdem KEKİK ÇINAR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu proje Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016/290 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir. Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'a, öğrencilik hayatım boyunca her konuda yardımını benden esirgemeyen saygı değer hocam Doç. Dr. Hakan GÜRKAN'a, tez konumun belirlenmesinde ve yazımında destek ve ilgisini benden esirgemeyen Öğr. Gör. Engin ATLI ve Dr. Öğr. Üyesi Selma DEMİR'e ve Dr. Öğr. Üyesi Emine İkbal ATLI'ya, tüm çalışma arkadaşlarıma, eşime ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**
GENEL BİLGİLER **3**
LENFOMALAR **3**
LÖSEMİLER **6**
GEREÇ VE YÖNTEMLER **18**
BULGULAR **28**
TARTIŞMA **35**
SONUÇLAR **39**
ÖZET **40**
SUMMARY **41**
KAYNAKLAR **42**
ŞEKİLLER **50**
TABLOLAR **51**
ÖZGEÇMİŞ **52**
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ATM	: Ataksi Telenjiektazi Mutasyon
CD	: Farklılaşma Kümeleri (Cluster of Diffentiation)
DBBHL	: Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma
dk	: Dakika
Del	: Delesyon
DLEU2	: Deleted in lymphocytic leukemia 2
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FISH	: Flouresan In Situ Hibridizasyon
Hb	: Hemoglobin
HL	: Hodgkin lenfoma
IgVH	: Immunglobulın ağır zincir değişken bölge
IWCLL	: International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
kDa	: Kilodalton
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
RNA	: Ribonükleik asit
MYC	: Myelocytomatosis

MyD88	: Miyeloid farklılaşma primer cevap 88 (Myeloid differentiation primary response 88)
NF-kB	: Nükleer Faktör Kabba B
NCIWG	: "National Cancer Institute-sponsored Working Group"
NGS	: Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing)
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
NICD	: NOTCH Hücre İçi Etki Alanı
NPC	: Nükleer Gözenek Kompleksi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Plt	: Platelet
SLL	: Küçük Lenfositik Lenfoma
sn	: Saniye
ß2M	: Beta-2 Mikroglobulin
TBE	: Tris-Borate-EDTA
TK1	: Timidin Kinaz1
TP53	: Tümör Protein 53
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
XPO1	:Exportin 1
ZAP-70	: Zeta chain associated protein 70

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi (KLL) Batı ülkelerde en sık görülen lösemi tipi olarak bilinmektedir. Tüm erişkin lösemilerinin %20-30'unu oluşturmaktadır. Hastaların önemli bir kısmı semptomsuzdur. Bu nedenle gerçek sıklığını saptamak çok zordur. Genel olarak Batı yarım kürede yaklaşık yılda 3/100.000 sıklıkta ortaya çıktığı bilinmektedir. ABD'de 2006-2009 verilerine göre 4.1/100.000 sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir (1). Ülkemizde ortalama yaş 63 olmakla birlikte, olguların %24'ünün 55 yaşın altında olduğu bildirilmektedir (2,3). Erkeklerde kadınlardan iki kat fazla görülmektedir (2).

Kronik lenfositik löseminin etiyolojisi henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Çevresel faktörler, radyasyon, infeksiyon etkenleri, immün bozukluklar, toksik ilaç veya kimyasallarla ilişkiye işaret eden bazı araştırmalar olmasına rağmen bulgular kanıt düzeyinde değildir (4,5). İspanya da Xose S. Puente ve ark. (6) 2011 yılında yapılan bir araştırmada batılı ülkelerde, kronik lenfositik löseminin dört olgusunda, tüm genom sekanslama yöntemiyle potansiyel gen fonksiyonunu etkileyebilir 46 somatik mutasyon tespit etmişlerdir. Üçyüz altmış üç hastada yapılan daha ayrıntılı analiz sonucunda tekrarlı mutasyona uğramış 4 gen tespit etmişlerdir. Bu genler ; (*NOTCH1*), exportin 1 (*XPO1*), miyeloid farklılaşma primer karşılık geni 88 (*MyD88*) ve Kelch benzeri 6 (*KLHL6*) genleridir. Bu genlerden *MyD88* ve *KLHL6* genlerindeki mutasyonlar, mutasyona uğramış immünoglobulin olan hastalarda, *NOTCH1* ve *XPO1* genlerindeki mutasyonlar, çoğunlukla mutasyona uğramamış immünoglobulin olan hastalarda bulunmuştur. *NOTCH1* geninin (p.P2515Rfs*4) protein lokalizasyonunda, *XPO1* geninin (*p.E571K ve p.E571G*) protein lokalizasyonlarında, *MYD88* geninin (*p.L265P*) protein

lokalizasyonunda ve *KLHL6* geninin (*F49L/L65P, L90F* ve *L58P/T64A/Q81P*) lokalizasyonlarında meydana gelen mutasyonlar KLL olgularıyla ilişkilendirilmiştir (6).

S. Jeromin ve ark. (8) 2014 yılında Almanya'da yapılan bir kohort çalışmasında 1160 KLL vakasının moleküler, immünofenotipleme ve sitogenetik verilerin doğrultusunda, genetik belirteç olan bazı genlerde (*SF3B1, NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1*) meydana gelen mutasyonları Sanger sekanslama yöntemiyle araştırmışlardır. *NOTCH1, SF3B1* ve *TP53* mutasyonlarının kronik lenfositik lösemi ile doğudan ilişkili olduğunu, *XPO1, FBXW7* ve *MYD88*'de meydana gelen mutasyonların düşük frekanslarda kısmen bağlı olduğunu bulmuşlardır (8).

Veronica Balatti ve ark. (7) 2012 yılında yapılan bir kohort çalışmasında 186 KLL olgusunda *IGVH/ZAP70* mutasyonlu ve mutasyonsuz olarak *NOTCH1* ve *XPO1* genlerinde meydana gelen mutasyonların sonuçlarını değerlendirmişlerdir. *NOTCH1* geni için (P2515fs) protein lokalizasyonunda meydana gelen bir mutasyon sonucu 2 baz çifti çerçeve kayması ("frameshift") delesyonu, *XPO1* geni için *(p.E571K ve p.E571G)* protein pozisyonunda meydana gelen mutasyonlar KLL olgularıyla ilişkilendirmişlerdir. 186 hastanın 6'sında 2 farklı zamanda tekrar örnek alınarak toplamda 192 örneği incelemişlerdir. *P.E571.K* pozisyonu için 192 örneğin 4'ünde (%2,1) bu mutasyonu saptamışlardır. 127 *IGVH/ZAP70* mutasyonsuz hastanın 6'sında, 65 *IGVH/ZAP70* mutasyonlu hastanın 1'inde *XPO1* mutasyonunu saptamışlardır. 127 *IGVH/ZAP70* mutasyonsuz KLL örneklerinden sadece 5'inde, *IGVH/ZAP70* mutasyonlu hastaların sadece 1'inde *NOTCH1* mutasyonu saptamışlardır (7). Bu elde edilen veriler doğrultusunda çalışmamızda 58 KLL olgusunda Real-Time PCR yöntemiyle bu mutasyonların saptanması amaçlandı. Fakat real-time PCR için gerekli primer dizaynı yapılamadığından dolayı, her iki gen için de çalışma yeni nesil DNA dizileme yöntemiyle gerçekleştirildi.

GENEL BİLGİLER

Hematolojik malignite tanımı ilk olarak 1832'de Thomas Hodgkin tarafından tanımlanmıştır. 30 yıllık çalışmaları sonucunda ilk olarak karakterize ettiği lenfoma tipine Hodgkin hastalığı adı verilmiştir (9). Lösemi ve multipl miyelom gibi diğer hematolojik malignitelerin yayınları daha sonra çıkmıştır. O zamandan bu yana, malignitelerin alt tipleri daha ayrıntılı bir şekilde tanımlanmış ve çeşitli kategorilere ayrılmaya çalışılmıştır. İmmünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler genetik testlerin yardımı ile artık hematolojik malignitelerin genetik olarak çok sayıda farklı hastalık içerdiği anlaşılmaktadır.

Hematolojik maligniteler iki ana başlık altında incelenir:

1. Lenfomalar
2. Lösemiler

LENFOMALAR

Lenfomalar, lenfositler veya NK (nötral killer/doğal öldürücü) hücrelerden köken alan klonal tümörlerdir. Lenfomalar; Hodgkin Lenfoma (HL) ve Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) olmak üzere iki ana başlıkta gruplandırılmıştır. HL ilk olarak 1832 yılında Thomas Hodgkin tarafından tanımlanmıştır. B lenfositlerden köken alarak gelişen bir hastalıktır (10). HL tüm kanser türlerinin %1'ini, lenfomaların ise yaklaşık %25-40'ını oluşturmaktadır (11,12).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2001 yılında yapmış olduğu, 2008 ve 2016 yıllarında güncellenmiş sınıflandırmasına göre DSÖ Hematopoetik ve lenfoid doku tümörlerinin sınıflandırılması aşağıda verilmiştir (13).

- Olgun B hücreli neoplazmalar
- Kronik lenfositik lösemi / küçük lenfositik lenfoma
- B-hücreli prolenfositik lösemi
- Splenik marjinal zon lenfoma
- Tüylü hücreli lösemi
- Splenik lenfoma/lösemi, sınıflandırılamayan
- Splenik diffüz kırmızı pulpa küçük B-hücreli lenfoma
- Tüylü hücreli lösemi varyant
- Ekstraosseous plazmasitom
- MALT tipi ekstranodal marjinal zon lenfoma
- Nodal marjinal zon lenfoma
- Pediyatrik nodal marjinal zon lenfoma
- Foliküler lenfoma
- Pediyatrik foliküler lenfoma
- Primer foliküler merkezli cilt lenfoması
- Mantle hücreli lenfoma
- Diffüz büyük B hücreli lenfoma (NOS)
- T-hücre/histiositten zengin BBHL
- Primer santral sinir sistemi DBBHL
- Primer cilt DBBHL, bacak tipi
- Yaşlıların EBV pozitif DBBHL
- Kronik inflamasyonla ilişkili DDBHL
- Lenfomatoid granülomatoz
- Primer mediastinal DBBHL
- Intravasküler BBHL
- ALK-pozitif BBHL
- Plazmablastik lenfoma
- BBHL, HHV8 ilişkili multisentrik Castleman hastalığı kaynaklı
- Primer enfüzyon lenfoması
- Burkitt lenfoma
- Sınıflanamayan B hücreli lenfoma, DBBHL ve Burkitt lenfomaya benzer özellikler taşıyan

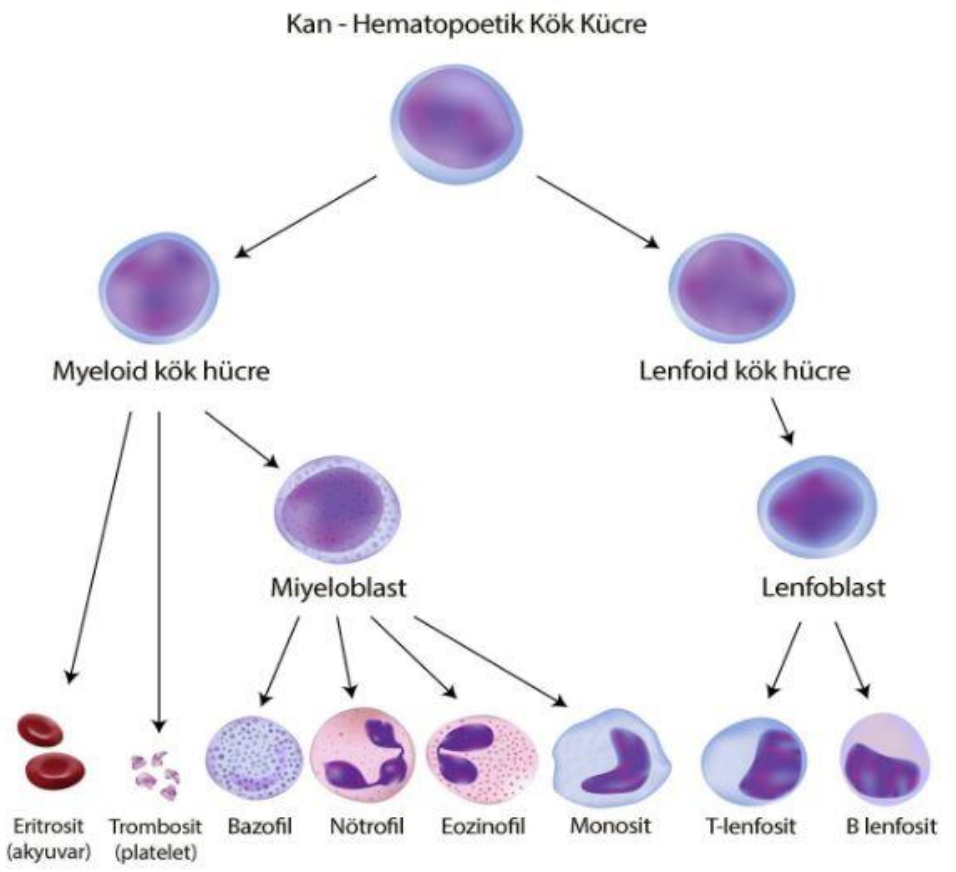
- Sınıflanamayan B hücreli lenfoma, DBBHL ve klasik HL ya benzer özellikler taşıyan
- Olgun T hücreli ve NK hücreli neoplazmalar
- T-hücresi prolenfositik lösemi
- T-hücresi büyük granüler lenfositik lösemi
- NK hücrelerinin kronik lenfoproliferatif bozukluğu
- Agresif NK hücreli lösemi
- Çocukluk çağı sistemik EBV pozitif T hücreli lenfoproliferatif hastalık
- Hydroa vacciniforme benzeri lenfoma
- Yetişkin T hücreli lösemi / lenfoma
- Ekstranodal NK / T hücreli lenfoma, nazal tip
- Enteropati ile ilişkili T hücreli lenfoma
- Hepatosplenik T hücreli lenfoma
- Derialtı pannikülit benzeri T hücreli lenfoma
- Mantar mikozu
- Sézary sendromu
- Primer kutanöz CD30 T hücreli lenfoproliferatif hastalıklar
- Lenfomatoid papülozis
- Primer kutanöz anaplastik γδ büyük hücreli lenfoma
- Primer kutanöz T hücreli lenfoma
- Primer kutanöz CD8 agresif epidermotropik sitotoksik T hücreli lenfoma
- Primer kutanöz CD4 küçük / orta boy T hücreli lenfoma
- Periferik T hücreli lenfoma, NOS
- Anjiyoimmunoblastik T hücreli lenfoma
- Anaplastik büyük hücreli lenfoma, ALK pozitif
- Anaplastik büyük hücreli lenfoma, ALK negatif
- lenfomatoid papülozis
- Primer kutanöz anaplastik büyük hücreli lenfoma
- Primer kutanöz T hücreli lenfoma
- Primer kutanöz CD8 agresif epidermotropik sitotoksik T hücreli lenfoma
- Primer kutanöz CD4 küçük / orta boy T hücreli lenfoma
- Hodgkin lenfoma
- Nodüler lenfosit baskın Hodgkin lenfoma

- Klasik Hodgkin lenfoma
- Nodüler skleroz klasik Hodgkin lenfoma
- Lenfosit zengini klasik Hodgkin lenfoma
- Karışık selülerite klasik Hodgkin lenfoma
- Lenfosit tüketen klasik Hodgkin lenfoma
- Histiyositik ve dendritik hücre neoplazmaları
- Histiyositik sarkom
- Langerhans hücreli histiyositoz
- Langerhans hücre sarkoması
- Interdigitating dendritik hücre sarkomu
- Foliküler dendritik hücre sarkomu
- Fibroblastik retiküler hücreli tümör
- Orta seviye dendritik hücreli tümör
- Yaygın juvenil ksantogranüloma
- Postplanplantasyon lenfoproliferatif hastalıklar (PTLD'ler)
- Erken lezyonlar
- Plazmastik hiperplazi
- Enfeksiyöz mononükleoz benzeri PTLD
- Polimorfik PTLD
- Monomorfik PTLD (B ve T / NK hücre tipleri)
- Klasik Hodgkin lenfoma tipi PTLD

LÖSEMİLER

Yunanca kökenli (leukemia) lösemi; kemik iliği veya kan kanseri olarak ifade edilmiştir. Kan hücrelerinden özellikle lenfositlerin normalin üzerinde çoğalmasıyla kendini gösteren bir kanser türüdür. Şekil 1'de kan yapıcı kök hücreden diğer bağışıklık sistemi hücrelerinin oluşması gösterilmiştir. Lösemiler, hücre tipine ve hücre olgunlaşma şekline göre sınıflandırılır. Akut lösemiler, olgunlaşmamış hücrelerin kemik iliğini doldurması ile karakterizedir. Tedavi edilmeyen hastalarda hızlı ve ölümcül seyreder. Kronik lösemilerde ise olgulaşmış lökositlerde normal farklılaşmayla birlikte nispeten yavaş bir ilerleme görülür (14). Akut ve kronik lösemilerin, lenfositik ve miyelositik olmak üzere başlıca iki tipi vardır. Gruplandırma dört ana başlıkta yapılmaktadır:

1. Akut lenfositik (lenfoblastik) lösemi (ALL)
2. Kronik lenfositik lösemi (KLL)
3. Akut myelositik (miyeloblastik) lösemi (AML)
4. Kronik miyelositik lösemidir (KML) (15).



Şekil 1. Hematopoetik (kan yapıcı) kök hücreden bağışıklık sistemi hücrelerinin oluşması(16)

Kronik Lenfositik Lösemi

Kronik lenfositik lösemi (KLL), morfolojik olarak olgunlaşmış küçük monoklonal B lenfositlerinin birikimi ile karakterize lenfoproliferatif bir hastalıktır. B hücrelerinin oluşumu kemik iliğinde başlar, olgunlaşması dalak ve lenf nodlarında devam eder (17). Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasına göre KLL daima neoplastik B hücrelerinin hastalığıdır. Daha önce T-KLL olarak tanımlanan tipi ise günümüzde "T-hücreli prolenfositik lösemi" olarak adlandırılmıştır. Yine WHO sınıflandırmasına göre KLL, bir B hücre neoplazmı olan küçük lenfositik lenfoma ile eşdeğer olarak kabul edilmiştir. Olgun görünümlü CD5-pozitif B

hücreleri çeşitli lenfoid dokularda, kemik iliği, karaciğer, dalak, lenf nodları ve bazen diğer organlarda birikimiyle oluşmaktadır.

Kronik lenfositik lösemi, batı dünyasında en yaygın görülen lösemidir. SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) veritabanı 2000-2005 verilerine göre ortalama tanı yaşı 72'dir. KLL görülme insidansı yaşla orantılı olarak artmaktadır (18). Hastalık seyri heterojendir. Klinik (Rai ve Binet) evreleme sistemleri, hastalara özgü tedavinin planlanmasında, prognoz ve tümör yükünün tahmininde kullanılır. KLL hastalarının tanısında prognozunun öngörülmesi, uzun dönemli sağ kalım ve hastalık seyri açısından önemlidir.

Tanı

KLL tanısı için birçok kriter geliştirilmesine rağmen, en sık kullanılan 1988'de "National Cancer Institute-sponsered Working Group (NCIWG)" ve "International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL)"nin ortaya koyduğu kriterlerdir (19). Bu kriterler Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Tanı tam kan sayımı, periferik yayma, periferik kanda immünofenotipleme ile konulmaktadır. Kemik iliği aspirasyonu veya biyopsisi tanıda çoğu zaman gerekli bulunmamaktadır (20).

Tablo 1. KLL Tanı Kriterleri (NCIWG)

Periferik kanda lenfositoz: 5.000/mm³
İmmunfenotipleme: En az 1 adet B hücre işareti (CD19, CD20, CD23) + CD5
Kemik iliğinde lenfositoz: ≥ %30
Atipik hücre oranı: < %50

Tablo 2. KLL Tanı Kriterleri (IWCLL)

≥10.000 lenfositoz + B fenotipi veya kemik iliği tutulumu
<10.000 lenfositoz+ B fenotipi + kemik iliği tutulumu
>%30 kemik iliği lenfosit oranı

Tipik olarak KLL hücreleri küçük, dar sitoplazmalı, çekirdekçiğin ayırt edilemediği yoğun çekirdek yapısına sahip olgun lenfositlerdir. Birlikte daha büyük, atipik görünümlü, çentikli çekirdekli hücreler ya da prolenfositler görülebilir. KLL ile açıklanamayacak sitopenilerde kemik iliği biyopsisi, hızlı tümör büyümesi ve klinik ağırlaşma olması durumunda

Richter transformasyonu açısından lenf bezi biyopsisi yapılabilir. Diffüz büyük B hücreli lenfomaya (DBBHL) dönüşüm Richter transformasyonu olarak adlandırılır ve genellikle kötü prognozu işaret eder (21).

Periferik kanda $5x10^9$ /L'den daha az klonal B lenfosit bulunan ve organomegali ya da lenfadenomegali gibi klinik semptomları veya sitopenisi olmayan hastalar monoklonal B lenfositoz olarak adlandırılır. Monoklonal B lenfositozlu olguların yıllık %1-2 oranında tedavi gerektiren KLL'ye dönüşüm olasılığı mevcuttur (22). WHO sınıflamasında SLL (küçük lenfositik lenfoma) ve KLL aynı kategoride ele alınmıştır (23).

SLL tanısı lenfadenopati veya organomegali (karaciğer veya dalakta büyüme) ile birlikte kanda en az 3 ay boyunca $5x10^9$ /L'den daha az monoklonal B lenfosit bulunması olarak tanımlanmıştır. Kemik iliğinin klonal olarak infiltre edilmesi nedeni ile sitopeni SLL'de olmamalıdır. KLL hastalığının aksine SLL'de lenf nodu biyopsisi mümkün oldukça önerilir (21).

İmmünfenotiplendirme KLL'nin diğer lenfomalardan ayrımını sağlar. Tanısal açıdan ve klonaliteyi göstermesi açısından immün fenotiplendirme yapılması önerilir. KLL hücreleri bir T hücre antijeni olan CD5 ile birlikte B hücre reseptörleri (CD19, CD23) taşırlar. CD20, CD79b ve FMC7 antijenlerini çok az taşır ya da hiç taşımazlar (24,25). CD19 pozitif olabilecek hastalıklardan olan folliküler lenfoma, tüylü (hairy cell) hücreli lenfoma ve marginal zon lenfomadan CD5 pozitifliği ile ayrılabilir. CD19 ve CD5 birlikte taşıyan mantle cell lenfoma ise KLL'nin aksine çoğunlukla CD23 taşımaz. Diğer yandan B hücreli prolenfositik lösemi olgularının yarısında CD5 bulunmaz ancak yüksek CD20 ve yüzey Ig taşırlar (25).

KLL lenfositleri normal B hücrelerine göre daha az yüzey immünglobulinleri, CD20 ve CD79b eksprese ederler (24,26). Her klon kappa ya da lambda hafif zincirlerinden birini üretir (24).

Evreleri

Klinik evrelemede kabul görmüş olan Rai ve Binet evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Bu iki evreleme sistemi fiziksel muayene ve standart laboratuvar testlerine dayanmaktadır (27). Rai evreleme sistemi 1975 yılında Rai ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (28). Rai evreleme öncelikle 5 prognostik gruptan oluşurken, modifiye Rai evreleme sisteminde 3 grup bulunmaktadır. Bu iki evreleme sistemine ait veriler Tablo 3 ve Tablo 4'te gösterilmiştir. Rai evreleme sisteminde kan ve kemik iliğinde lenfositoz bulunan hastalar düşük riskli (Rai 0),

lenfositoz, herhangi bir alanda büyümüş nodlar, splenomegali ve/veya hepatomegali bulunan hastalar orta-risk (Rai I-II), anemi ve trompositopeni içeren hastalar yüksek-risk (Rai III-IV) olarak tanımlanmıştır (27).

Binet evreleme sistemi ilk kez 1985 yılında Binet ve arkaşları tarafından önerilmiştir. Bu evreleme sistemine göre Binet A, B ve C olmak üzere 3 prognostik grup bulunmaktadır (29). Binet evreleme sisteminde çapı 1 cm'den büyük lenf nodları sayısı ve anemi ya da trombositopeni olup olmaması dikkate alınmaktadır (27)

Tablo 3. Rai evreleme sistemi

Evre	Klinik	Medyan Sağkalım
0	Lenfositoz	>10 yıl
1	Evre 0 ve Lenfadenomegali	7
2	Evre 0 veya 1 ve splenomegali ve/veya hepatomegali	7
3	Evre 0, 1 veya 2 ve anemi (Hb <11gr/dl)	2
4	Evre 0-3 ve trombositopeni (Plt <100.000/mm^3)	2

Tablo 4. Binet evreleme sistemi

Evre	Klinik	Lenfoid Sayısı	Medyan Sağkalım
A	Hb≥10gr/dl; Plt≥100.000/mm^3	<3	>10 yıl
B	Hb≥10gr/dl; Plt≥100.000/mm^3	≥3	5
C	Hb<10gr/dl veya Plt<100.000/mm^3	-	2

Prognoz

Rai ve Binet evreleme sistemleri en kullanışlı sistemler olmasına karşın, hastalık progresyonundaki bireysel riskleri ve erken evrelerdeki sağ kalımı öngörmek için yeterli değildirler. Son yıllarda hastalık seyrini belirlemeye yönelik işaretleyici araştırmaları yapılmaktadır (30). Prognostik faktör olarak; immünoglobülin ağır zincir (IgVH) mutasyon

durumu, sitogenetik anomaliler ve gen mutasyonları, CD38 ve ZAP-70 ifadesi, serum ß2-mikroglobulin (ß2M), serum CD23 (sCD23), timidin kinaz1 (TK1) vardır (31).

İmmünoglobülin ağır zincir mutasyonu içeren hastaların klinik durumu, mutasyon içermeyenlere göre daha iyidir. Mutasyona uğramış ağır zincir 3-21 (VH3-21) genleri olan olgular, mutasyona uğramamış olgulardan önemli ölçüde daha uzun sağkalım göstermektedir.

Zeta-chain-associated protein kinaz 70 kD (ZAP-70) ve CD38 ekspresyonunun, immünoglobülin gen mutasyon durumuyla korelasyon gösterdiğine dair çalışmalar vardır. ZAP-70 ve CD38 akım sitometri ile ölçülür (32). ZAP-70 pozitifliği ve IgVH mutasyon durumunu arasında korelasyon olduğunu göstermişleridir (33).

Yüksek seviyede CD38 ekspresyonunun, mutasyona uğramamış IgVH ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (34,35,36). Ancak, bazı hastalarda hastalık sürecinde CD38 seviyesinin değişkenlik gösterebilmesi, CD38'in IgVH mutasyon durumu yerine işaretleyici olarak kullanılmasını kısıtladığı belirtilmiştir (35,36).

Meuleman ve arkadaşları tarafından 2008 yılında, Kern ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmalarda ZAP-70 protein seviyesinin %20'den yüksek olması kötü prognostik olarak rapor edilmiştir (37).

Belirli kromozomal anomalilerin prognostik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Trizomi 12 varlığı ve 11q, 13q, 17p delesyonları(del) prognostik öneme sahip kromozomlardır. Del(11q) ve del(17p) delesyonu kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir (38).

KLL ve Genetik

Kronik lenfositik lösemide 11q, 13q, 17p delesyonları ve trizomi 12 varlığı prognostik değeri olan, KLL patogenezinde, sürecinde ve tedavi stratejilerini belirlemede rol oynayan kromozomal anomalilerdir (38). On üçüncü kromozomun uzun kolunun delesyonu, 13q14.3 bandını içerir ve en sık gözlenen sitogenetik anomalidir. Vakaların %50-60'ında gözlenmektedir. Kromozom 13q anomalileri iyi prognoz göstergesidir (30,39).

KLL hücrelerinin alışılmış mitojenlerle çoğalma hızının düşük olması nedeniyle sitogenetik çalışmalar temel olarak FISH (Flouresan In Situ Hibridizasyon) tekniği ile yapılmaktadır. En sık rastlanan anomali 13q14 delesyonu olup, bu bölgede *BCL-2* üzerinden etki gösteren iki microRNA (miR-15a ve miR-16) bulunmaktadır. Bunu sıklık sırasına göre

11q22-23 delesyonu (tümör supresor *ATM* geni ile ilişkili), trizomi 12 ve 17p13.1 delesyonları (tümör supresor *TP53* geni ile ilişkili) izler (40,41). Diğer lösemilerin aksine dengeli translokasyonlar KLL'de sık görülmez. Yaşla birlikte kromozom anomalisi görülme sıklığı artar. Söz konusu anomalilerin 13q delesyonu iyi prognoz göstergesi olup, 11q ve 17 p delesyonu kötü prognoz ile ilişkilidir (42). Son yıllarda CpG oligodeoksinükleotid ile uyarılmış hücrelerde anormal klonların daha iyi tespit edilebildiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (43,44,45).

KLL'nin moleküler patogenezi tam olarak açıklanamamıştır. Diğer B hücre malignitelerinin aksine, KLL tekrarlayan dengeli kromozomal translokasyonlarla ilişkili değildir (44). DLEU2 (deleted in lymphocytic leukemia 2) / MIR15-16 (mikroRNA 15-16) kümelerini etkileyen 13q14'ün delesyonu, KLL vakalarının yaklaşık % 50'sinde başlangıç lezyonudur. Bunu takiben sırasıyla TP53 ve ATM'yi etkileyen del17p13 ve del11q22-q23 delesyonları meydana gelir (40,46,47). Nadir *NOTCH1* mutasyonları düzensiz olarak bildirilmiştir (48).

KLL dönüşümü örneğinde, TP53 bozulması ve MYC değişiklikleri %50'ye kadar gözlenir. Richter sendromu vakalarında, ancak kalan %50'nin genetik lezyonları neredeyse bilinmemektedir (49). Ayrıca, tedaviye dirençli KLL vakalarının %40'ında TP53 bozulması gözlenir, ancak kalan %60 KLL'nin moleküler temeli bilinmemektedir (50).

NOTCH1 Geninin KLL ile İlişkisi

NOTCH yolağı, hücre metabolizmasındaki en önemli sinyal yollarından biridir. Önemi iyi bilinmesine rağmen, mekanizma ve işlevsel olarak çözülememiştir. *NOTCH*, hücre dışı ligandlar tarafından aktive edilir. Aktivasyonundan sonra aktive olan önemli bir membran proteinidir. İnsan *NOTCH* proteini; *NOTCH1*, *NOTCH*2, *NOTCH*3, *NOTCH*4 olarak dört farklı homologdan oluşmaktadır. *NOTCH1*, kromozom 9 (9q34.3) üzerinde 51.418 bp DNA'yı, 138.508.717 ve 138.508.135 bp arasında kromozomun p kolunu terminalden kapsar. *NOTCH1* RNA transkripti 34 ekson içerir ve uzunluğu 9,371 bp'dir. *NOTCH* sinyalinin embriyonik, doğum sonrası gelişimde önemli olduğu bilinmektedir (51). Kök hücre devamlılığı, apoptoz ve hücre farklılaşması, organ homeostazı gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenler (52,53,54). *NOTCH* hücre döngüsü, gelişim ve sağ kalım ile ilgili yolakları içeren geniş ağlar boyunca apoptozu düzenler.

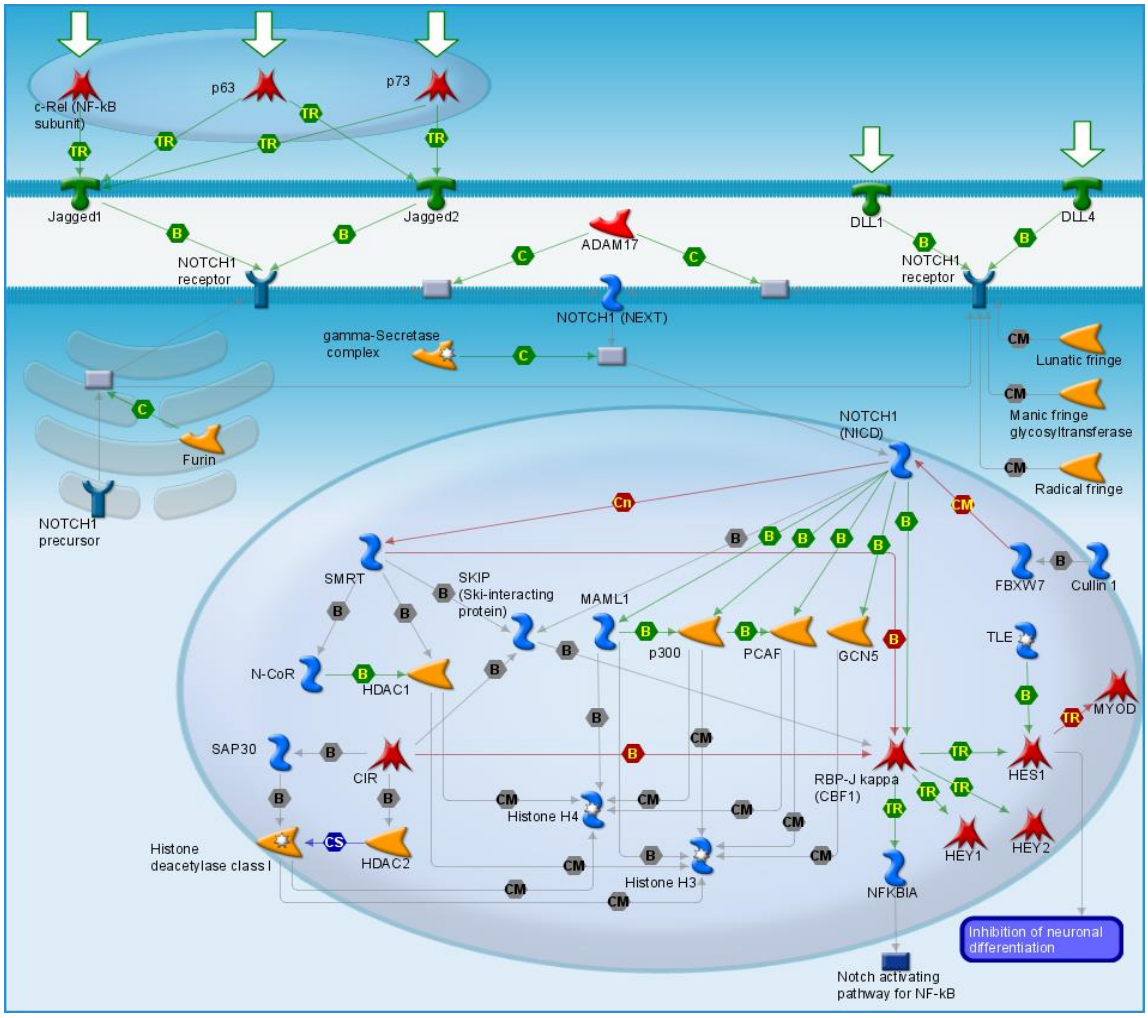
NOTCH sinyal yolağı apoptoz ve kanser üzerindeki etkisinden dolayı p53 sinyal yolağı ile ilişkilidir. NOTCH sinyal yolunun aktivasyonu için NOTCH reseptörü ve ligand bulunan hücreler arasındaki bir hücre-hücre teması gereklidir. NOTCH reseptörü ve ligand arasındaki bir etkileşim, hücre dışı ADAM metalloproteinaz'ın katalitik aktivitesi gereklidir (55). NOTCH reseptörü ve ligand, hücre dışı ADAM metalloproteinaz ve hücre içi bir Gamma-sekretaz içeren kompleksin katalitik aktivitesi yoluyla bölünmeye neden olur ve bu daha sonra NICD'nin (NOTCH hücre içi etki alanının) sitoplazmaya sonra çekirdeğe salınmasına neden olur (52).

Apoptozu düzenlemede NOTCH'un NF-ƙB yolağını nasıl düzenlediğine dair çeşitli modeller ileri sürülmüştür (56,57).

Birinci modelde; aktive *NOTCH p50, Re1A, Re1B* ve *cRe1* NF-ƙB genlerinin transkripsiyonunu uyarır. RBP-JK, bir NOTCH CSL proteini, normalde bu genlerin transkripsiyonunu baskılar. NICD varlığında transkripsiyon aktive edilir.

İkinci modelde; NICD NF-ƙB'ye bağlanmak için IƙB-α ile yarışır. Aktive NOTCH (NICD) sitoplazmik IKB'ye benzerlik gösteren 6 ankirin tekrarı içerir. IƙB-α ile inhibe olan NF-ƙB dimerleri NICD ile ilişki kurunca serbest kalır ve bu da onların aktivasyonuyla sonuçlanır.

Diğer bir modelde ise; NICD IKK'ya bağlanarak IƙB'nin fosforilasyonunu artırır ve yıkımı ilerletir. Böylece serbest kalan NF-ƙB dimerlerinin aktivitesi artar (56,57). Bütün bu mekanizmalar aracılığıyla NOTCH NF-ƙB'nın apoptozu inhibe etme fonksiyonuna NF-ƙB aktivitesini artırarak dahil olur ve böylece kanserleşme sürecine katkıda bulunur.



Şekil 2. *NOTCH* geninin hücre içi sinyal yolu(58)

NOTCH homolog 1 translokasyonu ile ilişkili (*NOTCH1*), FURİN tarafından NOTCH1 reseptör formuna bölünen NOTCH1 öncüsü olarak sentezlenir. NOTCH1 reseptörü JAGGED tarafından aktive edilir. O-fukosilpeptit 3-beta-N-asetilglukozaminiltransferaz (NOT) bağımsız Glikozilasyon, NOTCHl reseptörüne bağımlı glikosilasyon, Delta-benzeri (DLL)'ye bağlanma kabiliyetini arttırır, ancak JAGged tarafından NOTCH1 reseptör aktivasyonunu önler. Aktivasyondan sonra NOTCH1 reseptörü Presenilin 1 ve ADAM metaloproeptidaz alanı 17 (ADAM17) ile ayrılır. NOTCH1'in hücre içi alanı çekirdeğe taşınır ve immünoglobülin kappa J bölgesi (RBP-J kappa (CBF1)) esaslı transkripsiyon için rekombinasyon sinyal bağlama proteinine katılımı Şekil 2'de gösterilmiştir (58).

RBP-J kappa (CBF1), DNA için oluşturduğu protein kompleksine bağlı transkripsiyon baskılayıcı veya aktivatör olarak görev yapabilir. RBP-J kappa (CBF1), birlikte baskılayıcılara sahip bir kompleks içerisinde gen baskılayıcı olarak görev yapar. Nükleer alıcı ortak baskılayıcı 2 (SMRT) / Nükleer alıcı ortak baskılayıcı 1 (N-CoR) / Histon deasetilaz 1 (HDAC1) veya

CBF1 etkileşimli korper (CIR) / Sin3A ile ilişkili protein 30kDa (SAP30) / Histon deasetilaz 2 (HDAC2).HDAC, transkripsiyonu önleyen histon deasetilasyonuna katılır. SMRT ve CIR, 1 (SKIP) içeren bağlayıcı protein SNW bölgesinin doğrudan bağlanması yoluyla HDAC ve RBP-J kappa (CBF1) arasındaki bağlayıcılar olarak işlev görür. SKIP'e bağlanma NOTCH1 (NICD), SMRT ve muhtemelen CIR ile rekabet eder. NOTCH1 (NICD), E1A bağlayıcı protein p300 (p300) alımını kolaylaştıran Mastermind benzeri 1'i (MAML1) alır (58).

Sonuncusu, p300 / CBP ile ilişkili faktör (PCAF) alımını kolaylaştırır. Kompleks MAML1 / p300 / PCAF, histon asetilaz gibi davranır ve kromatin remodelingine yardımcı olur. NOTCH1 (NICD) RBP-J kappa (CBF1) koruyucular ile rekabet edilmesi, transkripsiyonun NOTCH1 (NICD) tarafından pozitif düzenlenmesini belirler.

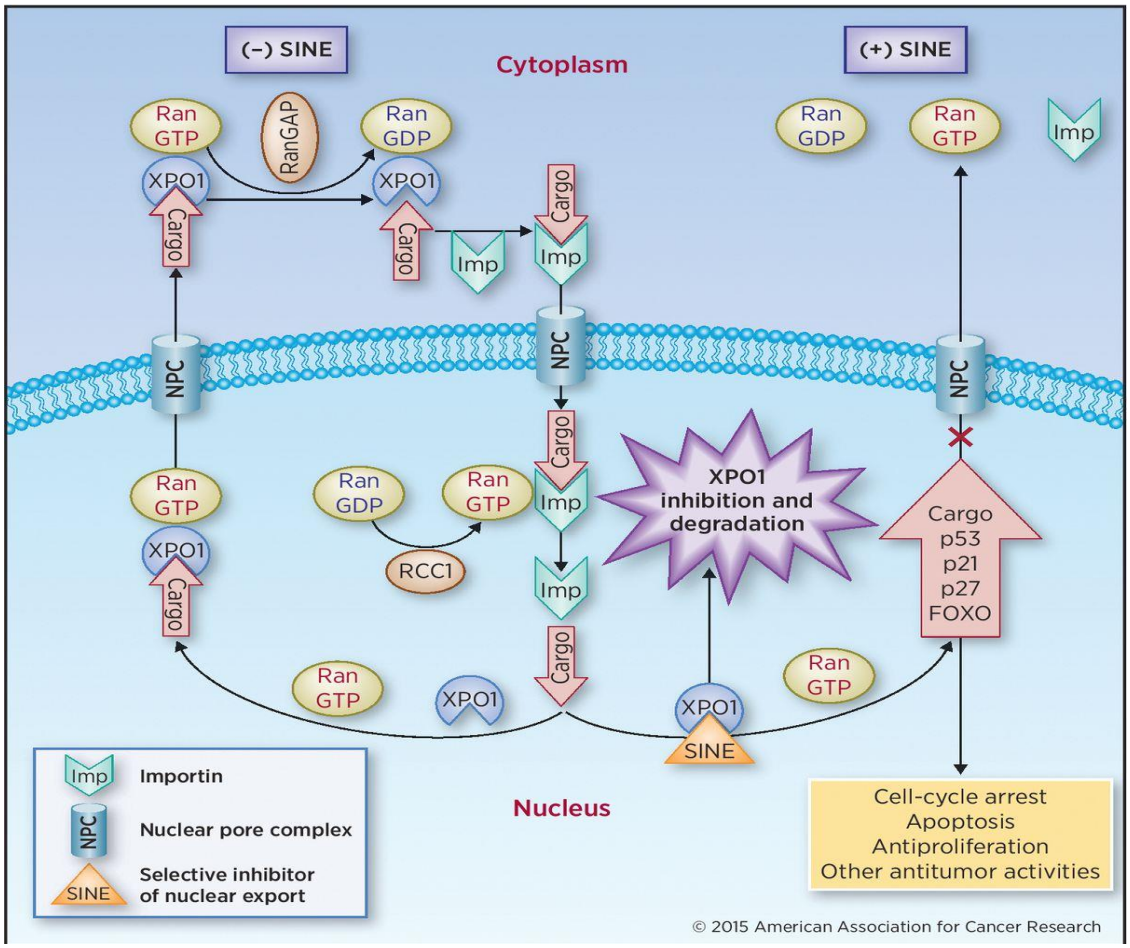
Çentik sinyali, NOTCH1'in (NICD) ubikuitin-proteazom aracılı bozunması ile F-kutusu ve WD, nükleer bir fosforilasyon olayından sonra 7 (FBXW7) içeren alanı tekrar eder.

KLL'de mutasyona uğramış bulunan genler arasında, *NOTCH1*, hastalığın spesifik fazlarında yüksek oranda tekrarlayan bir genetik lezyon hedefi olarak ortaya çıkmıştır. NOTCH1, ligandla aktive edilmiş bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gören ve hücre farklılaşması, çoğalma ve apoptozda önemli bir rol oynayan bir sınıf I transmembran proteinini kodlar (59,60,61).

Ligand bağlaması üzerine *NOTCH1*, hücre içi bölümünün çekirdeğe yer değiştirmesine izin veren çoklu proteolitik yarılmalara uğrar, böylece MYC de dahil olmak üzere çoklu hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar (62). T hücrelerinde akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), *NOTCH1* mutasyonlarını aktive eden vakaların %60'ına tekabül eden baskın genetik değişimdir (63).

XPO1 (Exportin1) Geninin KLL İle İlişkisi

İnsan *XPO1* / *CRM1* geni, hücre döngüsüne bağlı bir şekilde kopyalanır, mRNA transkripsiyonunun başlangıcı, G1 fazının sonunda gerçekleşir ve hücre döngüsünün G2 / M fazlarında zirveye ulaşır (64). *XPO1* / *CRM1* proteini, 112 kilodaltonluk (kDa) bir moleküler ağırlığa sahip 1071 amino asit kalıntısından oluşur. *NFY / CBP, Sp1* ve *p53* transkripsiyon faktörlerinin, *XPO1* / *CRM1* gen promotörü ile etkileşime girdiği ve transforme edilmiş ve kanser hücrelerinde *XPO1* / h*CRM1* promotör aktivitesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (65). *XPO1*'in hücre içi sinyal yolu Şekil 3'te gösterilmiştir (66).



Şekil 3. *XPO1* sinyal yolu(67)

Sitoplazmada, importin (Imp), NLS'sini tanıyarak kargo proteini ile bir kompleks oluşturur. Kompleks, nükleer gözenek kompleksi (NPC) içinden geçerek, RanGTP'ye bağlanması üzerine kargonun salındığı çekirdeğe geçer. Çekirdekte, XPO1 NES'i tanıyarak kargoya bağlanır ve RanGTP ile birlikte sitoplazmaya gönderilir. RanGTP'nin Ran-GTPaz aktive edici protein (RanGAP) tarafından katalize ettiği RanGDP'ye dönüştürülmesinin ardından, kargo kompleksi ayrıştırılır ve sitoplazmaya bırakılır. Bununla birlikte, SINE'nin varlığında XPO1 inhibe edilir, indirgenir ve kargo proteinlerini NPC'den sitoplazma dışına çıkaramaz. Bu, p53, p21, p27 ve FOXO dahil olmak üzere önemli TSP'lerin nükleer birikimine yol açar, bu da hücre döngüsü durması, apoptoz, antiproliferasyon ve diğer antitümör aktiviteleri ile sonuçlanır. RCC1, RanGTPase için bir guanin nükleotid değişim faktörüdür ve çekirdekteki RanGDP'nin RanGTP'ye değişimini yönlendirir (67).

NOTCH1 ve *XPO1* mutasyonları sonuç olarak mutasyona uğramamış immünoglobulinlere sahip hastalarda tespit edilir.

Yeni Nesil DNA Dizi Analizi (Next Generation Sequencing)

Yeni nesil DNA dizileme yöntemi, çok sayıda gen bölgesinin eş zamanlı olarak dizilenebildiği yüksek veri çıktısı alınabilen bir dizileme metodudur. Zincir sonlanma yöntemi olarak bilinen Sanger sekans metodu genom üzerindeki belirli bir bölgenin baz dizisinin gösterilmesi için altın standart olarak kullanılmaktadır. Fakat yeni nesil DNA dizi analizi klasik Sanger dizi analizine göre daha büyük bölgelerin DNA baz dizisini analiz etmeye imkan tanıyan bir yöntemdir (68).

Yeni nesil DNA dizi analizi'nde genom üzerinde belirli baz dizisinin elde edilebilmesi için önce hedeflenen bölgenin zenginleştirilmesi (çoğaltılması) gerekmektedir. Genom üzerinde belirli bölgenin zenginleştirilmesi işlemi dizin hibridizasyon veya PCR temelli yöntemlerden biri uygulanabilir. Genom üzerindeki hedef bölge tüm ekzonu içerebileceği gibi ilgilenilen hastalık için bilinen veya aday genlerde seçilebilir (68).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

HASTA VE SAĞLIKLI KONTROL ÇALIŞMA GRUPLARI

Kronik lenfositik lösemi hastalarında *NOTCH1* ve *XPO1* gen varyasyonlarının araştırılması için planlanan çalışmamızın uygulaması Trakya Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır. Çalışmaya 2000–2017 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Polikliniğinde tanı konulan ve takibi yapılan, Trakya Bölgesinde ikamet eden ve çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden 28 erkek ve 30 kadın olmak üzere yaş ortalamaları 61 olan 58 olgu dahil edildi. Sağlıklı kontrol grubu için çalışmaya Trakya bölgesinde ikamet eden, 55 yaş ve üzeri olan, çalışmamıza gönüllü katılmayı kabul eden, herhangi bir hastalığı bulunmayan 50 kadın ve 50 erkek olmak üzere yaş ortalamaları 60 olan 100 sağlıklı birey dahil edildi. Tüm hasta ve sağlıklı kontrol grubu bireyleri çalışma hakkında bilgilendirildi. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formları imzalatıldı. Çalışmada kullanılmak üzere periferik kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı. Çalışma finansal bakımdan, TÜBAP (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi) tarafından 2016/290 numaralı proje çalışması kapsamında desteklendi.

DNA İzolasyonu

Olgu ve sağlıklı kontrol grubundaki her bir bireyden EDTA'lı tüplere 2 ml olacak şekilde, 1 tüp periferik kan örneği alındı. Olgu ve sağlıklı kontrol grubundaki her örnek için çalışılacak hasta sayısı kadar kit çıkarıldı. 2 ml'lik tüplere alt üst edilen EDTA'lı tüplerden 200 µl kan örnekleri koyulup kit cihaza yerleştirildi. DNA izolasyonu bu periferik kan örneklerinde EZ1

DNA Blood 200 µl Kit izolasyon kitleri (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı. EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hilden, Almanya) nükleik asit izolasyon cihazında, son DNA hacmi 100 µl olacak şekilde yapıldı. DNA örneklerinin konsantrasyonu (20-60 ng/µl) ve saflık değerleri (1.8-2.0 ng/µl) NanoDrop cihazında ölçüldü [Nanodrop 2000C, Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri]. Konsantrasyon ve saflık kontrolünden geçen DNA'lar bir sonraki deneysel aşamalarda çalışılmak üzere -20℃'de saklandı.

PCR (Amplifikasyon)

DNA izolasyonu yapılan olgu ve kontrol grupları AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Thermo-Fisher Scientific) ile iki ayrı PCR şartı kullanılarak amplifikasyonu sağlandı. PCR işlemi Applied Biosystems by life Technologies ProFlex (Amerika Birleşik Devletleri) cihazında gerçekleştirildi.

NOTCH1 geni için primer Fast PCR, Ensemble, UCSC ve NCBI veritabanları ve programları kullanılarak dizayn edilmiştir. *NOTCH1* geni primer dizisi ileri (forward) "5'-CTGGAGTCACCCCATGGCTACC-3' / geri (reverse) 5'-GAGGGCTGGAGACGCCCT-3' şeklindedir.

Tablo 5. Birinci Set PCR Malzemeleri

ÇALIŞILAN GEN VE EKZON	**Reaktif 2X**	**Miktar (µl)**
NOTCH1 **EKZ 34**	Amplitaqgold	12,5
	Enhancing B	2
	dH2O	2,5
	primer F (2pmol)	3
	primer R (2pmol)	3
	DNA	2
	Total	25

Tablo 6. PCR Şartları

PCR PROGR		
95℃	10 dk	
95℃	40 sn	35 döngü
58,5℃	50 sn	
72℃	2 dk	
72℃	7 dk	

XPO1 geni için primer Fast PCR, Ensemble, UCSC ve NCBI veritabanları ve programları kullanılarak dizayn edilmiştir. *XPO1* geni primer dizisi ileri (forward) 5'- ATCAAGTGAATG GTACAGAGTGGTCATG-3' / geri (reverse) 5'-ATCACTTCTCCAACCTGAACCTGAAC-3' şeklindedir.

Tablo 7. İkinci Set PCR Malzemeleri

ÇALIŞILAN GEN VE EKZON	**Reaktif 2X**	**Miktar (µl)**
XPO1 **EKZ 15**	Amplitaqgold	12,5
	Enhancing B	2
	dH2O	2,5
	primer F (2pmol)	3
	primer R (2pmol)	3
	DNA	2
	Total	25

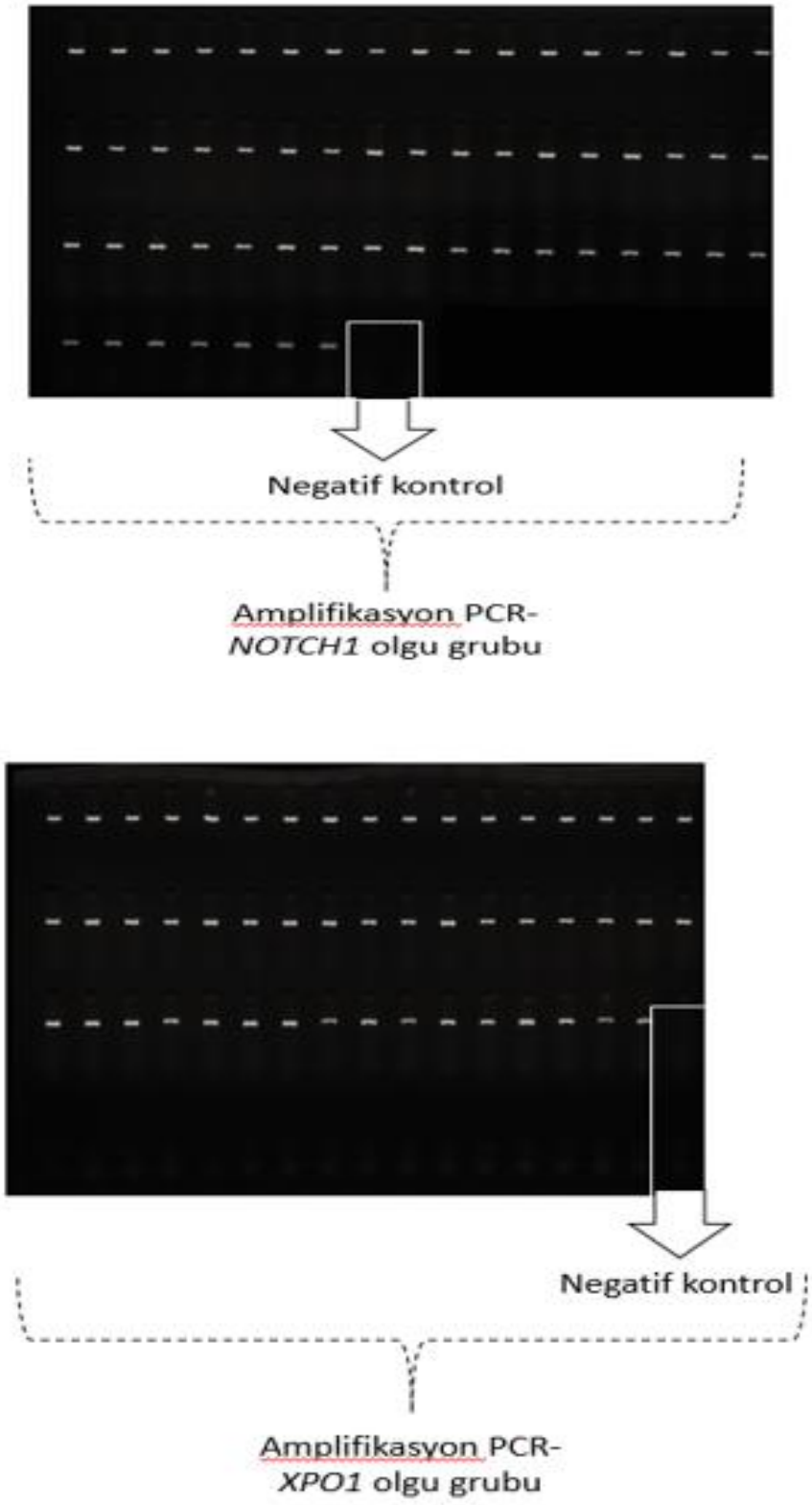
Tablo 8. PCR Şartları

PCR PROGR		
95℃	10 dk	
95℃	30 sn	35 döngü
56℃	50 sn	
72℃	1 dk	
72℃	7 dk	

Jel Elektroforezi

PCR yöntemi ile çoğaltılan olgu ve kontrol grupları, amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için jel elektroforezi işlemi yapıldı. %0,5Xml TBE (Tris-Borate-EDTA) ve Agarose D1-LE ile hazırlanan jelin içine 5,5 µl etidyum bromür eklenip kuyucukları yerleştirilmiş tank içine döküldü. 20 dk katılaşması için beklendi. Elektroforez haznesi içine jel için hazırlanan tampondan eklenip hazırlanan jel içine yerleştirildi. Her bir kuyucuk için 2,5 µl CoralLoad görüntüleme ve DNA'nın çökmesini sağlayan boya mikropipet yardımıyla alınıp örnek sayısı kadar parafilm üzerine kondu. Olgu ve hasta PCR ürünlerinden 5µl mikropipek yardımıyla alınıp parafilm üzerindeki CoralLoad ile pipetaj yapıldıktan sonra jeldeki kuyucuklara yükleme işlemi yapıldı. DNA işaretleyicisi ilk ve son kuyucuklara yüklendikten sonra DNA'nın anoda doğru hareket edeceği biçimde jel haznesinin kapağı kapatıldı. omniPAC Midi CS-300V (İngiltere) güç kaynağı cihazıyla140 volt ve 400 amper 25 dk da elektroforez işlemi gerçekleşti.

Elektroforez işlemi bittikten sonra haznenin içinden alınan jel transillüminatör (UV) Vilber Lourmat (Fransa) marka cihazının içine kondu. Görüntüleme işlemi bilgisayar ortamında Quantum ST4 programında gerçekleştirildi. Şekil 4' te Quantum ST4 programında gerçekleştirilen *NOTCH1* ve *XPO1* genlerine ait olgu gruplarının jel elektroforez görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4. KLL olgu gruplarının jel elektroforezi görüntüleri

Pürifikasyon (Saflaştırma)

Saflaştırma işlemi tüm adımları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş olup, tüm santrifüjler 10.000-14.000 rpm de gerçekleştiriliştir.

1. Adım: Tamamlanmış PCR karışımına 1: 1 oranında Binding Tamponu eklendi. İyice karıştırılıp çözeltinin rengini kontrol edildi. DNA için optimum pH gösteren renk gözlendi.

2. DNA parçası ≤500 bp olduğu için 1/2 oranında % 100 izopropanol eklendi.

3. 800 µL'ye kadar solüsyondan arıtma kolonu GeneJET'e aktarıldı. 30-60 sn santrifüjlendikten sonra kolondaki sıvı atıldı.

4. 700 µL yıkama tamponunu GeneJET saflaştırma sütununa ekleyip 30-60 sn'ye santrifüjlendi. Kolondaki sıvı atılıp kolon tekrar koleksiyona yerleştirildi.

5. 1 dakika boyunca boş GeneJET saflaştırma kolonunu santrifüjlendi. Kalan yıkama tamponunu tamamen çıkarıldı.

6. GeneJET saflaştırma kolonunu temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. GeneJET saflaştırma kolonunun merkezine 50 µL Elüsyon Tamponu eklendi ve 1 dakika boyunca santrifüj edildi.

7. GeneJET saflaştırma kolonunu atıldı ve saflaştırılmış DNA'yı -20 ° C'de saklandı.

YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ

Çalışmamızda MiSeq (Illumina, San Diego, CA) sistemi kullanılarak, hedefe yönelik dizileme yöntemi kullanıldı.

DNA Örneğinin Konsantrasyonunun QubitTM Florometre Cihazı ile Belirlenmesi

Sekanslanacak her bir gen için ayrı bir DNA kütüphanesi oluşturuldu. Bunun için öncelikle genomik DNA örneğinin konsantrasyonu QubitTM dsDNA BR Assay (Invitrogen Q32850, ABD) yardımıyla QubitTM Florometre Cihazı (Life Technologies PN Q32857, ABD) kullanılarak belirlendi. Bu aşamada dikkat edilmesi gereken nokta DNA örneğinin degrade olmamış ve yüksek kalitede olmasıdır. İzolasyon sonucu elde edilen DNA'lar 0,2 ng/µl konsantrasyonuna ayarlanmıştır.

Örneklerin Hazırlanması

Nextera XT Sample Preparation Kit kullanılarak örnekler 3 basamakta yüklemeye hazır hale getirildi:

1. Tegmentasyon (DNA' nın Parçalanması)
2. PCR
3. PCR pürifikasyonu

Tegmentasyon (DNA' nın Parçalanması)

Tablo 9. Tegmentasyon için gerekli malzemeler

Malzeme adı
Amplicon Tagment Karışım (ATM)
Tagment DNA Tampon (TD)
Neutralize Tampon (NT)
Input DNA (1ng)

1. Her örnek tüpü içine 10µl TD tampon konuldu.
2. Üzerine 0,2 ng/µl konsantrasyonundaki DNA' dan 5µl DNA 0.2' lik eppendorf tüpe alındı.
3. Üzerine 5µl ATM eklenip 5 kez pipetaj yapıldı.
4. 280Xg hızda 20℃'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Daha sonra PCR tüpleri PCR cihazına yerleştirilerek 55℃' de 5 dk, 10℃ dk'da ∞ koşullarda inkübasyon sağlandı.
6. Örnekler 10℃' e ulaştığında tek tek PCR cihzından alınarak üzerine 5µl NT eklenip 5 kez pipetaj yapıldı.
7. 280Xg hızda 20℃'de 1 dk santrifüj edildi.
8. Oda sıcaklığında 5dk beklenildi.

PCR

Tablo 10. PCR için gerekli malzemeler

Malzeme adı
Nextera master Karışım (NTK)
Index primer 1 (7xx)
Index primer 2 (5xx)

1. Tegmentasyon basamağından kalan 25µl' lik örnekler üzerine 15µl NTK eklendi.

2. Her bir tüpe 5µl index 1 primer eklendi.

3. Her bir tüpe 5µl index 2 primer eklendi.

4. 280xg hızda 20℃' de 1 dk santrifüj edildi.

5. Daha sonra PCR tüpleri PCR cihazına yerleştirilerek aşağıda verilen koşullarda inkübasyonu sağlandı.

Tablo 11. İzlenen PCR koşulları

1 döngü	**12 döngü**	**Son döngü**
	95℃ 10 sn	
72℃ 3 dk	55℃ 30 sn	72℃ 5 dk
95℃ 30 sn	72℃ 30 sn	+10℃ - ∞

PCR Pürifikasyonu

Tablo 12. PCR pürifikasyonu için gerekli malzemeler

Malzeme adı
Resuspension Tampon (RST)
AMPure XP Beads (AMP)
%80'lik Etanol

1. Ürünler PCR cihazından çıkarılarak 280 Xg hızda 20℃'de 1 dk santrifüj edildi.

2. Üzerine 90µl AMPure XP Beads eklendi ve 10 kez pipetaj yapıldı.

3. Oda ısısında 5 dk inkübe edildi.

4. Manyetik standda 2 dk bekletildi.

5. Supernatant kısmı atıldı.

6. Manyetik standdan kaldırmadan 200µl taze hazırlanmış %80'lik Etanol eklendi.

7. Supernatant kısmı atıldı.

8. 6. ve 7. basamaklar tekrarlandı.

9. Manyetik standdan kaldırmadan oda ısısında 15 dk kurumaya bırakıldı.

10. Manyetik standdan kaldırılıp 53µl Resuspension tampon eklendi ve 10 kez pipetaj yapıldı.

11. Manyetik standda 2 dk bekletildi.

12. 40µl supernatant yeni bir tüpe alındı.

Pürifiye Örneklerin Konsantrasyonlarının QubitTM Florometre Cihazı ile Belirlenmesi ve Hesaplanması

1. Bütün ürünlerin DNA konsantrasyonu Qubit DNA konsantrasyon ölçme cihazı ile ölçüldü ve her örnekten eşit "ng" olacak çekilde havuzlar karıştırıldı.

2. Birleştirilen örneklerin DNA konsantrasyonu tekrar Qubit DNA konsantrasyon ölçme cihazı ile ölçüldü.

Örneklerin Yüklenmesi

Tablo 13. Örneklerin yüklenmesi için gerekli malzemeler

Malzeme adı
Hibridizasyon Tampon 1 (HT1)
NaOH
PhiX

1. Örnek 4nM'a sulandırıldı. Sulandırılmış örnekten 5 µl alındı ve 5µl 0,2 NaOH ile birleştirilerek oda sıcaklığında 5 dk beklenildi.

2. 2nM'lik bu karışımdan 10µl alınıp 990µl HT1 ile birleştirildi ve finalde 20 Pm'lık ürün elde edildi.

3. V2 kartuş için 8-12 pM, V3 kartuş için 12-14 pM olacak şekilde örneğimiz tekrar HT1 ile sulandırıldı(toplam volüm 600µl olmak üzere).

4. 6µl PhiX eklendi.

5. Karışım 2 dk 96℃ de, 4dk sulu buzda bekletildi ve kartuşa yüklendi.

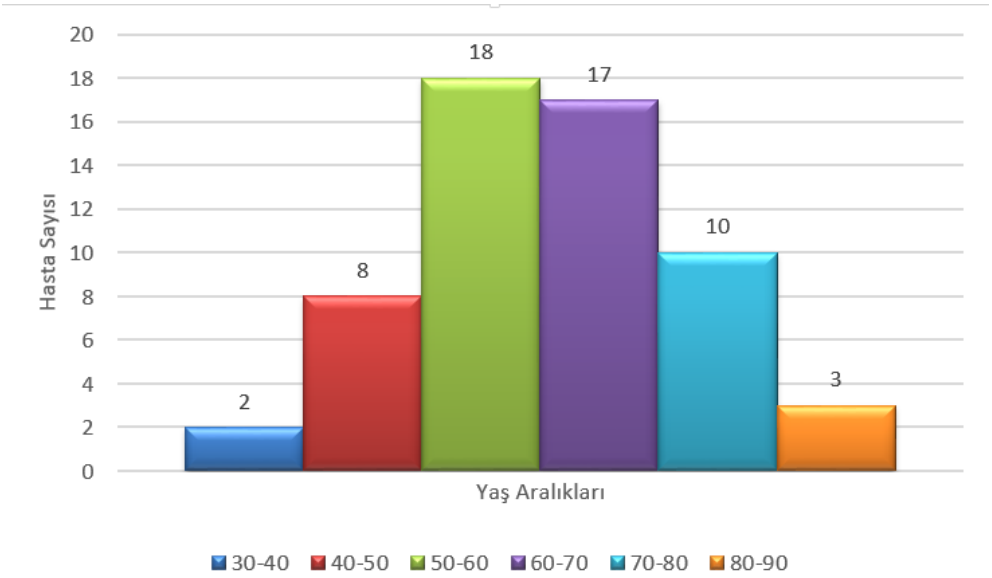
6. Kartuş ve flow cell cihaza yüklenip, dizileme işlemi başladı.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS 24.0 (Statistical Package Social Science) programında bilgisayar ortamında yapıldı. Kategorik değişkenlerin (*NOTCH1, XPO1*) analizi için Ki kare (Chi-Square) testi yapıldı. *NOTCH1, XPO1* genlerindeki ilgili varyasyonların bioinformatik analizleri IGV(Integrative Genomics Viewer Version 2.4.19) programı ile bilgisayar ortamında yapıldı.

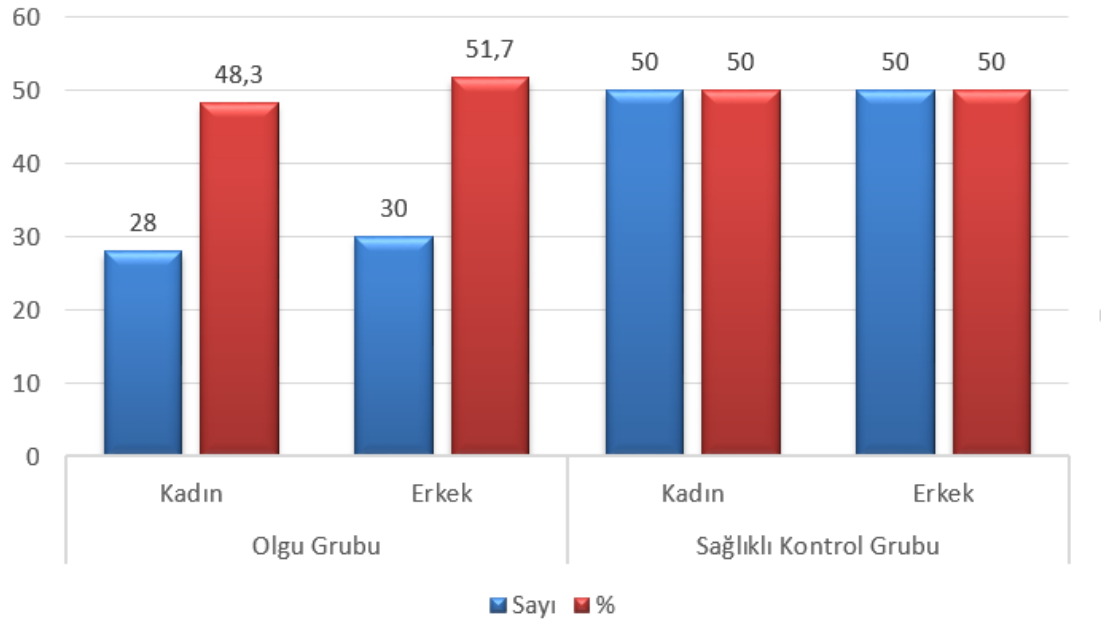
BULGULAR

Çalışmaya 2000–2017 yılları arasında tanı konulan ve rutin takibi yapılan 58 olgu ile gönüllü olarak 100 sağlıklı erişkin birey alındı. Çalışmamıza katılan KLL olgularının ortalama yaşı 64 (35-81) olarak bulundu. Sağlıklı kontrol grubu bireylerinin ortalama yaşı 63 (55-82) olarak bulundu. KLL olgularının tanı sırasındaki yaş ortalaması 61 (35-81) idi. Şekil 5'te KLL olgularının tanı sırasındaki yaş grafiği gösterilmiştir. Çalışmamızdaki KLL olguları ile sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete göre dağılımı Tablo 15'te, dağılım grafiği Şekil 6'da gösterilmektedir.

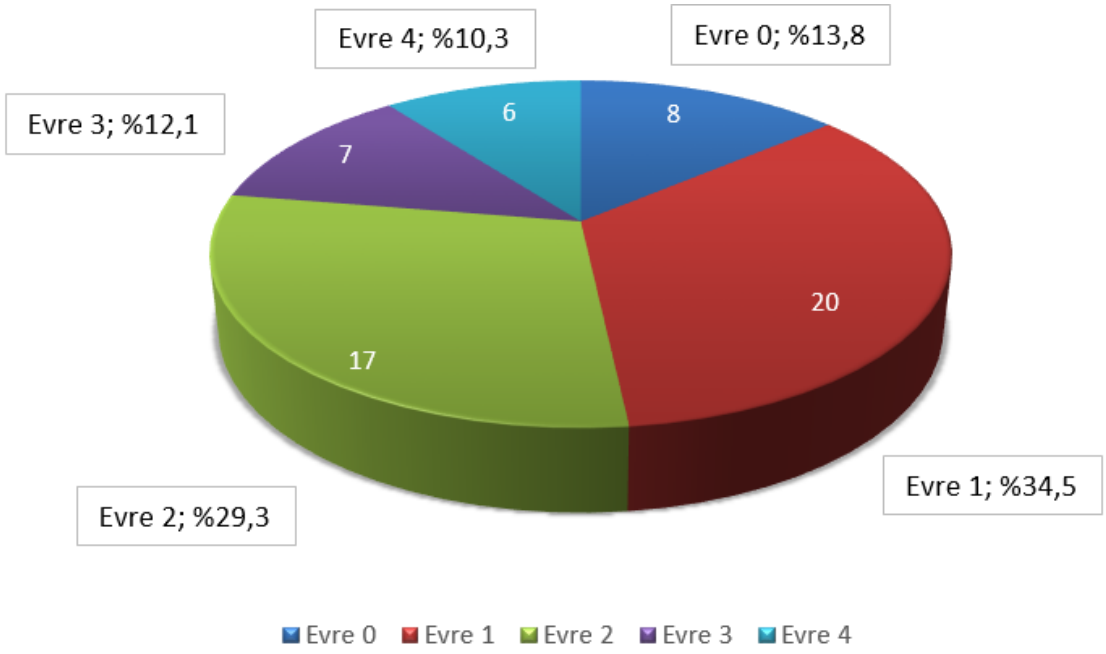


Şekil 5. KLL Olgularının yaş grafiği

Çalışmamızdaki KLL olgularının hastalık evresi Hematoloji Anabilim Bilim Dalı polikliniği tarafından Rai evreleme sistemine göre yapılmıştır. KLL hastalarının Rai evreleme sistemine göre sıklığı Tablo 16'da gösterilmektedir. Modifiye Rai evreleme sistemine göre; evre 0 olan 8 hasta (%13,8) düşük risk grubunda, evre I ve II olan 37 hasta (%63,8) orta risk grubunda, evre III ve IV olan 13 hasta (%22,4) yüksek risk grubundadır. KLL olgularının Rai evreleme sistemine göre yüzde dağılımı Şekil 7'de gösterilmektedir.



Şekil 6. KLL olguları ile sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete göre dağılım grafiği



Şekil 7. KLL olgularının Rai evreleme sistemine göre yüzde dağılımı grafiği

Çalışmamıza dâhil edilen 58 KLL olgusu ve 100 sağlıklı kontrol bireyleri *NOTCH1* ve *XPO1* genlerinde sırasıyla NM_017617.5:c.7541_7542delCT ve NM_0033400.3:c.1711G>A varyasyonlarının genotip analizleri yapıldı.

NOTCH1 geni 2514. protein lokalizasyonunda 2 baz çiftinin delesyonu NM_017617.5:c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs sonucu meydana gelen "frameshift" (çerçeve kayması) mutasyonu incelenmiştir. *NOTCH1* genindeki iki baz çiftinin delesyonu Ensemble veritabanına göre cDNA görüntüsü Şekil 8'de gösterilmiştir. *NOTCH1* geninde bulunan bu varyasyon 58 hastanın 56'sında yabanıl tip (Wild type) olarak tespit edildi. KLL olgularında 2 hastada *NOTCH1* geni NM_017617.5:c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs bölgesinde heterozigot delesyon saptandı. *NOTCH1* genindeki NM_017617.5:c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs varyasyonu Şekil 9'da IGV programındaki analiz görüntüsü ile gösterilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu bireylerinin tamamında NM_017617.5:c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs varyasyonu yabanıl tip (Wild Type) saptandı. *NOTCH1* genindeki olgu ve kontrol grubu hastalarının frekans bilgileri Tablo 17'de gösterilmiştir. Saptanan varyasyonun bazı veri tabanlarına göre elde edilen verileri Tablo 18'de gösterilmiştir. NM_017617.5:c.7541_7542delCT;p.P2514Argfs varyasyonu için ClinVar'da bir giriş bulunmakla birlikte patojenitesi "klinik açıdan önemi bilinmeyen" olarak bildirilmiştir.

Ancak saptanan bu varyasyon ACGM sınıflandırmasına göre PVS1 ve PM2 değerleri "olası patojenik" olarak değerlendirilmiştir.

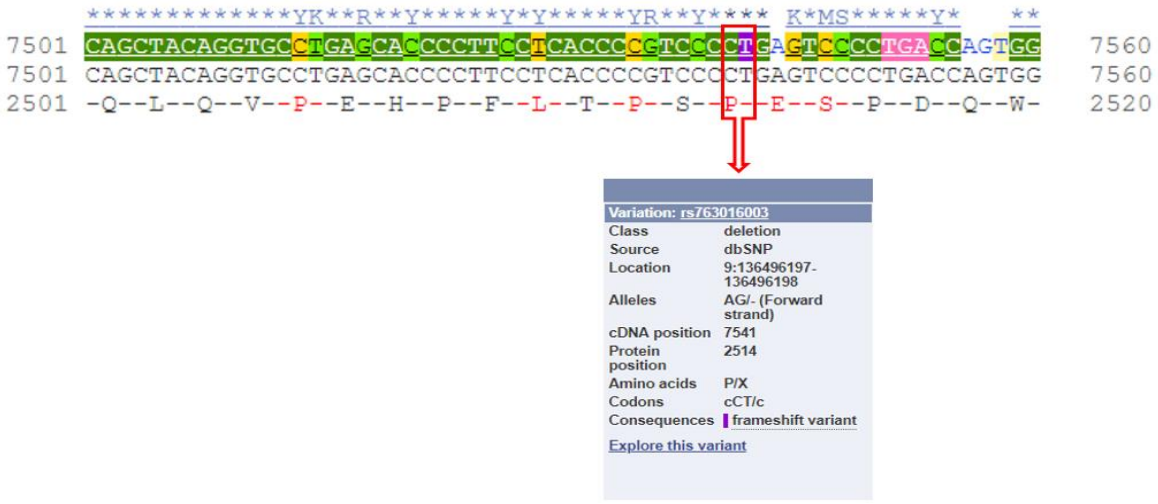
Tablo 14. *NOTCH1* genindeki olgu ve kontrol grubu hastalarının frekans bilgileri

	TOPLAM SAYI	YABANIL TİP	MUTASYON
KLL OLGU GRUBU	58	56	2
KONTROL GRUBU	100	100	0

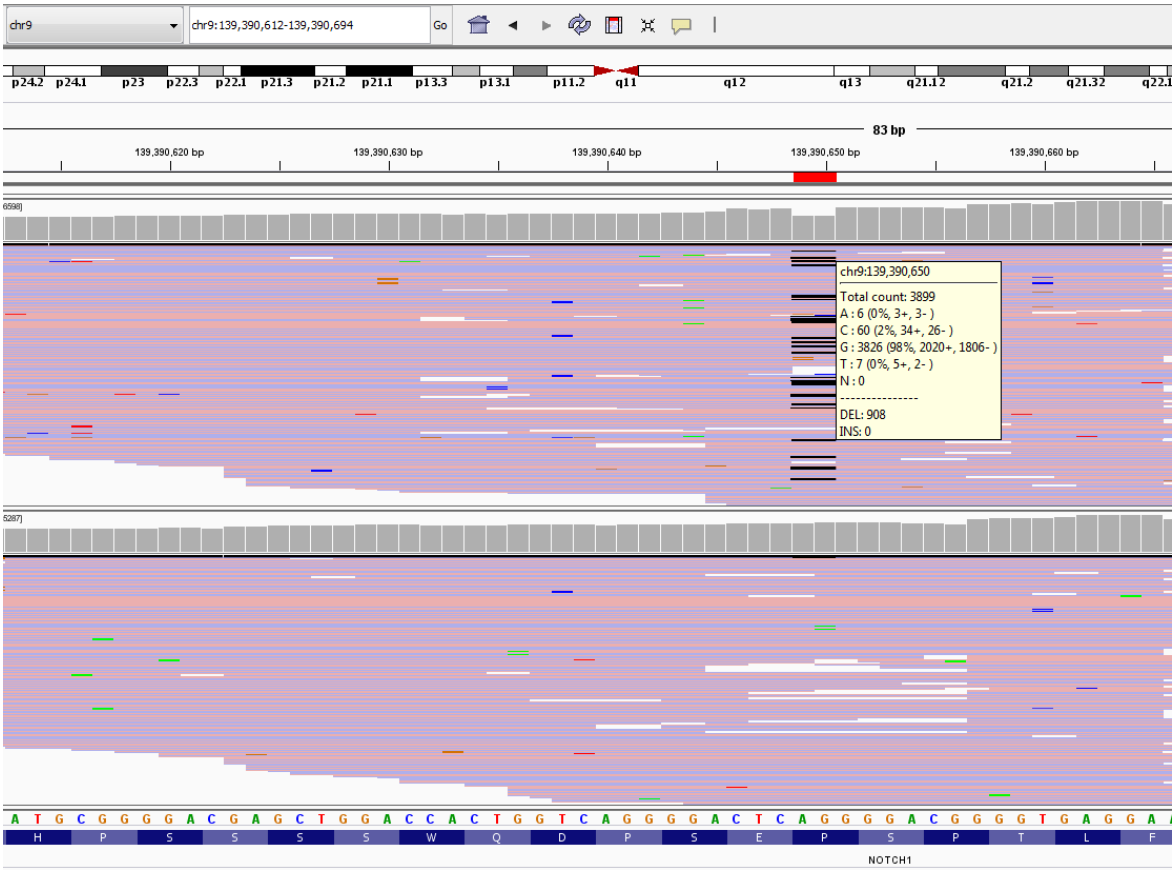
Tablo 15. *NOTCH1* geninde belirlenen varyasyona ilişkin veri tabanı bilgileri

	HGVS	ACGM Classification	dbSNP	ClinVar
N16.1,6	NM_017617.5:c. 7541_7542delCT	PVS1 PM2	rs763016003	"klinik açıdan önemi bilinmeyen"

N16.1,6: Nextera 16. Çalışmada varyasyonu saptanan 1. ve 6. Olgu; **HGVS:** Human Genome Variation Society; **ACGM:** American College of Medical Genetics; **dbSNP:** Single Nucleotide Polymorphism Database; **ClinVar:** Clinical Variants



Şekil 8. *NOTCH1* genindeki NM_017617.5:c.7541_7542delCT varyasyonunun Ensemble veri tabanına göre cDNA görüntüsü



Şekil 9. *NOTCH1* genindeki NM_017617.5:c.7541_7542delCT varyasyonunun IGV programındaki görüntüsü

XPO1 geninde NM_0033400.3:c.1711G>A bölgesinde meydana gelen tek nükleotid varyant analizi yapıldı. *XPO1* genindeki tek nükleotid varyasyonu Ensemble veri tabanına göre cDNA görüntüsü Şekil 10'da gösterilmiştir. *XPO1* geninde bir olguda 571. Pozisyonda sitozin (C) bazının timin (T) bazına değiştiği (NM_003400.3:c.1711G>A), diğer olguda ise sitozin (C) bazının guanin (G) bazına değişimi (NM_003400.3:c.1711G>C) gözlemlendi. *XPO1* geninde meydana gelen bu varyasyonlar Şekil 11'de IGV programındaki analiz görüntüsü ile gösterilmiştir. *XPO1* geninde bulunan bu mutasyon 58 hastanın 56'sında yabanıl tip (Wild type) olarak tespit edildi. *XPO1* genindeki olgu ve kontrol grubu hastalarının frekans bilgileri Tablo 19'da gösterilmiştir. KLL olgularında 2 hastada NM_003400.3:c.1711G>A ve NM_003400.3:c.1711G>C mutasyonları saptandı. Bu sağlıklı kontrol grubu bireylerinin tamamında varyasyon saptanmadı. Saptanan varyasyonun bazı veri tabanlarına göre elde edilen verileri Tablo 20'de gösterilmiştir. Saptanan bu varyasyonun ACGM sınıflandırmasına göre PM2 ve PP3 değerleri patojenik olarak değerlendirildi. ClinVar'a göre ise NM_003400.3:c.1711G>A varyasyonu "yüksek olasılıkla patojenik varyasyon",

NM_003400.3:c.1711G>C varyasyonu ise “klinik açıdan önemi bilinmeyen varyasyon” olarak bildirilmiştir.

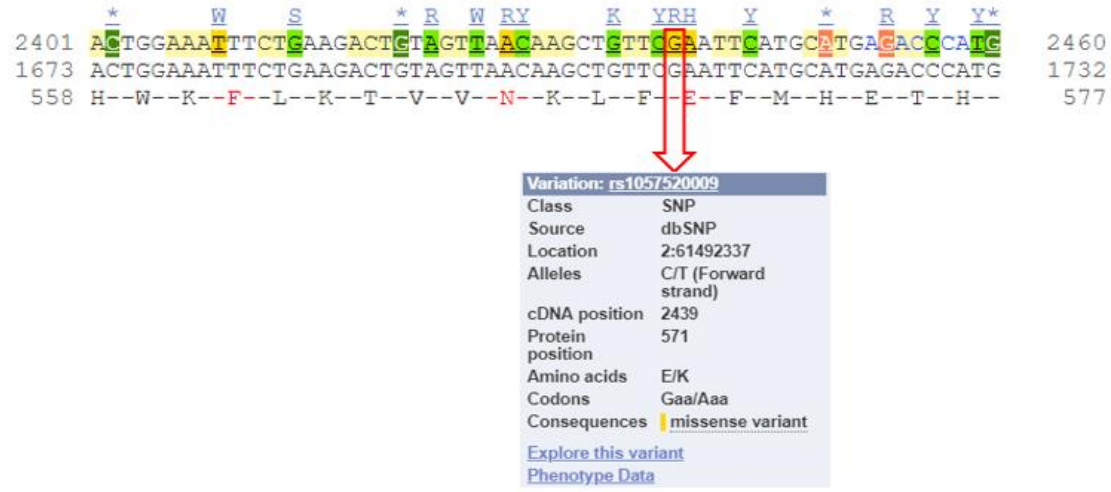
Tablo 16. *XPO1* genindeki olgu ve kontrol grubu hastalarının frekans bilgileri

	TOPLAM SAYI	**YABANIL TİP**	**MUTASYON**
KLL OLGU GRUBU	58	56	2
KONTROL GRUBU	100	100	0

Tablo 17. *XPO1* geninde belirlenen varyasyona ilişkin veritabanı bilgileri

	HGVS	**ACGM Classification**	**dbSNP**	**ClinVar**
N11.13	NM_003400.3:c.1711G>A	PP3	rs1057520009	“yüksek olasılıkla patojenik”
N11.16	NM_003400.3:c.1711G>C	PM2 PP3	–	“klinik açıdan önemi bilinmeyen”

N11.13: Nextera 11. Çalışmada varyasyon saptanan 13. Olgu; **N11.16: :** Nextera 11. Çalışmada varyasyon saptanan 16. Olgu; **HGVS:** Human Genome Variation Society; **ACGM:** American College of Medical Genetics; **dbSNP:** Single Nucleotide Polymorphism Database; **ClinVar:** Clinical Variants



Şekil 10. *XPO1* genindeki NM_003400.3:c.1711G>A varyasyonunun Ensemble veri tabanına göre cDNA görüntüsü



Şekil 11. *XPO1* genindeki NM_003400.3:c.1711G>A ve NM_003400.3:c.1711G>C varyasyonlarının IGV programındaki görütüsü

TARTIŞMA

NOTCH yolağı, hücre metabolizmasındaki en önemli sinyal yollarından biridir. *NOTCH* hücre döngüsü, hücre farklılaşması, hücre gelişimi ve sağ kalım ile ilgili yolakları içeren geniş ağlar boyunca apoptozu düzenlemektedir. *NOTCH*, NF-ƙB aktivitesini artırarak apoptozun da inhibisyonuyla kanserleşme sürecine katkı sağlar.

XPO1 geni hücre döngüsündeki gibi kopyalanır, G1 fazının sonlarına doğru mRNA transkripsiyonu gerçekleşir ve G2 fazında en üst seviyeye ulaşır. *NFY/CBP*, *Sp1* ve *p53* transkripsiyon faktörlerinin, *XPO1*/*CRM1* gen promotörü ile etkileşime girdiği bildirilmektedir. Transforme edilmiş kanser hücrelerinde *XPO1*/h*CRM1* promotör aktivitesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir.

S. Jeromin ve ark.(8) 2014 yılında yaptıkları 1160 KLL olgusundaki araştırmalarında ortalama yaşı 64 olan 411'i kadın, 749'u erkek üzerinde periferik kandan yeni nesil dizi analizi yöntemiyle bir çalışma yapılmıştır. KLL kliniği açısından önemli belirli genlerde mutasyon saptamayı amaçlamışlardır. 1160 tedavi edilmemiş KLL olgusunun %27,1'inde hastaların izole mutasyonları olduğunu, %6,3'ünde farklı genlerde en az iki mutasyon olduğunu tespit etmişlerdir. 1160 KLL olgusunun %12,3'nde *NOTCH1* mutasyonu, %3,4'ünde *XPO1* mutasyonu saptamışlardır. *NOTCH1* mutasyonunun izole olan mutasyonlara göre, özellikle TP53 mutasyonu ve / veya *XPO1* mutasyonu ile kombinasyon halinde meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Analizi yapılan 908 KLL olgusunun 122'sinde *NOTCH1* geninde en çok p.Pro2514Argfs*4 mutasyonunu saptamışlardır. 122 olgunun 80'inde p.Pro2514Argfs*4 mutasyonunu, geri kalan 42 hastada klinik açıdan anlamsız mutasyon gözlemlemişlerdir. *XPO1*

mutasyonunu analizi yapılan 969 hastanın 33'ünde saptamışlardır. İki *XPO1* mutasyonu olan tek hastada bialelik mutasyonu saptamışlardır (c.1711G>C, p.Glu571Gln ve c.1711G>A,p.Glu571Lys). Neredeyse saptanan tüm *XPO1* mutasyonları bir mutasyon haricinde yanlış anlamlı mutasyon olarak değerlendirilmiştir. S. Jeromin ve ark. yaptıkları çalışmada *NOTCH1* p.Pro2514Argfs*4 ve *XPO1* c.1711G>C, p.Glu571Gln ve c.1711G>A,p.Glu571Lys saptadıkları varyasyonlar bizim çalışmamızda saptadığımız varyasyonlarla birebir uyumlu görülmüştür. Çalışmamızda *NOTCH1* ve *XPO1* varyasyonları Yeni Nesil Dizi Analizi yöntemiyle hedef bölgeler çalışılmış olup, istatiksel verileriyle karşılaştırdığımızda *NOTCH1* geni varyasyonu açısından uyumsuzdur. Çalışmamızda 58 KLL olgusunda *XPO1* varyasyonu açısından %4 oranında mutasyon saptanırken S. Jeromin ve ark. 1160 KLL olgusunda *XPO1* varyasyonu açısından %3,4 mutasyon saptamışlardır. S. Jeromin ve ark. *XPO1* geni varyasyonu istatiksel olarak çalışmamızdaki verilerle karşılaştırıldığında kısmen uyumlu bulunmuştur.

Xose S. Puente ve ark. (6) 2011 yılında Whole-genome sequencing (tüm genom dizileme) yöntemiyle toplam 363 hastada 46 tane somatik mutasyon saptamışlardır. *NOTCH1* ve *XPO1* mutasyonlarını temel olarak mutasyona uğramamış immünoglobulinlere sahip KLL hastalarında tespit edilmiştir. Analizi yapılan *NOTCH1* geninde 255 hastanın 31'inde mutasyona uğramamış IGHV gen frekansı %20,4, mutasyona uğramış IGHV frekansı ise %7 olarak bulunmuştur. *XPO1* geninde 165 hastanın 4'ünde mutasyona uğramamış IGHV gen frekansı %4,6 olarak saptanmıştır. 363 KLL olgusunun %12,2'sinde *NOTCH1* mutasyonu, %2,4'ünde ise *XPO1* geninde mutasyon saptamışlardır. Analizi yapılan *NOTCH1* geninde 255 hastanın 29'unda P2515Rfs*4 mutasyonunu,1 hastada Q2503* mutasyonu ve 1 hastada F2482Ffs*2 mutasyonunu saptamışlardır. *XPO1* geninde 165 hastanın 3'ünde E571K mutasyonu, 1'inde ise E571G mutasyonu saptamışlardır. Çalışmamızın sonuçları Xose S. Puente ve ark. tüm genom analizi sonucunda tespit ettikleri *NOTCH1* P2515Rfs*4 mutasyonu ve *XPO1* E571K mutasyonu açısından uyumludur. Xose S. Puente ve ark.'nın p.P2515Rfs*4 olarak bildirdikleri varyasyonun, çalışmamızda referans aldığımız Ensemble veri tabanına göre p.P2514Argfs olduğu ve aynı delesyonu ifade ettiği gözlenmiştir. Çalışmamızda *XPO1* geninde Xose S. Puente ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak NM_003400.3:c.1711G>C mutasyonu saptandı. Yaptığımız çalışma *XPO1* geni ilgili varyasyonları açısından Xose S. Puente ve ark.'nın çalışmasında bildirilen istatiksel verileriyle uyumlu olmakla birlikte *NOTCH1* geni varyasyonları istatiksel açıdan uyumsuzdur.

Veronica Balatti ve ark. (7) 2012 yılında yapılan tüm genom dizileme yöntemiyle yaptıkları çalışmada 127 KLL olgusunda *NOTCH1* ve *XPO1* genlerindeki varyasyonların tekrarlayan mutasyonları içerdiği bulunmuştur. Mutasyona uğramamış *IGHV* geni bulunan vakalarda *XPO1* geninde %4,6'sında E571K ve E571G mutasyonlarını saptamışlardır. Mutasyona uğramamış *IGHV* geni bulunan vakalarda *NOTCH1* geninde ise %4'ünde 2 bazlık çerçeve kayması delesyonu p.P2515fs bulunmuştur. Veronica Balatti ve ark. p.P2515fs olarak bildirdikleri varyasyon çalışmamızda referans aldığımız Ensemble veri tabanına göre p.P2514Argfs olduğu, aynı delesyonu ifade ettiği gözlenmiştir. Veronica Balatti ve ark. KLL olgu kriterlerini mutasyona uğramış *IGHV* geni ve mutasyona uğramamış *IGHV* geni açısından değerlendirmiştir. Çalışmamızda KLL olguları *IGHV* geni açısından değerlendirilmemiş olup, Veronica Balatti ve ark.'nın bildirdiği istatiksel veriler doğrultusunda NOTCH1 ve *XPO1* genlerindeki varyasyonlar açısından uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda 58 KLL olgusu ve 100 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. KLL olgularının tanı sırasındaki yaş ortalaması 61 ve sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması 63 olarak bulundu. Sağlıklı kontrol grubundaki bireyler seçilirken literatürde belirtilen yaş kriterlerine uygun olarak seçim yapıldı. 58 KLL olgusunda Rai evreleme sistemine göre en fazla olgu sayısı Evre1 ve Evre2'de görüldü. Evre 1 ve Evre 2 deki olguların ortalama sağ kalımı Rai evreleme sistemine göre 7 yıl olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda yeni nesil dizi analizi yöntemiyle 58 KLL olgusu ve 100 sağlıklı kontrol grubu arasında *NOTCH1* geninde NM_017617.5:c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs delesyonu, *XPO1* genin de NM_0033400.3:c.1711G>A tek nükleotid varyasyonu saptamayı amaçladık. 58 KLL olgusu içinde 2 hastada; p.P2514Argfs delesyonu saptadık. Saptadığımız varyasyon için Sanger sekanslama yöntemi kullanarak konfirmasyonunu gerçekleştirdik. 1. hasta 63 yaşında, erkek ve ilk tanısını 62 yaşında almıştır. KLL Rai evreleme sistemine göre hasta "evre 4" olarak tanımlanmıştır. 2. Hasta 64 yaşında, erkek ve ilk tanı yaşı 62'dir. Bu hasta da "evre 4" olarak belirtilmiştir. Hasta grubumuzda "evre 4" olarak bildirilen toplam 6 olgu mevcuttur. KLL "evre 4" sağkalım yaşı son yayınlarda ortalama 2 yıl olarak bildirilmiştir. Her iki hastanın demografik özelliklerine bakıldığında benzerlik göstermekle birlikte *NOTCH1* NM_017617.5:c.7541_7542delCT varyasyonu varlığının KLL 4. evrede saptanması kötü prognozu desteklemektedir. Çalışmamızda *NOTCH1* NM_017617.5:c.7541_7542delCT saptanan hastalardan farklı olarak 2 hastada ise *XPO1* geninde NM_0033400.3:c.1711G>A ve NM_003400.3:c.1711G>C varyasyonlarını gözlemledik. Bu iki heterozigot varyasyon KLL

kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir. 58 KLL olgusunda %4 oranında *NOTCH1* mutasyonu, %4 oranında *XPO1* mutasyonu tespit edildi. Sağlıklı kontrol grubumuzda ilgili tüm varyasyonlar yabanıl tip (wild type) olarak saptandı.

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz veriler KLL olgularının sağ kalımı ile ilişkili olup, bu ilişkinin ileri analizlerle desteklenmesi açısından tüm ekzom sekanslama ya da tüm genom sekanslama yöntemleriyle çalışılması mevcut bulgularla katkı sağlayacağını öngörmekteyiz. Çalışmaya dahil ettiğimiz hasta sayısının yüksek olmaması sebebiyle istatiksel olarak yeterli veri elde edilememesi göz önüne alındığında, hasta sayısının artırılarak çalışmanın genişletilmesinin bulgulara destek sağlayacağını düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Sonuç olarak bu çalışma ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniğine başvuran KLL tanısı konmuş olgular arasında *NOTCH1* ve *XPO1* genlerindeki varyasyonların, tedavi ve genel sağ kalım süresi ile ilişkisini aydınlatmayı amaçladık. Çalışmamıza katılmayı kabul eden tanısı konmuş hastaların medyan yaşı literatürle uyumlu olarak 61 olarak tespit edildi. 58 KLL tanısı almış olguların 28'i (%48,3) erkek ve 30'u (%51,7) kadındır. Olguların 8'i (%13,8) Rai 0, 20'si (%34,5) Rai I, 17'si (%29,3) Rai II, 7'si (%12,1) Rai III, 6'sı (%10,3) Rai IV evresindeydi. Hastaların %58,6'sının tedavi almadan takibi yapılmakta, %5,17'sine tanı konduktan hemen sonra tedaviye başlanmıştı. *NOTCH1* geninde NM_017617.5:c.7541_7542delCT;p.P2514Argfs varyasyonu ve *XPO1* geninde NM_0033400.3:c.1711G>A ve NM_003400.3:c.1711G>C varyasyonları varyasyonlarını inceledik. Çalışmamızda iki hastada *NOTCH1* geninde NM_017617.5:c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs varyasyonu, iki hastada ise *XPO1* geninde NM_0033400.3:c.1711G>A ve NM_003400.3:c.1711G>C varyasyonlarını saptadık. Bu tez çalışması kapsamında araştırılması hedeflenen varyasyonların, çalışmaya dahil edilen KLL olguları için sağkalım ve tedavi açısından anlamlı bulunmamıştır. Genetik açıdan başka verilerin incelenmesi, hasta popülasyonunun arttırılması ve diğer varyasyonlarla birlikte araştırılması öngörülmüştür.

ÖZET

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), yetişkinlerde en sık görülen lösemi tipidir. KLL'nin nedeni hala kesin olarak bilinmemektedir. *NOTCH1* geninde NM_017617.5:c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs varyasyonu ve *XPO1* geninde NM_0033400.3:c.1711G>A varyasyonu KLL olgularında hastalığın kötü seyri ile ilişkilidir. 58 KLL tanısı alan olgu ile 100 sağlıklı kontrol bireylerinin dâhil edildiği çalışmamızda *NOTCH1* geni NM_017617.5:c.7541_7542delCT varyasyonu ve *XPO1* geni NM_0033400.3:c.1711G>A varyasyonu Yeni Nesil Dizi Analizi(NGS) yöntemi ile incelendi. Çalışmamızda iki hastada *NOTCH1* geninde NM_017617.5:c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs varyasyonu, iki hastada ise *XPO1* geninde NM_0033400.3:c.1711G>A ve NM_003400.3:c.1711G>C varyasyonları gözlemlendi. Tüm hasta ve sağlıklı kontrollerde ilgili varyasyonlar yabanıl tip (wild type) olarak saptandı. Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda, *NOTCH1* geni NM_017617.5:c.7541_7542delCT;p.P2514Argfs ve *XPO1* geni NM_0033400.3:c.1711G>A varyasyonlarının KLL hastalarında prognoza etkisinin daha iyi araştırılabilmesi için KLL hasta sayısının artırılmasının uygun olacağı öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: NOTCH1, XPO1, Kronik Lenfositik Lösemi, Yeni Nesil Dizi Analizi (NGS)

INVESTIGATION OF NOTCH1 AND XPO1 GENE VARIATIONS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

SUMMARY

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most common type of leukemia in adults. The cause of CLL is still unknown. NM_017617.5: c.7541_7542delCT p.P2514Argfs in NOTCH1 gene and NM_0033400.3: c.1711G>A variation in XPO1 gene are associated with poor prognosis of CLL. In our study, which included 58 patients with CLL and 100 healthy control subjects, NOTCH1 gene NM_017617.5: c.7541_7542delCT variation and the XPO1 gene NM_0033400.3: c.1711G>A variation were examined by Next Generation Sequencing (NGS) method. As a result of the study NM_017617.5: c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs in NOTCH1 gene was found in two patients. NM_0033400.3: c.1711G>A and NM_003400.3: c.1711G>C variations in XPO1 gene was observed in two patients. All healthy control subjects were determined as wild type genotype for these three variation. According to the data obtained from this study, it is predicted that the number of CLL patients should be increased in order to investigate the effects of the NOTCH1 gene NM_017617.5: c.7541_7542delCT; p.P2514Argfs and XPO1 gene NM_0033400.3: c.1711G> A variations on the prognosis in CLL.

Key words: NOTCH1, XPO1, Chronic Lymphocytic Leukemia, Next Generation Sequencing (NGS)

KAYNAKLAR

1. Horner, MJ, Ries, LAG; Krapcho, M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975- 2006. National Cancer Institute; Bethesda, MD: 2009.

2. Pamuk ON, Pamuk GE, Soysal T, Ongören S, Başlar Z, Ferhanoğlu B, et al. Chronic lymphocytic leukemia in Turkey: experience of a single center in Istanbul. South Med 2004;J;97:240-245.

3. Pamuk GE, Pamuk ON, Soysal T, Ongören S, Başlar Z, Ferhanoğlu B, et al. An overview of young CLL patients: a single-centre experience from Turkey. Haematologia (Budap) 2002;31:303-311.

4. Schubauer-Berigan MK, Daniels RD, Fleming DA, Markey AM, Couch JR, Ahrenholz SH, et al. Chronic lymphocytic leukaemia and radiation: findings among workers at five US nuclear facilities and a review of the recent literature. Br J Haematol 2007;139:799-808.

5. Linet MS, Mary K. Schubauer-Berigan, Weisenburger DD, Richardson DB, Landgren O, Aaron Blair A, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. Br J Haematol 2007;139:672-86.

6. Xose. S. Puente, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Gonzalo R. Ordo´n˜ez, N. Villamor, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia; 2011.

7. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti L. Z, Kipps Thomas J, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. Blood Journal 2012; blood-2011-10-386144.

8. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. Nature Leukemia 28 2014;108–117.

9. Lichtman MA. Battling the hematological malignancies: The 200 years' war. Oncologist 2008;13,126–138.

10. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. Med Chir Trans 1832;17:69–97

11. Rosen PJ, Lavey RS, Haskell CM. Hodgkin‟s Disease In: Haskell CM (ed). Cancer treatment. 4th ed. Philadelphia. W.B. Saunder Company. 1995;951-979

12. Bernhards J, Fischer R, Hubner K, et al. Histopatological classification of Hodgkin‟s lymphoma. Results from the reference pathology of the German Hodgkin‟s trial. Annals of Oncology 1992;3:31-33

13. Campo E, Swerdlow S, Harris N, Pileri S, Stein H, Jaffe E. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood 2011; 117(19):5019-5032.

14. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France, IARC Press, 2001:131–2.

15. Kumar V, Cotran, RS, Robbıns, SL. Temel Patoloji (çeviri: U. Çevikbaş), Hematopoietik ve Lenfoid Sistem. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi;2000.s.341-392.

16. Kök Hücre Nakli Nedir? Hangi Kanserlerin Tedavisinde Kullanılır? https://www.drozdogan.com/kok-hucre-nakli-nedir-hangi-kanserlerin-tedavisinde-kullanilir/ 05.05.2019

17. Hoffman, R, Benz, JE, Shattıl SJ, Furıe, B, Hematology. Basic principles and practice. 5th edition. Phildelphia: Churchill Livingstone, Elsevier;2009.

18. Umay A. Kronik Lenfositik Lösemide (Kll) Metilentetrahidrofolat Redüktaz (Mthfr) Enziminin Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması (tez) Adana: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü;2016.

19. Cheson, BD, Bennett, JM, Grever, M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. Blood 1996;87: 4990-4997.

20. Rodrigues CA, Gonçalves MV, Ikoma V, Lonard-Metze I, Pereira AD, Farias D, et al. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. Revista Brasileira de Hematologia de Hemoterapia 2016;38(4):346–357.

21. Eichhorst B, RT, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. ESMO Guidelines Committee. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. Sep;26 Suppl 5:v78-84. CLL trialists' collaborative group. Chemotherapeutic options in chronic lymhocytic leukemia. J Natl Cancer Inst, 2015;1999:p. 91:861–868.

22. Marti GE, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B- cell lymphocytosis. British journal of haematology 2005;130(3):p.325-332.

23. Öztürk G. Kronik Lenfositik Lösemi/Küçük Lenfositik Lenfoma, Hodgkin Lenfoma Ve Hodgkin Dışı Lenfoma Tanılı Hastalarda Tanı Anındaki Ve İzlemdeki Hepatit Serolojilerinin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi (tez) İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2016.

24. Moreau EJ, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). American Journal of Clinical Pathology 1997;108(4):p.378-382.

25. Ginaldi L, et al., Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. Journal of clinical pathology 1998;51(5): p. 364-369.

26. Hallek M, et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. Blood 2008;111(12):p.5446-5456.

27. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. American Journal of Hematology 2017;92(9):946-965

28. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Channa AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1975;46:219-34

29. Binet JL, Auquier A, Dighiero G. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 1981;48-198-206

30. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia, The New England Journal of Medicine 2000;343:1910-1916

31. Robak T. Staging and Prognostic Factors in Chronic Lymphocytic Leukemia: Current Status. J Leuk 2014;2:5

32. Szankasi P, Bahler DW. Clinical Laboratory Analysis of Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes for Chronic Lymphocytic Leukemia Prognosis. Journal of Molecular Diagnostic 2010;12(2): 244–249.

33. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate forimmunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2003;348:1764-1775

34. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999;15-94(6):1840-7.

35. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. Blood 2002;1-99(3):1023-9.

36. Del Principe MI, Del PG, Buccisano F, Maurillo L, Venditti A, Zucchetto A, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 2006;108:853-861

37. Pashaei M, Shokrollahi M, Kokhaei P. Somatic Mutation in Immunoglobulin Gene Variable Region in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Prognostic Impact. Basic & Clinical Cancer Research 2016;8(4):29-36.p:33

38. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. BioMed Research International 2014;p:13.

39. Durak B, Akay OM, Aslan V, Özdemir M, Şahin F, Artan S, et al. Prognostic impact of chromosome alterations detected by FISH in Turkish patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 2009;15-188(2):65-9.

40. Chiorazzi N. Implication of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2012;76-87.

41. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. NEJM 2000;343(26):1910

42. Furman RR. Prognostic markers and stratification of chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010;77-81.

43. Heerema NA, Byrd JC, Dal Cin PS, Dell' Aquila ML, Koduru PR, Aviram A, et al. Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study. Chronic Lymphocytic Leukemia Research Consortium. Cancer Genet Cytogenet. 2010;203(2):134-40.

44. Put N., Konings P., Rack K., Jamar M., Van Roy N., Libouton J.M., et al. Belgian Cytogenetic Group for Hemato-Oncology (BCGHO). Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. Genes Chromosomes Cancer 2009; 48(10):843-53.

45. Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. Blood 2012;119(10):2310-13

46. Klein U, Dalla-Favera R. New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Semin. Cancer Biol. 2010;20:377–383.

47. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. 2010b. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. Nat. Rev. Cancer 2010;10:37–50.

48. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, et al. Notch1 Pest domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. Br. J. Haematol. 2010;151:404–406.

49. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. Blood 2011;117:3391–3401.

50. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D, et al. 2010a. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. J. Clin. Oncol. 2010;28:4473–4479.

51. Gene. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/NOTCH1ID30ch9q34.html

52. Borggrefe T, Lauth M, Zwijsen A, Huylebroeck D, Oswald F, Giaimo B D. The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGFbeta/BMP and hypoxia pathways. Biochim Biophys Acta 2016;1863(2),303-313.

53. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. J Cell Sci 2013;126(Pt 10), 2135-2140.

54. Koch U, Lehal R, Radtke F. (). Stem cells living with a Notch. Development 2013;140(4), 689-704.

55. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Kopan R. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. Mol Cell 2000;197-206.

56. Dang TP. (). Notch, apoptosis and cancer Notch Signaling in Embryology and Cancer 2012;pp:199-209.

57. Yağcı E, Güneş Hasan Veysi. Notch Signaling Pathway and Carcinogenesis, Osmangazi Journal of Medicine 2017;39(109- 116).

58. Development Notch Signaling Pathway. http://pathwaymaps.com/maps/513/20.05.2019

59. Grabher C, Boehmer Von H, Look AT. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Nat. Rev. Cancer. 2006;6:347–359.

60. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies 2011;223:262–273.

61. Paganin M, Ferrando A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2011;25:83–90.

62. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth 2006;103:18261–18266.

63. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia 2004;306:269–271.

64. Kudo N, Khochbin S, Nishi K, Kitano K, Yanagida M, Yoshida M, et al. Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins 1997;272(47):29742-51.

65. Van der Watt PJ, Leaner VD. The nuclear exporter, Crm1, is regulated by NFY and Sp1 in cancer cells and repressed by p53 in response to DNA damage 2011;1809(7):316-26.

66. Gene. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/XPO1ID44168ch2p15.html/17.05.2019

67. Molecular Pathways: Anticancer Activity by Inhibition of Nucleocytoplasmic Shuttling http://clincancerres.aacrjournals.org/content/21/20/4508/10.05.2019

68. Hastalıkların Moleküler Temeli ve Yeni Moleküler Testler https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-hastaliklarin-molekuler-temeli-ve-yeni-molekuler-testler-60602.html/ 16.05.2019

ŞEKİLLER

Şekil 1. Hematopoetik (kan yapıcı) kök hücreden bağışıklık sistemi hücrelerinin oluşması.....7
Şekil 2. *NOTCH* geninin hücre içi sinyal yolu 14
Şekil 3. *XPO1* sinyal yolu 16
Şekil 4. KLL olgu gruplarının jel elektroforezi görüntüleri 22
Şekil 5. KLL Olgularının yaş grafiği.....28
Şekil 6. KLL olguları ile sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete göre dağılım grafiği 29
Şekil 7. KLL olgularının Rai evreleme sistemine göre yüzde dağılımı grafiği.....30
Şekil 8. *NOTCH1* genindeki NM_017617.5:c.7541_7542delCT varyasyonunun Ensemble veri tabanına göre cDNA görüntüsü 31
Şekil 9. *NOTCH1* genindeki NM_017617.5:c.7541_7542delCT varyasyonunun IGV programındaki görüntüsü.....32
Şekil 10. *XPO1* genindeki NM_003400.3:c.1711G>A varyasyonunun Ensemble veri tabanına göre cDNA görüntüsü.....34
Şekil 11. *XPO1* genindeki NM_003400.3:c.1711G>A ve NM_003400.3:c.1711G>C varyasyonlarının IGV programındaki görütüsü.....34

TABLOLAR

Tablo 1. KLL Tanı Kriterleri (NCIWG) 8
Tablo 2. KLL Tanı Kriterleri (IWCLL) 8
Tablo 3. Rai evreleme sistemi 10
Tablo 4. Binet evreleme sistemi 10
Tablo 5. Birinci Set PCR Malzemeleri 19
Tablo 6. PCR Şartları 20
Tablo 7. İkinci Set PCR Malzemeleri 20
Tablo 8. PCR Şartları 21
Tablo 9. Tegmentasyon için gerekli malzemeler 24
Tablo 10. PCR için gerekli malzemeler 25
Tablo 11. İzlenen PCR koşulları 25
Tablo 12. PCR pürifikasyonu için gerekli malzemeler 26
Tablo 13. Örneklerin yüklenmesi için gerekli malzemeler 27
Tablo 14. *NOTCH1* genindeki olgu ve kontrol grubu hastalarının frekans bilgileri 31
Tablo 15. *NOTCH1* geninde belirlenen varyasyona ilişkin veri tabanı bilgileri 31
Tablo 16. *XPO1* genindeki olgu ve kontrol grubu hastalarının frekans bilgileri 33
Tablo 17. *XPO1* geninde belirlenen varyasyona ilişkin veritabanı bilgileri 33

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Tekirdağ ilinin Çerkezköy ilçesinde doğan Elif TUNALI ÖZEN, ilk ve ortaokulu Fevzipaşa İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra Kapaklı Çok Programlı Lisesi'nde Fen Bilimleri bölümünde okumuş, ardından 2010 yılında girdiği Trakya Üniversitesi Biyoloji bölümünü 2014 yılında bitirmiştir. 2014-Eylül 2015- Haziran ayları arasında Koçak Farma İlaç Ve Kimya Sanayi'nde Mikrobiyoloji bölümünde Biyolog olarak çalışmıştır. 2015-Eylül ayında Trakya Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını yapmaya başlamış, öğrenciliği boyunca Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik bölümünde çalışmalara katkıda bulunmuş, 2018-Ekim ayında evlenmiştir.

EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun …… tarih ve …….. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (AÇIK AD…….) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** Kronik Lenfositik Lösemi de *NOTCH1* ve *XPO1* genlerindeki Varyasyonların araştırılması

- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Kronik lenfositik lösemi de kötü prognoza ve toplam sağ kalım süresinde azalmaya neden olan genetik değişikliklerin araştırılması

- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Yard. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Edirne

- **Araştırmanın amacı:** Kronik lenfositik lösemide kötü prognoz ve sağ kalım süresinde azalmaya neden olan varyasyonların araştırılması

- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Tez çalışması

- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** 29/11/2016- 12 ay

- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** Örneklem büyüklüğü 200 olgu (100 hasta,100 kontrol)

- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Kronik lenfositik lösemi tanısı almış olgulardan rutin tetkikler için alınan periferik kan örneklerinden ve kontrol grubundan oluşan bireylerden EDTA'lı tüpe 5ml periferik venöz kan alınacaktır.

- **Araştırmanın deneysel kısımları:** Alınmış olan periferik venöz kandan DNA elde edilecek ve DNA örneklerinde NOTCH1 genine ait bir varyasyon ve XPO1 genine ait iki varyasyon araştırılacaktır.

- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Bulunmamaktadır.

- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Kronik lenfositik lösemi tanısı almış olduğunuz için NOTCH1 ve XPO1 genlerinde meydana gelen varyasyonlarının araştırılması için çalışmaya dahil edilmek istenmektesiniz.

- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Doğrudan yarar beklenmemektedir. Bilimsel olarak elde edilen sonuçlar evrensel bir katkı sağlayacaktır.

- **Gönüllünün sorumlulukları:** Herhangi bir sorumluluğu bulunmamaktadır.

- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Çalışmaya dahil olan olgulardan rutin tetkikler için alınacak olan periferik venöz kanın bir miktarı (5 ml) çalışmamızda kullanılacağı için gönüllünün maruz kalabileceği risk ve/veya rahatsızlık bulunmamaktadır.

- **Risklere karşı alınan önlemler:** Çalışmamızda önlem almayı gerektirecek herhangi bir risk bulunmamaktadır.

- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Alternatif başka bir yöntem uygulanmayacaktır.

- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Herhangi bir girişimsel işlem yapılmayacağından zarar oluşumu beklenmemektedir.

- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Çalışma size herhangi bir maddi yük getirmeyecektir.

- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Gönüllü dilediği zaman kendi rızası ile araştırmadan çıkabilir.

- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** Çalışma sonucunda anlamlı bir ilişki saptanması durumunda hastalara genetik danışma verilecektir.

- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:** Yard. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Edirne

Telefon numarası: 0(284)235 76 41 Dahili: Gsm: 0(532) 436 74 01

- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** DNA elde etmek için periferik kan örneği kullanılacaktır.

- **Gönüllülerden elde edilecek biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için onay:**

- Kronik Lenfositik Lösemi de *NOTCH1* ve *XPO1* genlerindeki Varyasyonların **araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan, idrar, vb…);**

☐ **Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.**

☐ **İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.**

☐ **Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.**

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmalim nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

- **Gönüllünün; (El yazısı ile)**

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

Tarih:

- **Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)**

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

Tarih:

- **Açıklamaları yapan araştırmacının**

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih:

EK-2

ETİK KURULU ONAY BELGESİ

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2016/267	
	PROTOKOL ADI	Kronik Lenfositik Lösemide NOTCH1 ve XPO1 Genlerindeki Varyasyonların Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 19/18** **Tarih:23.11.2016** Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Elif TUNALI'nın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.
ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E (H)	(E) H	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E (H)	(E) H	
Yrd. Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E (H)	(E) H	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E (H)	(E) H	
Öğretim. Gör. Uzm. Dr. Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E (H)	(E) H	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E (H)	(E) H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.