T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ÇOCUK AKUT LÖSEMİ HASTALARINDA PANEL HALİNDE MUTASYON TARAMASI VE NOTCH SİNYAL YOLAĞI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

EGZONA QİPA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi SÜREYYA BOZKURT

EŞ DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi MURADİYE ACAR

İSTANBUL-2020

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ÇOCUK AKUT LÖSEMİ HASTALARINDA PANEL HALİNDE MUTASYON TARAMASI VE NOTCH SİNYAL YOLAĞI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

EGZONA QİPA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi SÜREYYA BOZKURT

EŞ DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi MURADİYE ACAR

İSTANBUL-2020

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT
Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Muradiye ACAR
Ortak Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER	İstinye Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Süreyya BOZKURT	İstinye Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Meryem ALAGÖZ	Biruni Üniversitesi

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "Çocuk Akut Lösemi Hastalarında Panel Halinde Mutasyon Taraması ve Notch Sinyal Yolağı İle İlişkisinin Araştırılması" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Egzona QİPA

ÖZET

ÇOCUK AKUT LÖSEMİ HASTALARINDA PANEL HALİNDE MUTASYON TARAMASI VE NOTCH SİNYAL YOLAĞI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Egzona Qipa
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı
Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Süreyya Bozkurt
Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Muradiye Acar

2020

Bu çalışmada akut lenfoblastik lösemi tanısı almış 52 pediatrik olgunun kemik iliği örneklerinde, *RUNX1, IDH2, İL2RA* genlerindeki olası mutasyonlar sanger dizileme yöntemi ile araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, RUNX1 geninde amino asit değişimine L148Q (p.Leu175Gln) neden olan c.524T>A mutasyonu saptandı. IL2RA geninde, intronik bölgede yer alan c.367+12A>T, c.367+7G>C, varyasyonlar tespit edildi. Akut Lösemi ve Notch sinyal yolağında rol alan genlerin karşılaştırmalı olarak araştırılması, sinyal yolağının fonksiyonunun daha iyi anlaşılması, akut lösemilerde, hastalığın terapötik müdahalesi için çok sayıda yol sağlayabilir. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerde görülen genetik anomalilerin hastaların prognozunu belirlemede önemli bir faktör olduğu için, ALL gelişimindeki mekanizmaların, sinyal yolakları üyeleri ile birlikte incelenmesi, bundan sonraki deneylerde prognoz tespiti açısından gelecek çalışmalara da rehber olabilir.

Anahtar kelimeler: NOTCH sinyal yolağı, B-ALL, *RUNX1, IDH2, IL2RA*

ABSTRACT

GENE PANEL MUTATİON SCREENİNG İN CHİLDREN WİTH ACUTE LYMPHOBLASTİC LEUKEMİA AND İTS RELATİONSHİP WİTH NOTCH SİGNALİNG PATHWAY

Egzona Qipa
Medical Biology and Genetics Master Program
Advisor: Asst. Prof. Süreyya Bozkurt
Co-Consultant: Asst. Prof Muradiye Acar

2020

The mutations found in bone marrow in RUNX1, IDH2, IL2RA genes have been studied using the Sangers sequencing method in our study of 52 acute lemphoblastic leukemia diagnosis. The cause of c.524T>A mutation that resulted in the change in amino acid L148Q (p.Leu175Gln) (Leucine- Glutamine) in the RUNX1 gene has been discovered. The variations c.367+12A>T, c.367+7G>C, have been found in the IL2RA Gene's intronic region. The comparison of genes found in Acute leukemia and Notch Signal pathway is vital for the therapeutic intervention in the acute leukemia to discover the importance of signaling pathway functions. Because of the importance of the anomalies of child acute lemphoblastic leukemia patients for prognosis, the mechanisms behind ALL development, it is of the utmost importance that the signaling pathway members to be examined for the guidance in prognosis of the experiments in the future.

Key words: NOTCH signaling pathway, B-ALL, *RUNX1, IDH2, IL2RA*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans süresince, başlangıcından sonuna kadar her koşulda yanımda olan çok sevgili danışmanlarım Dr. Öğretim Üyesi Muradiye ACAR ve Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT'a yürekten sonsuz teşekkürümü borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca bilgi, öneri, ve sonuç analizleri süresince sabrı ve desteği için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı çok değerli hocam Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e, yüksek lisans eğitimim ve Genetik Tanı Merkezi çalışanı olarak başladığım bu yolda engin bilgileri ve desteği için Dr. Öğretim Üyesi Murat BÜYÜKDOĞAN hocama çok teşekkür ederim.

Çalışma süresince verilerin toplanmasında gösterdikleri yakın ilgi ve yardımları için, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tip Araştirma Enstitüsü, Prof. Dr. Müge SAYİTOĞLU, Öğr.Gör. Yücel Erbilgin ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca her şekilde bana yardım eden arkadaşlarım Ceren AYNACI, Selma BİLURDAGİ. Laboratuvar çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyip bana herzaman yoldaşlık eden, haftasonı deney çalışmaları boyunca beni yanlız bırakmayan sevgili arkadaşım Hazal Berivan SÖNMEZ'e, tez yazım süresince ve 7 yılldır bana yoldaşlık eden canım arkadaşım Gülsüm ÜZEYİR'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Beni bu günlere zor demeden büyük uğraşlarla getiren hayatım her anında desteklerini madi ve manevi olarak hissettiren babam Veton, annem Valdete, canımın içi ablam Rilinda, can kardeşim Blin QİPA'ya ve küçük kalplerim MAL ve RİGA'ya yürekten sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....**i**
ABSTRACT.....**ii**
TESŞEKKÜR.....**iii**
İÇİNDEKİLER.....**iv**
ŞEKİL TABLOSU.....**vii**
TABLO LİSTESİ.....**viii**
KISALTMA LİSTESİ.....**x**
GİRİŞ.....**1**
1. GENEL BİLGİLER..... **1**
1.1. HEMATOPOEZ……..…1
1.2. KANSER..... 3
1.2.1. Tümör Baskılayıcı Genler 4
1.2.2. Onkogenler 5
1.3. HEMATOLOJIK HASTALIKLAR VE GENETIK 6
1.3.1. Normal Myelopoez..... 6
1.3.2. Myeloid Kök Hücreleri 6
13.3. Myeloid Büyüme Faktörleri 6
1.3.4. Myeloid Hücre Fonksiyonu..... 7
1.4. LÖKOMOGENEZİS..... 8
1.4.1. Akut Lösemi 8
1.4.2. Akut Miyeloid Lösemi: 9
1.4.3. Akut Lenfositik Lösemi..... 11
1.4.4. Akut Lenfoblastik Lösemi Epidemiyolojisi 11
1.4.5. Akut Lenfoblastik Lösemi Etiyolojisi 11
1.4.6. Morfolojik Özellikler..... 11
1.4.7. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Tarafından ALL Sınıflandırılması 13
1.4.8. Akut Lenfoblastik Lösemi Genetik Temeli……..13
1.4.9. B- Lenfoblastik Lösemi..... 13
1.4.10. T- Hücreli ALL Genetik Değişikliklere Göre Alt Grupları..... 14
1.4.11. Prognoz..... 15
1.4.12. ALL Tedavisi 16
1.5. NOTCH SINYAL YOLAĞI 18
1.5.1. Notch Sinyal Yolağı Elementleri..... 18
1.5.2. Ligand-Reseptör İlişkisinin Regülasyonu 19
1.5.3. Reseptör Aktivasyonu 20
1.5.4. Notch Sinyal Yolağının Aktivasyonu..... 20
1.5.5. NOTCH Sinyal Yolagı ve Hematopoez 24
1.6. GENLER 25
1.6.1. RUNX1- Geni..... 25
1.6.2. *IDH-2* Geni..... 25
1.6.3. *İL2RA*-Geni 26
2. MATERYAL VE METOD……..…27
2.1. ÇALIŞMA SÜRESINCE KULLANILAN CIHAZLAR VE MALZEMELER27

2.2. ÖRNEK SEÇIMI 28
2.3. ARAŞTIRMA YÖNTEMI : 28
2.4. DNA İZOLASYONU 30
2.5. DNA DILÜSYONU 30
2.6. PRIMER DIZAYNI 30
2.7. POLIMERAZ ZINCIR REAKSIYONU 32
2.8. JEL ELEKTROFOREZ 36
2.9. KAPILLER ELEKTROFOREZ'DE SEKANS ANALIZI 38
2.10. ELEKTROFOREZ SONRASINDA VERILERIN DEĞERLENDIRILMESI 38
3. BULGULAR.....39
4. TARTIŞMA VE SONUÇ…….48
KAYNAKLAR……..……53

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Hematopoetik hücre gelişimi…….....2
Şekil 1.2: Onkogen ve tümor baskılayıcı Genler…….4
Şekil 1.3: ALL'nin morfolojik tipleri……12
Şekil 1.4: NOTCH sinyal yolağı elementleri……19
Şekil 1.5: NOTCH1, NOTCH2 ve JAGGED1'deki alanların atomik çözünürlüğü..22
Şekil 1.6: *RUNX1* geninin kromozomal pozisyonu……...25
Şekil 1.7: *IDH2* genin kromozomal pozisyonu……..25
Şekil 1.8: *IL2RA* geninin kromozomal pozisyonu……..26
Şekil 3.1: VarsomeClinical platformunda c.524T>A mutasyonunun …….….42
Şekil 3.2: c.524 T>A mutasyonu taşıyan olgunun elektroforogram görüntüsü…….43
Şekil 3.3: VarsomeClinical platformunda g.381A>T mutasyonun ……..44
Şekil 3.4: g.38139A>T mutasyonu elektroforogram görüntüsü……...45
Şekil 3.5: VarsomeClinical platformunda g g.38134G>C ……....46
Şekil 3.6: g.38139A>T mutasyonu elektroforogram görüntüsü……...47

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: Lökomogenezde Katkıda Bulunan Etmenler 8
Tablo 1.2: WHO Kriterine Göre AML sınflandırılması 10
Tablo 1.3: FAB Kriterine Göre Morfolojik AML Sınflandırılması 10
Tablo 1.4: EGİL'e Göre ALL'nin İmmünolojik Sınıflaması 12
Tablo 1.5: Farklı türlerde Notch yolu üyeleri için kullanılan terminoloji 18
Tablo 1.6: NOTCH Sinyal Yolağı Mutasyonu İçeren Hastalıklar 23
Tablo 2.1: Çalışma Süresince Kullanılan Cihazlar……27
Tablo 2.2: Çalışma Süresince Kullanılan Kimyasal Malzemeler……28
Tablo 2.3: Kullanılan Primer Dizileri……...31
Tablo 2.4: PCR Birinci Aşamasında KullanılanBileşenler……...32
Tablo 2.5: RUNX1- Exon 1 PCR Koşuları……...32
Tablo 2.6: RUNX1- Exon 2 PCR Koşuları……...33
Tablo 2.7: RUNX1- Exon 3 PCR Koşuları……..33
Tablo 2.8: RUNX1- Exon 4 PCR Koşuları……...33
Tablo 2.9: RUNX1- Exon 8 PCR Koşuları……...34
Tablo 2.10: RUNX1- Exon 6 PCR Koşuları ……34
Tablo 2.11: RUNX1- Exon 7 PCR Koşuları……34
Tablo 2.12: IDH-2 PCR Koşuları……35
Tablo 2.13: İL2RA Exon 3 PCR Koşuları……35
Tablo 2.14: İL2RA Exon 6 PCR Koşuları……35
Tablo 2.15: ExoSap aşamasında kullanılan bileşen miktarları……36
Tablo 2.16: ExoSap koşuları……36
Tablo 2.17: Sekans PCR aşamasında kulanılan bileşenler ve miktarları……37
Tablo 2.18: Sekans PCR koşuları……37
Tablo 3.1: Çalışmaya dahil edilen B-ALL hastalarının klinik özellikleri……..40
Tablo 3.2: RUNX1 mutasyonu taşiyan hastanin laboratuar özellikleri……..41
Tablo 3.3: MutationTester analiz programı sonucunda c.524T>A mutasyonu…..42
Tablo 3.4: IL2RA mutasyonu taşıyan hastanin laboratuar özellikleri……43
Tablo 3.5: MutationTester analiz programı sonucunda g.38139A>T mutasyonu.44
Tablo 3.6: IL2RA mutasyonu taşıyan hastanin laboratuar özellikleri……..45
Tablo 3.7: MutationTester analiz programı sonucunda g.38134G>C mutasyonu…46

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler		Açıklama
HSC	**:**	Hemapoetik Kök Hücre
BM	**:**	Bone Marrow, kemik iliği
LOH	**:**	Hetozigozite kaybı
KML	**:**	Kronik miyeloid lösemi
AML	**:**	Akut miyeloid lösemi
ALL	**:**	Akut lenfositik lösemi
WHO	**:**	Dünya Sağlık Örgütü
FAB	**:**	French-American British
EGIL	**:**	European Group for the Classification of Acute Leukemia
FİSH	**:**	Floresan insitu hibridizasyon
PCR	**:**	Polimeraz zincir reaksiyonu
MGG	**:**	May-Grünwald-Giemsa
RAM	**:**	Reseptörün sitoplazmik alanı
ANK	**:**	Ankrin
NLS	**:**	Nükleer lokalizasyon parçaları
İCN	**:**	NOTCH sinyal yolağının intraselüler alanları
ATP	**:**	Adenozin trifosfat
ADP	**:**	Adenozin difosfat
µl	**:**	Mikrolitre
mL	**:**	Mililitre
mRNA	**:**	Messenger RNA
Tm	**:**	Melting temperature / Erime sıcaklığı
DNA	**:**	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	**:**	Ribo Nükleik asit
gDNA	**:**	Genomik DNA
ng	**:**	nanogram
dNTP	**:**	Dinükleotittrifosfatlar
TBE	**:**	Tris borik EDTA
RB	**:**	Transcriptional Corepressor 1
NF1	**:**	Neurofibromin 1
PTCH	**:**	Patched 1
EGF	**:**	Epidermal Growth Factor
FGF	**:**	Fibroblast Growth Factor
IL4	**:**	Interleukin 4
EGFR	**:**	Epidermal Growth Factor Receptor
ERBB2	**:**	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ERBB3	**:**	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3
ERBB4	**:**	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4
MET	**:**	Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
RET	**:**	Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor Ret
SRC	**:**	Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
BCR-ABL	**:**	BCR Activator Of RhoGEF And GTPase- ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase
HRAS	**:**	V-Ha-Ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene

KRAS : V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene
NRAS : Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene
BRAF : B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
AKT1 : AKT Serine/Threonine Kinase 1
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
v-CRKV : -Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene
RUNX1 : Runt-Related Transcription Factor 1
MLL : Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia Protein
MDM2 : E3 Ubiquitin Protein Ligase
EBV : Epstein-Barr virus
RARA : Retinoic Acid Receptor Alpha
PML : Promyelocytic Leukemia
IKZF1 : IKAROS Family Zinc Finger 1
PAX5 : Paired Box 5
PTPN11 : Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11
TAL1 : Transcription Factor 1, Erythroid Differentiation Factor
FLT3 : Fms Related Tyrosine Kinase 3
CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
ETV6 : ETS Variant Transcription Factor 6
TLX1 : T Cell Leukemia Homeobox 1
PICALM : Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein
NOTCH1 : Translocation-Associated Notch Protein TAN-1
FBXW7 : F-Box And WD Repeat Domain Containing 7
PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog
CD1a : T-Cell Surface Glycoprotein CD1a
GATA3 : Trans-Acting T-Cell-Specific Transcription Factor GATA-3
EP300 : E1A Binding Protein P300
IL7R : Interleukin 7 Receptor
JAK1 : Janus Kinase 1
JAK3 : Janus Kinase 3
JAK2 : Janus Kinase 2
SH2B3 : Adaptor Protein 3
SETD2 : SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase
JAG2 : Jagged Canonical Notch Ligand 2
MAML1 : Mastermind Like Transcriptional Coactivator 1
LFNG : O-Fucosylpeptide 3-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase
RFNG : O-Fucosylpeptide 3-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase
MFNG : O-Fucosylpeptide 3-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase
DLL1 : Delta Like Canonical Notch Ligand 1
CBF1/RBPJ : Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region
CNOT3 : Transcription Complex Subunit 3
WBC : White Blood Cells

GİRİŞ

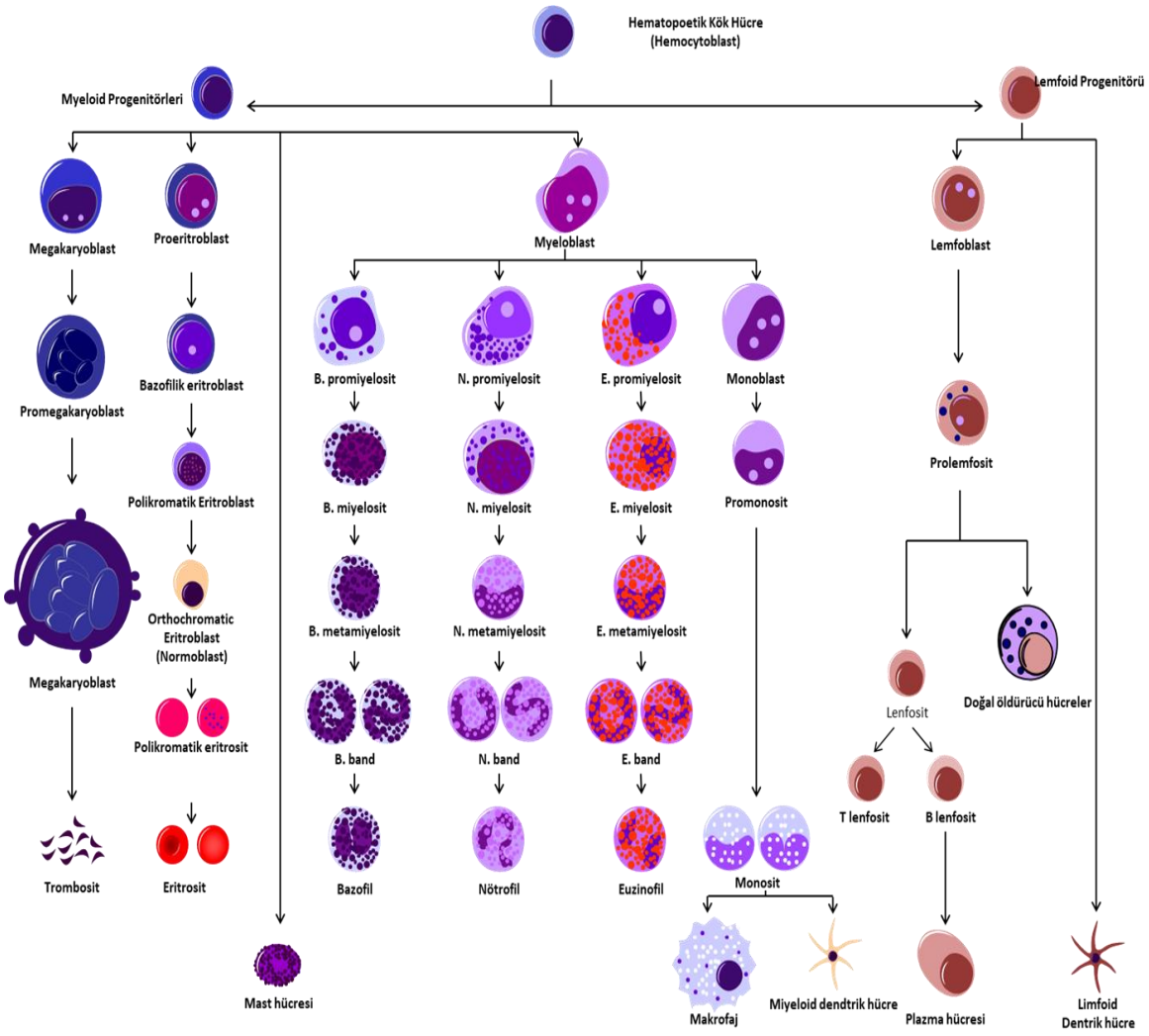
Bu çalışmada akut lenfoblastik lösemi tanısı almış 52 pediatrik olgunun kemik iliği örneklerinde, *RUNX1, IDH2, İL2RA* genlerindeki yer alan olası mutasyonlar sanger sekans dizileme yöntemi ile araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, *RUNX1* geninin exon 5'inde yalnızca 1 olguda (olgu no.14) c.524T>A mutasyonu saptandı. *IL2RA* geninde, intronik bölgede yer alan varyasyonlar tespit edildi. Olgu 10'da c.367+12A>T, olgu 12'de c.367+7G>C, olgu 18'de c.367+12A>T saptandi. *IDH2* geninde ise herhangi bir mutasyon, varyasyon tespit edilmemiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. HEMATOPOEZ

Kan, kemik iliği ile birlikte vücutta homeostazın sağlanmasına katkıda bulunan organ sistemini meydana getirir. Kan, proteinler, farklı besinsel bileşenler ve özel hücrelerden oluşan sıvı bir dokudur. Kan hücrelerinin sınırlı yaşam süreleri vardır; sürekli olarak yapılır ve parçalanırlar. Hematopoezin amacı, periferik kandaki farklı hücre tiplerini sabit seviyede tutmaktır. Hem insan eritrositi hem de plateletleri tüm yaşam sürelerini dolaşımdaki kanda geçirirler, fakat lökositler kemik iliğinden geçtikten kısa bir süre sonra dolaşım dışına göç ederler ve değişken yaşam sürelerini bu dokularda geçirirler.

Kan dokusu, çeşitli işlevlere sahiptir ve 10'dan fazla farklı kan hücresi türü içerir: Bunlardan Lökositler, doğal ve edinilmiş bağışıklık sistemi ile ilgili birçok hücre türünü temsil eder. Eritrositler O_2 ve CO_2 taşınımı sağlarken, megakaryositler ise trombosit üretiminini sağlar. Tüm kan hücresi tipleri, kemik iliğinde (Kİ) bulunan hematopoetik kök hücrelerden (HSC'ler) meydana gelmektedir (şekil1.1.). Uygun sinyallerin varlığında hematopoietik kök hücreler çoğalır, farklılaşır ve kanı oluşturan herhangi bir hücre tipine olgunlaşır (Rieger & Schroeder, 2012) (Yokota & Kanakura, 2016).



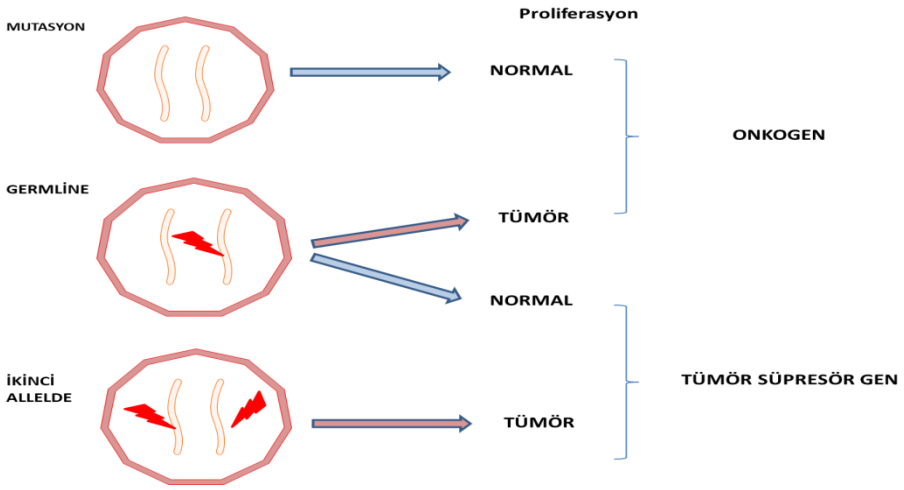
Şekil 1.1. Hematopoetik hücre gelişimi

1.2. KANSER

Kanser klinikte sık rastlanan hastalıklardan biridir. Yapılan istatistiksel çalışmalarda, gelişmekte olan ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık %10'dan fazlasının kanser tedavileri harcamaları olduğu belirtilmektedir. Kanser kontrolsüz hücre çoğalması, proliferasyonuyla karakterize edilen bir hastalık grubudur. Anormal bir doku kitlesinin kanser olabilmesi için malign özellik göstermesi, kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi ve uzak mesafelere yayılabilme (metastaz yapabilme) özelliğine sahip olması gerekmektedir.

Kanserin üç tip olmak üzere; epitelyal-dokudan kaynaklanan karsinomlar, mezenşimal dokudan kaynaklanan (Kas, kemik) sarkomlar, ve lenfoid sistem (Kemik iliği) (Nussbaum, Mclnnes, & Willard, 2005).

Kanser, çevresel faktörlerin genetik materyal üzerinde yaptığı değişiklikler sonucu hücrenin diferensiasyon ve proliferasyon kontrolünün kaybolduğu klonal bir hastalık olup çok basamaklı bir süreç sonucunda meydana gelmektedir. Karsinogenez olarak bilinen bu süreçte hücrenin proliferasyon ve diferansiyonunda rol oynayan proteinleri kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar önemli rol oynamaktadır. Tümor baskılayıcı genler ve onkogenler olarak bilinen bu genlerden, tümor baskılayıcı genlerin kanser oluşumunda etkili bir halde olabilmesi için her iki alelin de fonksiyonel işlevini kaybetmesi gerekirken; onkogenlerde, alellerden yanlızca birisinde oluşan mutasyon kansere yol açabilmektedir. Tümor baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar, genlerin kodladıkları protein ürününde işlev kaybına yol açabilirler (ŞEKİL1). Onkogelerde meydana gelen mutasyonlar ise genellikle sporadik kanserlerin oluşumunda rol oynamaktadır, çoğunlukla proteinde işlev arttışına veya proteinlerde yeni işlev kazandıran bir değişiklik yaratarak genellikle sporadik kanserlerin oluşumunda rol oynaralar (Tükün & Akay, 2016).



Şekil 1.2. Onkogen ve tümor baskılayıcı Genler

1.2.1. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genlerin her iki allelinin fonksiyonunu yitirmesi ile bu genlerde işlev kaybı meydana gelir. Tümör baskılayıcı genler hücre siklusünde meydana gelen bozulmanın devamını durdurarak, bazı durumlarda hücreleri apoptoz yolu ile hücre ölümüne göndererek, hücre DNA'sının tamirini, replikasyonunu, doğru bir şekilde gerçekleştirerek genom bütünlüğünün korunmasını sağlar.

Tümör Baskılayıcı Gen İnaktivasyonu:

Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu çift vuruş hipotezi ile özetlenmektedir. Örneğin; retinoblastomaya neden olan RB (RB Transcriptional Corepressor 1) geni ile NF1 (Neurofibromin 1) ve PTCH1(Patched 1) genleri çeşitli mekanizmalar ile kanser oluşumuna neden olmaktadır. Kanser gelişiminde rol oynayan Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olan mekanizmalar;

- Nokta mutasyonları
- Heterozigosite kaybı (LOH)
- Metilasyon artışı şeklinde özetlenebilir.

1.2.2 .Onkogenler

Onkogenler, hücre içindeki yeri ve işlevine göre farklı gruplara sınflandırılabilir;

- Büyüme faktörleri: EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), IL-4 (interleukin4),
- Büyüme faktörü reseptör tirozin kinazlar: EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ERBB2 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2), ERBB3 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3), ERBB4 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4), MET (MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase), RET (Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor Ret)
- Reseptör olmayan tirozin kinazlar: SRC (SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase), BCR-ABL (BCR Activator Of RhoGEF And GTPase- ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase)
- Membran ilişkili G-proteinler; HRAS (V-Ha-Ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene), KRAS(V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene),NRAS (Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene)
- Serin-treonin kinazlar: BRAF (B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase), AKT (AKT Serine/Threonine Kinase 1)
- Sitoplazmik düzenleyiciler: v-CRK (V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene)
- Nüklear proteinler: CMYC (MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor), RUNX1 (Runt-Related Transcription Factor 1) , MLL (Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia Protein)
- Siklinler: MDM2 (Proto-Oncogene).

Bu genler hücrenin bölünmesinde ve büyümesinde kontrol görevini üstlenirler ve protoonkogen denilen genlerin mutasyona uğraması sonucunda meydana gelirler. İnsanda 50'den fazla onkogen tanımlanmıştır. Genetik değişimlerin meydana gelmediği durumlarda bu yapılara protoonkogen adı verilir. Genetik değişimlerin meydana geldiği durumlarda ise onkogen ismini alırlar ve anormal hücre çoğalmasına neden olurlar. Onkogenler dominant karakterde olup, anne ve babadan

gelen allellerden bir tanesinde dahi mutasyonun meydana gelmesi, hücrenin aşırı çoğalmasına neden olarak, kanser gelişmesi için yeterlidir (Şekil 1.2.).

Onkogen Aktivasyonuna neden olan mekanizmalar

- Nokta mutasyonları
- Gen amplifikasyonu (overekspresyon)
- Gen aktivasyonu
- Gen füzyonu şeklinde özetlenebilir (Yeni kimerik gen) (Tükün & Akay, 2016).

1.3. HEMATOLOJIK HASTALIKLAR VE GENETIK

1.3.1. Normal Myelopoez

Nötrofil, bazofilik granülositleri içeren yeni miyeloid kökenli hücrelerin sağlıklı, kontrolü bir şekilde üretilmesi normal myelopoez önemli bir rol oynamaktadır. Bu şekilde hücrelerin sağlıklı ve kontrolü olarak üretilmesinde bir çok büyüme faktörü rol oynamaktadır.

1.3.2. Miyeloid Kök Hücreleri

Miyeloid kök hücreler, asıl kaynagı multipotent kök hücreler olan ve kan-doku sistemimizde diğer hücre serilerine dönüşebilme yeteneğine sahip olan granülosit-makrofaj olarak bilinen bir öncü hücreye sahiptir. Bu hücreler miyeloid, megakaryosit ve diğer tüm hematopoetik hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahiptir.

13.3. Miyeloid Büyüme Faktörleri

Granülosit-makrofaj hücrelerinin, diğer hematopoetik hücrelere dönüşümünü etkileyen birçok dış faktör bulunmaktadır. Dönüşümü etkileyen faktörlerden biri de büyüme faktörleridir. İlk öncül hücrenin diferansiasyona girebilmesi için, büyüme faktörleri ile etkileşime girerek diferansiasyon için gerekli olan genleri aktive ederler ve bu şekilde birkaç transkripsiyon protein faktörlerini üretirler.

Miyeloid büyüme faktörleri sırasıyla;

- Granülosit makrofaj uyarıcı faktör
- Granülosit koloni uyarıcı faktör
- Monosit uyarıcı faktör
- Kök hücre uyarıcı faktörü şeklinde özetlenir.

1.3.4. Miyeloid Hücre Fonksiyonu

Oluşan myeloid hücrelerin üç önemli görevi bilinmektedir. İlk özellikleri olası bir inflamasyon sonucunda, kendilerini dolaşımdan dokuya aktarabilme yetenekleridir. Bir diğer önemli görevleri fagositoz yetenekleridir. Hücrenin fagositoz kabiliyeti ve içine nüfuz eden infeksiyoz ajanı yok edebilme özeliği bu şekilde kontrol altındadır. Üçüncü görevleri ise ekzositoz olarak bilinen granül içeriğinin uzaklaştırılmasıdır (Hillman, Ault, & Rinder, 2009).

1.4. LÖKOMOGENEZİS

Bağışıklık sisteminde meydana gelen bozukluklar, çevresel faktörler, bazı kalıtsal sendromik hastalıklar, enfeksiyonlar gibi etkenlerin sonucunda hücre döngüsünde yer alan birçok gendeki işlevsel sinyal moleküllerinde meydana gelen değişiklikler sonucunda hematopoetik hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesini sağlarlar. Lösemi gelişimi çok aşamali ve çok genli bir süreç olup, diğer kanserlerde de olduğu gibi değişime uğrayan tek bir hücreden köken alarak klonal bir bozukluk olarak tanımlanabilir (Çetingül, Aydın, Özbek, & Karakaş, 2011).

Tablo 1.1. Lökomogenezde Katkıda Bulunan Etmenler (Çetingül, Aydın, Özbek, & Karakaş, 2011)

Lökomogenezde Katkıda Bulunan Etmenler
a. Çevresel etmenler İyonize radyasyon Kimyasal etmenlere maruziyet Hamilelikte alkol kullanımı Beslenme Enfeksiyonlar (onkojenik retrovirüsler/EBV (Epstein-Barr virus)
b. Diğer etmenler Doğumsal genetik hastalıklar, bağışıklık sistemi bozuklukları Down sendromu, Fanconi anemisi, Kostman sendromu, Diamond-Blackfan sendromu, Noonan sendromu, Ailesel trombosit bozuklukları, Bloom sendromu
c. Edinsel Aplastik anemi, Trombositopeni,

1.4.1. Akut Lösemi

Lösemiler, kemik iliği ve kan doku kaynaklı ve yaşamı tehdit eden bir hastalık grubudur. Ergen ve erişkin populasyonunda kronik miyeloid lösemiden çok akut lösemiler daha yaygındır. Lösemiler her yaşta ortaya çıkabilen, fakat yaş gruplarına göre de farklılık gösterebilen hastalıklardır. Lösemiler kan ve / veya kemik iliğinde artan sayıda lökositle ortaya çıkan çeşitli malign bozuklukların ortak adıdır. Baskın olarak ortaya çıkan lösemi hücreleri, kronik lenfositik lösemi (KLL) gibi olgun veya

akut lösemiler gibi çeşitli hücre soylarının öncü hücreleri veya kronik miyeloid lösemide (KML) olduğu gibi hem öncü hem de olgun hücreler olabilir. Çocukluk döneminde ALL (akut lenfoblastik lösemi)'ye sıkça rastlanırken, erişkinlerde AML (akut miyeloid lösemi) yaygındır (Juliusson & Hough , 2016) .

1.4.2. Akut Miyeloid Lösemi

Akut miyeloid lösemi kompleks bir hastalık olup, genototip ve fentotipte değişiklikler gözlemlenmektedir. AML'de çeşitli genlerdeki mutasyonlar ve sitogenetik aberasyonlar gibi bir çok faktör bulunmaktadır. Akut myeloid lösemi oranı coğrafik ve etnik kökene göre farklılık göstermektedir. AML sıklığının arttığı durumlar, genetik faktörlerden; down sendromu, fankoni anemisi, nörofibromatozis, klinefelter sendromu, ailevi trombositopeni, diamond blackfan anemisi, kostman sendromu, çevresel faktörler olarak ise; maternal ilaç-sigara kullanımı, maternal topoisomeraz II içeren gıdalar, iyonize ışınlar, benzen, pestisitler, ağır metaller gibi etkenler sıralanabilir. Akut myeloid lösemide sık rastlanan kromozomal translokasyonların çoğu kimerik füzyon gen oluşturur. Bunlardan en sık gözlenen çeşitli dokuların farklılaşmasında görevli olan CBF (core binding factor) ailesi translokasyonlarıdır (AML1-ETO) t(8;21). AML olgularının %12'sinde tespit edilir bu nedenle önemli bir belirteç olarak kullanılır. RARA (retinoik asit reseptör alfa) t(15;17) t(11;17), PML (Promyelocytic Leukemia) geninde lokalize gen füzyonunu oluşturur, retinoik asitte meydana gelen transaktivasyon sonucunda dominant negatif olarak inhibe edilir ve fenotipik olarak gelişimin durmasına neden olur. AML'de PML-RARA t(15;17) translokasyonu hastaların %95'inde pozitif olarak saptanır. AML'de sınıflandırma öncelikle sitokimyasal, morfolojik özellikler göz önüne alınarak bir sınıflandırma yapılır. WHO (dünya sağlık orgütü) göre 1997'de sitogenetik özelikler de göz önüne alınarak yeni bir sınıflandırma tablosu oluşturulmuştur (Anak & Sarıbeyoğlu, 2011).

Tablo 1.1. WHO Kriterine Göre AML sınflandırılması

WHO Sınıflaması
Tekrarlayan translokasyonlar gösteren AML
t(8;21)(q22;q22) AML1-ETO füzyonu
Akut premyiyelositik lösemi: t(15;17)(q22;q12), PML-RARA füzyonu
Çok seride displazi gösteren AML
Öncesinde miyelodisplastik sendromu
Öncesinde miyelodisplastik sendromu yok
Öncesinde miyelodisplastik sendrom olan AML, tedaviye bağlı
Alkileyici ajanlara bağlı
Epipodfilotoksi'e bağlı
Sınıflanmayan AML
Minimal diferansiye AML

Tablo 1.2. FAB Kriterine Göre Morfolojik AML Sınflandırılması

FAB sınflaması	**İsim**	**Sıklık**
M0	Minimal diferansiye AML	%2-6
M1	Azdiferansiye AML	%12-21
M2	Maturasyonun olduğu	%27-30
M3	AML	%5-17
M4	Promyelositik lösemi	%16-25
M5	Eosinofilik M4 variantı	
M6	Monositik lösemi	%13-22
M7	Eritrolösemi	%1-5
	Megakaryositik lösemi	%4-8

1.4.3. Akut Lenfositik Lösemi

B ve T hücre farklılaşma süresince, gelişimin oluştuğu safhalardan birinde meydana gelen herhangi bir genetik bozukluluk, proliferasyon sürecinin bozulmasına, hücre populasyonunda artışa ve akut lenfoblastik lösemiye (ALL) neden olmaktadır. ALL 15 yaşın altındaki çocuklarda (genellikle 2-5 yaşları arasında) sıkça görülen bir malignansidir ve çocukluk çağı kanserlerinin %85'ini oluşturur (Inman & Kuehl, 2014). ALL'de genellikle translokasyonlar mevcuttur (BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL füzyon gen ürünleri, TEL-AML1). Akut lenfoblastik lösemi sınıflandırımasında kullanılan FAB (French-American British) ve EGIL (European Group for the Classification of Acute Leukemia) sınıflandırmaları genetik ve immünolojik birleşimine dayanmaktadır. Hastalığın etiyolojisi tam olarak belirlenememiş olsa da ana etken olarak bazı kromozomal düzenlenmeler, anöploidi ve translokasyonların sorumlu olduğu bilinmektedir. ALL'den sorumlu birçok submikroskobik genetik anomalilerin ve ALL sinyal yolaklarında yeni etken genlerin keşfedilmesi ALL tiplerinin belirlenmesine yardımcı olmuştur (Anak & Sarıbeyoğlu, 2011).

1.4.4. Akut Lenfoblastik Lösemi Epidemiyolojisi

Akut lenfoblastik lösemi çocukluk çağında en sık rastlanan kanser tipidir. ALL 2-5 yaş arasında sıklıkla görülür. Akut lenfoblastik lösemi, çocukluk dönemi kanserlerin %80'ini oluşturur ve akut miyeloid löseminden daha sık rastlanır.

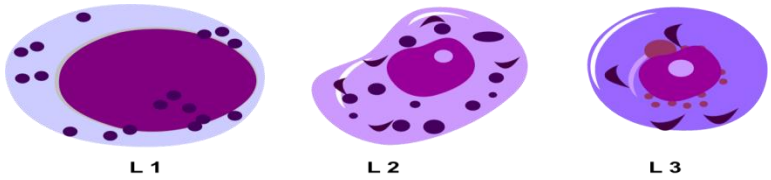
1.4.5. Akut Lenfoblastik Lösemi Etiyolojisi

Çoğu lösemi ile ilişkili hastalıkların etiyolojisi bilinmemektedir, bilinen en belirgin nedenler arasında, genetik faktörlerin rolü, yapısal karyotipik değişimler, ailede bilinen olguların varlığı, genetik instabilite gibi nedenler sıralanabilir.

1.4.6. Morfolojik Özellikler

Akut lenfoblastik lösemi'de kemik iliği ve periferik kan örneklerinden morfolojik sınıflandırma üç gruba ayrılmıştır;

1. L1- Lenfositler küçük ve belirgin olmayan nukleolusları varıdr.
2. L2 Lenfosit görüntüleri yuvarlak nükleus, ve dar sitoplazma ile karakterizedir.
3. L3- Lenfositler büyük, nukleusları yuvarlak, ince kromatin ve bazofilik şekilde sitoplazmaları ile karakterize edili



Şekil 1.3. ALL'de lenfosit tipleri

Morfolojik sınıflandırma ve tanıda MGG (May-Grünwald-Giemsa) boyama yöntemi ile periferik kan ve kemik iliğinden morfolojik inceleme yapılır. Lenfoblastlar tipik olarak dar ve küçüktür, belirgin olmayan nükleol, sitoplazmada bazen granüller görülebilir (Soycan, Akçay, & Ağaoğlu, 2011). Hastalığın morfolojik olarak sınıflandırılması hücre boyama özellikleri, kromatin yapısı, sitoplazma genişliği ve hücrelerin büyüklüklerine göre ayırt edilir, fakat buna rağmen B ve T hücre dizileri ile ilişkili belirleme yetersiz kalmıştır, bu nedenle de ALL alt tiplerini belirlemede FAB sınıflandırma yetersiz kalmıştır ve bunun yerini genetik şemalar ve imunofenotipleme almıştır (PUI, 1995).

Tablo 1.4. EGİL'e Göre ALL'nin İmmünolojik Sınıflaması

1. B hücreli ALL
Pro-B-ALL (B-I)
Common ALL (B-II)
Pre-B-ALL (B-III)
Matür B-ALL (B-IV)
2. T-hücreli ALL
Pro-T-ALL (T-I)
Pre-T-ALL (T-II)
Kortikal-T-ALL (T-III)
Matür-T-ALL(T-IV)
α/ β + T-ALL (grup A)
3. Miyeloid antijen +ALL

1.4.7. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Tarafından ALL Sınıflandırılması

Akut lösemilerde sitokimyasal, genetik ve morfolojik bulgular sayesinde tanı ve sınıflandırma son yıllarda değişimler göstermiştir. 2001 yılında WHO genetik bozukluklukları miyeloid neoplazilerin sınıflandırmasında parametre olarak kullanmaya başlamıştır. 2008 yıllarında ise T ve B lenfoblastik lösemi başlıkları altında genetik özellikleri ile sınıflandırılmıştır (Vardiman, et al., 2009).

- B-Prekürsör Lösemi (olguların %75'idir)
- T-Prekürsör Lösemi (olguların %25'idir)
- Burkitt Lösemi (olguların %5'den daha azıdır)

1.4.8. Akut Lenfoblastik Lösemi Genetik Temeli

1.4.9. B- Lenfoblastik lösemi

Hiperdiploidi (> 50 kromozom):

Hiperdiploidi B-ALL'de en sık rastlanan kromozal anomalidir, genetik değişiklikler ve translokasyonlar gözlemlenmez. Hastaların %50'sinde belirli kromozomların (4,6,10,14,17,18,21 ve X) artması ile karakterizedir. B-ALL genellikle *İKZF1, PAX5, FLT3, NRAS, KRAS* ve *PTPN1, CDKN2A* mutasyonları ile birlikte gözlemlenir.

Hipodiploidi (<40 kromozom):

B- hücreli ALL olgularında kötü prognozu işaret eder. Kromozom sayısı ne kadar düşük olursa prognoz o kadar kötü olur. Meydana gelen mutasyonlarda etken sinyal yolakları RAS-MEK-RAF-ERK sinyal yolakları olarak gösterilmiştir.

t(12;21) (p11.3;q3;q22): Kodlanan bölge *ETV6-RUNX1* füzyon bölgesidir, iyi prognoz ile ilişkilidir.

t(9;22)(q34;q11p11.2): Bu translokasyon sonucunda *BCR-ABL* füzyon proteini kodlanır. Çocuk ALL vakalarında %2-4 arasında, erişkin ALL vakalarında ise % 2-30 oranında görülür ve sık rastlanan kromozom anomalilerinden birisidir.

t(1;19)(q23;p13): Kodlanan bölge TCF3-PBX1 füzyon proteinidir. Çocuklarda sıkça rastlanır.

t(4;11)(q21;q23): Kodlanan bölge MLL-AF4 füzyon proteinidir. 11q23 bandında MLL geni ve diğer genler arasında translokasyon meydana gelir. t(4;11) translokasyonu taşıyan olgular kötü prognoz ile ilişkilidir.

1.4.10 T- Hücreli ALL Genetik Değişikliklere Göre Alt Grupları

T- hücreli ALL'de hücreler genel olarak orta büyüklükte, yoğun kromatinli ve dar sitoplazma ile karakterizedir. Çocukluk dönemi lösemilerin %15 oluşturmaktadır. Çoğu hastada tanı için karyotipleme yetersiz kalır bu nedenle moleküler incelemeler istenmektedir. Bu gibi olgularda delesyonlar ve NOTCH1 mutasyonları görülür.

T hücreli ALL, transkripsiyon faktörlerini kodlayan genleri, T hücre antijenlerini kodlayan genleri, gelişimsel genleri ve tümör baskılayıcı yolakları bozan genleri etkileyen translokasyonlar ile karakterizedir.

t(10,17)(p32;q35), t(1;14)(p32;q11), intertisyel 1p32 delesyonu. Genellikle iyi prognozu gösterir.

t(11;14)(q15;q11) ve 5' LMO2 delesyonu, LMO2 disregülasyonu: Sıklığı %2'dir. Genellikle iyi prognozu gösterir.

t(10;14)(q24;q11), ve t(7;10)(q35;q24), TLX1 (HOX11) disregülasyonu: T hücreli ALL'de sıklıkta görülür. İyi prognozu gösterir.

t(5;14)(q35;q32), TLX3 disregülasyonu: %20 sıklıkta görülür. Genellikle BCL11 füzyonu oluşur. Kötü prognozu gösterir.

t(10;11) (p13;q14 *PICALM-MLLT10* (*CALM-AF10*): Sıklığı %10'dur. Kötü prognozu gösterebilir.

MLL-MLLT1 (MLL-ENL): Sıklığı % 2- 3 'tür. Diğer *MLL*'de disregülasyon yapan mutasyonlara göre daha iyi prognozludur.

9q34 amplifikasyonu: Sıklığı %6'dır. Tirozin kinaz inhibitörlerine yanıt verebilir. Yüksek riskli B-ALL de de saptanır. T-ALL de saptanan diğer kinaz füzyonları *EML1-ABL1, ETV6-JAK2,* ve *ETV6-ABL1*'dir.

t(7;9)(q34;q34): *NOTCH1* de yeniden düzenlenme de ortaya çıkar. NOTCH1 bir membran proteini olmakla birlikte, ligandı ile aktive edilirse transkripsiyon faktörü olarak rol oynar. T hücreli ALL de %50'den fazla sıklıkta, aktive edici NOTCH1 dizi

mutasyonu vardır. Bu ubiqutin ligaz kodlayan gen olan FBXW7 (F-Box And WD Repeat Domain Containing 7) geninindeki mutasyonlar NOTCH1 molekülünün yıkımını önler. Yapılan çalışmalar NOTCH1 ve FBXW7 genlerindeki mutasyonların, özellikle *RAS* veya *PTEN* (Phosphatase And Tensin Homolog) mutasyonu olanlarda, prednizola iyi yanıt ve indüksiyon sonrası minimal rezidüel hastalığın daha nadir gelişimi ile birlikte olduğunu göstermektedir.

Erken T- öncül hücreli ALL: %10-15 sıklıkta görülür. Hücreler immatür fenotiptedir. Bu hücreler T- hücresi belirteçleri olan CD1a, CD8, ve CD5'i eksprese etmezler veya çok zayıf olarak eksprese ederler. Bu tip ALL'de 3 farklı yolaktaki genler'de mutasyon vardır;

1. Hemapoetik gelişimsel genler- RUNX1, İKZF1 (IKAROS Family Zinc Finger 1), ETV6 (ETS Variant Transcription Factor 6), GATA3 (Trans-Acting T-Cell-Specific Transcription Factor GATA-3), EP300 (E1A Binding Protein P300),
2. Ras ve sitokin sinyal reseptör genleri- NRAS, İL7R, KRAS, JAK1/3 (Janus kinase 1/3), PTPN11 (Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11),
3. Kromatin modifiye edici genler- SETD2 (SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase).

Son yıllarda yapılan tüm ekzom tarama çalışmaları, T- hücreli ALL'de, ribozomal proteinleri kodlayan genlerde ve transkripsiyonel kompleksin bir parçası olan CNOT3 (CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 3) geninde mutasyonlar olduğunu göstermiştir. Ayrıca B hücreli ALL'de görülen kinazları ilgilendiren füzyon genlerinin T hücreli ALL'de de olabildiği görülmüştür. Böylece kinazları hedef alan tedavi yöntemlerinin, T hücreli ALL'de de kullanılabileceği düşünülebilir (Soycan, Akçay, & Ağaoğlu, 2011).

1.4.11. Prognoz

Akut lenfoblastik lösemide prognozu şekilendiren belirli faktörler bulunmaktadır;

- Hastada meydana gelen kromozomal değişimler
- Hastanın yaşı
- Hastalığın metastaz yapma olasılığı (omurilik ve sinir sistemine yayılması)

- Hastalığın nüks etmesi (Campo, Swerdlow, Harris, Pileri, Stein , & Jaffe, 2011).

Evreleme:

Çoğu hastalıkta olduğu gibi kanser tiplerinde de evreleme hastalığın vücuda yayılma olasılığını tanımlamak için kullanılır. Lösemi tanısında ilk olarak kemik iliğinde veya kanda yer alan hücrelerin anormal fenotipleri ve olgunlaşma dereceleri belirlenir, daha sonra lenfositik veya miyelositik hücrelerin varlığı ile lösemi tanısı konur. Tanı ve sınıflandırma, genellikle May-Grünwald-Giemsa (MGG) yöntemi ile periferik kan veya kemik iliğinin morfolojik incelemesi ile olur. Hastalığın kan, kemik iliği veya başka bir sistemde bulunup bunlmadığını saptanması evreleme de bir başka önemli kriterdir, bu nedenle; akciğer grafisi, göğüs kafesi ve akciğer inceleme tektikleri istenir. (Anak & Sarıbeyoğlu, 2011)

1.4.12. ALL Tedavisi

Günümüzde akut lenfoblastik lösemi süresince kullanılan tedavi yöntemi standart tedavi yöntemi olarak bilnmektedir. Uygulanan tedavi hastada saptanan genetik bozukluluk, yaş ve lökosit sayısına göre farklılık göstermektedir.Test aşamasında olan tedaviler ise, klinik tadavi olarak bilnmektedir, bu tür klinik tedaviler belirli merkezlerde test edilen ilaçlar ile standart kullanılan tedavilerden daha üstün ve yeni standart tedavi kategorisine uygun olarak kabul edilebilir.

ALL'de kullanılan standart tedaviler:

- Kemoterapi
- Radyasyon tedavisi
- Kök hücre nakli
- Hedefe yönelik tedavilerdir

ALL tedavisi genellikle birkaç fazdan oluşur;

ALL heterojen bir hastalık grubu olup, hastanın fentotipi, genotipine göre farklılık göstermektedir, bu nedenle de her hastaya aynı tedavi protokolü uygulanmaktadır. Akut lenfoblastik lösemi tedavi protokolleri genel olarak üç ana başlıkta toplanabilir. Bunlardan ilki remisyon indüksiyon- iyileşme sağlanması; tedavinin ilk aşamasıdır, bu aşamada ana amaç kemik iliğinde oluşan lösemi

hücrelerinin öldürülmesidir. İkinci aşama intensifikasyon aşamasıdır, bu aşama ALL tedavi süresince en önemli komponentlerden biridir. Son olarak idame tedavisi verilir, bu süreçte standart tedavi sonrasında, daha hafif kemoterapi protokoleri uygulanır (Juliusson & Hough , 2016).

1.5. NOTCH Sinyal Yolağı

NOTCH sinyal yolağı, T ve B hücre gelişiminde, hücre sağkalımında ve farklılaşmasında önemli bir rol oynayan hücre-hücre iletişim aracıdır. İlk olarak 1917 yılında Thomas Hunt Morgan tarafından, sirke sineği Drosophila'da tanımlanan Notch sinyal yolağı ile ilgili olarak memeli biyolojisindeki işlevleri ve etkileri üzerinde çalışmalar sürdürülmüştür . NOTCH yolağı timusta T-hücre gelişimindeki erken safhada, lenfoid hücrelerinden meydana gelen B- hücreleri ve dentrik hücrelerin düzenlenmesinde ve T- hücre gelişiminde rol oynamaktadır (Chung, Riella, & Maillard, 2016).

Tablo 1.5. Notch yolu üyeleri için kullanılan terminoloji

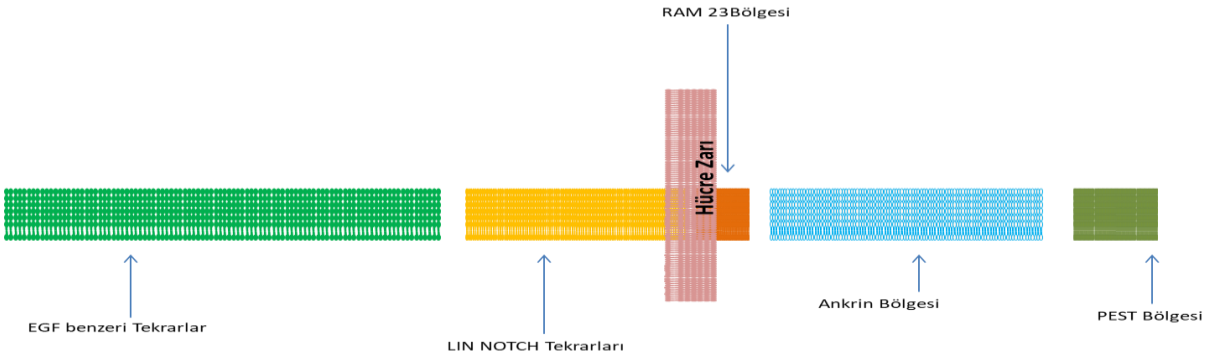
	Homo sapiens	*Drosophila melanogaster*
Notch reseptörleri	*NOTCH-1*	*NOTCH*
	NOTCH-2	
	NOTCH-3	
	NOTCH-4	
Notch ligandları	*Delta-like-1 (DLL-1)*	*Delta*
	Delta-like-4 (DLL-4)	
	Delta-like-3 (DLL-3)	
	Jagged-1 (JAG-1)	
	Jagged-2 (JAG-2)	
Ko-aktivatörler	*Mastermind-like-2 (MAML-2)*	*Mastermind*
	Mastermind-like-1(MAML-1)	
Glikotransferaz	*Lunatic fringe (LFNG)*	*Fringe*
	Radical fringe (RFNG)	
	Manic fringe (MFNG)	
CSL transkripsiyon faktörü	*CBF1/RBPJ-K*	*Suppressor of hairless*

1.5.1. Notch Sinyal Yolağı Elementleri

NOTCH sinyal yolağında ilk basmak ligand-reseptör düzenlenmesidir. Memelilerde birbiriyle yakından ilişkili 5 ligand bulunmaktadır. Bunlar; Jagged1,

Jagged2, Delta-benzeri 1 (Dll1), Delta benzeri 3 (Dll3), ve Delta benzeri 4 (Dll4), ve yine birbiri ile ilişkili hücre dışında yer alan dört NOTCH reseptörü vardır; NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, VE NOTCH4. Ekstraselüler kısımda negatif düzenleyici olarak bilinen 3 LİN tekrarları, protein stabilitesinde görev alan PEST alanı, ANK-ankrin bölgesi ve reseptörün sitoplazmik alanı olan RAM kısmı bulunmaktadır. Reseptör sitoplazmik alanı olan RAM domaini ile reseptörler ve ANKRİN tekrarları sayesinde transkripsiyon faktörleri ile bağlantı kurar.

NOTCH sinyal yolağı, bir ligandın, hücre üzerindeki bir Notch reseptöründe bir dizi proteolitik yarılma olayını indüklediği çok basit bir sinyalleme mekanizmasıdır. Ligand-reseptör arasındaki iletişim ADAM10 metalloproteaz ve γ-sekretaz tarafından gerçekleştirilir (Andersson & Lendahl, Therapeutic modulation of Notch, 357-360).



Şekil 1.4. NOTCH sinyal yolağı elementleri

1.5.2. Ligand-Reseptör İlişkisinin Regülasyonu

Her bir NOTCH molekülünün tek bir sinyal oluşturmak için proteoliz işlemine maruz kaldığı ve bunun sonucunda sadece bir kez sinyal verebildiği göz önüne alınırsa, hücre yüzeyinde ligandın ve reseptörün bu süreç boyunca düzenlenmesi, NOTCH sinyal yolağı kontrolü için anahtardır denebilir. Ligandların ve reseptörlerin diferansiyel ekspresyon paternleri, sinyalleme aktivitesinde gözlenen farklılıkları açıklamak için yeterli değildir. Post-translasyonel modifikasyonlar sonrası değişikliklerin düzenlenmesi, ligand veya reseptörlerin bulunması ve / veya üretken ligand-reseptör etkileşimlerini kontrol eden önemli mekanizmalar olarak ortaya çıkmıştır.

1.5.3. Reseptör Aktivasyonu

Metalloproteaz aracılığı ile, Ligand-uyarılması, Notch sinyal iletiminde önemli bir düzenleyici nokta olarak görev görür. S2 bölünme bölgesi, LNR ve HD bölgelerini kapsayan NRR alanı içinde bulunur. NRR alanı, ligand yokluğunda Notch proteolizini önleme işlevini görür (Andersson & Lendahl, Therapeutic modulation of Notch, 2006).

1.5.4. Notch Sinyal Yolağının Aktivasyonu

Sinyal yolağı aktivasyonu, reseptörün 3 farklı ayrılma işlemi ile başlar: Öncellikle ‘’S1 ayrılması’’ olarak bilinen ve golgi de yer alan furin benzeri proteazlar, NOTCH proteinlerini-heterodimerlere farklılaştırmasıyla aktivasyon başlatılır. Transmembran protein olan NOTCH proteini üç kısımdan oluşmaktadır, resptörler hücre dışında bulunan ligandlar sayesinde bağlantı kurar, bu bağlantı sonucunda’’S2 ayrılması’’ hücre zarında yer alan ADAM17 metalloproteazı ile başlar ve bu şekilde NOTCH hücre dış bölgesi serbest kalır. Hücre içi kısmının zardan ayrılması ile NOTCH aktif hale gelir, bu süreçte’de ‘S3’’ ayrılma meydana gelir. Aktif hale gelen NOTCH taşıyıcı protein sayesinde nukleusa geçiş yapar (Kramer, 2000).

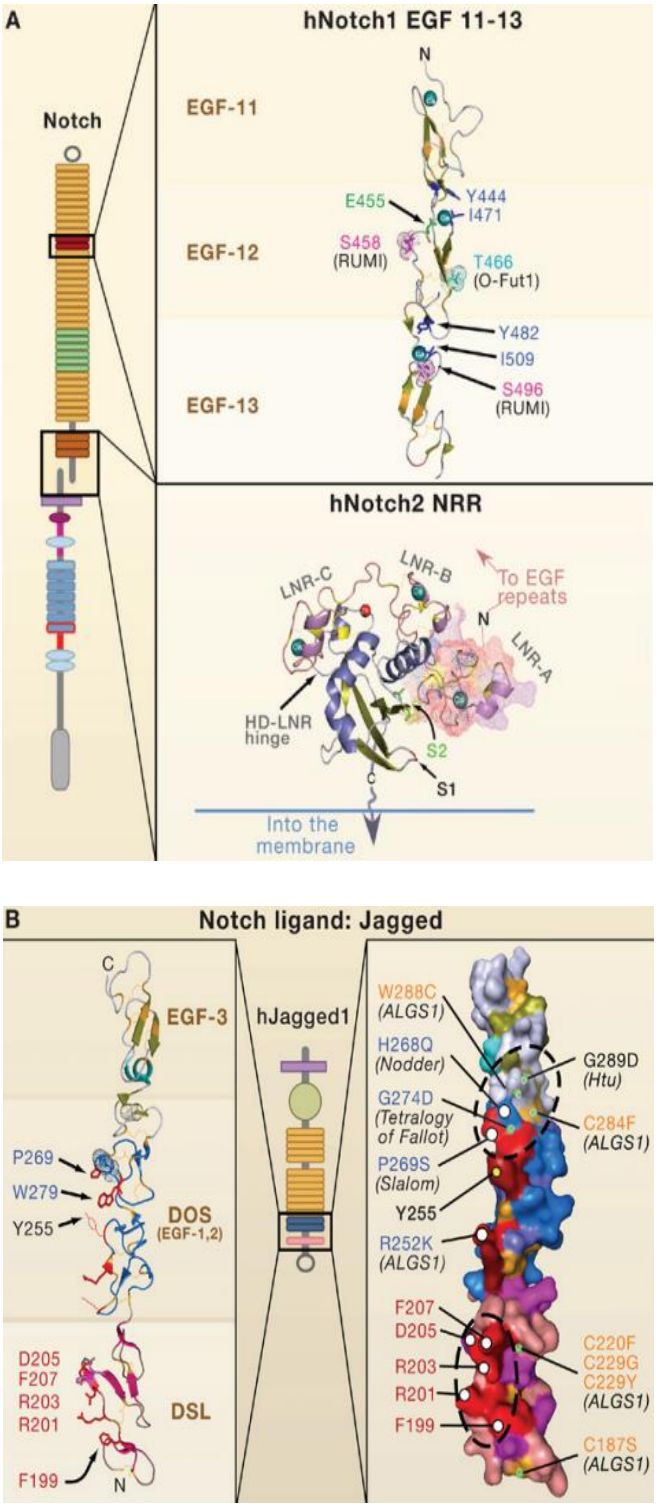
(A) Ligand bağlanma bölgesi (EGF 11-13) insan NOTCH-1 kristal yapısı.

NOTCH-1 ligand bağlanma bölgesi EGF 12'ci tekrarında bulunur, ve Ca2 + bağlanmasını (mavi), O-glukosilasyonu (serin 458, serin 496) ve O-fukosilasyonu (treonin 466) alanlarını koordine eden kalıntıları içerir.

Glutamik asit 455'in Valine(E455V) mutasyonu Drosophilia türünde bağlanma ligandını ortadan kaldırır. İnsanlarda bu bölge NOTCH1 (Hnotch1) Jagged1 (hJagged1) DSL ligandı ile etkileşime girdiği öne sürülmektedir. (Cordle et al., 2008a). Threonine 466 farelerde NOTCH sinyal yolağı için temel yapı taşıdır. Negatif düzenleyici bölge, LNR-A, HD-C sarmalı ve LNR-A / B bağlayıcı tarafından korunan bir cepte bulunan S2 bölünme bölgesinden (yeşil) korumak için katlanır.

Furin bölünme bölgesi (S1), kristalleşmeyi kolaylaştırmak için yapılandırılmamış bir halka içinde yer almaktadır. LNR, kalsiyum iyonlarına tekrar tekrar bağlanması; Ca2 + 'nın şelasyonu, negatif düzenleyici bölge ayrışmasına ve NOTCH sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar.

(B) hJagged-1, NOTCH bağlanma bölgesi üç kısım içerir bunlar; DSL, DOS ve EGF-3 tekrar, bölgeleri. hJagged-1 ribon kristal yapısı (sol).DSL katlanması ve EGF katlanması ayrı olarak bulunmaktadır. NOTCH sinyal yolağı etkileşimi için gerekli olan DSL amino asitleri kırmızı ile işaretlidir. Fenilalanin 207 ile alanin (F207A) yer değiştirmesi boş bir protein üretir. Buna karşılık, arginin 203 ile alanin (R203A) ve fenilalanin 199 ile alanin (F199A) yer değişimleri başka bir hücreden sunulan ligandın bağlanmasını, aynı hücrede bulunan ligandın cis bağlanmasını engeller. Aspartik asit 205 ile alanin (D205A) ve arginin 201 ila alanin (R201A)yer değiştirmesi hipomorfiktir. DOS alanı iki korunmuş atipik EGF tekrarı içerir (mavi renkte korunan amino asitlerin varlığı ile tanımlanır) (Komatsu ve ark., 2008). Tirozin 255 (Y255), Jagged DSL ligandlarının karakteristiğidir ve Delta-benzeri ligandlarda küçük bir hidrofobik amino asit ile değiştirilir (bu kalıntı, Fringe glikosiltransferaz aktivitesine duyarlılığın tanımlanmasında rol oynar). (Sağ) hJagged1 şerit yapısının yüzey görünümü (Kopan & Ilagan, The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation, 2009).



Şekil 1.5. İnsan NOTCH1, NOTCH2 ve JAGGED1'deki alanların atomik çözünürlüğü

Tablo 1.3. NOTCH Sinyal Yolağı Mutasyonu İçeren Hastalıklar

Organ veya sistemler	**NOTCH'un Rolü**	**Hastalık**	**Mutasyon**
Kalp dokusu	Kardiyak modelleme, kardiyomiyosit farklılaşma, kapak gelişimi, ventriküler trabekülasyon	Aort kapak hastalığı, Alagille sendromu (kalıtsal otozomal baskın bozukluk	*NOTCH1* mutasyonunda artış *JAG1, NOTCH2* mutasyonunda fonksiyon kaybı
Meme Dokusu	Alveoler gelişim, luminal hücre kaderi,	Meme Kanseri	*NOTCH1, NOTCH2* mutasyonlarında aktivasyon
Hematopoetik, lemfatik ve İmmün Sistem	Hematopoez gelişimi, B ve T hücre kaderi, Timik hücre morfogenezi	T- hücre akut lemfoblastik Lösemi, Kronik Lenfositik Lösemi, Jüvenil miyelomonositik Lösemi	*NOTCH1* aktivasyonu, *FBXW7* fonksiyon kaybı,
Deri	Hücre proliferasyon kontrolü, Hücre adezyonu,	Sedef hastalığı Baş boyun kanseri Kutanöz ve skuamöz akciğer karsinomu	*NOTCH1-NOTCH2* mutasyonlarında fonksiyon kaybı
Omurga	Osteoblast ve Osteklast diferansiyonu	Spondylocostal dysostosis • Hajdu–Cheney sendromu	*DLL3, MESP3, LFNG* ve *HES7* Mutasyon

1.5.5. NOTCH Sinyal Yolagı ve Hematopoez

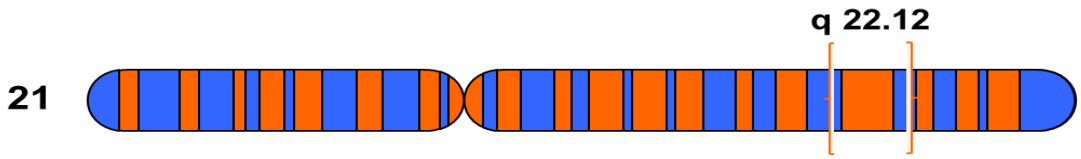
Notch sinyal yolağı evrim süresince korunmuş, gelişim döneminde hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan hücre etkileşim mekanizmalarından biridir. Notch sinyal yolağı organ oluşumunu ve morfogenezi etkileyerek proliferasyonda, farklılaşmada ve apoptozda düzenleyici rol oynar. Notch yolağı kök ve öncü hücre katmanlarını kontrol eder. Karakteristik fonksiyonu iki yönlü hücre akıbeti kararlarının regülasyonudur. Bu, hücrenin bir doku öncülü olarak mı kalacağı veya epidermisin bazal tabakasında olduğu gibi farklılaşmaya mı gideceği kararlarını da içerir. Notch sinyalleşmesi aynı zamanda farklılaşmış bir intestinal hücrenin bir enterosit mi, goblet hücresi mi olacağı veya lenfosit hattında T hücre veya B hücresi alt hatlarına mı geçeceği ile ilgili kararları da içerir. Hematopoetik sistemde, Notch erken T hücre gelişimi ve olgun T hücre bağışıklığında önemli bir rol oynar.

Hematopoetik sistemde düzensiz NOTCH sinyaL yolağı lösemi ve lenfoma ile ilişkilişkilendirilir; T-ALL1 hastalarında NOTCH1 içeren kromozomal translokasyonlar gözlemlenir; T-ALL hastalarının % 50'sinden fazlası, NOTCH1 mutasyonlarının fonksiyon artışı gözlemlenmiştir 146. T-ALL olan bazı hastalar, FBXW7'de fonksiyon mutasyonu kaybeder (Ebens & Maillard, 2013).

1.6. GENLER

1.6.1. RUNX1- Geni

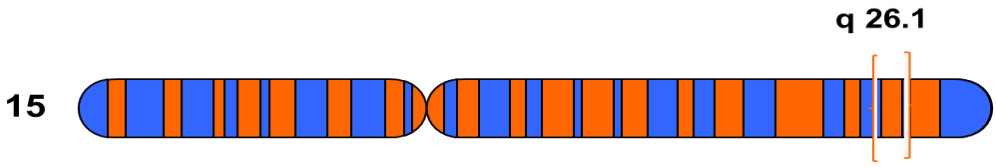
Diğer transkripsiyon faktörleri gibi, *RUNX1* proteini de DNA'nın belirli bölgelerine bağlanır ve ilgili genlerin aktivitesini kontrol etmeye yardımcı olur. *RUNX1* proteini, DNA'nın parçalanmasını engelleyen çekirdek bağlayıcı-taşıyıcı faktör CBF β (CBF geninden üretilen) ile etkileşime girer. *RUNX1* proteini, kan hücrelerinin (hematopoez) gelişimini kontrol etmeye yardımcı olan genleri aktive eder. Özellikle hematopoetik kök hücrelerin, beyaz kan hücrelerinin, kırmızı kan hücrelerinin ve trombositlerin gelişiminde önemli bir rol oynar. 21. Kromozomun uzun kolunda, 22.12 pozisyonunda bulunmaktadır.



Şekil 1. 6. *RUNX1* geninin kromozomal pozisyonu

1.6.2. *IDH-2* Geni

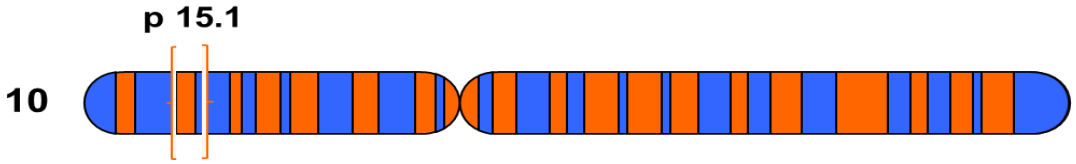
Ara metabolizma ve enerji üretiminde rol oynar. Piruvat dehidrojenaz kompleksiyle sıkı bir şekilde birleşebilir veya etkileşime girebilir. İzositrat dehidrogenazlar, izositratın 2-oksoglutarata oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder. *IDH2*'nin mitokondriyal formu birçok hastalık ile ilişkilidir. Mutant *IDH1* ve *IDH2*'nin neomorfik aktivitesinin inhibitörleri şu anda hem solid hem de kan tümörleri için Faz I / II klinik çalışmalarında bulunmaktadır. 15. Kromozomun uzun kolunda, 26.1 pozisyonunda bulunmaktadır (Parker & Metallo, 2016).



Şekil 1. 7. *IDH2* genin kromozomal pozisyonu

1.6.3. *İL2RA*-Geni

Aktif T ve B hücrelerinde, miyeloid öncüleri ve oligodendrositler üzerinde bulunan bir tip I transmembran proteinidir. *IL2RA*, çoğu B hücresi neoplazmında, bazı akut lenfositik lösemilerde, nöroblastomlarda ve tümör infiltrasyonlu lenfositlerde eksprese edilir. 10 Kromozomun kısa kolunda, 15.1 pozisyonunda bulunmaktadır (Triplett, Curti, Bonafede, Miller, Walker, & Weinberg, 2012).



Şekil 1. 8. *IL2RA* geninin kromozomal pozisyonu

2. MATERYAL VE METOD

2.1. ÇALISMA SÜRESINCE KULLANILAN CIHAZLAR VE MALZEMELER

Tablo 2.1. Çalışma Süresince Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	**Katalog Numarası**
▪ Qubit	Q33239
▪ ABI 3500xl genetic analyzer,RUO/HİTACHİ	24346-110
▪ Thermal Cycler, BioRad/ T100	621BR09450
▪ Thermal Cycler, Veriti/Applied Biosystems/96 well	2990212442
▪ MikroSantrifüj/HETTİCH	374
▪ Hasas Terazi/OHAUS	8729207447
▪ Elektroforez Güç Kaynağı /THERMO	1596070807407
▪ Jel görüntüleme sistemi/Transsimulatör/Vilber Lourment	8102082
▪ Mikrodalga Fırın/SAMSUNG	J4CP7MBQ200104A
▪ Vorteks/STUART	R800002625
▪ KURU BLOK ISITICI/TECHNE	R000100016
▪ SPİN CİHAZI/LABNET	9031408

Tablo 2.2. Çalışma Süresince Kullanılan Kimyasal Malzemeler Ve Bileşenler

Kimyasal Malzemeler	**Katalog no;**
▪ DNA izolasyon kiti, Gentra Puregene Blood Kit, Qiagen	158389
▪ DNA İzolasyon kiti, QiaAmp DNA Blood Mini Kit, Qiagen	51106
▪ Ethanol	1070172511
▪ Agaroz	800-015-EG
▪ 10X TBE Buffer	880-545-CL
▪ Syber Safe	MG-SSGD-01-400
▪ DNA Leader 100bp	MG-LDR-100
▪ ExoSap	78200.200.UL
▪ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4337454
▪ DNA Sequencing Clean-Up Kit	D4053

2.2. ÖRNEK SEÇIMI

Çalışılan örnekler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü çocuk kliniğinden yönlendirilmiş olan ve B-ALL tanısı alan çocuk hastalardan oluşmaktadır, hastalara ait periferik kan örnekleri hasta arşivinden alınmıştır. Bu hastalar arasından geriye dönük olarak onay formu alınabilecek olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

2.3. ARAŞTIRMA YÖNTEMI

Çalışma yöntemi 5 ana başlık altında toplanmış olup şu şekildedir:

1) Örneklerin Toplanması

Daha önce rutin analiz amacıyla DETAM'a yönlendirilen ve analiz sonrası arşivlenen hasta kan örneklerinden çalışılmıştır.

2) Örneklerden Dna İzolasyonu

Akut lenfoblastik lösemi tanisi konmuş çocuk hastalardan alınan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu Qiamp DNA Blood Mini Kit kullanılarak gerçeklesştirildi.

3) Primer Dizaynı:

Hedef genlere spesifik primerler NCBİ Primer Blast veritabanları kullanılarak dizayn edilmiştir. Hedef genlere spesifik primerler kullanilarak gradient PCR yapılarak primer bağlanma sıcaklıkları belirlenip, akabinde hasta ve kontrol grubunun hedef genleri çoğaltılmıştır.

4) Agaroz Jel Elektroforezi

%2'lik agaroz jel hazırlanarak PCR bölgelerinin doğru amplifiye olup olmadığı kontrol edilmiştir.

5) ExoSAP-IT Pürifikasyonu

PCR sırasında hedef diziye bağlanmayan primerler ve dNTP'ler exosap enzimi kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmıştır.

6) Sekans PCR

Bigdye TERMİNATOR v3.1 CYCLE sequencing kit kullanılarak hedef genlerin forward ve reverse yönlerinden PCR'i yapılmıştır.

7) Kapiller Elektroforezi

Hedef bölgelerin dizilenmesinde ABI 3500xL genetic analyzer cihazi kullanıldı.

8) DNA Dizilerinin Analizi

Genlerin DNA dizilerinde referans diziden farklılık olup olmadığı, Seqscape, *NCBI Blast, Mutation Tester, Varsome, İnterVar* ve *Mutation Surveyor* programlari kullanılarak incelendi.

2.4. DNA İZOLASYONU

Hasta Örneklerinde DNA İzolasyonu, Gentra Puregene Blood Kit, Qiagen ile elde edilmiştir.

Yöntem:

1. 300 µl Cell Lysis Solution eklendi ve kuvvetli bir şekilde vortex yapıldı.
2. 100 µl Protein Precipitation Solution eklenir ve salayarak karıştırıldı.
3. 13000g'de 1 dk santrifüj edildi.
4. 1,5 ependorf tüplere 300 µl isopropanol ekleyerek elde edilen (ikinci aşamada elde ettiğimiz) süpernatanta aktarıldı.
5. DNA küme, iplikçik haline gelene kadar karıştırıldı.
6. 13000 g'de 1 dk boyunca santrifüj edilir.
7. DNA peletine zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı.
8. 300µl, %70 ethanol eklenir ve karıştırılır.
9. 13000 g'de 1 dk santrifüj edilir.
10. Pelete zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı.
11. Oda sıcaklığında DNA kurutulur.
12. 100 µl DNA Hydration Solution ekleyerek 5 dk vortexlenir.
13. 65°'de 15 dk inkübe edilir, ve DNA'NIN çözünmesi sağlanır.

2.5. DNA DILÜSYONU

DNA konsantrasyonları 2,5 ng olacak şekilde nükleaz su içermeyen ile sulandırılmıştır ve PCR karışımına eklenerek BioRad cihazında çoğaltılmıştır.

2.6. PRIMER DIZAYNI

Liyofilize halde sentezletilen primerler, distile su eklenerek öncellikle stok çözeltileri 100 µM'lik hazırlandı. PCR aşamaları boyunca kullanılacak olan primer ana stok çözeltilerinden 10 µM'lik çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

Tablo 2.1. Kullanılan Primer Dizileri

RUNX1 EXON 1 Reverse	GTAAAACGACGGCCAGTCTTCCTGTTTGCTTTCCAGC
RUNX1 EXON 1 Forward	CAGGAAACAGCTATGACCCACGCGCTACCACACCTAC
RUNX1 EXON 2 Reverse	GTAAAACGACGGCCAGTACCACGTCGCTCTGGTTC
RUNX1 EXON 2 Forward	CAGGAAACAGCTATGACCATCCTCGTCCTCTTGGGAGT
RUNX1 EXON 3 Reverse	GTAAAACGACGGCCAGTAAGAAAATCAGTGCATGGGC
RUNX1 EXON 3 Forward	CAGGAAACAGCTATGACCACCCTGGTACATAGGCCACA
RUNX1 EXON 4 Reverse	GTAAAACGACGGCCAGTTGTTACGACGGTTTGCAGAG
RUNX1 EXON 4 Forward	CAGGAAACAGCTATGACCGGAAGGGAAGGGAAATCTTG
RUNX1 EXON 8 Reverse	GTAAAACGACGGCCAGTAGAAAGCTGAGACGAGTGCC
RUNX1 EXON 8 Forward	CAGGAAACAGCTATGACCGCAGAACCAGAACGTTTTCC
RUNX1 EXON 6 Reverse	GTAAAACGACGGCCAGTGCAACTTTTTGGCTTTACGG
RUNX1 EXON 6 Forward	CAGGAAACAGCTATGACCGGTAACTTGTGCTGAAGGGC
RUNX1 EXON 7 Reverse	GTAAAACGACGGCCAGTCCGAGTTTCTAGGGATTCCA
RUNX1 EXON 7 Forward	CAGGAAACAGCTATGACCCATTGCTATTCCTCTGCAACC
IDH2 EXON Reverse	TGTAAAACGACGGCCAGTGGGTTCAAATTCTGGTTGAA
IDH2 EXON Forward	CAGGAAACAGCTATGACCAACATGCAAAATCACATTATTGCC
IL2RA EXON 6 Reverse	CTCAGCCTGGTGTACAT
IL2RA EXON 6 Forward	CTCGTGCTGTCCTAAAGTC
IL2RA EXON 3 Reverse	GTGCGCTAGCAGGAGTTA
IL2RA EXON 3 Forward	GTGCTTCTCAAGTGAATGAATAC
IL2RA EXON 2 Reverse	AAGAAATATGTGATTAAGTCATTATAGGAT
IL2RA EXON 2 Forward	GTGCGCTAGCAGGAGTTA

2.7. POLIMERAZ ZINCIR REAKSIYONU

Günümüzde yaygın olarak kullanılan Sanger temelli DNA dizi analizi yöntemi, Fred Sanger ve arkadaşları tarafından 1977 yılında geliştirilen bu yöntem enzimatik olarak DNA sentezine, zincir sonlanma yöntemidir. Bu teknik ile DNA dizisi kalıp olarak yeni sentezlenecek DNA ipliği için kullanılır.

Tablo 2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Birinci Aşamasında Kullanılan Bileşenler

Reaksiyon Bileşenleri	**Miktarlar**
Reverse Primeri	1µl
Forward Primeri	1µl
2X FS Taq MasterMix	16µl
gDNA(genomikDNA)	2µl
Toplam Hacim	**20 µl**

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) aşağıda belirtilen koşularda yapılmıştır;

Tablo 2.3. RUNX1- Exon 1 PCR Koşuları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	37 Döngü
Primer Bağlanması	59.6°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.4. RUNX1- Exon 2 PCR Koşuları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	37 Döngü
Primer Bağlanması	59.6°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.5. RUNX1- Exon 3 PCR Koşuları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	37 Döngü
Primer Bağlanması	59.6°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.6. RUNX1- Exon 4 PCR Koşuları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	40 Döngü
Primer Bağlanması	64°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.7. RUNX1- Exon 8 PCR Koşuları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	40 Döngü
Primer Bağlanması	60.5°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.8. RUNX1- Exon 6 PCR Koşuları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	40 Döngü
Primer Bağlanması	60.5°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.9. RUNX1- Exon 7 PCR Koşuları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	40 Döngü
Primer Bağlanması	60.5°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.10. IDH-2 PCR Koşuları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	36 Döngü
Primer Bağlanması	66°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.11. İL2RA Exon 3 PCR Koşuları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	36 Döngü
Primer Bağlanması	66°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

Tablo 2.12. İL2RA Exon 6 PCR Koşuları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94°C	5dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	36 Döngü
Primer Bağlanması	66°C	30sn	
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

2.8. JEL ELEKTROFOREZ:

PCR aşaması süresince DNA'nın çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek amacı ile agaroz jel elektroforezi yapıldı. %2'lik agaroz jel hazırlamak için beher içinde önceden hazırlanan 1X TBE buffer (Tris-Borik asit-EDTA) stok çözeltisinden 50 mL, agaroz'dan 1 gr hassas terazide tartılarak seffaflaşana kadar 2 dk boyunca kaynatılmıştır, ardından 8 µl syber safe eklenerek homojenize edilerek elektroforez tepsisine taraklar eklenerek jelin polimerleşmesi beklenmiştir.

Jel katı hale geldikten sonra elektroforez kalıbının bulunduğu tanki 1X TBE buffer jelin üzerini kaplayacak şekilde dökülmüştür. Birinci kuyucuğa 100bp'lik Leadder'dan 2µl, diğer kuyucuklara ise PCR örneklerinden 3,5 µl eklenmiştir. Jel 10 dk boyunca yürütülerek. Jel görüntüleme sisteminde incelenmiştir.

Elde Edilen PCR Ürünlerinin Saflaştırılması;

Artan primerler ve dNTP'leri uzaklaştırmak için ExoSap karışımı kullanılır, EXO 1 (Exonuclease 1) ve SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase).

Exo doğru hedef bölgeye bağlanmayan primerleri, Sap ise dNTP'lerin parçalanmasına neden olur.

Tablo 2.13. ExoSap aşamasında kullanılan bileşen miktarları

Kullanılan Bileşenler	**Kullanılan Miktar**
ExoSap enzimi	2µl
PCR ürünü	5 µl

Hazırladığımız karışım önceden programladığımız ExoSap ısı programında çalıştırıldı. Yanlış olarak bağlanmış primerlerin ve istenmeyen dNTP'lerin uzaklaştırılmasi için ExoSap ürünün aktif olduğu süre'de çalıştırılmıştır.

Tablo 2.14. ExoSap koşuları

ExoSap	**Sıcaklık**	**Süre**
Enzim Aktivitesi	**37°C**	30dk
Enzim İnaktivitesi	**85°C**	15dk

Sekans PCR Aşaması

Saflaştırdığımız PCR ürünlerimizi dizilemek için BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'I kullanılmıştır.

Tablo 2.15. Sekans PCR aşamasında kulanılan bileşenler ve miktarları

Kullanılan Bileşenler	**Kullanılan Miktar**
F Primeri	1 µl
R Primeri	1µl
BigDye	1µl
Steril Distile Su	9µl
ExoSap Ürünü	3.4µl
5X Sequencing Buffer	4µl
Total Miktar	19.4µl

Tablo 2.16. Sekans PCR koşuları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	96°C	20 sn	1
Denatürasyon	95°C	10sn	26 Döngü
Primer Bağlanması	50°C	5sn	
Uzama	60°C	3dk	
Bekleme	4°C	∞	1 döngü

Pürifikasyon, Saflaştırma Aşaması;

Sekans PCR ürünlerinin dizilenebilmesi için bağlanmamış floresan işaretli dNTP'leri uzaklaştırma işlemi Zymo Research, DNA Sequencing Clean-up Kiti ile yapılmıştır.

- Sekans PCR ürünlerimizin üzerine 200µl Sequencing Buffer multichannel pipet yardımı ile dağıtılmışır.
- 3000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Alt plaktta kalan supernatant kalıntısı attılarak, üzerlerine 240 µl Sequencing Wash Buffer eklenerek

- 3000 g’de 5 dakika santrifüj edilir
- Örnekler Sekans Plakına alınarak üzerlerine 10 µl Formamid solusyonu damlatılır ve 3000 g’de 2 dakika boyunca santrifüj edildi
- Sekans Plakımızın üzeri septa ile kapatılarak analiz yapılması için cihaza yüklenmiştir.

2.9. KAPILLER ELEKTROFOREZ’DE SEKANS ANALIZI

Saflaştırılmış PCR ürünlerimiz Kapiller Elektroforez Cihazında (ABİ 3500 xL) bulunan örnek kısmına yerleştirilir, ürün yerleştirildikten ve kapak kapatıldıktan sonra cihaz sıcaklığı elektroforez için uygun olan 60° kadar çıkar. Tüm örnekler işaretlenerek veri tablasına aplike edilir.

2.10. VERILERIN DEĞERLENDIRILMESI

ABİ 3500 XL analizatör cihazına yüklenen örnekler sonucunda elde edilen veriler *SeqScaner 2, MutationSurveyor V5,1.2, Mutationtaster, NCBİ BLAST* programları ile analiz edildi.

3. BULGULAR

Araştırmada çalışılan, ALL ve NOTCH sinyal yolağında yer alan RUNX1, IL2RA ve IDH2 genlerinin, çalışmaya dahil edilen 52, B-hücreli-Çocuk Akut Lenfoblastik Lösemi tanısı almış olguların tanı anında ve hastalığın takibi süresince kaydedilen cinsiyet, yaş ortalamaları, kemik iliği blast oranları, WBC, trombosit, hemoglobin değerleri, sağkalım oranları, tespit edilen translokasyonları ve hastalığın nüks etme durumu (Tablo3.1) verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, RUNX1 geninin exon 5'inde yalnızca 1 olguda (olgu no.14) c.524 T>A mutasyonu saptandı. IL2RA geninde, intronik bölgede yer alan varyasyonlar tespit edildi. Olgu 19'da g.38134G>C, olgu 12'de c.367+7G>C saptandi. IDH2 geninde ise herhangi bir varyasyon tespit edilmemiştir.

Tablo 3.1. Çalışmaya dahil edilen B-ALL hastalarının klinik özellikleri

	Diagnostic (n=52)
Ortanca yaş (min-mak)	5(0.9-15)
Cinsiyet (Erkek:Kız)	30:22 (1.3:1)
Kİ blast (%) ortalama	93
WBC ($x10^9$/L) ortanca (min-mak)	22000(1700-629000)
Hemoglobin (dL) ortanca (min-mak)	7.8 (5-19)
Trombosit ($x10^9$/L) ortanca (min-max)	40000 (8000-284000)
Sağ kalım (ay) ortanca (min-max)	
Tüm sağ kalım	44 (10-113)
Relapssız sağ kalım	39 (9-112)
Relaps	
Var	5
Yok	37
Takip dışı	10
Son durum	
Sağ	38
Eks	4
Takip dışı	10
Translokasyon (n)	
BCR-ABL1	3
MLL-AF4B	1
TEL-AML	3

RUNX1 (Runt-Related Transcription Factor 1) geni mutasyonu;

Çocuk ALL tanısı almış 9 yaşındaki erkek olguda, RUNX1 geninin 5.ekzonunda c.524 T>A değişimi gösteren heterozigot bir mutasyon saptandı. EGİL'in immünolojik sınıflandırılmasına göre olgu B2 (B2; common B ALL) fenotipinde olup, tanı anındaki beyaz küre (lökosit) oranı 132400/mm3, hemoglobin oranı 7.4g/dl, trombosit oranı ise 146000/mm3 olarak kaydedilmiştir. Hastaya ait laboratuvar bulguları tablo (Tablo 3.2.) yer almaktadır. Yapılan in silico analizlerde; MutationTester analiz programında, kromozom 21.'de, 36231860 pozisyonda amino asit değişikliğine neden olan L148Q (p.Leu175Gln) (Leucine- Glutamine) mutasyon heterozigot olarak saptandi ve tabloda gösterildi (Şekil 3.2.)(Tablo 3.3.) VarsomeClinical platformunda araştırma sonucunda bulunan mutasyon muhtemel patojenik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.1.).

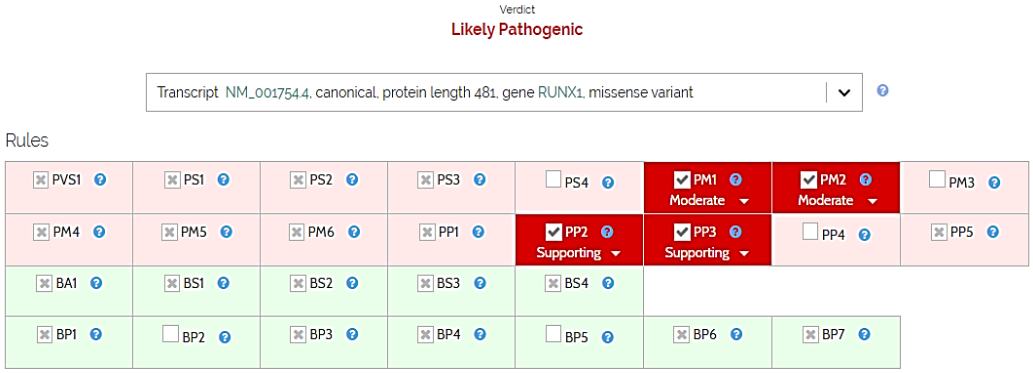
Tablo 3.2. RUNX1 mutasyonu taşiyan hastanin laboratuar özellikleri

Hasta Numarası	Hasta no.14
Çalışılan Gen	*RUNX1*
Fenotip	B2
Yaş	9
Cinsiyet	Erkek
Nüks	Var
Beyaz Küre Hücre	132400/mm3
Hemoglobin	7.4 g/dl
Trombosit	146000/mm3
Translokasyon	Yok

Tablo 3.3. MutationTester analiz programı sonucunda elde edilen, c.524T>A mutasyon verileri

Kromozom	Gen	Pozisyon	Sitogenetik bant	AA değişimi	Varyant	DNA değişimi
21.	*RUNX1*	36231860	21q22.12	L148Q	SNV	c.443T>A

SNV: A single-nucleotide variant, L148Q



Şekil 3.1. VarsomeClinical platformunda c.524T>A mutasyonunun muhtemel patojenik ajan olarak gösterilmesi

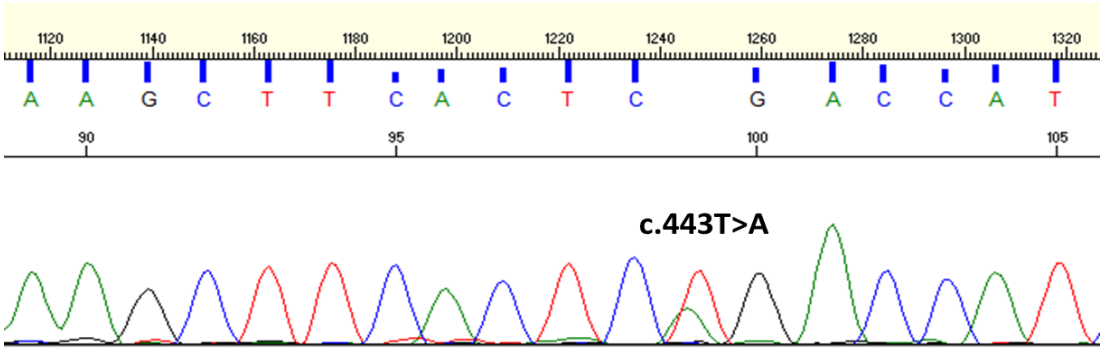
ACMG, VarSome klasifikayonuna gore patojeniteye uyan kriterleri bulundurma kriterleri

PM1: Hot-spot bölgede bulması

PM2: Exom Sekans ProjesiNDE, 1000 Genom Projesi veya Exome Toplama Konsorsiyumu'nda bulunmaması (veya resesif ise aşırı düşük frekansta).

PP2: Düşük benign missens varyasyon oranına sahip olan ve bu gibi missense varyantlarının yaygın bir hastalık mekanizması olduğu bir gende bulunması.

PP3: Gen veya gen ürünü üzerinde zararlı bir etkiyi desteklemesi.



Şekil 3.1. c.524 T>A mutasyonu taşıyan olgunun sanger sekans dizi analizi sonucunda elde edilen elektroferogram görüntüsü

IL2RA (Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha) geni mutasyonları;

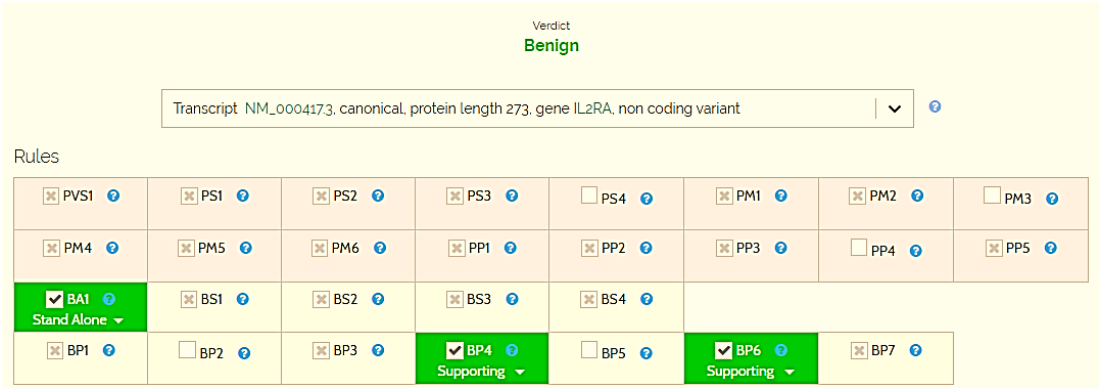
Toplamda 52 pediatrik ALL çocuk hastada sanger dizileme yöntemi ile incelenen IL2RA geninde 4 olguda intronik bölgede farkli varyasyonlar tespit edildi, olgu 12, 2 yasinda çocuk akut lenfoblastik lösemi tanısı almis ve tanı anında labaratuar değerleri, beyaz küre oranı 1700/mm3, hemoglobin oranı 7.1 g/dl, trombosit değeri ise 110000/mm3 olarak kaydedilmiştir tablo (Tablo 3.4.). İn silico analizler mutation tester sonucunda intronik bölgede (kodlama yapmayan bölgede) g.38139A>T değişimine neden olan homozigot polimorfizim saptanmıştır (Şekil 3.4.). VarsomeClinical mutasyon analizi sonucunda, 6066195 pozisyonunda kromozom 10.'da, A>T değişimine neden olan bening özellikte SNV varyantı bulunmuştur.

Tablo 3.3. IL2RA mutasyonu taşıyan hastanin laboratuar özellikleri

Hasta Numarası	Hasta no.12
Çalışılan Gen	*IL2RA*
Fenotip	B2
Yaş	2
Cinsiyet	Kız
Nüks	Yok
Beyaz Küre Hücre	1700/mm3
Hemoglobin	7.1 g/dl
Trombosit	110000/mm3
Translokasyon	Yok

Tablo 3.4. MutationTester analiz programı sonucunda elde edilen, g.38139A>T mutasyon verileri

Kromozom	Gen	Pozisyon	Sitogenetik bant	Varyant	DNA değişimi	RS.no
10.	*IL2RA*	6066195	10p15.1	SNV	g.38139A>T	rs12358961



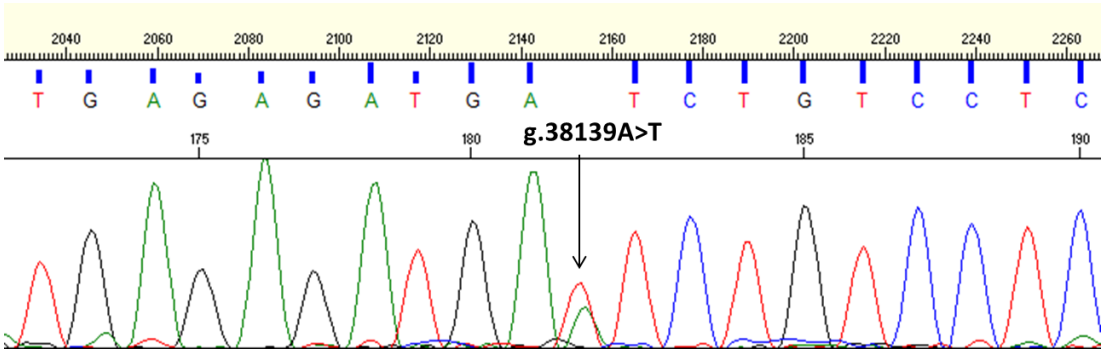
Şekil 3.2. VarsomeClinical platformunda g.381A>T mutasyonun benin ajan olarak gösterilmesi

ACMG, VarSome klasifikayonuna gore patojeniteye uyan kriterleri bulundurma kriterleri

BA1: Exome Sekanslama Projesi, 1000 Genom Projesi veya Exome Toplama Konsorsiyumu'nda allel frekansı >% 5.

BP4: Gen veya gen ürünü üzerinde herhangi bir etki göstermez.

BP6: ClinVar varyantı Benign olarak sınıflandırır.



Şekil 3.3. g.38139A>T mutasyonu taşıyan olgunun sanger sekans dizi analizi sonucunda elde edilen elektroforogram görüntüsü

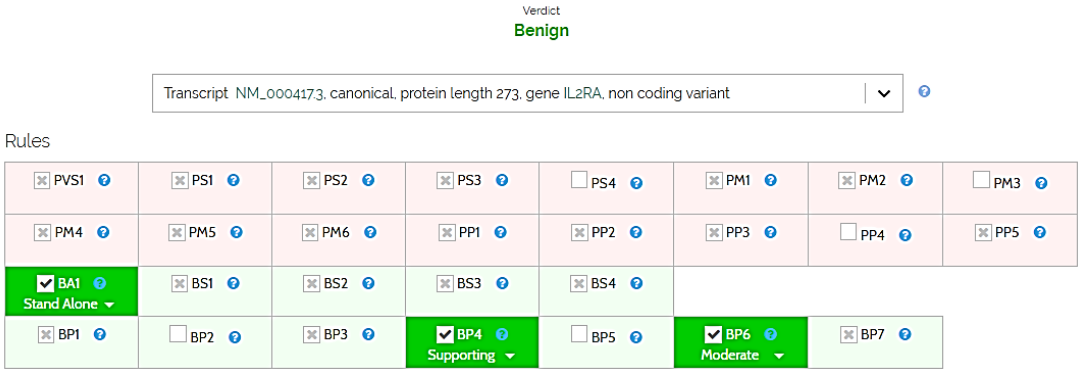
İkinci olgu no.19, çocuk akut lenfoblastik lösemi tanısı almiş 2.5 yaşında kız hastamızı kapsamaktadır. Hatanın tanı anında labaratuar değerleri, beyaz küre oranı 4100/mm3, hemoglobin oranı 9.2 g/dl, trombosit değeri ise 160000/mm3 olarak kaydedilmiştir tablo bulunmuştur (Tablo 3.6.). İn silico analizler sonucunda intronik bölgede (kodlama yapmayan bölgede) g.38134G>C değişimine neden olan homozigot polimorfizim saptanmıştır (Şekil 3.6.). VarsomeClinical mutasyon analizi sonucunda, 6066200 pozisyonunda kromozom 10.'da, G>C değişimine neden olan benin özellikte SNV varyantı bulunmuştur.

Tablo 3.5. IL2RA mutasyonu taşıyan hastanin laboratuar özellikleri

Hasta Numarası	Hasta no.19
Çalışılan Gen	*IL2RA*
Fenotip	B2
Yaş	2.5
Cinsiyet	Kız
Nüks	Yok
Beyaz Küre Hücre	4100/mm3
Hemoglobin	9.2 g/dl
Trombosit	160000/mm3
Translokasyon	Yok

Tablo 3.6. MutationTester analiz programı sonucunda elde edilen, g.38134G>C mutasyon verileri

Kromozom	Gen	Pozisyon	Sitogenetik bant	Varyant	DNA değişimi	RS.no
10.	*IL2RA*	6066200	10p15.1	SNV	g.38134G>C	rs11256369



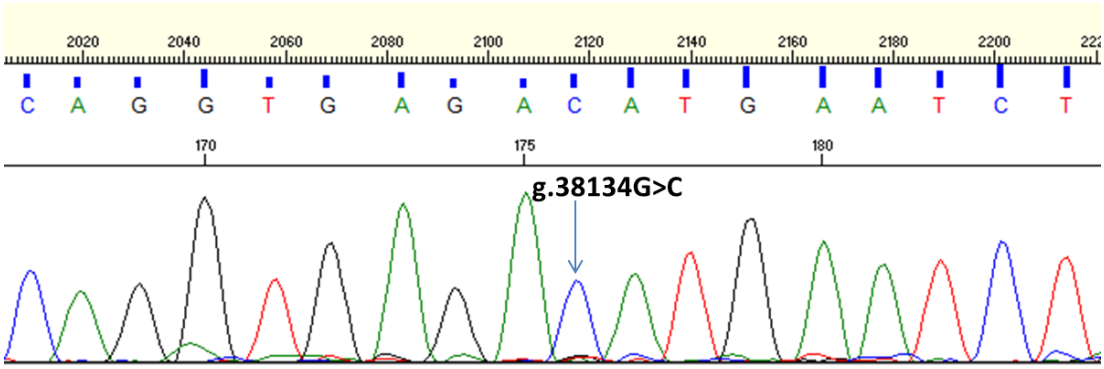
Şekil 3.4. VarsomeClinical platformunda g g.38134G>C mutasyonunun benin ajan olarak gösterilmesi

ACMG, VarSome klasifikayonuna gore patojeniteye uyan kriterleri bulundurma kriterleri

BA1: Exome Sekanslama Projesi, 1000 Genom Projesi veya Exome Toplama Konsorsiyumu'nda allel frekansı >% 5.

BP4: Gen veya gen ürünü üzerinde herhangi bir etki göstermez.

BP6: ClinVar varyantı Benign olarak sınıflandırır.



Şekil 3.5. g.38134G>C mutasyonu taşıyan olgunun sanger sekans, dizi analizi sonucunda elde edilen elektroforogram görüntüsü

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akut lenfoblastik lösemi miyeloid öncül hücrelerin anormal gelişimi ile karakterize edilen kök hücre hastalığıdır (Yokota & Kanakura, 2016). Diğer lösemi türlerinde de olduğu gibi ALL'de, B ve T hücrelerin öncül miyeloid hücrelerden farklılaşması süresince oluşan kromozomal yeniden düzenlemeler, translokasyonlar, gen ekspresyonlarında meydana gelen değişimler ve delesyonlar gibi genetik bozukluklar; hücre populasyonunda artışa ve proliferasyon sürecinin bozulmasına neden olarak hastalık gelişimine sebep olurlar (Inman & Kuehl, 2014) (Harrison, 2004).

B-ALL'de artan sayıda genetik anormallik tanımlanmasıyla, zamanla meydana gelen moleküler olayların-düzensizliklerin kronolojilerinin incelenmesi mümkün hale gelmiştir. Bu gibi bilgiler lösemik hücrelere neden olan mekanizmaların ve etken sinyal yolaklarının aydınlatılmasında yardımcı olmaktadır.

Hematopoetik sistemde meydana gelen anormal gelişim, kromozomal ve moleküler değişimlerin yanı sıra öncül hücre gelişiminde etkili olan birçok farklı sinyal yolakları yer almaktadır. Bunlardan biri Notch sinyal yolağıdır. Notch sinyal yolağı hücre gelişiminin erken safhalarında T hücreleri, B hücreleri ve dentrik hücrelerin düzenlenmesinde, organ oluşumunu ve morfogenezi etkileyerek proliferasyonda, farklılaşmada ve apoptozda düzenleyici rol oynar (Herve, Kamdje, & Krampera, 2011) (Chung, Riella, & Maillard, 2016).

Çalışmada akut lenfoblastik lösemi tanısı almış 52 pediatrik olgunun kemik iliği örneklerinde, RUNX1, IDH2, IL2RA genlerindeki yer alan olası mutasyonlar sanger sekans dizileme yöntemi ile araştırıldı. Hastaların ortanca yaş oranı 5 (0,9-15) yıl idi. ALL'li çocuk hastalarımızda cinsiyet dağılımı ise daha önce yapılan çalışmalara (1/1,2) benzer olarak, erkek-kız 30:22 (1.3:1) belirlendi (Hamrnond, et al., 1986).

Prognostik faktörlerin araştırılmasında, çocuk ALL'li hastalar tehşisin yapıldığı yaşa göre farklı risk grubuna dahil edilebilir. Bunlardan 10 yaş ve üzerindeki yaşlar, yüksek risk grubunu oluşturmaktadır (Hamrnond, et al., 1986).

Akut lenfoblastik tanısı almış hastalarda WBC, hemoglobin, trombosit değerleri farklılık göstermektedir. Araştırmada WBC oranı 1700-629000x109/L olarak kaydedilmiştir. WBC oranı çok fazla değişkenlik gösteren bir prognostik belirteç olup, daha önceki çalışmalarda WBC oranı >100,000/mm3 üzerinde kötü prognoz

olarak belirlenmiştir (Hamrnond, et al., 1986). Bir başka çalışmada ise 1-9 yaş arasında WBC oranı ≥50,000 ile standart risk grubunu oluştururken, 10 yaş ve üzerinde ≥50,000 WBC oranı yüksek risk olarak kabul edilmektedir (Smith, Arthur, & Camitta, 1996). Hastalarımızda trombosit oranı 7.8 dL ve hemoglobin oranı ise 40000x109/L olarak tespit edildi. Literatürde, hemoglobin ve trombosit seviyelerindeki değişikliğin prognoz üzerindeki etkisi tartışılmamıştır.

Yapılan in silico analizlerde, değerlendirilen 52 olgu içerisinden bir olguda RUNX1 geninde amino asit değişikliğine neden olan L148Q (p.Leu175Gln) mutasyonu heterozigot formunda saptandı. Bu mutasyon klinik platformda muhtemel patojenik olarak gösterilmiştir.

L148Q mutasyonunu taşıyan 9 yaşındaki erkek hastanın, WBC oranı 1324000x109/L olarak kaydedilmiştir, bu oran yapılan diğer araştırmalara gore standart risk grubu arasında yer almaktadır (Smith, Arthur, & Camitta, 1996). Miyeloid malignensilerin %25'inde etki gösteren RUNX1 mutasyonu, miyeloid ve lenfoid hücrelerin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Linden, Schnittger, Grol, Juergens , & Rossig, 2010).

Yenidoğanlarda fonksiyonel ETV6-RUNX1 füzyonlarının sıklığı %1 lösemi oranındadır. Fonksiyonel çalışmalar, B hücresinde ETV6-RUNX1 füzyonunun tek başına lösemi oluşumunda etkili olmadığını, bunun yanında ek olarak diğer genetik yapıların birliktelikleriyle etkili olabileceği düşünülmektedir (Mori, et al., 2002) (Andreassona, Schwallera, Anas, Asterd, & Gillilanda, 2001). Bu gibi gözlemler ETV6-RUNX'in erken lösemi klonal gelişiminde etkili olmasına rağmen, tek başına ALL gelişimi için yetersiz olduğunu ve lösemi gelişimi için ikincil bir genetik değişikliğinin varlığını vurgulamaktadır (Bertrand,, et al., 2007).

Benzer bir diğer çalışma Wayden ve arkadaşları tarafından, B-ALL'li farelerde yapılmıştır. RUNX1'in ALL'de diğer genler ile olan ilişkisini araştırmak için B-hücreli ALL'de etkili olan diğer genleri sleeping beauty transpozon sistemini kullanarak hastalık biyolojisinde yer alan işbirlikçi genler incelenmiştir. Tespit edilen genlerin ALL'nin oluşmasında ETV6-RUNX1 ile işbirliği yapmak için çekici adaylar olduğunu bildirilmiştir. (Weyden , et al., 2011).

IL2RA geninde yapılan mutasyon incelenmesi sonucunda, 52 olgu içerisinde 3 olguda intronik (5'UTR ve 3'UTR de kodlama yapmayan bölge) bölgede farklı varyasyon tespit edildi.

2 yaşında ALL tanısı almış çocuk olgumuzda, yapılan dizileme analizi sonucunda, 6066195 pozisyonunda kromozom 10'da, g.38139A>T değişimine neden olan bir polimorfizm tespit edildi. Hastaya ait WBC oranı 1700/mm3 olarak belirlendi, ve literatür incelendiğinde bu varyasyonun kötü prognozla ilişkili olmadığı gözlendi (Smith, Arthur, & Camitta, 1996).

IL2RA geninde polimorfizim varyantını tespit ettiğimiz bir diğer olgu 2.5 yaşında kız hastamızdı. Hastanın tanı anındaki beyaz küre oranı herhangi bir kötü prognoz ile ilişkili değildir, hastanın WBC oranı 4100/mm3 olarak bildirildi. Yapılan in silico klinik araştırmalar sonucunda intronik bölgede yer alan bir SNP polimorfizm varyantı, 6066200 pozisyonunda kromozom 10.'da, bening özellikte g.38134G>C değişimi gözlemlendi.

Bir diğer tespit edilen polimorfizım varyantı ise 10 yaşında erkek hastamızda görülmüştür. Hastanın tanı anında labaratuar değerleri, beyaz küre oranı 2260000/mm3 olarak belirlenmiştir, ve WBC oranı diğer çalışmaları destekler nitelikte yüksek risk grubunda yer almaktadır. İn silico analizler sonucunda intronik bölgede (kodlama yapmayan bölgede) g.38134G>C değişimine neden olan homozigot polimorfizim saptanmıştır. VarsomeClinical mutasyon analizi sonucunda, 6066200 pozisyonunda kromozom 10'da, G>C değişimine neden olan bening özellikte SNV varyantı bulunmuştur.

IL2RA genini in silico veritabanlarında sonuçlandırdığımız 3 olguda SNV (single nucleotide variant) varyantları bening olarak tespit edildi. Fakat aynı gen üzerinde daha önce yapılan benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda incelenen bir diğer gen olan IDH2'de herhangi bir varyant tespit edilememiştir. IDH2'nin mitokondriyal formu bir çok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. IDH2 geni glioma gelişiminde etkili rol oynamaktadır, hipotoni, ataxia ve lösemi türleri ile birlikte görülmektedir. Hirabayashi ve arkadaşlarının inceledikleri bir klinik vakada, 15 yaşında ALL tanısı almış Maffucci sendromlu bir hastada IDH2 geninde c.394C>T bir mutasyonunu tespit edilmiştir. IDH2'nin mutasyonuna ALL'den ziyade AML'de daha sık rastlanmaktadır. Bu gibi olgularda Maffucci sendromlu hastalar, embriyonik gelişim sırasında bir mozaik paterninde ortaya çıkan IDH1 veya IDH2 mutasyonları nedeniyle çeşitli malign tümörler geliştirme riski altındadır (Hirabayash, Seki, & Haseg, 2017).

Hematopoetik sistemde derregüle NOTCH sinyal yolağı lösemi ve lenfoma ile ilişkilendirilerek, T ve B hücre ALL'li hastalarında kromozomal translokasyonlar, ve genetik değişiklikler gözlemlenir (Chung, Riella, & Maillard, 2016). Çocuk ALL hastalarının %25'inde RUNX1 geni prognoz açısından risk grubunda yer almaktadır (Reichard, Kang, & Robinett, 2011).

IL2RA gen lokusunun ise çok sayıda polimorfik alleli, çeşitli otoimmün hastalıkların gelişimi ile ilişkilidir (Schwartz , et al., 2017).

B-ALL, genetik değişiklikler sonucunda lenfoid hücrelerin gelişiminde meydana gelen bozukluklar ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Bu çalışmada araştırdığımız bir grup pediatrik akut lenfoblastik lösemi tanısı almış hastanın moleküler mutasyon analizi sonucunda, hastaların moleküler heterojenliğini tanımladık. 4 olguda kodlama yapan ve kodlama yapmayan bölgelerde muhtemel patojenik ve bening özellikte varyantlar saptandı ve bu 4 olguda klonal bir değişiklik olduğunu söyleyebiliriz.

Mutasyon verilerini, hastaların klinik verileri ile karşılaştırdığımızda, WBC oranı 1324000x109/L olarak kaydedilen ve RUNX1 geni mutasyonu taşıyan hastanın klinik verileri, daha önce yapılan prognostik çalışmalara göre kötü prognoz ile ilişkilendirildi. Hastada bulunan mutasyon amino asit değişikliğine neden olarak muhtemel patojenik sınıfında yer almaktadır. Elde ettiğimiz bulgulara dayanarak, RUNX1'de meydana gelen genetik değişiklik ve WBC oranındaki artışın, anlamlı bir şekilde ilişkilendirilebilir. Fakat hasta sayısın az olması nedeni ile B-ALL'de prognostik bir belirteç olarak sınıflandıramamaktayız. Çalışma sonucunda RUNX1 pozitifliğinin ve WBC oranının kötü prognoz ile uyuşmasına rağmen bu konudaki çalışmalar halen yetersizdir, bu nedenle daha kapsamlı çalışmalar önerilir.

IL2RA geninde tespit edilen SNV varyantları ile ilişkili herhangi bir çalışma bulunmaması nedeni ile, hasta klinik verileri ile anlamlı bir ilişki kurulamadı.

Moleküler prognoz, B hücreli ALL hastalarındaki önemi, lökomogenezi tetikleyen özellikle NOTCH sinyal yolağı gibi öncül hücre gelişiminde yer alan sinyal iletilerin ve bu yolakların üyeleri olan genlerin araştırılması prognozda önemli belirteç odakları haline gelmiştir. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerde görülen genetik anomalilerin hastaların prognozunun belirlenmesinde önemli bir faktör olduğu için, ALL gelişimindeki mekanizmaların, sinyal yolakları üyeleri ile birlikte incelenmesi bundan sonraki deneylerde prognoz tespiti açısından gelecek çalışmalara da rehber olacaktır.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar litertürdeki sonuçlara uygunluk göstermektedir. Fakat daha güvenli bir değerlendirme yapılabilmesi için, daha fazla hasta sayısı ve bu hastaların sitogenetik sonuçlarının, klinik dataları ile birlikte entegrasyonu, mutasyon verileri ile birlikte incelenmesi ALL hastalarının moleküler doğasının daha iyi anlaşılmasında yol gösterecektir.

Bu çalışmada, B-ALL hücrelerinde Notch sinyalizasyon katkısını kapsamlı bir şekilde tanımlamak için in siliko ve moleküler yaklaşımlar kullandık. Genel olarak, Notch yolu, hücre içi RUNX1 geninde meydana gelen genetik değişiklikler B-ALL hücrelerini teşvik ettiğini söyleyebilmekteyiz. Bu bulgular kombinasyonu klinik öncesi bir mantığı temsil etmektedir.

B-ALL'da primer genetik değişiklikler ile sinyal yolaklarında meydana gelen değişiklikler paterni arasındaki güçlü korelasyon göz önüne alındığında bu gibi verilerin-bulguların daha uzun perspektifte, B-ALL biyolojisi bilgisinin artmasının, hedeflenen tedavilerin geliştirilmesine ve böylece hastalık prognozu açısından gelecek çalışmalara da rehber olacaktır.

KAYNAKLAR

Andersson, E.,Lendahl, U. (2006). Therapeutic modulation of Notch. *NATURE*, 358.

Andreassona, P., Schwallera, J., Anas, E., Asterd, J., & Gillilanda, D. (2001). The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Elsevier*, 98-100.

Anak , S., & Sarıbeyoğlu, E. (2011). Akut Miyeloid Lösemi. Anak, G. Aydoğan, M. Çetin, G. İrken, S. Kemahli, G. Öztürk., Pediatrik Hematoloji (623-634). İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi.

Belson, M., Kingsley, B., & Hol, A. (2006). Risk Factors for Acute Leukemia in Children. *Environmental Health Perspectives*, 138-141.

Bertrand,, P., Bastard, C., Maingonnat, C., Jardin, F., Maisonneuve, C., Courel, M.,(2007). Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Nature*, 521-522.

Campo, E., Swerdlow, S., Harris, N., Pileri, S., Stein , H. Jaffe, E. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 2-25.

Chung, J., Riella, L. V., & Maillard, I. (2016). Targeting the Notch Pathway to Prevent Rejection. *American Journal of Transplantation*, 379-381.

Çetingül, N., Aydın, M., Özbek, U., & Karakaş, Z. (2011). Lökomogenezis. S. Anak, G. Aydoğan, M. Çetin , G. İrken, S. Kemahli, G. Öztürk, Pediatrik Hematoloji (σσ. 557-562). İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi.

Ebens, C.,Maillard, I. (2013). Notch signaling in hematopoietic cell transplantation and T. *Blood*, 271-275.

Hamrnond, D., Sather, H., Nesbit, M., Miller, D., Coccia, P., Bleyer, A., (1986). Analysis of Prognostic Factors in Acute. *Medical And Pediatric Oncology*, 124-134.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144.

Herve, A., Kamdje, N.,Krampera, M. (2011). Notch signaling in acute lymphoblastic leukemia: any role for stromal. *Blood*, 6512.

Hirabayash, S., Seki, M., Haseg, D. (2017). Constitutional abnormalities of IDH1 combined with secondarymutations predispose a patient with Maffucci syndrome to acute lymphoblastic leukemia. *Wiley*, 1-4.

Juliusson , G., Hough , R. (2016). Leukemia. *Tumors in Adolescents and Young Adults*, 87.

Kopan, R.,Ilagan, X. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation. *Cell*, 4-6.

Linden, T., Schnittger, S., Grol, A., Juergens , H., & Rossig, C. (2010). Childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia in a patient with familial thrombocytopenia and RUNX1 mutation. *British Journal of Haematology*, 528.

Nowell, P. (1976). The Clonal Evolution of. *Science*, 23-28.

Parker, S., & Metallo, C. (2016). Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. *Pharmacology & therapeutics*, 1-2.

PUI, C.-H. (1995). CHILDHOOD LEUKEMIAS. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 1618-1622.

Reichard, K., Kang, H., & Robinett, S. (2011). Pediatric B-lymphoblastic leukemia with RUNX1 amplification: clinicopathologic study of eight cases. *Modern Pathology*, 1609-1611.

Schwartz , A., Demin , D., Vorontsov, I., Kasyanov , A., Putlyaeva , L., Tatosyan , K.,. (2017). Multiple single nucleotide polymorphisms in the first intron of the IL2RA. *Elsevier*, 1.

Tükün, A., & Akay, G. G. (2016). Kanser Genetiği. *Tıbbi Genetik Ve Klinik Uygulamaları* (. 271). Turkiye: Munis Dündar.

Vardiman, J., Thiele, J., Daniel , A., Brunning, R., Borowitz, M., Porwit, A.,. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 937-943.

Weyden , L., Giotopoulos, G., Rust, A., Matheson, L., Delft, F., Kong, J.,. (2011). Modeling the evolution of ETV6-RUNX1–induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. *Blood*, 1046-1050.

Harrison, C. (2004). Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of hematology*, 147-148.

(2009). Klinik Pratikte Hematoloji. Στο R. Hillman, K. Ault, & H. Rinder, *Klinik Pratikte Hematoloji.* Nobel Tıp Kitabevi.

Inman, H., & Kuehl, D. (2014). Acute Leukemia. *Elsevier*, 583.

Mori, H., Colman, S., Xiao, Z., Ford, A., Healy, L., Donaldson, C., και συν. (2002). Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *PNAS*, 8242.

Nussbaum, R., Mclnnes, R., & Willard, H. (2005). Genetik Ve Kanser. Στο *Tıbbi Genetik* (σ. 311).

Rieger, M., & Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1-5.

Smith, M., Arthur, D., & Camitta, B. (1996). Uniform Approach to Risk Classification and Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 19-22.

Soycan, L. Y., Akçay, A., & Ağaoğlu, L. (2011). Lösemiler. Στο *Pediatrik Hematoloji* (σσ. 599-600). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.

Triplett, T., Curti, B., Bonafede, P., Miller, W., Walker, E., & Weinberg, A. (2012). Defining a functionally distinct subset of humanmemory CD4+T cells that are CD25POSand FOXP3NEG. *European Journal of İmmunology*, 1991.

Yokota, T., & Kanakura, Y. (2016). Genetic abnormalities associated with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Science*, 721-722.