

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ
HASTALARINDA MN1 GEN EKSPRESYON SEVİYESİNİN ANALİZİ

MEHMET DENİZ YENER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2018

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK
LÖSEMİ HASTALARINDA MN1 GEN
EKSPRESYON SEVİYESİNİN ANALİZİ

MEHMET DENİZ YENER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2018

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**ANALYSIS OF MN1 GENE EXPRESSION
LEVEL IN CHILDHOOD
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

MEHMET DENİZ YENER
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2018



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/01/2018 tarih ve 2018/03 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18/01/2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Mehmet Deniz Yener'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Meningioma 1 (MN1) geni hematopoez sürecinde transkripsiyon ko-aktivatörü olarak görev yapıp, transaktivasyon bölgeleri içermektedir. MN1 geninin lösemiyle ilişkisi ilk olarak t(12;22)(MN1-TEL) translokasyonu sonucu oluşan anormal füzyon geninin saptanmasıyla bulunmuştur.

Karşılıklı genomik materyal değişimi olarak tanımlanan translokasyonlar, kromozomal yeniden düzenlemelerdir ve farklı lösemi türleri için prognostik değerler taşımaktadır. Karyotipik olarak normal olan lösemi vakalarında MN1'in aşırı ifade düzeyleri, ATRA (All-trans retinoic acid) tedavisine direnç ve hastalığın kötü seyri ile ilişkilendirilmiştir. Grubumuzun daha önceki çalışmaları; gerek MN1-TEL'in gerekse MN1'in, fare kemik iliği hücrelerinde aşırı ekspresyonunun lösemi oluşturduğunu göstermiştir. MN1'in myeloid neoplazilerdeki etkisini ortaya koyan çalışmalar bulunmakla birlikte, lenfoblastik lösemi patogenezinde bir fonksiyonu olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Çalışmamızda 9 sağlıklı bireye ait kemik iliği örneği ile 73 pediatrik B-hücreli akut lenfoblastik lösemi hastasına ait kemik iliği örnekleri MN1 gen ekspresyon düzeyleri açısından birbiri ile kıyaslanmıştır. Hasta örnekleri translokasyon taşıyan ve taşımayan olarak iki ana grupta toplanmıştır. Translokasyon taşıyan lösemi hasta örnekleri de kendi içerisinde; t(4;11) (MLL-AF4), t(12;21) (TEL-AML1) ve t(9;22) (BCR-ABL) olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır. Tüm kemik iliği örneklerinin MN1 gen ifade düzeyleri RT-qPCR yöntemi kullanılarak belirlenip, gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; TEL-AML1 pozitif 27 B hücreli ALL hastasının 22'sinde MN1 seviyesi daha yüksektir. Tedavi kriterleri açısından iyi prognoz ile ilişkili t(12;21) (TEL-AML1) taşıyan lösemi hastalarının MN1 gen ifade düzeylerindeki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar MN1 geninin lenfoblastik hücre gelişiminde bağımsız bir prognostik faktör olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: MN1, Akut Lenfoblastik Lösemi, B Lenfosit.

SUMMARY

Meningioma 1 gene (MN1) contains transactivation regions and acts as transcription co-activator in the hematopoietic process. The association of the MN1 gene with leukemia was first discovered by the detection of an abnormal fusion gene resulting from t(12; 22) (MN1-TEL).

Translocations identified as reciprocal genomic material exchanges are chromosomal rearrangements and carry prognostic value for different types of leukemia. Overexpression levels of MN1 in karyotypically normal leukemia cases have been associated with resistance to ATRA (all-trans retinoic acid) treatment and poor disease progression. The previous studies of our group showed that both MN1-TEL and MN1 overexpression in mouse bone marrow cells causes leukemia. Although there are studies that demonstrate the effect of MN1 in myeloid neoplasms, it is not yet known whether it is a function in the pathogenesis of lymphoblastic leukemia.

In our study, bone marrow samples from 9 healthy individuals and bone marrow samples from 73 patients with pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia were compared in terms of MN1 gene expression. Patient samples were collected in two main groups as those who has translocations and those who has not. The patient samples with translocations then divided into three sub-groups as t(4;11) (MLL-AF4), t(12;21) (TEL-AML1) and t(9;22) (BCR-ABL). MN1 gene expression levels of all bone marrow specimens were determined by using the RT-qPCR method and compared among the groups.

When the obtained data are evaluated, MN1 is higher in 22 out of 27 patients with TEL-AML1 translocation. In terms of treatment criteria, increase in MN1 gene expression levels of leukemia patients who has t (12; 21) (TEL-AML1) which is associated with good prognosis were found to be statistically significant according to the control group. These results suggest that MN1 may be an independent prognostic factor in the development of lymphoid cells.

Key words: MN1, Acute Lymphoblastic Leukemia, B Lymphocyte

TEŞEKKÜR

Bilim alanında başarılı olabilmek için daha çok çalışmam gerektiğinin bilincinde olarak; yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, insani değerleri ile örnek edindiğim ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Ayten KANDİLCİ'ye; tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarının yanı sıra bilgi ve tecrübelerini de bizden esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden Prof. Dr. Uğur ÖZBEK, Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ, Prof. Dr. Müge AYDIN SAYITOĞLU, Dr. Yücel ERBİLGİN ve Suzin TATONYAN'a ayrıca İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sema ANAK'a; tez sürecindeki destekleri ile her an yanımda olan arkadaşlarıma ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. İMMUN SİSTEM	2
3. HEMATOPOETİK SİSTEM	3
3.1. B Hücre Gelişimi	4
4. LÖSEMİ	7
4.1. Löseminin Tarihçesi	7
4.2. Akut Lösemiler	8
4.2.1. Lösemi Sıklığı	8
4.2.2. Lösemi Etyolojisi	9
4.3. Lösemi Patogenezi	10
4.3.1. Genetik ve Konjenital Faktörler	11
4.3.2. Lösemi Laboratuvar Bulguları	12
4.3.3. Lösemi Klinik Bulguları	13
4.4. Lösemilerin Morfolojik Sınıflandırılması	13
4.4.1. FAB Sınıflandırması	14
4.4.2. WHO Sınıflandırması	15
4.4.3. Lösemilerin Sitokimyasal Sınıflandırması	15
4.4.4. Lösemilerin İmmunolojik Sınıflandırması	17
5. LÖSEMİDE SIK GÖRÜLEN GENETİK BOZUKLUKLAR	20
5.1. Sık Görülen Yapısal Anomaliler	22
5.1.1. t(12;21)(p12-13;q22)	22
5.1.2. t(9;22)(q34;q11)	23

5.1.3. t(4;11)(q21;q23)	25
5.1.4. t(1;19)(q23;p13)	26
5.1.5. Kromozom 8’de Görülen Translokasyonlar	26
5.2. Sayısal Anomaliler	26
6. MN1 GENİ ve LÖSEMİ	28
7. MATERYAL	30
7.1. Biyolojik Materyaller	30
7.2. Kullanılan Cihazlar	31
7.3. Kullanılan Kimyasallar	31
7.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	32
8. YÖNTEMLER	33
8.1. Lökosit izolasyonu	33
8.2. RNA izolasyonu	33
8.3. Agaroze Jel Elektroforezi	35
8.4. cDNA Sentezi	35
8.5. RT-qPCR Yöntemi	36
9. BULGULAR	37
10. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	60
EKLER	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kisaltmalar</u>	
ABL1	: Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AML	: Akut myeloid lösemi
B-ALL	: B hücreli akut lenfoblastik lösemi
BCR	: B hücre reseptörü
CBF	: Kor bağlayıcı faktör
CD	: Ayırım kümesi “Cluster of differentiation”
cDNA	: Komplementer DNA
CLP	: Öncül lenfoid hücreler
CMP	: Öncül myeloid hücreler
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FISH	: Florasan in situ hibridizasyonu
FLT3	: FMS benzeri tirozin kinaz 3
GFP	: Yeşil floresan protein
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör
HSC	: Hematopoetik kök hücre
Ig	: İmmünglobulin
IL	: İnterlökin
KLL	: Kronik lenfoblastik lösemi
KML	: Kronik myeloid lösemi
LAP	: Lenfadenopati
MDS	: Myelodisplastik sendrom
MPO	: Myeloperoksidaz
MPP	: Multipotent öncül hücreler
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
T-ALL	: T hücreli akut lösemi
TCR	: T Hücre reseptörü
TdT	: Terminal deoksinükleotidil transferaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Hematopoezin şematik gösterimi ve önemli transkripsiyon faktörleri.	3
3.2: B lenfosit hücresi gelişim evreleri.	6
4.1: B lenfosit hücresi yüzey belirteçleri.	17
9.1: MN1 geni için RT-qPCR analiz sonuçlarından elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri grafiği.	38
9.2: HPRT geni için RT-qPCR analiz sonuçlarından elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri grafiği.	39
9.3: Kontrol kemik iliği ortalamasına göre MN1 ifadesi 2 kat ve daha yüksek olan hastaların oranı.	45
9.4: Kontrol ve hastalardaki MN1 ifade düzeyinin Mann-Whitney analiz sonuçları.	46
9.5: TEL-AML-1 pozitif olan veya translokasyon taşımayan hastalarda MN1 ekspresyon seviyesi dağılımı.	47

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
9.1: Analiz edilen hastalara ait klinik ve RT-qPCR verileri.	40
9.2: ALL hasta gruplarının hemoglobin (Hb), lökosit (WBC), hematokrit (Hct) ve trombosit (Plt) değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.	42
9.3: Hastaların remisyon, relaps, ölüm sayılarının taşıdıkları translokasyonlara göre karşılaştırılması.	43
9.4: Hastaların remisyon, relaps, ölüm sayılarıyla MN1 ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması.	43
9.5: B-ALL hastalarında MN1 ekspresyon düzeyi ve yaş/beyaz kan hücresi sayısı arasındaki ilişki.	47

1. GİRİŞ

Lösemi kan hücrelerinde meydana gelen miyeloid veya lenfoid hücre gelişiminin belirli bir basamağında aksamaması ve klonal olarak çoğalmasıyla gerçekleşen malign bir grup hastalık grubu olarak kabul edilmektedir. Lösemik klonal hücre serileri olgunlaşmamış kan hücrelerini üreterek diğer hematopoetik hücre oluşumlarını da etkilemektedir [Fader et al., 2010]. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), çocukluk çağında sıklıkla görülen lenfoid hücre serisinden köken alan bir lösemi türüdür ve tüm çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %25' ini oluşturmaktadır [Howell et al., 2015].

Lösemi; kemik iliğinden köken alan, kana ve diğer organlara ikincil olarak yayılım gösteren, hematopoetik kök hücrelerden kaynaklanan neoplazmlardır. Hücre bölünmesi ve farklılaşmasında etkili moleküler kontrol mekanizmalarında oluşan hatalar sonucu kemik iliğinin yaygın olarak neoplastik hücreler ile dolmasıyla karakterizedir [Tasian et al., 2015]. Löseminin belirgin bir sonucu olarak kanda çok sayıda olgunlaşmamış kan hücreleri saptanmaktadır ve bu anormallik kemik iliği işgali ile başlayıp diğer organlara koloni oluşturmaları ile sonuçlanmaktadır.

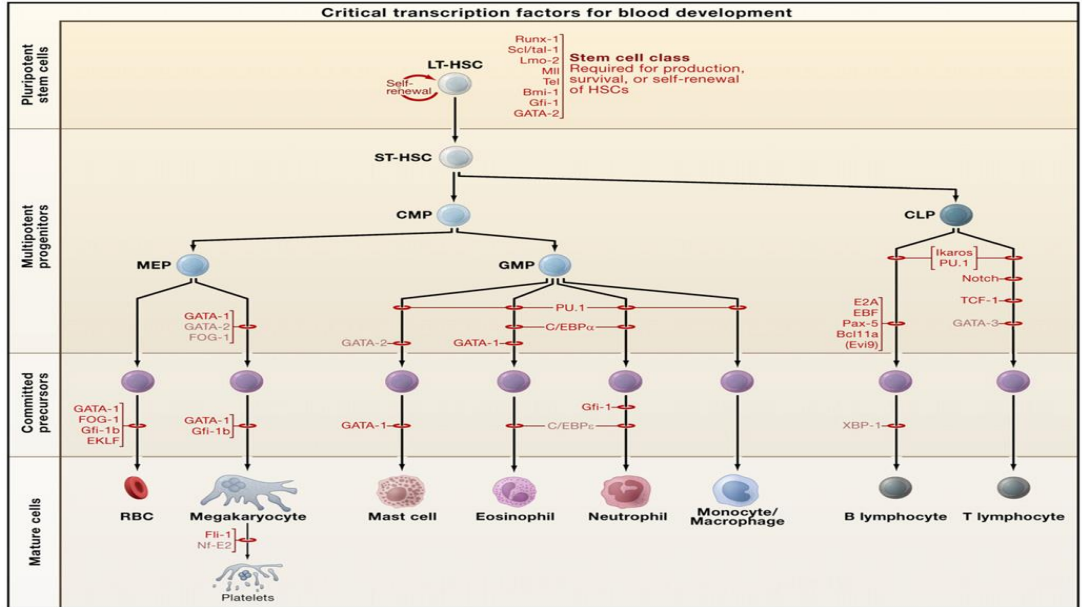
2. İMMÜN SİSTEM

İmmün Sistem, bakteri ve virüsler gibi yabancı organizmalara karşı gelişen ve kendinden olan ve olmayanı ayırt etme özelliğine sahip savunma sistemidir. İmmün yanıt; doğal ve edinsel immün yanıt olmak üzere 2 ana kolda incelenebilir [Santori, 2015]. Doğal immün yanıt, belli bir antijenden bağımsız olarak ortaya çıkan, sonucunda immünolojik hafıza oluşmayan sadece genel olarak vücuda karşı olanı tanımaya yönelik olan genel bir yanıttır. Doğal immün yanıtı; doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri, eozinofiller, bazofiller, nötrofiller, makrofajlar ve dentritik hücreler gerçekleştirir. Edinsel immün yanıt ise, kendinden olmayan patojenin belirli epitoplarını tanıyıp, bu patojene özgü yanıtın oluşması ve sonucunda daha sonraki enfeksiyonlarda hızlı yanıt oluşturabilmek için immünolojik hafıza oluşturan yanıttır. Edinsel immün yanıtın temel elemanları B ve T lenfositlerdir. Her bir B ve T hücresi organizmadan farklı olan epitopları tanıyan özgün bir antijen reseptörü taşırlar [Salimi et al., 2010]. Bu kadar fazla çeşitliliği tanımayı sağlayan bu sistem T hücrelerinde T hücre reseptörü (TCR) ve B hücrelerinde immünglobulin genlerinin yeniden yapılanmaları ile olur. Lenfosit hücreleri özelleşmiş immün cevap geliştirdiğinden gelişimsel ve fonksiyonel olarak myeloid hücre serisinden ayrılırlar [Hebeisen et al., 2010].

Vücudumuzda doğada bulunan birçok antijeni tanıyabilen ve bu antijenlere özgü antikorlar salgılayabilecek kapasitede büyük çeşitliliğe sahip B hücreleri üretilmektedir. B hücrelerinin çok çeşitli antijen tanıma kapasiteleri bu hücrelerin gelişiminin erken safhalarında meydana gelen ve B hücrelerine özgü olan V(D)J rekombinasyonu olarak adlandırılan gen segment değişimleri ile gerçekleşmektedir. V(D)J rekombinasyonu sırasında B hücre antijen reseptörlerini kodlayan değişken (variable (V)), çeşitlilik (diversity-D) ve birleşme (joining-J) gen bölgeleri somatik olarak farklı kombinasyonlar şeklinde yeniden düzenlenmekte ve böylece B hücreleri için yüksek oranda reseptör çeşitliliği sağlanmaktadır [Herzog et al., 2009]. Bu mekanizmada Ig ağır zincir reseptör bölgesi oluşurken önce D segmenti ile J segmenti birleşir sonrasında V segmenti ve DJ segmenti birleşir. Ig hafif zincirinde ise D segmenti bulunmamaktadır ve yalnızca V ve J segmentleri bir araya gelmektedir [Kuehl and Bergsagel, 2002].

3. HEMATOPOETİK SİSTEM

İmmün sistem hücrelerini de içeren kanın bütün şekilli elemanları, kemik iliğindeki multipotent özellikteki hematopoetik hücrelerden köken alırlar [Chen et al., 2015]. Hematopoetik gelişimin ilk aşaması birçok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip kök hücrelerin, myeloid veya lenfoid öncül hücrelere farklılaşmasıyla gerçekleşir. Hematopoetik öncül hücrelerden olgun kan hücrelerinin gelişimi, yani hematopoez; fetal dönemin erken evresinde 4 ve 6. haftalar arasında vitellüs kesesinde, 6. haftadan sonra ise karaciğer ve dalakta (8. hafta) gerçekleşir. Kemik iliğinde üretimi insanlarda 4-5. aydan itibaren başlar. Doğumdan sonra ise, bütün hematopoetik fonksiyonlar sadece kemik iliğinde gerçekleşir. Karaciğer ve dalakta hiç bir hematopoetik aktivite kalmaz. Kanın bütün şekilli elemanları; eritrosit, megakaryosit, lenfosit, monosit, bazofil ve eozinofiller, farklılaşma yeteneği olan multipotent hücrelerden köken alırlar [Lim et al., 2013]. Hematopoez'in şematik gösterimi ve önemli transkripsiyon faktörleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir [Orkin and Zon 2008].



Şekil 3.1: Hematopoezin şematik gösterimi ve önemli transkripsiyon faktörleri. HSC, hematopoetik kök hücre; CLP, ortak lenfoid öncül hücresi; CMP, ortak myeloid öncül hücresi; MEP, megakaryosit eritrosit öncül hücresi; GMP, granülosit makrofaj öncül hücresi; RBC, kırmızı kan hücresi.

Multipotent özellikteki bu hematopoetik kök hücreler, kendi kendini yenileyebilme (self-renewal) ve farklılaşma yeteneğine sahip uzun dönem (long-term HSC) hematopoetik kök hücrelerdir. Erken farklılaşma aşamasında uzun dönem hematopoetik kök hücreler kendi kendini yenileyebilme özelliklerini kaybederek öncelikle kısa-dönem hematopoetik kök hücrelere (short-term HSC) daha sonrada hızlıca multipotent öncül hücrelere (MPP) farklılaşırlar [Bernitz et al., 2016]. Multipotent öncül hücreler çok kısıtlı veya hiç kendi kendini yenileyebilme özelliği olmayan sadece lenfoid veya myeloid seri hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Farklılaşan bu lenfoid öncül hücrelerden (common lymphoid progenitor = CLP) B ve T lenfositleri ile doğal öldürücü (“natural killer=NK) hücreler oluşurken, myeloid öncül hücrelerden (common myeloid progenitor=CMF) eritroid, megakaryositik ve granülositik/ monositik (GM) hücreleri oluşur. Multipotent öncül hücrelerin VCAM-1- (vascular cell adhesion molecule) eksprese etmeyenleri GM hücre serilerine doğru yönelirken, VCAM+ eksprese eden hücreler lenfoid ve diğer myeloid hücre serilerine yönelirler [Doulatov et al, 2012].

Hematopoetik hücreler morfolojik olarak birbirlerine çok benzemelerine rağmen fonksiyonel olarak birbirlerinden çok farklıdırlar. Hematopoetik hücreler, antikor panelleri ile tanınabilen yüzey proteinleri ile birbirinden ayırt edilebilmektedir. Bu proteinlerin standart adlandırılması ‘CD’ (ayırım kümesi = cluster of differentiation) tanımlamasıdır; bunlar belli bir hücre serisi veya hücre farklılaşma evresini tanımlamak için kullanılır [Barnkob et al., 2014].

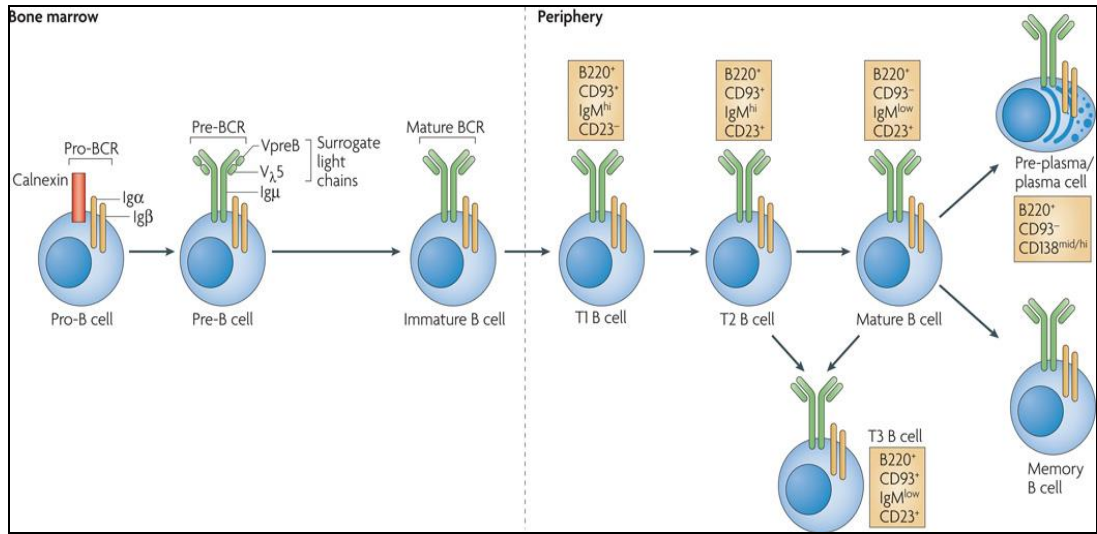
Kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşma özelliğine sahip kök hücrelerin olgun hücrelere farklılaşması epigenetik düzenlemeler ve transkripsiyon faktörleri gibi iç etkenler ile sitokinler, hormonlar veya adezyon molekülleri gibi çevresel faktörlerin kontrolü altında olur [Wang and Wagers, 2011].

3.1. B Hücre Gelişimi

B lenfositleri ilk defa 1960’lı yılların sonlarına doğru, kuşlarda Bursa fabricius’da (Bursa fabricii) bulunmuş ve antikor üretiminden sorumlu hücreler olarak tanımlanmıştır. B lenfositleri memelilerde kemik iliginde (“Bone Marrow”), kuşlarda ise bursa fabriciusta olgunlaştığı için adını bu organların baş harfinden alır [Reese, 1998]. B hücreleri ontogeninin erken evrelerinde omentum ve fetal

karaciğerde üretilirken embriyonik dönemin ortalarında üretimi kemik iliğinde gerçekleşmeye devam eder. İnsanlarda B hücrelerinin farklılaşması ve olgunlaşması tümüyle kemik iliğinde gerçekleşir [Dzierzak and Robin, 2010]. Hematopoetik kök hücrelerden farklılaşan genel lenfoid hücre serisinden, B hücre öncülleri oluşur. Genel lenfoid hücre serisinden farklılaşarak oluşan ilk B hücresi pre-pro B hücresi, fraksiyon A veya CLP-2 adını alır. Bu hücreler B hücrelerine özgü bir yüzey proteini olan B220 proteini taşırlar. B hücre serisi oluşturacak öncül hücreler interlökin-7 nin etkisiyle farklılaşarak CD34+, CD19-, CD22+ pro B hücrelerine dönüşürler [Pearson et al., 2015]. Olgunlaşmanın bir sonraki basamağı olan pre B hücreleri hala erken dönem hücre yüzey proteini CD34'ü taşıyalar da olgun B hücre belirteci CD19 yüzey proteini açısından pozitif hale gelmişlerdir. Kromozomun ağır zincir lokusundaki immünglobulin genleri yeniden yapılandırılarak μ ağır zincir proteininin oluşmasını sağlar [Okuno et al., 2002]. Bu aşamadaki B hücreleri pre B II büyük (pre B II large) hücreleri adını alırlar. Pre B hücreler daha sonra CD34-, CD19+, CD10+, CD20- yüzey proteinlerini taşıyan pre B II küçük hücrelere dönüşürler. Bu aşamada hala μ ağır zincir sitoplazmik haldedir [Meffre and Nussenzweig, 2002]. B hücreleri pre B aşamasında iken μ ağır zincir proteinlerinin bir kısmı öncü bir B hücre reseptörü oluşturmak üzere hafif zincire benzeyen iki değişmez proteine bağlı olarak hücre yüzeyinde bulunurlar. Bu aşama B lenfositlerinin ilk denetim aşamasıdır. Bu aşamada μ proteinin yanlış rekombinasyonu yüzünden bu proteini üretemeyen hücreler, apoptoza uğrayarak elenirler. μ proteini ve erken B hücre reseptörü kompleksi iki işlem için sinyal sağlar. Öncelikle 2. kromozomdaki Ig ağır zincir rekombinasyonu durdurulur. Bunun sebebi her bir B hücresinin kalıtsal olarak anne ya da babadan sadece birinin allelinden gelen immünglobulini üretmesidir [Brenner et al., 2011], [Pone et al., 2012]. Allelik dışlama (allelic exclusion) adı verilen bu işlem ile her bir hücrenin tek bir özgüllükte reseptör üretmesi sağlanır. İkinci sinyal ise Ig hafif zincir lokusunda önce kappa sonra lambda zincirinin rekombinasyonunu başlatır. Hafif zincirlerden biri üretildiğinde bu zincir ağır zincir ile birleşerek hücre zarında IgM antijen reseptörünü oluşturur. Bu reseptör, çoğalmayı sağlayan sinyaller göndererek hatasız IgM reseptörü üreten hücrelerin korunmasını sağlayıp, hatalı hücrelerin apoptoza giderek ölmelerini sağlar. Bu olay B hücre gelişimindeki ikinci denetim aşamasıdır. Doğru IgM reseptörü üreten hücrelerin gönderdiği sinyaller sonucunda rekombinaz enzimleri durdurulur ve rekombine olmamış diğer hafif zincir lokusundaki rekombinasyonlar engellenir. Bu

sayede her bir B hücresi, anne veya babanın allelinden gelen kappa veya lambda zincirinin sadece bir tanesini üretir. Hücre yüzeyinde IgM üreten B hücreleri olgunlaşma basamağının bir sonraki evresi olan olgunlaşmamış (immature) B hücreleri adını alır. Olgunlaşmamış B hücreleri yüzey proteinleri açısından CD34-, CD19+, CD20+ hücrelerdir. Bu hücrelerin olgun B lenfositlerine dönüşmesi ise kemik iliğinde veya kemik iliğini terk ettikten sonra periferik kanda gerçekleşir [Vettermann and Schlissel, 2010], [Nemazee, 2017]. B lenfosit hücreleri gelişim evreleri Şekil 3.2’de şematik olarak gösterilmiştir [Cambier et al., 2007].



Şekil 3.2: B lenfosit hücresi gelişim evreleri. ProB, progenitör B hücresi; PreB, öncü B hücresi; Immature B cell, olgunlaşmamış B lenfosit hücresi; Mature B cell, olgunlaşmış B lenfosit hücresi; Transitional (T1, T2, T3) B cells, geçici (T1, T2, T3) B lenfosit hücreleri.

4. LÖSEMİ

Lösemiler, bir hematopoetik hücrede meydana gelen genetik ya da epigenetik bozukluğa bağlı olarak normal miyeloid veya lenfoid hematopoezin belirli bir basamakta duraksaması ve bu immatür hücrelerde anormal olarak “klonal” proliferasyon gelişmesi sonucu oluşan malign bir grup hastalık olarak tanımlanmaktadır [Couto et al., 2005]. Lösemik hücreler, hem kemik iliğini baskılayarak ve onun yerini alarak hem de ekstrameduller bölgelerde yayılarak akut lösemilere özgü klinik tabloyu oluşturur. Lösemiler çocukluk çağı malignitelerinin yaklaşık % 25-30’undan sorumlu tutulmaktadır. Morfolojik yönden hastalığa tutulan hücre dizisinin tipine göre (myeloid ya da lenfoid) ve proliferen olan kan hücresinin olgunlaşmasına göre (akut ya da kronik) sınıflandırması yapılmaktadır [Cobaleda and Sanchez, 2009].

Akut lösemiler, olgunlaşmamış (blastik) kan hücrelerinin artışı sonucu oluşmaktadır. Akut lösemilerde kontrolsüz çoğalan hücreler lenfoid öncü hücreler ise “akut lenfoblastik (lenfoid) lösemi (ALL)”, myeloid öncü hücreler ise “akut myelositik (myeloid) lösemi (AML)” olarak tanımlanmaktadır [Terwilliger et al., 2017].

Kronik lösemiler ise olgunlaşmış kemik iliği elemanlarının artışı sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Kronik lösemilerde kontrolsüz çoğalan hücreler lenfoid öncü hücreler ise “kronik lenfositik (lenfoid) lösemi”, myeloid öncü hücreler ise “kronik myelositik (myeloid) lösemi” olarak tanımlanmaktadır [Whitehead et al., 2016].

4.1. Löseminin Tarihçesi

Literatürde ilk kez 1827’de lösemili bir olgu bildirilmiştir. 1827’de Velpeau tarafından lösemi ile ilgili ilk vaka bildiriminden bu yana, lösemi, gerek klinik gerekse genetik incelemelerde ilgi duyulan bir neoplazm olmuştur. Velpeau tarafından tespit edilen hastada; ateş, güçsüzlük, karın şişliği ve idrar yolları taşlarından kaynaklanan ağrılar şikayet edilmiş ve hastaneye başvurusundan kısa bir süre sonra hasta kaybedilmiştir. Bu tarihten 1845 yılına kadar lösemi ile ilgili çalışmalar yeterli olmamıştır. Bu tarihlerde Virchow ve Benett ayrı ayrı olgularının

otopsisinde, kanın beyaz rengine dikkat çekmiş ve hastalığı tanımlamışlardır [Reese et al., 1998].

İlk tanımlanan olguda, dalak oldukça büyük ve lökositöz damarların içindeki sarı beyaz kitle olarak tarif edilmiştir. O dönemde lökositlerdeki yapısal özelliklerden henüz bahsedilmemektedir. Yüksek lökosit sayısından ötürü, beyaz kan terimi (weisses blut) kullanılmış, daha sonra ise Yunanca kökenli olarak beyaz anlamına gelen “leukos” ve kan anlamına gelen “haima” sözcüklerinden “leukemia” terimi türetilerek kullanılmaya başlanmıştır. İlk defa 1870 yılında lösemiye, miyelojen, dalak ve lenfatik lösemi olarak Neumann sınıflandırmıştır ve kemik iliğinden kaynaklandığını göstermiştir. Erlich 1891 yılında yeni boya yöntemleri ile lösemi histolojisinde yeni bir sayfa açmıştır. 1903 yılında lenfatik lösemilerin akut ve kronik olarak ayrılmasının ardından Naegeli 1905 yılında miyeloblastları tarif etmiştir [Cannas and Thomas, 2015].

4.2. Akut Lösemiler

Akut lösemiler, olgunlaşmamış (blastik) miyeloid ya da lenfoid dizi hücrelerinin kemik iliği, periferik kan ve diğer dokularda birikimi sonucu oluşmaktadır. Lösemi hücrelerinin kemik iliğini istila etmesi sonucu normal kan hücrelerinin (eritrosit, granülosit, trombosit) üretimi engellenir ve buna bağlı olarak gelişen anemi, infeksiyon ve kanamalar hastalığın ana belirti ve bulgularını oluşturur. Kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücrelerin myeloid ya da lenfoid öncü hücre olmasına bağlı olarak akut lenfoblastik lösemi ya da akut myelositik lösemi olarak sınıflandırılmaktadır [Cobaleda et al., 2009], [Badar et al., 2015].

4.2.1. Lösemi Sıklığı

Akut Lösemiler, insanda tüm kanserlerin %10'unu oluşturur. Çocuklarda ve genç erişkinlerde en sık rastlanan habis hastalık akut lösemidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 15 yaşın altında lösemi sıklığı 100.000'de 4 olarak belirtilirken, coğrafi bölgelere göre bu oran farklılık gösterebilmektedir [Boyle and Levin, 2008], [Howlader, 2015]. Yaklaşık olarak çocuklarda görülen akut lösemilerin %80'i ALL, erişkinlerde görülen akut lösemilerin de %80'i AML'dir. Akut lösemilerin insidansı

coğrafi bölgelere göre değişmekle beraber erkeklerde ve beyaz ırkta daha sık görülmektedir. Görülme sıklığı en fazla 3-5 yaş arasındadır ve daha sonra sıklık giderek azalarak yaşamın üçüncü dekatında yeniden artmaktadır. ALL, erkeklerde kızlardan daha sık görülür. Erkek predominansı T hücreli ALL'de daha da belirgindir [Saultz and Garzon, 2015].

4.2.2. Lösemi Etyolojisi

Lösemi nedenleri arasında çeşitli çevresel etkenler gösterilmektedir. Genetik faktörlerin ve ailesel geçişlerin yanı sıra birçok dış etkende hücrel kontrol mekanizmalarına etki ederek hastalık oluşumunda rol almaktadır [Wiemels, 2012].

İyonize Işıklar: Gebelik dönemlerinde röntgen incelemesi yapılan hamilelerin bebeklerinde lösemi riskinin 1,5-2 kat arttığı görülmüştür. Radyasyonun hücrel hasarları literatürde bilinen bir olgu olmasıyla birlikte, bu hafif artışın çocuklarda lösemi gelişme riskinin sadece radyasyon ışınının doğrudan etkisine değil, anneyle ilgili başka olası etmenler olabileceğini düşündürmektedir. Radyoaktif ortamlarda çalışan erkeklerin çocuklarında lösemi gelişme sıklığının normal popülasyona göre arttığı bildirilmektedir [Kuznetsova et al., 2016]. Bu bulgular iyonize edici radyoaktif ışınların lösemi gelişmesinde önemli olduğunu göstermektedir [Hattchouel et al., 1995].

Virüsler: Lösemi ile belirli bir enfeksiyon etkeni arasında şimdiye kadar kesinleşmiş doğrudan herhangi bir ilişki saptanamamıştır. Human T-cell leukemia virus-I (HTLV-I) bazı kronik lenfositler lösemi ile ilişkili bulunmuştur ancak bu hastalarda löseminin bulaşıcılığı gösterilememiştir. Maial ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada; gebeliklerinde Epstein-Barr virus (EBV) IgM (+) ve Mycoplasma pneumoniae (+) olan hamileler ile bu annelerden doğan çocukların ileride lösemi olması arasında ilişki gösterilmiştir [Chanudet et al., 2007], [Maial and Wünsch, 2013]. Yapılan araştırmalar sonucunda ilgili enfeksiyonların doğrudan etkisi ile lösemiye neden oldukları ya da lösemi hücrelerinde virus gen dizisi varlığı saptanamamıştır. Enfeksiyonlara bağlı geçirilmiş hastalıklar neticesinde çocukların immün sistemlerinde var olan bir bozukluk ve ek olarak genomik bir yatkınlığının fenotipe yansiyıp löseminin oluşabileceği ileri sürülmüştür [Esau, 2017], [Liu et al., 2017].

Kimyasal Madde ve İlaçlar: Sanayi ve kimyasal endüstrinin gelişmesi birçok zararlı etmene de maruziyeti arttırmaktadır. Birçok endüstriyel üründe kullanılan kimyasal maddelerden olan benzen ve türevleri akut lösemi riskini arttırmaktadır. Genomik materyal ile etkileşimi gösterilen bu kimyasallar enzimatik birçok defekte yol açmaktadır ve DNA tamir mekanizmalarının doğru işlemesine engel olabilmektedir. Alkilleyici ajanlarla tedavi gören hastalarda, AML ve miyelodisplastik sendrom gelişme riski yüksek olduğu bilinmektedir. Topoizomera II inhibitörleri (Epipodofiloksin türevleri, antrasiklinler) ile tedavi gören ALL’li vakalarda da Akut Myeloid Lösemi (AML) gelişme riski yükselmektedir [Polychronakis et al., 2013].

4.3. Lösemi Patogenezi

Akut lösemi, olgunlaşmamış miyeloid ya da lenfoid hücrelerin proliferasyonu ile kendini gösteren bir hastalıktır. Akut lösemi hücrelerinin temel özelliği farklılaşma yeteneğini kaybetmiş olmalarıdır. Bu hücrelerin olgunlaşması ALL’de lenfoblast düzeyinde kalmıştır. Genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörler de lösemi oluşumunda sorumlu tutulmaktadır. Bunlar arasında; viral enfeksiyonlar, kimyasal ve alkilleyici ajanlarda hücrelerin normal biyolojik süreçlerini etkileyen faktörlerdir. Bu etkenler direkt ya da immün yetmezlik sendromları oluşturarak da çocukluk çağı lösemilerinde önemli etiyolojik faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser etiyojisinde rol oynadığı düşünülen virüsler normal hücrelerin haberleşme sinyal ve yollarını etkileyebilmektedirler. Bu etkiler hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için önemli olan kontrol basamaklarının bozulmasına yol açabilmektedirler. Böylece hematopoezin bir basamağında takılan hücreler kontrolsüz çoğalıp farklılaşma özelliklerini kaybedebilmektedirler [Schnersch et al., 2012], [Okkenhaug et al., 2016].

Kan hücreleri kemik iliğindeki multipotent hemotopoietik kök hücreden türemektedirler. Lenfoid kök hücreler lenfositleri, myeloid kök hücrelerse nötrofilleri, monositleri, eosinofilleri, bazofilleri, eritrositleri ve trombositleri oluşturacak şekilde farklılaşmaktadır. Lösemik transformasyon herhangi bir farklılaşma düzeyindeki hücrede ortaya çıkabilmektedir. Diferansiyasyon bozukluğu ve aşırı proliferasyon sonucu kemik iliğinde biriken lösemi hücresi çevre kanına

geçip diğer dokuları infiltre etmektedir. Lösemiye yol açan transformasyonun biriken genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu olduğu kabul edilmektedir. Kromozomlardaki yeniden düzenlemeler, translokasyonlar, delesyonlar, gen amplifikasyonu, nokta mutasyonları gibi olaylarla, genlerin ürünleri değişikliğe uğramaktadır. Bu yeni oluşan ürünler normal hematopoez gelişiminin ve düzenlenmesinin bozulup hücrel proto-onkogenlerin onkogen karakteri kazanmasına yol açmaktadır [Lopez et al., 2017].

Hematopoetik kök hücrelerden dolaşıma katılan kan hücrelerinin gelişiminin düzenlenmesi; kök hücre faktörü (stem cell factor), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), interlökin-3 (IL-3), interlökin-7 (IL-7), eritropoetin ve trombopoetin gibi büyümede etkili faktörler ile sağlanmaktadır. ALL etiyolojisinde de yer alan kromozomal aberasyonlar bu biyolojik faktörlerin etkilerinde değişimler yaratıp hücre farklılaşmalarında bozukluklara sebep olabilir. Bu aşamada öncü hücreler gelişim aşamasını sağlıklı tamamlayamadan fonksiyonel olmayan lösemik hücrelere dönüşüp, neoplastik bir karakter kazanabilmektedirler [Wiemels, 2012], [Tabe and Konopleva, 2014].

4.3.1. Genetik ve Konjenital Faktörler

Akut lösemnin ortaya çıkmasında genetik faktörlerin önemli birçok rolü bulunmaktadır. Bazı ailelerde hematopoetik hastalıkların sık görüldüğü ve akut lösemili bazı vakaların kardeşlerinde de lösemi gelişme sıklığının beklenenden 2-4 kat fazla olduğu bildirilmiştir [Mullighan, 2012], [Wiemels, 2012]. 6 yaşının altındaki ikizlerden birinde lösemi gelişmiş ise diğer ikizinde de lösemi hastalığının ortaya çıkma olasılığı yaklaşık olarak %20 oranında öngörülmektedir. Down Sendromlu kişilerde lösemi gelişme sıklığı normal popülasyona göre 20 kat daha fazla görülmektedir [Mateos, 2015]. Bazı genetik geçişli hastalıklarda hastalığın bir bulgusu ya da ikincil bir sonucu olarak da akut lösemiler ortaya çıkabilmektedir. Nörofibromatosis, glutathion redüktaz eksikliği, pigmenti hastalıkları, immün yetmezlik bozuklukları, kostman sendromu, rubinstein-taybi sendromu, , fanconi anemisi, bloom sendromu, poland anomalisi, wilms tümörü, shwachman sendromu, klinefelter sendromu, down sendromu (Trizomi 21), patau sendromu (Trizomi 13), edward sendromu (Trizomi 18), kaposi sarkoma gibi hastalıklarda lösemi görölme

sıklığının artmış olduğu bilinmektedir [Stieglitz and Loh, 2013], [Brisson et al., 2015].

4.3.2. Lösemi Laboratuvar Bulguları

Günümüzde hastalara akut lösemi tanısı koymak için öncelikle tam kan sayımı ve periferik yayma yapılmaktadır. Şüpheli klinik vakalarda tam kan sayımı sonuçlarında lökosit sayısında büyük değişiklikler gösterir. Lökosit hücre sayıları normal değerlerden uzak bir şekilde yüksek ya da düşük değerlerde olabilmektedir. Bu mevcut kan hastalığının türüne ve derecesine bağlı olabilmektedir. Dominant hücre klonunun kemik iliği ve hematopoetik organlara olan infiltrasyonuna bağlı olarak trombosit sayılarında ise belirgin bir derecede azalma gözlenmektedir. Laboratuvar tetkikleri kullanılarak özel hücre bazlı boyama yöntemleri kullanılarak periferik kan yaymasında lösemi hücrelerinin varlığına bakılmaktadır [Kadia et al., 2015]. Akut lenfoblastik lösemi hastalarının karakteristik periferik kan yayması bulgularında; anemi, trombositopeni ve blastik hücrelerin varlığı ayırıcı tanıyı oluşturmaktadır. Fakat ilk tanı anında vakaların %20'sinde normal kan değerlerine ait tablo görülebilmektedir. Hastalar arasında yaşanan anemi en sık ve en erken görülen laboratuvar bulgudur. Lösemik hastaların kan değerleri arasında trombosit hücre sayıları genellikle başlangıçtan beri düşük seyretmektedir. Olguların yaklaşık yarısında $50000/\text{mm}^3$ 'ün altında değerler görülmektedir. Lökosit sayısı tanı anında yaklaşık %50 olguda artmış bir şekilde izlenmektedir. Lösemi olgularının %20'sinde ise lökosit hücre azlığı olarak lökopeni durumu bildirilmektedir [Inaba et al., 2013].

Lösemik hücrelerde gerçekleşen pürin metabolizmasında oluşan artış sonucu gözlenen hiperürisemi, tanı anında veya tedavi sürecinin başlarında hücre yıkımının artmasına bağlı olarak ortaya çıkabilir. Bu vakalara ait klinik tabloya azotemi, hiperpotasemi, hiperfosfatemi ve hipokalseminin eklenmesi ile tümör lizis sendromu gelişebilir. Lösemik hücrelerin yıkımı sonucunda vakalarda sıklıkla yüksek serum LDH düzeylerine rastlanabilir. Tanı esnasında lösemik hücrelerin karaciğeri infiltre etmesi nedeniyle karaciğer enzimlerinde yükseklik de sıklıkla saptanan laboratuvar bulgularını oluşturmaktadır [Fader et al., 2010].

4.3.3. Lösemi Klinik Bulguları

Lösemi hastalarında neoplastik hücrelerin kemik iliği ve vücudumuzun diğer organlarında birikimi sonucunda hastalığa ait çeşitli klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Kemik iliği kendi dokusu içinde çoğalıp biriken bu olgunlaşmamış hücrelerden dolayı fonksiyonunu yapamamakta ve bunun sonucunda da hastalarda anemi, nötropeni ve trombositopeni oluşabilmektedir. Anemik duruma bağlı olarak hastalarda halsizlik, kolay yorulma, çarpıntı ve nefes darlığı gibi klinik semptomlar görülmektedir. Kan pıhtılaşmasında özel bir yeri olan trombosit hücre azlığına bağlı olarak burun, dişeti, konjunktiva, merkezi sinir sistemi ve retina kanamaları ortaya çıkmaktadır. Kanamalar zaten var olan aneminin daha da derinleşmesine yol açmaktadır [Howell et al., 2015]. Akut lösemilerde enfeksiyonlar granülositopeniye bağlı olarak sık görülmektedir. Enfektif ajanların kontrol altına alınamamasına bağlı lenf düğümlerinde büyüme (lenfadenopati) çocuklarda daha belirgindir. ALL tanısı almış çocukluk çağı vakalarının yaklaşık % 30-60'ında tanı esnasında belirgin hepatomegali ve/veya splenomegali mevcuttur. Hepatomegali ve splenomegali ayrıca yüksek lökosit sayımı ile birliktelik gösterir. Kemik ağrısı ve sternal hassasiyet olguların yaklaşık yarısında erken klinik semptomlar olarak kendini göstermektedir. İlk tanı konduğu sırada akut lösemi vakalarında deri, karaciğer, akciğer, göz, nazofarinks ve böbrekler gibi dokuların lösemi hücreleri ile infiltrasyonuna bağlı semptom ve bulgular görülebilmektedir [Hu et al., 2011].

4.4. Lösemilerin Morfolojik Sınıflandırılması

Lösemiler, hematopoetik hücre kaynağının morfolojik yapısına göre miyeloid veya lenfoid seri olarak ayrılmaktadır. Aynı zamanda hücre serisinden gelişen hücre klonlarının genç veya olgunlaşmış olmasına göre de akut ya da kronik lösemiler olarak sınıflandırılmaktadır.

Akut lösemiler olgunlaşmamış miyeloid ya da lenfoid seri hücrelerinin kemik iliği, periferik kan ve diğer organlarda birikimi ile tanımlanan neoplastik hastalıklardır. Lösemi hastalığında kontrolsüz fonksiyonel olmayan hücre çoğalmaları gerçekleşir ve kan hücreleri kemik iliğini istila ederler aynı zamanda normal kan hücrelerinin (eritrosit, granülosit ve trombosit) üretimi engellerler. Buna

bağlı olarak gelişen anemi, enfeksiyonlar ve kanamalar hastalığın ana belirti ve bulgularını oluştururlar. Akut lösemilerde, tedavi almayan hastaların survilerinde hızlı ve ölümcül bir seyir gözlenir [Zhang et al., 2015], [Whitehead et al., 2016].

Kronik lösemide ise hızlı bir şekilde çoğalmayan fakat normal işlevlerini de yerine getiremeyen blast karakterli hücreler bulunmaktadır. Bu durumda başlangıç aşamasındaki kronik lösemi hastalarında herhangi bir klinik semptom gözlenmez ve hastalığın gelişim aşaması akut lösemilere göre kısmen yavaştır [Tasian et al., 2015].

4.4.1. FAB Sınıflandırması

Fransa-Amerika-İngiltere (FAB) sınıflandırması 1976 yılında Fransız-Amerikan-İngiliz hematologlar tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırma, hücre büyüklüğü, çekirdek kromatini ve şekli, çekirdekçik, sitoplazma oranı, bazofilisi ve vakuol gözönüne alınarak yapılmaktadır. ALL L1, L2 ve L3 olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır. Akut miyeloid lösemi (AML) ise 2'si daha nadir olarak görülmek üzere (M0 ve M7) toplam 8 sınıfa ayrılmaktadır. Çocukluk dönemi ALL'lerinde görülme sıklıkları L1 %80-85, L2 %15, L3 %1-2 oranındadır [Bennett et al., 1976], [Walter et al., 2013].

Lösemik hücrelerin tanımlanması ve sınıflandırılması için uluslararası geçerliliği olan ve ortak bir sınıflandırma modeli geliştirilmiştir. French-American-British (FAB) kriterlerine göre çocukluk çağı Akut Lenfoblastik Lösemi hastalığı; L1, L2, L3 tipleri olarak sınıflandırılmıştır. Bu ayrımın yapılması aşamasında, hücrenin boyutu, nükleus/nukleolus özellikleri, nükleus/sitoplazma oranı, sitoplazmik bazofili ve vakuol varlığına göre değerlendirilip morfolojik değerlendirmeler yapılır. Akut lenfoblastik lösemiler içinde %85 oranı ile en sık görülen grup L1 morfolojisi iken, L2 yaklaşık %14 ve L3 grubu ise %1 sıklıkla görülmektedir. Morfolojilerine göre hastalık prognozu en iyi olan ALL grubu L1 olarak belirtilmektedir [Lilleyman et al., 1986], [Zhang et al., 2015].

FAB L1: Çocukluk çağında gelişen ALL hastalığının yaklaşık %85'ini bu tip oluşturmaktadır. Morfolojik olarak hücreler homojen ve küçük olarak izlenmektedir ve sitoplazmaları hafif bazofiliktir ve dardır. Bu gruptaki lösemik hücrelerin çekirdek sınırları düzenlidir ve çekirdekçik çok küçük/belirsizdir veya belirsizdir [Walter et al., 2013].

FAB L2: Çocukluk çağı ALL'lerin %14'ünü oluşturmaktadır. Bu gruptaki hücreler heterojen bir yapıya sahip olup, daha büyük morfolojiye sahiptir ayrıca sitoplazmaları daha geniştir. Histolojik olarak değişken derecelerde bazofilik boyanırlar. Çekirdek sınırları düzensizdir ve çekirdekçik daha belirgin olup bir veya daha fazla sayıda olabilir [Jaffe et al., 2001].

FAB L3: Hücreler homojen dağılımlı olup diğer gruptakilere göre daha büyüktür, bu gruptaki hücrelerin sitoplazmaları koyu bazofilik boyanırlar ve oldukça geniştirler. Sitoplazmalarında belirgin vaküolizasyon yapıları bulunmaktadır. Çekirdekleri yuvarlak yapıda olup sınırları düzenlidir. Çekirdekçik büyük ve belirgin sınırlara sahip olup çok sayıda vezikül içerirler. Bu hücreler sıklıkla mitoz aşamasında izlenebilir. Çocukluk çağı ALL'lerin %1'ini oluşturur. Bu grupta sınıflandırılmış neoplastik hücreler, Burkitt lenfomasının lösemik şekli olarak kabul edilmektedir [Hirzel et al., 2013].

4.4.2. WHO Sınıflandırması

World Health Organization'a (WHO) göre ALL pre-B-lenfoblastik lösemi ve pre-T-lenfoblastik lösemi olarak 2 sınıfa ayrılmaktadır. Yapılan sınıflandırmada, olgun B hücreli ALL (FAB sınıflandırmasında:L3) Burkitt lenfoma olarak belirlenmiş ve olgun B hücre neoplazmalar ile aynı grupta yer almıştır [Walter et al., 2013].

4.4.3. Lösemilerin Sitokimyasal Sınıflandırması

Lösemi tip ve alt gruplarını belirleme aşamasında morfolojik olarak sınıflandırılan FAB kriterlerini destekleme amaçlı olarak sitokimyasal metodlar kullanılmaktadır. Çeşitli hücresel komponentlerin boyanma özelliklerine göre myeloid ve lenfoid özellikteki hücre grupları kimyasal içeriklerine göre ayrılabilir. Bu amaçla Asit fosfataz, Miyeloperoksidaz, Sudan siyahı, , Periodik Asit Schiff, Nonspesifik esteraz, Terminal deoksinükleotidil transferaz boyaları kullanılmakta ve laboratuvar incelemelerine göre kan hücrelerinin ayrımı yapılabilmektedir [Srivastava et al., 1983], [Zhang et al., 2015].

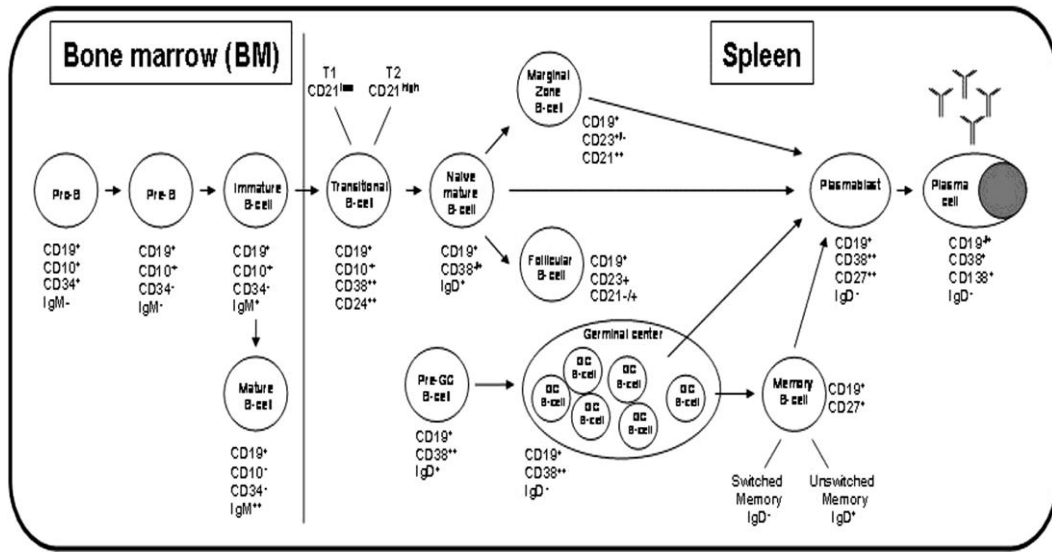
Myeloperoksidaz aktivitesi (MPO), non-spesifik esteraz (NSE) ve periodik asit schiff (PAS) reaksiyonlarını içeren sitokimyasal boyalar kullanılarak bazı sitoplazmik komponentlerin belirlenmesi yöntemine dayanan sınıflandırma metodudur. Myeloperoksidaz aktivitesi granülosit ve monosit tipindeki hematolojik hücrelerin azurofilik granüllerde bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı lenfositlerde olmadığı için myeloid ve lenfoid karakterdeki lösemilerin ayırımında kullanılır. Lenfoblast ve myeloblastlar serideki hücreler NSE içermektedir aynı zamanda monosit ve monositik öncü hücre gruplarında sodyum florid NSE aktivitesini inhibe etmektedir. Fakat lenfoblast ve myeloblast grubu hücrelerde inhibisyon olmamaktadır. Bu hücresel özelliklerden yararlanılarak, monositik lösemilerin Akut Lenfoblastik Lösemiden ayırımı histokimyasal olarak sağlanmaktadır [Lee et al., 2015].

Periodik Asit Schiff testi, hücrelerin sitoplazmik karbonhidratlarını, karbonhidrat bağlı proteinleri ve yağ vakuollerini tespit etmekte kullanılmaktadır. Myeloblastlar genellikle PAS boyası için negatif sonuç verirken, lenfoblastların sitoplazmalarından PAS boyası için pozitif sonuç alınmaktadır. Akut lenfoblastik lösemili olguların biyomateriyallerinde lösemik blastların çekirdekleri etrafında PAS pozitif alanlar görülmektedir. Bu özellik yine histokimyasal metodlar ile hücre tipi ayırımında kullanılmaktadır [Srivastava et al., 1983].

T hücreli lösemik lenfoblastlarda asit fosfataz (AP) aktivitesi paranükleer bölgede tespit edilmektedir. Aynı şekilde β -glukoronidaz da benzer şekilde reaksiyon vermektedir. Azurofilik granüller barındıran diğer atipik özellikteki lenfoblastlar MPO, NSE ve SBB ile boyandığında negatif reaksiyon göstermektedir. Lösemik lenfoblastların tüm tiplerinde sitoplazma yüksek oranda RNA içermektedir, bu durum en çok L3 grubunda bulunan lösemik klonlar için geçerlidir. Akut lenfoblastik lösemili vakaların %90'ından fazlasında lösemik lenfoblastlar terminal deoksinükleotidil transferaz "TdT" içermektedir. Bu histokimyasal boyalar ve hücrelerin verdiği reaksiyonlar hematopoetik hücrelerin sınıflandırılmasına katkı sağlamaktadır. Hücre çeşitlerinin belirlenmesi ve hücrelerin gösterdiği morfolojik farklılıkların tespiti klinik açıdan doğru teşhisin konulmasına katkı sağlamaktadır. Bu tür farklılıklar aynı zamanda tedavi rejimlerinin belirlenmesinde de sıkça başvuru alan yöntemleri oluşturmaktadır [Zhao et al., 2010], [Hirzel et al., 2013].

4.4.4. Lösemilerin İmmunolojik Sınıflandırması

Akut lenfoblastik lösemilerde hücre yüzeyi belirteçlerinin kullanılmaya başlandığı 70'li yıllarda ayırte edilen immünolojik gruplardan ilki T-ALL'dir. Bu immunofenotipe sahip çocukların lenfoblastlarında koyun eritrositleri ile rozet oluşturduğu ve buna neden olan yüzey reseptörün CD2 antijeni olduğu saptanmıştır. Lenfoid ve miyeloid hücrelerin yüzeylerinde antijenler tespit edilmiştir. "Cluster of Differentiation" (CD) olarak adlandırılan bu antijenler, lösemilerin sınıflandırılmasına yardımcı olmaktadır İnsan lösemi hücrelerindeki antijene karşı, antiserum üretimi sonucu daha önce non-T, non-B ALL olarak tanımlanan lösemi hücrelerinin büyük bir kısmında ortak olarak bulunan bu antijen "common ALL antijen" olarak tanımlanmıştır. Bu antijeni taşıyan lösemiler ise common-ALL olarak adlandırılmıştır [Jaffe et al., 2001]. B lenfosit hücresi gelişim aşamalarında bulundukları hücre yüzey belirteçleri Şekil 4.1'de şematik olarak gösterilmiştir [Engel et al., 2007].



Şekil 4.1: B lenfosit hücresi yüzey belirteçleri. CD (Cluster of Differentiation), farklılaşma kümeleri; Transitional (T1, T2) B cells, geçici (T1, T2) B lenfosit hücreleri.

İmmunofenotipleme ile ALL 2 gruba ayrılmaktadır. Bunlar B ve T hücreli ALL gruplarıdır:

B Hücre Kaynaklı ALL: B-ALL lenfosit hücrelerinin farklılaşmaya başladığı evreye (prematüre, erken, intermediate) göre alt sınıflara ayrılmaktadır.

Erken B öncü hücreli ALL (Pro-B-ALL): Yenidoğanlarda ve 1 yaş altı çocuklarda daha sıktır. FAB tipi L1/L2'dir. Tüm B immüfenotipik lösemi grubunun %5'lik kısmını oluşturup, CD10 antijeni (CALLA: Common ALL antijeni) negatiftir. İnfant ve yetişkinlerde sıklığı fazla olup, tanı anında yüksek lökosit sayısı ve santral sinir sistemi (SSS) tutulumu sıktır. Pro-B ALL de sitogenetik olarak MLL gen yeniden düzenlenmesi ve t(4;11) yapısal kromozom anomali sıklığı yüksektir. Yaşam beklentisi diğer alt gruplara göre daha azdır [Cobaleda and Sanchez, 2009].

Pre-Pre-B hücreli ALL (Common ALL): Çocuklarda ve erişkinlerde en sık görülen ALL alt tipidir. CD10 antijeni karakterize edilmektedir. FAB tipi L1/L2'dir [Hirzel et al., 2013].

Pre-B hücreli ALL: Blastik hücreler intrastoplazmik μ ağır zinciri taşırlar. Terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) pozitifdir ve çocukluk çağı ALL lerinin %15-20 sini oluşturur. Bu immüfenotipik grubun hipodiploidi, yüksek lökosit sayısı, t(1;19) kromozom anomalisi ile birlikteliği sık görülmektedir. Kemik iliği ve SSS nüks oranı fazlayken, sağ kalım süresi kısadır. FAB tipi L1/L2'dir [Walter et al., 2013].

B-ALL: Olgun B hücrelerinden oluşan ALL, çocuklarda %2-3 oranında görülmektedir. FAB tipi L3'tür. Burkitt lenfomasına özgü kromozom anomalisi t(8;14)(q24;q32) saptanmaktadır [Kang et al., 2016].

Fenotipik ve genotipik olarak iki çeşit olgun B hücreli lösemi vardır. Sık görülen türünde hücre yüzeyinde sitoplazmik IgM, CD19, CD20, CD22, CD79a ve sıklıkla da CD10 bulunur. CD34 ve TdT ise bulunmaz. Morfolojik olarak bu tip L3 özelliklerini gösterirken, genetik olarak Burkitt lenfoma için tipik olan 8. kromozom translokasyonları izlenir. Buna karşın daha nadir görülen ikinci tipinde ise, yüzeyel ağır ve hafif zincirler bulunmakla birlikte, CD20 yoğunluğu düşüktür. L1 ya da L2 morfolojisi ile uyumlu görünüm izlenmekte olup 8. kromozom translokasyonları bulunmaz. TdT ve CD34 pozitifliği izlenebilir. Çocuk ve erişkin ALL'lerinin %1-2 sini oluşturur. SSS tutulum insidansı daha yüksektir [Zhao et al., 2010].

T Hücre Kaynaklı ALL: T lenfositler, yüzeylerinde CD2, CD3, CD5, CD7 ve TdT'yi taşırlar. Bunların dışında CD1, CD4 ve CD8 de T hücre belirticidir. CALLA antijeni genellikle negatiftir. Genellikle PAS ile boyanmazlarken, asit fosfatazla boyanırlar. Hem çocukluk hem de erişkin dönem ALL olgularının %15-20'sini oluştururlar. Çoğunlukla erkeklerde ve yüksek lökosit sayısı ile birlikte görülür. Hastaların %50-60'ında mediastinal kitle görülür. SSS tutulumu ve ekstrapedüller

tutulum, diğer ALL tiplerinden daha fazla görülür. Sağ kalım oranı diğer alt gruplara göre düşüktür [Vlierberghe and Ferrando, 2012].

T-ALL hücrelerin farklılaşmaya başladığı evreye göre alt sınıflara ayrılmaktadır:

Pre-T-ALL: Sitoplazmik CD3, CD2, CD7 veya CD5 ve CD1 antijenlerinin varlığı ile karakterize olmaktadır [Aifantis et al., 2008].

T-ALL (intermediate): CD7, CD5, CD4, CD8, CD2, CD1a ve CD45RB antijenlerini eksprese etmektedir [Aifantis et al., 2008].

Olgun T-ALL: Olgun T hücre fenotipi CD3 membranının varlığı ile belirlenmektedir. CD7, CD5, CD2, CD6, CD4 veya CD8 antijenleri de pozitifdir [Aifantis et al., 2008].

5. LÖSEMİLERDE SIK GÖRÜLEN GENETİK BOZUKLUKLAR

Tümör oluşumundan sorumlu olan genler, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve diğer genlerdir.

Onkogenler: Hücre büyümesi ve farklılaşması ile ilgili normal genlerin (protoonkogen) aktifleşmesi ile onkogenler ortaya çıkmaktadır. Aktive olmuş protoonkogenler tümör oluşumunda önemli bir etkiye sahiptir. Mutasyonlar, gen amplifikasyonları ve kromozomal yeniden düzenlenmeler gibi proto-onkogenlerin aktifleşmesini sağlayan genetik mekanizmalardır [Chiaretti et al., 2014], [Whitehead et al., 2016].

Mutasyonlar: Bazların yer değiştirmeleri, delesyonlar, insersiyonlar proto-onkogenleri aktive edebilen mutasyonlardır. İnsan tümörlerinde, en çok ortaya çıkan onkogen mutasyonları bir aminoasitin yerine başka bir aminoasit geçmesiyle oluşan baz yer değiştirmeleridir (nokta mutasyonları). Nokta mutasyonları sıklıkla RAS genlerinde (K- RAS, H- RAS ve N- RAS) oluşmaktadır. %15-20 oranında insan tümörlerinin RAS mutasyonu sonucu oluştuğu bildirilmiştir [Couto et al., 2005].

Gen Amplifikasyonları: Onkogenlerin artan kopyaları görülmektedir. Genomik DNA'nın aşırı replikasyonu sırasında meydana gelen amplifikasyon sonucunda, küçük kromozomlar (double-minutes (DMs)) ya da normal kromozom içinde inversiyon yapmış homojen boyanan bölgeler (homogeneous staining regions (HSRs)) oluşmaktadır. DMs kromozomlar sentromer içermemektedir. Amplifikasyon sonucunda oluşan DMs ve HSRs'lerde hücre büyümesinde etkili olan yüzlerce DNA kopyası bulunmaktadır [Wiemels et al., 2012].

Epigenetik düzenlemeler: DNA metilasyonu, genomun düzenlenmesinde ve özellikle karsinogenezde önemli bir rol oynayan epigenetik modifikasyonların başlıca tipini oluşturmaktadır. Dinamik bir değişim paternine sahip olan genomik metilasyon genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin ifade düzeylerini doğrudan etkilemektedir. Farklı lösemi alt türlerinde yapılan çalışmalarda CpG adalarında gerçekleşen metilasyon profillerinin lösemi alt türlerine özgü motifler gösterdiğini ifade etmektedir. AML de yapılan çalışmalarda şimdiye kadar 16 farklı DNA metilasyon örüntüsü bildirilmiştir [Yan et al., 2017]. Ayrıca bu konuda artan çalışmalar doğrultusunda bu motiflerin çeşitlerinde ve yarattığı genomik ifade profillerinde farklılıkların ortaya koyulacağı ifade edilmektedir. Çeşitli kanser

türlerinde metilasyon dengesizlikleri bilinmektedir. Özellikle promotor bölgesine yakın CpG adalarında oluşan metilasyonlar neoplastik değişimleri tetikleyebilmekte ve epigenetik kalıtım ile diğer nesillere aktarılabilmektedir [Figuerola et al., 2010].

Kromozomal Yeniden Düzenlenmeler: 2 ayrı mekanizma ile hematolojik malignitelere sebep olmaktadır. Proto-onkogenlerin transkripsiyonel aktivasyonunda immunoglobulin ya da T-hücre reseptörüne transloke olan proto-onkogenin ekspresyonunu bozularak hücrelerin neoplastik transformasyonuna sebep olmaktadır. Füzyon gen oluşumundaysa kromozomal translokasyon sonucu 2 geni kodlayan bölgelerin füzyonu ile anormal kimerik protein ortaya çıkmaktadır [Tasian et al., 2015].

Tümör Baskılayıcı Genler: Hücre farklılaşması, proliferasyonu gibi hücre fonksiyonlarında düzenleyici rol oynayan tümör baskılayıcı genlerin delesyon, kromozom monozomisi, kromozomal translokasyon, nokta mutasyonu gibi olaylarla inaktive olması sonucunda kanser ortaya çıkmaktadır. Onkogenlerin etkileri dominant biçimde oluşurken, tümör baskılayıcı genlerde bu etki resesif olarak görülmektedir. Delesyon ya da monozomi görülmeyen durumlarda bu genlerin her iki allelinde bir mutasyon meydana gelmektedir. Bunun bilinen en iyi örneği p53 ve Retinoblastoma (RB) genleridir. DNA tamir genlerinde ve apoptoz (hücre ölümü) genlerinde oluşan mutasyonlar sonucunda malign transformasyonlar ortaya çıkabilmektedir [Wiemels et al., 2012], [Terwilliger et al., 2017].

Kromozomal Anomaliler: İlk kromozom anomalisi 1960'lı yıllarda Nowell ve Hungerford tarafından kronik myeloid lösemi olgularında tanımlanmış ve bu kromozoma Philadelphia (Ph) kromozomu adı verilmiştir. İlerleyen yıllarda sitogenetikte bantlama teknikleri, FISH, PCR, RT-PCR gibi yöntemlerin gelişmesiyle birlikte sitogenetik ve moleküler genetikte anomalilerin tanımlanması sağlanmıştır. Bu genetik ayrımlar hastalık gruplarının ayrılmasına ve farklı tedavilerin uygulanmasına olanak vermiştir. Çocukluk çağında görülen akut lenfoblastik lösemi hastalarının yaklaşık olarak %80'inde kromozomal yeniden düzenlenmeler ortaya çıkmaktadır. Genetik olarak (yapısal ve sayısal anomaliler) bu anomalileri saptamak, ALL'de prognozunu belirlemek, doğru tedavi rejimlerinin uygulanması açısından büyük önem taşımaktadır [Hanson et al., 1993], [Whitehead et al., 2016].

5.1. Sık Görülen Yapısal Anomaliler

5.1.1. t(12;21)(p12-13;q22)

“Translocation ETS Leukemia” olarak tanımlanan TEL geni 12p13'te lokalizedir. E-26 transforme spesifik (ETS) transkripsiyon faktörü ailesinden bir gen olduğu için ETV6 (ETS Varyant Gen 6) olarak da tanımlanmaktadır [Sharrocks et al., 1997], [Kawagoe and Grosveld, 2005]. Transkripsiyon telomerden sentromer bölgesine doğru olmaktadır. Üç tane 2400 kb'lık, 4300 kb'lık ve 6200 kb'lık mRNA'sı vardır ve 1356 kb'lık cDNA kodlamaktadır. TEL geni 240 kb'lık bölgeyi kapsamaktadır. Bu gende 8 adet ekson bulunmaktadır. İki adet alternatif başlama kodonu ile iki farklı protein oluşmaktadır. Başlama kodonlarından bir tanesi ile 57 kDa'luk protein, diğeri ile de 53 kDa'luk protein oluşmaktadır. TEL geni transkripsiyonel düzenleyici olarak görev yapmakta, kemik iliği hematopoezinde önemli bir rol oynamaktadır [Hock et al., 2004].

Akut Myeloid Lösemi 1 (AML1) geni, 21q22.3'te lokalizedir. İlk olarak 1991 yılında t(8;21)'de 21.kromozomda saptanmıştır. Bu gen RUNX1 olarak da tanımlanmakta olup 260 kb'lık bölgeyi kaplamakta ve 12 adet ekson içermektedir. mRNA'sı 8 kb olan AML1 geni 20 kD ile 52 kD arasında değişen protein üretmektedir. Hematopoezde, hematopoietik hücrelerin farklılaşma evrelerinde rol oynamaktadır [Miyoshi et al., 1991],

t(12;21)(p13;q22) sonucunda TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) füzyon geni oluşmaktadır. Translokasyon sonucunda TEL'in 5. Ekzonuyla AML1'in 2. Ya da 3. Ekzonu birleşmektedir. Bu füzyon gen 1995 yılında Romana ve Gloub tarafından tanımlanmıştır. Bu translokasyonun klasik sitogenetik yöntemlerle çok zor saptanmasından dolayı, nadir olarak ortaya çıkan genetik bir anomali olduğu düşünülmüştür. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile bu translokasyonun kolaylıkla saptanması mümkün olmuş ve çocukluk dönemi ALL'lerinde en sık ortaya çıkan yapısal kromozomal anomali olduğu görülmüştür. Genellikle 1 ile 10 yaş arasında olan, düşük lökosit sayısına sahip, pre-B ALL fenotipli ve nonhiperdiploidi (>50) sayısal kromozom anomalisi görülen hastalarda %25-30 oranında ortaya çıkmaktadır. Bu genlerin fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber, TEL/AML1 geninin ekspresyonu

diğer genlerin transkripsiyonel aktivitesini etkileyebilmektedir. TEL-AML1 füzyon geni TEL proteinin fonksiyon kaybı veya AML1'in hedef genlerinin kontrolünün bozulmasıyla ALL oluşumuna yol açmaktadır. t(12;21)(p13;q22) translokasyon varlığı iyi prognozu göstermektedir. Çocukluk dönemi ALL hastalarında prognozun tespitinde bu translokasyonun sıklığının belirlenmesinin önemli bir yeri vardır [Romana et al., 1995], [Golub et al., 1995], [Loh et al., 2006].

Hiperdiploidi, t(9;22), t(1;19)(q23;p13) ya da 11q23 anomalileri, t(12;21) pozitif olan olgularda çok nadir olarak rastlanmaktadır. İki yaşından büyük olan ve bu translokasyona sahip çocuklarda remisyon, diğer sitogenetik bulgulara sahip çocukluk dönemi ALL'li hastalara göre daha uzun süreli olmaktadır [Loh et al., 2006].

5.1.2. t(9;22)(q34;q11)

“Breakpoint Cluster Region” olarak tanımlanan BCR geni 22q11.2'de lokalizedir. Yüz otuz kb'lık bir bölgeyi kaplayan BCR geni 23 ekson içermektedir. İki adet 4.5 kb ve 7 kb'lık mRNA transkribe olmaktadır. Translasyon ürünü olarak genellikle 160 kDa'lık (1271 aminoasitlik), 130 kDa'lık ve 190 kDa'lık proteinler oluşmaktadır. Bölünme dışında olan hücrelerde sitoplazmada lokalize olan bu proteinler, mitoz evresinde iken kromozom çevresinde lokalize olmaktadır. Diğer dokularda da eksprese olmakla beraber, en çok beyin ve hemotopoitik dokularda eksprese olmaktadır [Groffen et al., 1984], [Kang et al., 2016].

“Breakpoint Cluster Region” proteinin hücre siklusunun düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Bu protein serin- treoninkinaz aktivitesine sahiptir. Bu genin ilk ekzonu bir serin- treoninkinaz aktivitesi kodlamaktadır. Üç adet farklı kırık noktası vardır. Philadelphia kromozomu (+) (bcr/abl füzyonu) saptanan ALL olgularının büyük kısmında, kırık noktası ekzon e1 ile e2 arasında intron bölgesinde m-bcr (minör breakpoint cluster region) olarak adlandırılan bölgede oluşur. Bu füzyon sonucunda 190 kd ağırlığında protein oluşmaktadır ve p190 BCR-ABL olarak tanımlanır. Kronik myeloid lösemili hastalarda çok nadir görülmektedir. Kronik myeloid lösemi olgularında en sık görülen kırılma noktası M-bcr (major breakpoint cluster region) bölgesinde oluşan ekzon b1 ile b5 arasında kadar p210 BCR-ABL olarak ifade edilen 210 kD ağırlığındaki füzyon proteinidir. Bu kimerik füzyon

proteinin apoptozu inhibe ederek proliferasyonu arttırdığı bilinmektedir. Lösemilerde nadir olarak görülen protein ise 230 kD ağırlığında olup, p230 BCR-ABL olarak adlandırılmaktadır.

ABL1 geni 9q34.1'de lokalize olmaktadır. Abelson murine lösemi virüsünün transformasyon geni olan v-abl geninin insandaki homologudur. ABL1 protoonkogeni, hücre farklılaşması, hücre bölünmesi ve hücre adezyonu gibi süreçlerde rol oynayan sitoplazmik ve nükleer protein tirozinkinaz kodlamaktadır. C-ABL proteini SH3 bölgesi tarafından negatif olarak regüle edilmekte ve SH3 bölgesinin delesyonu ABL1 geninin onkogene dönüşmesine yol açmaktadır. Bu gen 230 kb'lık bir alan kaplamakta ve 12 ekzon içermektedir. Eksonlar 5' uçtan sentromere doğru uzanmakta olup 1a ve 1b olarak adlandırılan 5' alternatif ekzon bulunmaktadır. İki adet 6 kb ile 7 kb'lık mRNA transkribe olmaktadır ve 145 kd'luk 2 adet nükleer ve sitoplazmik c-ABL proteini oluşmaktadır. Bu translokasyon 9.kromozomun q34.1 bant bölgesi ile 22. kromozomun q11.2 bant bölgelerinin translokasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Oluşan füzyon gene 1973 yılında Rowley tarafından Philadelphia (Ph) kromozomu adı verilmiştir. Kronik myeloid lösemi olgularında %90, yetişkin ALL olgularında %20, çocukluk dönemi ALL olgularında ise yaklaşık olarak %5 oranında görülmektedir [Heisterkamp et al., 1983], [Greuber et al., 2013], [Hirzel et al., 2013].

Çocukluk dönemi ALL'sinde Ph (+) saptanan olgularda klinik tablo; L1 ya da L2 FAB sınıflandırması, B- hücre fenotipi daha çok olmakla beraber T- hücre fenotipi, yüksek lökosit sayısı (50-150 X 10⁹/l), genellikle CD10+, daha az CD19+ CD10- olarak tanımlanmaktadır. Bu translokasyonda, BCR genindeki kırık bölgelerine bağlı olarak farklı yapıda füzyon genleri oluşmaktadır. Kronik miyeloblastik lösemilerde sık olarak p210 BCR-ABL olarak ifade edilen 210 kD ağırlığındaki füzyon proteini oluşmaktadır [Reckel et al., 2017].

Kronik myeloid lösemi hastalarında çok nadir, yetişkinlerde daha sık olmak üzere çocukluk dönemi ALL olgularında, t(9;22) sonucu oluşan füzyon proteini p190 BCR-ABL olarak tanımlanmaktadır. Çocukluk dönemi ALL'sinde Ph (+) saptanan olguların %90'ında p190 BCR-ABL füzyon proteini görülmektedir. Philadelphia kromozomu ile beraber hastanın diğer özelliklerine (lökosit sayısı, yaşı) bağlı olarak da tedaviye verilen cevapta değişiklik görülsede çocukluk dönemi ALL olgularında bu kromozom kötü prognoz göstermektedir [Tasian et al., 2015].

5.1.3. t(4;11)(q21;q23)

Mixed lineage leukemia olarak tanımlanan MLL geni 11q23'te lokalizedir. Bu gen 21 ekzon içermektedir ve mRNA'sı 13-15 kb'dır. Erken embriyonik gelişimde ve hematopoezde transkripsiyonal düzenleyici faktör olarak görev yapan 431 kDa'luk protein oluşturmaktadır. Tanı yöntemlerine bağlı olarak 1 yaş altı ALL vakalarında MLL gen bozukluğunun görülme sıklığı %60-80 arasında değişmektedir. Bir yaş üzerinde olan ALL'li olgularda ise MLL gen yeniden düzenlenmelerinin görülme sıklığı % 4.5 ile % 7.5 arasında değişme göstermektedir [Linden et al., 2015]. En sık görülen translokasyonlardan biri olan t(4;11) ise çocukluk ve erişkin dönem ALL olgularında %3-4 oranında görülmektedir. Bu gen anomalisine sahip çocukluk dönemi ALL olgularında genel olarak organomegali, yüksek lökosit oranı, tanı sırasında santral sinir sistemi (CNS) gelişimi görülmektedir. Akut lösemili diğer olgularla karşılaştırıldığında özellikle yenidoğanlarda görülen 11q23 anomalileri kötü prognoz göstermektedir. Mixed lineage leukemia geninin (MLL) dahil olduğu çok sayıda translokasyon bulunmaktadır. Bunların arasında ALL'li olgular arasında en sık görüleni t(4;11)(q21- q23) ve t(11;19)(q23;p13.3)'dur [Aplan, 2006], [Chiaretti et al., 2014].

t(4;11)(q21;q23)'ın yeni doğan ALL hastalarında (1 yaş altı) sıklığı %40-50 oranındadır. Bu oran daha büyük yaştaki çocuklarda %3-4'dür. Bu translokasyon sonucunda MLL-AF4 füzyon geni oluşur. ALL1 Fused Gene From Chromosome 4 olarak tanımlanan AF4 geni 4q21'de lokalizedir. Onbirinci kromozomun q23'te lokalize MLL geni ile translokasyon sonucu ortaya çıkan hibrid gen 5' MLL- 3' AF4 yönünde oluşmakta 12kd'lik mRNA transkribe olmaktadır. Bu translokasyonun yol açtığı lökomojenik etki bilinmemekle beraber; 11q23'te değişkenlik gösteren kırılma noktaları ile MLL bölgesinin translokasyonu sonucu 11q23'ten telomere kadar olan parça kaybı sonucu 5' MLL geni tarafından kodlanan der(11) füzyonunun onkogenik bir füzyon proteini olduğunu düşündürmektedir. Lösemik hücreler olgunlaşmamış erken (öncü) B kökenli ya da pro-B tipindedir, genellikle CD19 pozitifliği ve CD10 negatifliği vardır. Kliniğinde genel olarak organomegali, trombositopeni, aşırı yüksek oranda blastlara sahip çok miktarda lökosit bulunmaktadır [Liedtke and Cleary, 2009].

5.1.4. t(1;19)(q23;p13)

Çocukluk dönemindeki ALL’li olgularda t(1;19)(q23;p13) %5-6, çocukluk dönemi pre-B ALL’li hastalarda ise %25 oranında görülmektedir. Hücrelerin morfolojisi genellikle ALL L1’dir. Bu translokasyon 1q23’te bulunan basic helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörü E2A ile 19p13’te bulunan PBX1 geninin füzyonu ile oluşur. Kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir [Jeha et al., 2009].

5.1.5. Kromozom 8’de Görülen Translokasyonlar

Kromozom 8’de bulunan 8q24 bölgesi farklı kromozomlardaki genomik bölgeler ile translokasyon yapabilir. Lösemi hastalarında bu kromozomla ilgili en sık gözlenen translokasyonlar (8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q11)’ dir.

B hücre kaynaklı ALL’lerde ve Burkitt lenfomada daha sık olmak üzere olguların yaklaşık olarak %2’sinde görülmektedir. Bu translokasyon, B hücre kaynaklı ALL’lerde ortalama yaş oranı 11 olan erkek çocuklarında ve ALL L3 morfolojisine sahip hastalarda daha sık ortaya çıkmaktadır. t(8;14)(q24;q32), 8q24’te bulunan c-MYC onkogeninin 14q32’te bulunan immunoglobulin ağır zincir geni ile füzyonu sonucu; t(2;8)(p12;q24), 2p12’te bulunan immunoglobulin hafif zincir geni ile 8q24’te bulunan c-MYC onkogeninin füzyonu, t(8;22)(q24;q11) ise 8q24’te bulunan c-MYC onkogeninin 22q11’te bulunan immunoglobulin λ hafif zincir geni ile füzyonu sonucu oluşmaktadır. Bu üç translokasyon c-MYC onkogeninin aşırı ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır [Grisanzio and Freedman, 2010], [Huppi et al., 2012].

5.2. Sayısal Anomaliler

Akut lenfoblastik lösemi hastalarının yaklaşık olarak yarısında sayısal kromozom anomalisi gözlenmektedir [Safavi et al., 2015].

Hiperdiploidi: Lösemik hücrelerin kromozom sayısının 47-57 arasında olması hiperdiploidi olarak tanımlanmaktadır. Bu sayısal anomali çocukluk dönemi ALL’sinde %20 oranında görülmekte olup 3-5 yaş arasında sıklığında artış olmaktadır. Düşük oranda beyaz hücre sayısı, common ALL ya da öncü pre-B

immunofenotipi ile karakterize edilmektedir. FAB tipi L1 ya da L2'dir [Paulsson et al., 2010].

Hipodiploidi: ALL'de nadir olarak görülen hipodiploidide kromozom sayısı 35-45 arasında değişmektedir. Erişkinlerde daha sık ortaya çıkar [Salazar et al., 2015].

6. MN1 GENİ ve LÖSEMİ

MN1 (Meningioma1) geni ilk olarak meninjiomalı bir hastada sporadik dengeli t(4;22) translokasyonunun kırık noktasında tespit edilmiştir [Buijs et al., 1995]. MN1, 53.22 kb büyüklüğüne sahip 2 ekzondan oluşan bir gendir ve 22q12.1 kromozom bölgesinde bulunur. MN1 mRNA uzunluğu 7555 bp olup proteini ise 1319 aa uzunluğundadır, 136 kDa ağırlığındadır [genecard.org]. MN1 geninin lösemi ile ilişkisi ise akut myeloid lösemide (AML) ve myelodisplastik sendromda (MDS) MN1-TEL füzyon geninin saptanmasıyla bulunmuştur [Buijs et al., 1995]. MN1 geni transkripsiyon ko-aktivatörü olarak görev yapıp, transaktive edici bölgeler içermektedir. Buijs ve arkadaşları, MSV virusü ile geçici transkripsiyon deneyleri (transient transcription assay) ile MN1 genine ait uzun terminal tekrarlarının (MSV-LTR) transkripsiyonu aktive ettiğini göstererek, MN1 geninin transkripsiyon ko-aktivatörü olduğunu bildirmişlerdir [Buijs et al., 2000]. MN1'in, RAR-RXR nükleer reseptör dimeri aracılığı ile transkripsiyonun aktivasyonunda ve osteoblastlarda vitamin D reseptörünün aktivasyonunda rol aldığı gösterilmiştir [Van Wely et al., 2003]. MN1 "null" farelerin kraniyel membranöz kemiklerinin gelişiminde defektler olduğu bildirilmiştir [Meester-Smoor et al., 2005]. MN1 geninin aşırı ekspresyonunun in vitro koşullarda miyeloid hücrelerin çoğalmasına, in vivo fare modelinde ise miyeloproliferatif hastalığın (MPD) gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca fare modellerinde yapılan deneyler ile MN1 ve CbfbMYH11' in birlikte anlatımının AML (Akut Myeloid Lösemi) gelişimine sebep olduğu ve miyeloid hücre farklılaşmasını bloke ettiği de bildirilmiştir [Carella et al., 2007], [Kandilci et al., 2009].

t(12;22) sonucunda oluşan MN1-TEL füzyon geninin akut miyeloid lösemi (AML), miyelodisplastik sendrom (MDS) ve kronik miyeloid lösemi (KML) gibi hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir [Couto et al., 2005]. MN1-TEL füzyon geni MN1 geninin tamamının, ETS transkripsiyon faktörü ailesinden olan TEL geni ile birleşmesi sonucu oluşmakta olup, MN1 geninin transaktivasyon domaini ve TEL geninin DNA bağlanma bölgesini içerir [Buijs et al., 2000], [Belson et al., 2007]. Fare hematopoetik hücrelerinde MN1-TEL hematopoetik öncü hücrelerin farklılaşmasını engelleyerek, kısmen de kendini yenileme kapasitesini arttırarak lösemi gelişiminde etkili olmaktadır [Kawagoe et al., 2005], [Carella et al., 2007].

MN1-TEL füzyon geninin NIH3T3 fibroblast hücrelerini transforme ettiği de gösterilmiştir [Buijs et al., 2000].

AML patogenezinde MN1'in rolüne dair her geçen gün artan literatür verilerine rağmen, MN1'in akut lenfoblastik lösemi (ALL) oluşumunda da bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında yürüttüğümüz araştırmalarımızın uzun vadedeki amacı, MN1'in gerek normal gerekse lösemik lenfoid hücre gelişimindeki rolünü belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda, tez kapsamında farklı prognoza sahip ALL alt gruplarında MN1'in ekspresyon seviyesinde (mRNA düzeyinde) değişiklik olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, farklı kromozomal translokasyonları (TEL-AML1, BCR-ABLp190 ve MLL-AF4) taşıyan ve bu translokasyonlardan yoksun olan toplam 73 pediatrik B-ALL ve 9 sağlıklı bireye ait kemik iliği örneklerinde MN1 geninin ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir. MN1'in, prognoz açısından farklılık gösteren bu ALL alt gruplarında anormal olarak eksprese edilip edilmediği hem gruplar arasında, hem de her bir grubun normal kemik iliği örneğiyle karşılaştırılması yapılarak belirlenmiştir.

7. MATERİYAL

Bu tez çalışması, BAP 2012-A-04 no'lu ve "Multiple miyeloma ve akut lenfoblastik lösemi hastalarında DEK ve Meningioma1 (MN1) genlerinin prognostik değerlerinin belirlenmesi" başlıklı GTÜ BAP projesi ile desteklenmiştir.

7.1. Biyolojik Materyaller

Bu tez çalışması, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji/ Onkoloji Bilim Dalı birimlerinde B-ALL tanısı almış çocukluk çağı (0-18 yaş) olgularının (n=73) kemik iliği veya kan örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hasta materyali, 2000-2012 yılları arasında İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik Anabilim Dalı bölümüne rutin tanı hizmeti almak için gelen çocuk hastaların sonuçları raporlandıktan sonra arta kalan örneklerden elde edilmiştir. Çalışma öncesi İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan onay alınmış (15.02.2012 /315) ve örnekleri alınan tüm hastalara ve ailelerine çalışmanın kapsamını detayları ile anlatan gönüllü onay formu imzalatılmıştır. Akut lösemi hastalığının prognostik belirteçlerinden birisi de hastaların kemik iliği blast yüzdelerinin yüksek olmasıdır. Çalışmamızda hastaların İstanbul Üniversitesi Patoloji Anabilim dalı tarafından belirlenen immunofenotip sonuçları incelenerek lösemik blast oranı %70 ve üzerinde olan hastalar çalışmamıza dahil edilmiştir. Hastalardan kemik iliği blast yüzdesi düşük olanlar için hematologlar tarafından klinik ve laboratuvar parametreleri immünfenotip bulgularına da bakılarak hastaya B-ALL teşhisi konulmuş olması sebebiyle bu hastalar da çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmamızda biyolojik materyal olarak, gönüllü olur formu imzalatılmış sağlıklı bireylere (n=9) ait kemik iliğinden ayırıştırılan beyaz kan hücreleri ve tanı almış B-ALL hasta örnekleri (n=73) kullanılmıştır. Çalışma amacımıza uygun olarak hasta örnekleri translokasyon taşıyan (n=43) ve translokasyon taşımayan (n=30) olmak üzere iki ana deney grubuna ayrılmıştır. Translokasyon taşıyan olgular da kendi içerisinde; t(4;11)(MLL;AF4) (n=7), t(9;22)(BCR;ABL) (n=9) ve t(12;21)(TEL;AML) (n=27) olmak üzere üç farklı alt gruba ayrılmıştır.

7.2. Kullanılan Cihazlar

- LC480 RT-PZR cihazı (Light Cycler480 RT-PCR, Roche)
- PZR cihazı (Techne)
- Flow kabin (Thermo Scientific)
- Spektrofotometre (Nanodrop)
- Vorteks (Kermanlar)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Otomatik pipetler (Glison, Eppendorf)
- Çeker ocak (Kermanlar)
- Otoklav (Kermanlar)
- Distile su cihazı (Millipore)
- Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) (Arçelik, Bosch)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)
- Masa üstü mini santrifüj (Hettich, Eppendorf)
- CCD kamera- bilgisayar donanımı (BIO-RAD)
- Güç kaynağı (Stratagene)

7.3. Kullanılan Kimyasallar

- Trizol (İnvitrogen, İsviçre)
- B-Merkaptoethanol (Sigma, Almanya)
- Etil alkol (Merck, Almanya)
- Etidyum Bromür (Sigma, Almanya)
- Bromfenol mavisi (Sigma, Almanya)
- Gliserol (Sigma, Almanya)
- Tris baz (Sigma, Almanya)
- EDTA (Sigma, Almanya)
- Glasiyal asetik asit (Merck, Almanya)
- Agaroz (İnvitrogen, İsviçre)
- Hidroklorik asit (Sigma, Almanya)
- Hidrojen peroksit (Sigma, Almanya)

7.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Eritrosit parçalama çözeltisi; 4.15g NH_4CL ve 0.5g KHCO_3 kimyasalları 500 ml distile suda çözüldü. Sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirildi ve oda ısısında saklandı.

Etidyum bromür; steril ddH₂O ile hazırlanarak 10mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı.

Agaroz jel yükleme tamponu (50X); 10 ml steril ddH₂O içinde %0,25 Bromfenol mavisi, %30 gliserol olacak şekilde hazırlandı.

Tris-asetat EDTA-TAE (500 ml, 50X); 121 gr Tris baz, 28,5 ml glasiyal asetik asit, 50 ml EDTA 0,5M ddH₂O ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

Tris baz-Borik asit-EDTA-TBE (1000 ml, 5X); 60,57 g Tris baz, 30,90 g Borik asit ve 40 ml EDTA (0.5M) distile su ile 1 lt'ye tamamlandı ve otoklav ile steril edildi.

Alkol ile hazırlanan çözeltiler; oda ısısındaki %70 ve %100'lük alkol serisi hazırlandı. %70'lik alkol için; 70 ml etil alkol ve 30 ml distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. %100'lük alkol için ise 100 ml etil alkol ile hazırlandı.

8. YÖNTEMLER

8.1. Lökosit İzolasyonu

Çalışmamıza dahil ettiğimiz yukarıda bahsedilen kriterlerimize uygun B hücreli akut lenfoblastik lösemi tanısı almış hastalardan ya da kontrol bireylerinden alınan 10 ml EDTA lı kan/veya kemik iliği ile çalışılmıştır. Tanı amacıyla alınan bu materyallerden beyaz kan hücrelerinin izolasyonu ve RNA izolasyonu rutin analiz dahilinde DETAE’de gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada örnekler eritrosit parçalama tamponu (lysis buffer) ve ficoll polimer solüsyonu kullanılarak (ficoll yöntemi) ayrı yöntemler kullanılarak hücre izolasyonları yapılmıştır. Kontrol olarak elde ettiğimiz materyallerden beyaz kan hücresi ve RNA izolasyonu eritrosit parçalama tamponu (lysis buffer) ve trizol kullanılarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

EDTA’lı (mor kapaklı) kan toplama tüpü ile laboratuvara ulaştırılan 10 ml kemik iliği ilk olarak 50 ml steril tüpe dökülmüştür. Gelen materyal miktarının iki katı olacak şekilde (20 ml) eritrosit parçalama tamponu (lysis buffer) steril tüpe eklenip en az 10 defa alt-üst edilerek karışması sağlanmıştır. Bu karışımın inkübasyonu için +4 °C de 15 dakika bekletilmiştir. Örnekler daha sonra +4 °C ve 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası eppendorf tüpün dibine çöken lökositleri dağıtmamak için yavaş bir şekilde tüm kan atık kutusuna dökülmüştür. Tüpün dibinde bulunan lökositler vortekslenmiştir. Daha sonra gelen materyal miktarı kadar eritrosit parçalama tamponu tekrar tüpe eklenip ikinci defa +4 °C ve 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Lysis buffer atık kutusuna yavaşça dökülüp tüpün dibinde kalan küçük miktardaki bufferın uzaklaştırılması için pipet kullanılmıştır. 1 ml PBS (phosphate buffered saline) alınıp tüpün dibinde bulunan lökositlerin üzerine eklenip pipetaj yapılmıştır. Bu aşamadan sonra hücre sayımına geçilmiştir. Hücre sayımı için thoma lamı kullanılmıştır. 1 ml PBS ile sulandırdığımız lökosit çözeltisinden 10 µl alınıp sayım yapılmıştır. Trizol reaktifi ile yapılan hücre izolasyonunda çözeltimizin 1 mililitresinde 1-10 milyon hücre olması sağlanmıştır. Hücre sayımı için kullandığımız PBS’i tekrar hücrelerden ayırmak için karışım 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pipet ile üst fazda bulunan PBS solüsyonu toplanmıştır. Son olarak 1 ml Trizol reaktifi alınıp tüpe eklenmiştir. Son olarak lökositleri fiziksel olarak parçalamak için enjektör ile çözelti 10 defa şiddetli olarak alınıp verilmiştir.

Daha sonrasında örneklerimiz 1,5 ml lik eppendorf tüplere alınıp -80 °C de saklanmıştır.

8.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Trizol reaktifi kullanılarak yapılmıştır. Trizol hücrelerden ve dokulardan total RNA izolasyonu için kullanıma hazır bir kimsayaldır. Reaktif, fenol ve guanidinizotiosiyanattan meydana gelen tek fazlı bir solüsyondur. Trizol, materyalin homojenizasyonu veya lizisi sırasında hücreleri parçalayıp hücre bileşenlerini çözerken RNA bütünlüğünü sağlar. Kloroform eklenip ardından santrifüjlenince solüsyon üstte kalan sıvı faz (aköz) ve organik fazlara ayrılır.

Lökosit izolasyonu sonrası -80 °C den çıkartılan 1ml Trizol içerisinde bulunan hücre tekrarlı pipetleme ve enjektör ile tekrarlı olarak çek-bırak yapılarak hücreler fiziksel olarak parçalanmıştır. Nükleoparin komplekslerinin ayrışması için örnekler 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Örnekler 37 °C de 10 dakika ve 1400 rpm de Thermo mixer e yerleştirilmiştir. Daha sonra 1 ml Trizol için örnek tüplerine 0,2 ml kloroform eklenmiştir. Örnek tüpleri birbiri ardına 15 dakika en yüksek seviyede vortekslenip; 10 dakika 8 °C de 10600 rpm de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj ardından karışım, tüpün alt kısmında pembe renkte fenol-kloroform fazına, ortada bir interfaza ve üstte renksiz aköz bir faza ayrıldığı gözlemlenmiştir. Hedefimiz olan total RNA yalnızca aköz fazda bulunmaktadır. Aköz faz homojenizasyon için kullanılan karışımın yaklaşık %60 lık hacmini oluşturmaktadır.

Aköz faz (sıvı faz) yeni steril bir tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpte kloroform ile yıkama tekrarlanmıştır. Çözelti sütümsü bir görünüm alana kadar vortekslenmiştir. 10 dakika 8 °C de 10600 rpm de santrifüj yapılmıştır ve tekrar aköz faz yeni bir tüpe alınmıştır. RNA ları çöktürmek için 0,5 ml 4 °C de %100 etanol eklenmiştir. 2 dakikalık vorteks sonrası örnekler -20 °C de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler 10 dakika 10600 rpm de santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra tüpün dibinde RNA nın jelimsi bir pellet oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Süpernatant tüpten uzaklaştırılmıştır. RNA pelletlerinin üzerine 1 ml %75 etanol eklenip, kısa vorteks yapılmıştır. Örnekler 5 dakika 8 °C de ve 8400 rpm de santrifüj edilmiştir. Pipet yardımı ile süpernatant örnek tüpünün dibinde gözlemlenen

RNA pelletine dokunmadan uzaklaştırılmıştır.

Prosedürün sonunda RNA thermo mixer kullanılarak 37 °C de 2 dakika kurutulmuştur. Ardından 24 µl RNase free su kullanılarak RNA pelletleri çözülmüştür. Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak örneklerin RNA konsantrasyonlarına ve 260/280, 260/230 absorbans değerlerine bakılmıştır.

8.3. Agaroz Jel Elektroforezi

%1'lik konsantrasyonda agaroz jel hazırlanması için 1gr agaroz tartılarak 100 ml 1X TAE solüsyonu içinde bir beherde çözülmüştür. Karışım mikrodalga fırında homojenize olana kadar kaynatılmıştır. Takiben 55°C'ye kadar soğutularak içerisine 10mg/ml stok olarak hazırlanmış etidyum bromür solüsyonundan 1 µl çeker ocak altında eklenmiştir. Sıvı haldeki agaroz elektroforez tepsisine dökülmüştür. Taraklar yerleştirilip jelin donması için beklenmiştir. Tepsi 1X TAE solüsyonu içeren yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Toplam 24 µl volümde gerçekleştirilen RNA izolasyonunun kontrolü amacı ile 2 µl örnek alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. 90 miliamper akımda yaklaşık 20 dakika yürütülüp UV ışık altında CCD kamera ile görüntüler bilgisayara aktarılmıştır.

8.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor first strand cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılmıştır. Senteze başlamadan farklı konsantrasyonlarda RNA bulunan örneklerin, RNA konsantrasyonları 1 µg/µl olacak şekilde dilüsyonları hazırlanmıştır. cDNA sentezinde her bir reaksiyon için PCR tüpüne 2 µl Random hegzamer ve ilgili örnekten 1µg total RNA eklenmiş ve final volüm 11 µl olacak şekilde dH₂O ile tamamlanmıştır. Bu öncül karışım 65° C'de 10 dakika inkübasyon sonrası hemen buza alınmıştır. Daha sonra her örnek için 4 µl ters transkriptaz tamponu, 0,5 µl RNaz inhibitörü, 2 µl dNTP ve son olarak 0,5 µl ters transkriptaz enzimi eklenerek hazırlanan karışım PCR tüplerine eklenerek cDNA sentez döngüsü başlatılmıştır. Döngü sırası ile 10 dakika 25 °C, 30 dakika 55 °C, 5 dakika 85°C olacak şekilde programlanmıştır. Sentezlenen cDNA' lar daha sonra kantitatif RT-

PCR deneylerinde kullanılmak üzere -20°C 'de saklanmıştır.

8.5. RT-qPCR Yöntemi

Örnekler 2 tekrarlı (duplicate) olarak çalışıldı ve her bir tekrar için 10 μl 2X Taqman Universal Master Mix, 6 μl nükleaz içermeyen su, 1 μl primer/probe karışımı (MN1 Hs00159202_m1, HPRT 4326321E; Applied Biosystems) ve 2 μl cDNA örneği kullanıldı.

Elde edilen cDNA'lar; RT-qPCR cihazında, 50°C 'de 2 dk, 95°C 'de 10 dk'lık inkübasyonun ardından, toplam 40 döngü olacak şekilde denatürasyon için 95°C 'de 15 sn, primer bağlanması ve uzaması için 60°C 'de 1 dk'lık inkübasyon sürelerini içeren program uygulanarak gerçekleştirildi. MN1 geni ve referans gen olarak kullanılan HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase1) için standart eğri oluşturmak amacıyla, bu genleri eksprese eden HL60-MN1 hücre hattından elde edilen RNA'dan cDNA sentezlendi. . Sulandırılmamış, 8 μl HL60-cDNA'sı "1. Standart (St 1)" olarak kullanıldı (en fazla miktarda MN1 ve HPRT mRNA'sı içeren standart) ve bu standart için "2" sayısal değeri seçildi. Ardından aşağıdaki seri-sulandırmalar yapılarak standartlar ve bu standartlara karşılık gelen sayısal değerler belirlendi:

- St 1: sulandırılmamış HL60-cDNA'sı (sayısal değer 2).
- St 2: 1/5 oranında sulandırılmış "St 1" (sayısal değer $2/5=0.4$).
- St 3: 1/5 oranında sulandırılmış "St 2" (sayısal değer $0.4/5=0.08$).
- St 4: 1/5 oranında sulandırılmış "St 3" (sayısal değer $0.08/5=0.016$).
- St 5: 1/5 oranında sulandırılmış "St 4" (sayısal değer $0.016/5=0.0032$).
- St 6: 1/5 oranında sulandırılmış "St 5" (sayısal değer $0.0032/5=0.00064$).

Her RT-qPCR reaksiyonunda elde edilen standart eğri grafiğinde, analiz edilen örneklerin Y ekseninde yer alan Ct (threshold cycle) değerine X ekseninde karşılık gelen "standart değer" o genin ekspresyon seviyesini belirledi. Bir örnekteki MN1 ekspresyon seviyesi değeri aynı örneğin referans gen ekspresyon seviyesi değerine bölünerek (MN1/HPRT) normalize edilmiş MN1 ekspresyon seviyesi elde edildi.

9. BULGULAR

Projemizde pediatrik B-hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL) hastaları (n=73) ve sağlıklı bireylerin (n=9) kemik iliği veya kan örneklerinde MN1 geninin ekspresyon düzeyi RT-qPCR yöntemiyle incelenmiştir. Çalışma kapsamında, 2000-2012 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'ne genetik analiz için başvuran, yeni tanı almış ve tedavi süreci başlamamış olan t(12:21)(TEL-AML1) (n=27), t(4;11)(MLL-AF4) (n=7), t(9;22)(BCR-ABL;p190) (n=9) translokasyonlarından birisini taşıyan veya bu translokasyonlara sahip olmayan (n=30) B-ALL hastalarının örnekleri analiz edilmiştir.

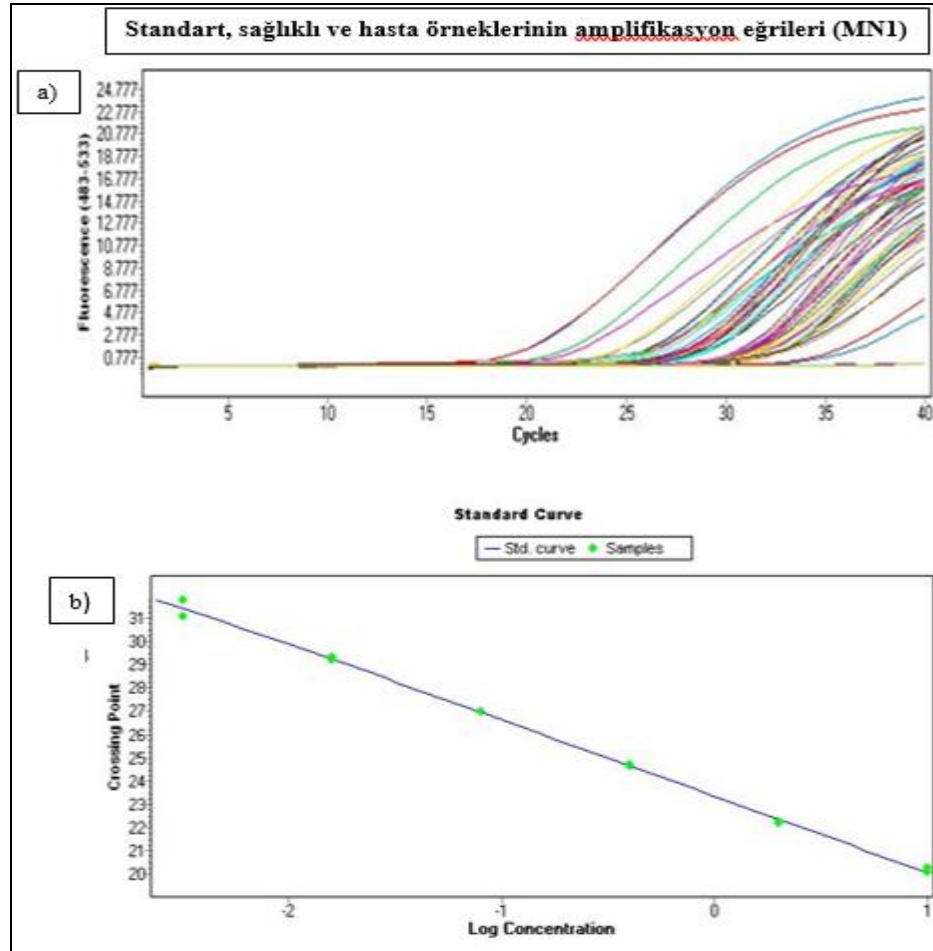
Hastalardan tanı amacıyla elde edilen biyolojik materyallere sırası ile şu işlemler uygulanmıştır:

- Kemik iliği aspirasyonu veya periferik kandan mononükleer kan hücrelerinin ayrımı (ticari kitler kullanılarak yapılır).
- Hücrelerden total RNA izolasyonu.
- Elde edilen RNA dan, komplementer DNA (cDNA) sentezi.
- RT-qPCR analizi (hem hedef gen (MN1) hem de referans gen (HPRT geni (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) için).
- Standart eğri metodu kullanılarak, referans gen ekspresyonuyla normalize edilmiş MN1 ekspresyonu belirlenmesi.

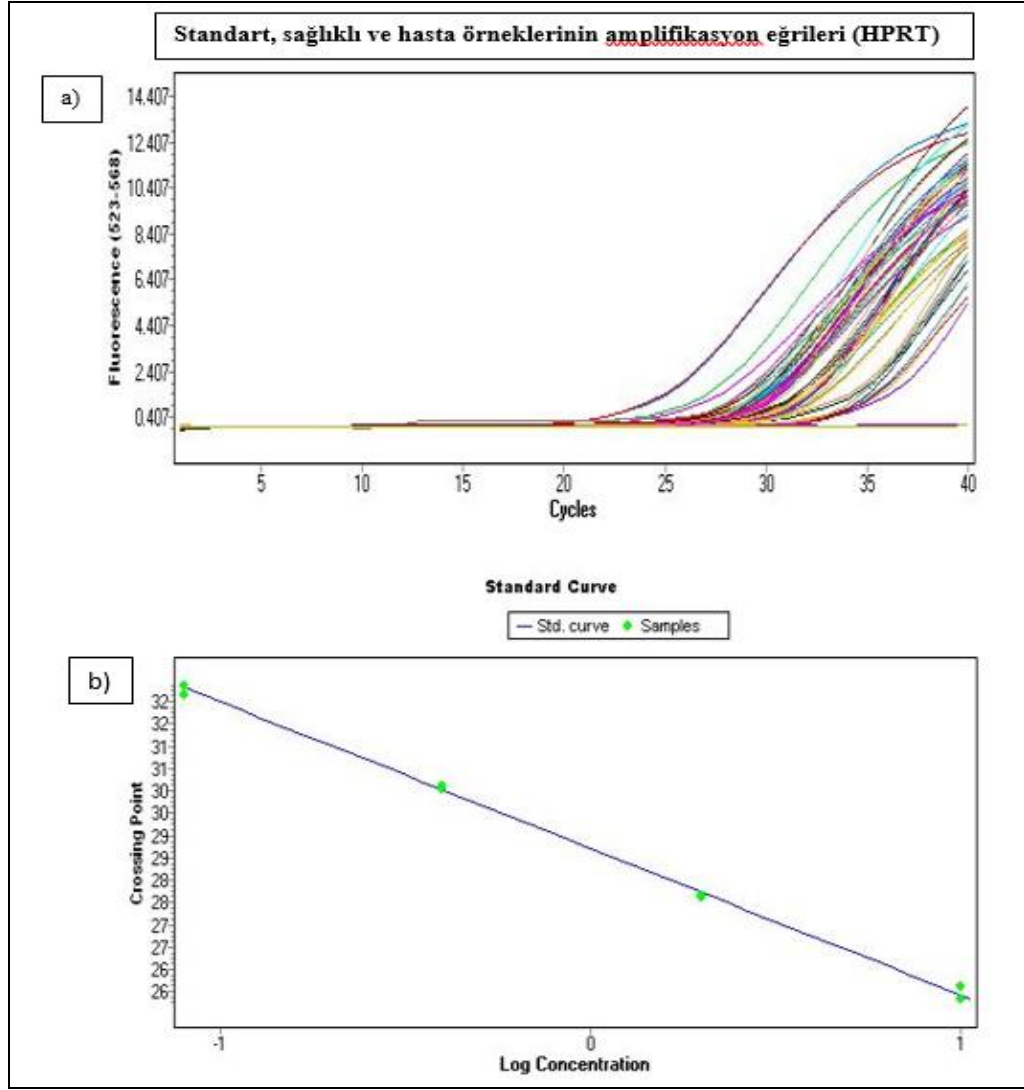
MN1 mRNA Ekspresyonunun Belirlenmesi: MN1 geninin ekspresyonunun normalize edilmesi için, HPRT house keeping geni referans olarak kullanıldı. Yapılan RT-qPCR analizi sonucunda, tüm hasta ve kontrol örneklerinde referans olarak kullanılan HPRT geninin eksprese olduğu gözlemlendi. Hedef ve referans gene ait RT-qPCR analizinden elde edilen amplifikasyon eğrileri ve kullanılan standartlara ait curve eğrileri Şekil 9.1'de ve Şekil 9.2'de gösterilmiştir. Normalize edilmiş MN1 ekspresyon değerleri de (MN1/HPRT) Tablo 9.1'de gösterilmiştir (MN1 ekspresyonu gözlenmeyen örneklerde normalize edilmiş MN1 değeri sıfır "0" olarak kabul edildi).

Translokasyonlar sonucu oluşan füzyon gen ürünlerinden TEL-AML1'in iyi prognozla, BCR-ABL(p190) ve MLL-AF4'ün ise kötü prognozla ilişkili olduğu

bilinmektedir. Çalışılan hastalarda erkek/kız oranı (50/26) 1.9' dur (Tablo 9.1). Hastalar birçok seçim kriterine göre seçildiklerinden dolayı cinsiyet dağılımları farklılık göstermektedir. Çalışmada kullanılan hastalar 4 ay-15 yaş aralığında bulunup tanı sırasındaki ortalama yaşları 5.7 dir. t(12;21) translokasyonuna sahip hasta grubunun yaş ortalaması 5.3, t(4;11) yaş ortalaması 3, t(9;22) yaş ortalaması 8, translokasyon taşımayan hasta grubunun yaş ortalaması 6.5, sağlıklı (kontrol) grubunun yaş ortalaması ise 7.2 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 9.1: MN1 geni için RT-qPCR analiz sonuçlarından elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri grafiği. a) Amplifikasyon eğrileri, b) Standart eğri grafiği.



Şekil 9.2: HPRT geni için RT-qPCR analiz sonuçlarından elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri grafiği. a) Amplifikasyon eğrileri, b) Standart eğri grafiği.

Tablo 9.1: Analiz edilen hastalara ait klinik ve RT-qPCR verileri.

	Örnek no	Yaş	Cinsiyet	Translokasyon	RT-qPCR (MN1/HPRT)		Blast	WBC	Htc	Plt	Hb
1	Kontrol 1	-	E	Sağlıklı	1.00*	Kont. Ort. 1.43	Sağlıklı				
2	Kontrol 2	8	E	Sağlıklı	1.64		Sağlıklı				
3	Kontrol 3	7	E	Sağlıklı	0.41		Sağlıklı				
4	Kontrol 4	23	E	Sağlıklı	1.89		Sağlıklı				
5	Kontrol 5	-	E	Sağlıklı	0.01		Sağlıklı				
6	Kontrol 6	-	K	Sağlıklı	3.32		Sağlıklı				
7	Kontrol 7	4	K	Sağlıklı	0.87		Sağlıklı				
8	Kontrol 8	1	K	Sağlıklı	2.67		Sağlıklı				
9	Kontrol 9	6 ay	-	Sağlıklı	1.05		Sağlıklı				
						Normalize MN1/1.43					
1	00-1006	3	K	t(12;21)	0.62	0.43	98	13.000	7.9	88.000	5.6
2	08-517	7	E	t(12;21)	0.70	0.49	97	3.900	35.1	348.000	11.9
3	06-825	15	E	t(12;21)	0.99	0.69	80	117.000	31.7	29.000	7.5
4	09-01	5	E	t(12;21)	1.07	0.75	70	10.700	-	173.000	6.8
5	06-760	4	E	t(12;21)	1.29	0.90	75	103.000	30.4	152.400	5.9
6	00-940	6	E	t(12;21)	1.31	0.92	52	9200	-	30.000	6.1
7	12-552	5	E	t(12;21)	1.47	1.03	-	-	-	-	-
8	08-590	6	K	t(12;21)	1.58	1.11	94	8.000	25.6	29.000	8.3
9	07-642	4	E	t(12;21)	1.59	1.11	85	8000	24.8	269.000	13.0
10	10-860	6	E	t(12;21)	1.76	1.23	96	24.400	36.5	52.700	11.1
11	11-1444	1	E	t(12;21)	2.22	1.55	-	-	-	-	-
12	12-761	2	K	t(12;21)	2.30	1.61	93	71.900	23.4	210.000	3.7
13	07-1155	5	E	t(12;21)	2.42	1.69	98	165.000	37	32.000	5.5
14	10-912	4	K	t(12;21)	2.43	1.70	75	37.000	34	98.000	9.5
15	12-243	2	E	t(12;21)	2.68	1.87	85	-	-	-	-
16	07-497	8	K	t(12;21)	2.86	2.00	85	-	-	-	-
17	09-11	5	E	t(12;21)	3.04	2.13	95	16.400	31.7	98.000	7.6
18	07-310	8	K	t(12;21)	3.17	2.22	94	3.600	29.3	259.000	9.9
19	12-927	3	E	t(12;21)	3.52	2.46	84	25.600	25.0	71.000	8.2
20	10-517	3	E	t(12;21)	3.68	2.57	84	-	-	-	-
21	12-769	5	E	t(12;21)	3.98	2.78	75	39.900	30.8	46.100	5.8
22	06-763	10	K	t(12;21)	4.22	2.95	100	110.000	24.8	72.000	7.6
23	12-206	5	K	t(12;21)	4.25	2.97	90	28.200	13.6	23.000	4.5
24	12-399	7	E	t(12;21)	4.67	3.27	80	15.200	-	230.000	8.8
25	11-1262	8	K	t(12;21)	5.00	3.50	85	62.300	29.5	55.000	10.6
26	11-662	2	E	t(12;21)	6.72	4.70	30	14.900	27.5	95.000	12.4
27	10-82	9	E	t(12;21)	12.6	8.81	80	20.000	39	135.000	13.5
28	07-1079	3	K	t(4;11)	0.089	0.06	79	14.600	25	124.000	8.3

Tablo 9.1: Devam

29	06-881	4	E	t(4;11)	0.46	0.32	95	11.100	19.7	49.600	7.7
30	12-1561	4 ay	K	t(4;11)	1.83	1.28	85	131.000	15.4	36.900	4.5
31	08-131	1	K	t(4;11)	3.44	2.41	85	138.000	28.1	9.000	5.6
32	12-1928	5 ay	K	t(4;11)	5.04	3.53	75	2000	33.8	62.000	11.6
33	12-1483	13	E	t(4;11)	5.05	3.53	70	380.000	16.2	26.000	5.4
34	04-1296	2	E	t(4;11)	7.11	4.97	90	97.000	24.0	83.700	6.8
35	08-32	6	E	t(9;22)	0.05	0.03	98	166.000	20.6	37.000	5.8
36	12-1112	5	K	t(9;22)	0.06	0.04	97	23.800	26.8	273.000	14.9
37	12-996	2	E	t(9;22)	0.35	0.24	90	-	-	-	-
38	08-34	13	E	t(9;22)	0.54	0.38	94	95.000	30.3	110.000	5.1
39	08-598	12	E	t(9;22)	0.73	0.51	75	4.000	28	234.000	9.9
40	10-329	4	K	t(9;22)	1.02	0.71	80	8.400	27.2	17.000	4.3
41	08-684	13	K	t(9;22)	1.20	0.84	64	8.600	22.4	55.000	7.2
42	11-331	9	E	t(9;22)	1.50	1.05	70	19.300	24.5	94.000	6.5
43	10-518	8	E	t(9;22)	3.46	2.42	100	2600	23.7	154.000	4.3
44	12-1004	12	E	trans(-)	0.04	0.03	85	18.600	28.5	364.000	7.4
45	08-77	14	E	trans(-)	0.13	0.09	80	6.200	31.6	34.000	13
46	07-1190	3	E	trans(-)	0.38	0.27	90	66.400	15.5	35.000	5.3
47	09-356	2	K	trans(-)	0.47	0.33	99	71.000	26.0	95.000	7.6
48	07-911	4	K	trans(-)	0.49	0.34	90	2830	37.6	18.000	12.6
49	09-381	5	K	trans(-)	0.65	0.45	80	19.900	23.2	78.000	5.8
50	08-361	1	E	trans(-)	0.70	0.49	90	20.800	27.0	68.000	9.9
51	07-1073	2	E	trans(-)	0.78	0.55	87	12.700	30.8	41.000	5.4
52	08-359	8	K	trans(-)	0.78	0.55	75	23.500	26.4	65.000	10.6
53	08-93	2	E	trans(-)	0.81	0.57	30	8.800	33.5	348.000	11.4
54	12-1024	14	E	trans(-)	1.09	0.76	80	55.000	34.4	160.000	8.2
55	12-1252	9	E	trans(-)	1.13	0.79	75	28.700	25.1	252.000	10.2
56	09-396	2	K	trans(-)	1.19	0.83	100	1.700	22.9	110.000	7.1
57	12-1090	13	E	trans(-)	1.38	0.97	80	14.000	23.5	44.000	7.7
58	12-1159	15	K	trans(-)	1.55	1.08	95	67.800	30.8	118.000	9.5
59	09-414	11	E	trans(-)	1.59	1.11	80	3.110	28.4	233.000	9.3
60	12-1245	6	E	trans(-)	1.62	1.13	68	1.900	20.7	14.000	7.0
61	12-1367	1	E	trans(-)	1.81	1.27	80	31.200	22.7	37.900	5.9
62	07-644	3	E	trans(-)	3.0	2.10	66	19.900	29.5	43.000	5.5
63	12-1242	2	K	trans(-)	3.06	2.14	55	5.000	31.4	83.000	10.8
64	09-57	6	E	trans(-)	3.11	2.18	90	23.000	14.6	37.000	4.9
65	09-289	3	E	trans(-)	4.35	3.04	99	60.200	33.2	68.000	11.1
66	12-1017	1	K	trans(-)	4.98	3.48	86	27.200	24.0	65.000	5.7
67	07-386	10	E	trans(-)	5.01	3.50	96	1800	8.8	16.000	3
68	08-234	13	E	trans(-)	6.08	4.25	85	69.000	37.7	63.000	10
69	12-1145	3	K	trans(-)	6.98	4.88	65	18.500	23.6	33.900	4.8

Tablo 9.1: Devam

70	09-259	9	E	trans(-)	9.09	6.36	100	132.400	17.3	146.000	7.3
71	08-18	10	E	trans(-)	15.77	11.03	100	226.00	19.0	30.000	6.9
72	12-1065	5	E	trans(-)	20.18	14.12	75	26.200	25.9	478.000	5.5
73	12-1273	8	E	trans(-)	22.16	15.50	75	43.000	27.2	320.000	11.4

Ekspresyon düzeylerini belirlemede referans olarak kullanılan kontrol örneği. K: Kontrol; WBC: Beyaz kan hücresi; Hct: Hematokrit; Plt: Trombosit.

Hastaların klinik takipleri sırasında 6 hastanın verilerine ulaşılamamış olup, 70 hastanın hemoglobin, lökosit sayısı, hematokrit ve trombosit verileri gruplar arasında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Lökosit sayılarına bakıldığında t(4;11) MLL-AF4 füzyon geni taşıyan hasta grubunda diğer gruplarımıza göre artış gözlenmiştir (Tablo 9.2).

Tablo 9.2: ALL hasta gruplarının hemoglobin (Hb), lökosit (WBC), hematokrit (Hct) ve trombosit (Plt) değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.

	n	Hb	WBC	Hct	Plt
TEL-AML1	25	8,43±2,71	39,483±43,116	28,5±7,43	121,590±89,702
MLL- AF-4	7	7,12±2,38	110,528±132,185	23,1±6,61	55,880±38,604
BCR-ABL	8	7,25±3,59	40,962±58,874	25,4±3,2	121,750±92,609
TRANS(-)	30	8,02±2,62	30,356±29,793	26±6,74	116,590±120,992

Hastalar Türkiye'nin çeşitli illerinden tedavi için geldiklerinden dolayı tüm hastaların klinik takibi gerçekleştirilememiştir. Toplam 36 hastanın yaşam durumu hakkında bilgi edinilmiş olup 4 hastada ölüm gerçekleşmiştir. 36 hastadan 28'inin remisyonda olduğu, 4 hastanın da relaps (nüks) olduğu belirlenmiştir (2012 ya da 2013 yılı itibariyle). İyi prognoz kriterleri arasında gösterilen TEL-AML1 translokasyonuna sahip hiçbir hastada relaps/ölüm belirlenmemiştir (2012 yılı itibariyle). Hasta gruplarına göre remisyon yüzdeleri belirlenmiştir ve Tablo 9.3'te gösterilmiştir.

Tablo 9.3: Hastaların remisyon, relaps, ölüm sayılarının taşıdıkları translokasyonlara göre karşılaştırılması.

	HASTA SAYISI	REMİSYON (ORTALAMA AY)	RELAPS SAYISI	ÖLÜM SAYISI
TEL-AML1	9	49.7	0	0
MLL-AF4	3	64	0	1
BCR-ABL P190	5	37.6	0	2
TRANS(-)	19	45.5	4	1

İlginç olarak, hastaların MN1 ekspresyon düzeyi, dokuz sağlıklı bireye ait MN1 ekspresyon düzeyinin Tablo 9.1’de belirtilen ortalama değer “1.43” ile bölünerek, ekspresyon düzeyindeki değişiklik sağlıklı kontrollere göre kat farkı olarak hesaplandığında (MN1/1.43) relaps, relaps/ölüm ya da ölüm gözlenen hastaların tamamında MN1 ifadesinin kontrol kemik iliği değerinin (1’in) altında olduğu belirlenmiştir (Tablo 9.4).

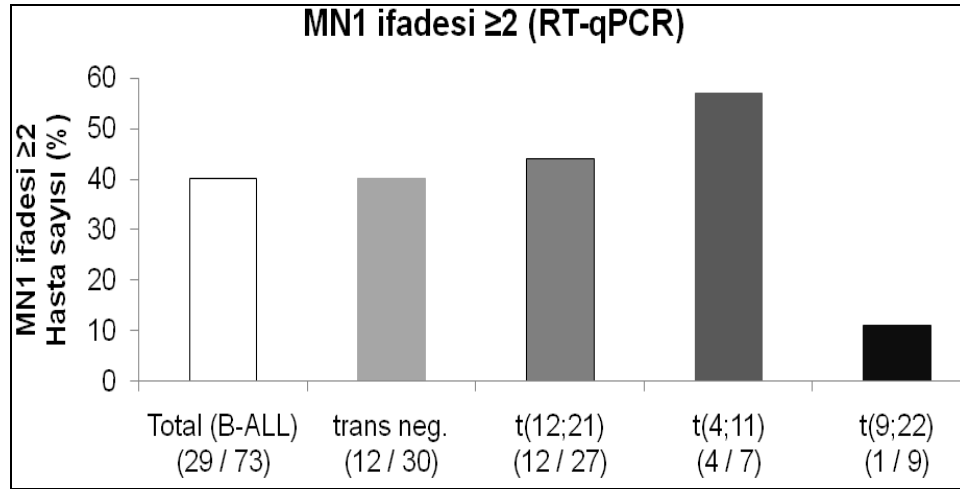
Tablo 9.4: Hastaların remisyon, relaps, ölüm sayılarıyla MN1 ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması.

	Örnek no	Translokasyon	MN1 hasta/MN1 kont. Ort. (1.4)	Yaşam (ay)
	Kontrol ki (n=9)		1 (1.43/1.43)	Sağlıklı
1	12-1004	trans (-)	0.03	5
2	08-32	t(9;22)	0.03	53
3	07-1079	t(4;11)	0.06	56 /ex
4	08-77	trans (-)	0.09	52
5	07-1190	trans (-)	0.27	55
6	06-881	t(4;11)	0.32	81
7	09-356	trans (-)	0.33	33/relaps
8	07-911	trans (-)	0.34	57
9	08-34	t(9;22)	0.38	52/relaps; ex
10	09-381	trans (-)	0.45	32/relaps
11	08-361	trans (-)	0.49	49/relaps
12	08-517	T(12;21)	0.49	48
13	08-598	t(9;22)	0.51	44
14	07-1073	trans (-)	0.55	56/ex
15	08-359	trans (-)	0.55	49
16	08-93	trans (-)	0.57	52
17	09-01	T(12;21)	0.75	42
18	09-396	trans (-)	0.83	32/relaps

Tablo 9.4: Devam

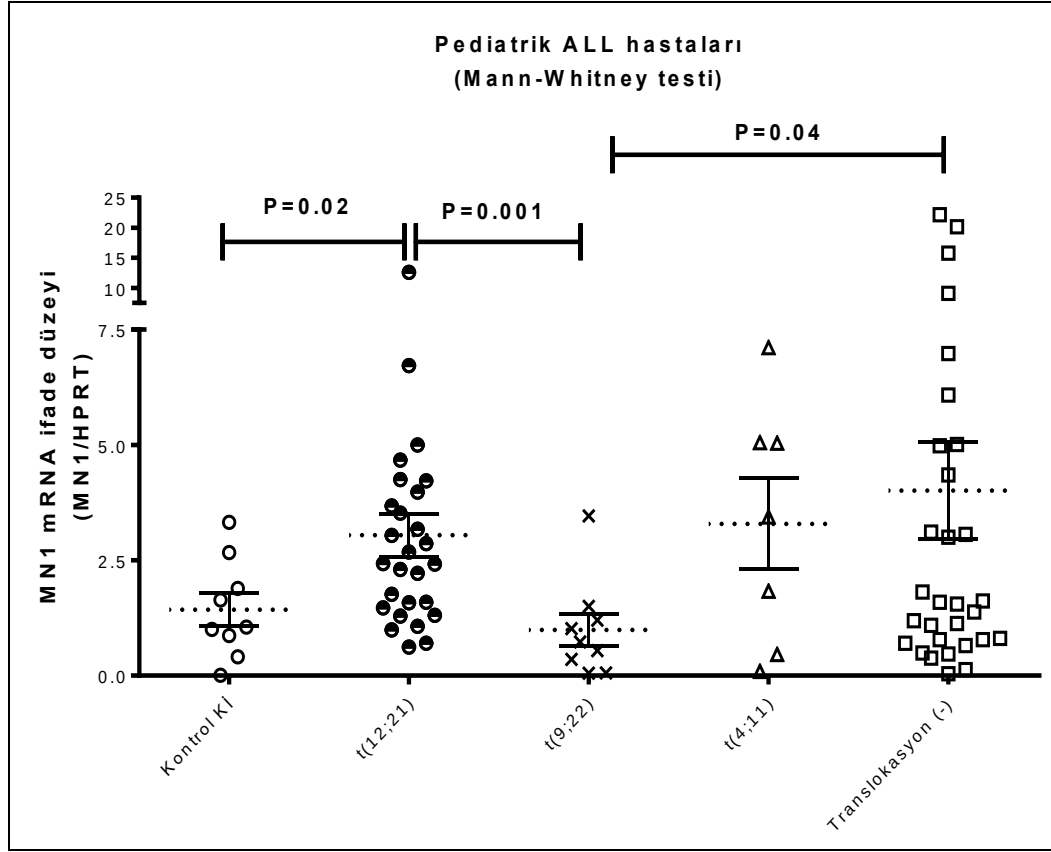
19	08-684	t(9;22)	0.84	42/ex
20	06-760	T(12;21)	0.90	70
21	00-940	T(12;21)	0.92	141
22	11-331	t(9;22)	1.05	16
23	08-590	T(12;21)	1.11	41
24	09-414	trans (-)	1.11	31
25	10-860	T(12;21)	1.23	25
26	07-1155	T(12;21)	1.69	64
27	07-644	trans (-)	2.10	60
28	09-57	trans (-)	2.18	40
29	08-131	t(4;11)	2.41	47
30	12-769	T(12;21)	2.78	7
31	09-289	trans (-)	3.04	35
32	07-386	trans (-)	3.50	62
33	08-234	trans (-)	4.25	50
34	11-662	T(12;21)	4.70	10
35	09-259	trans (-)	6.36	36
36	08-18	trans (-)	11.03	53

Elde ettiğimiz veriler, sağlıklı bireylerdeki ortalama MN1 ekspresyonuna göre (ortalama=1.43) iki kat ve daha fazla ekspresyon artış ya da azalma dikkate alındığı zaman, tüm hastaların % 40'ında (29/73) MN1 ekspresyonunun arttığını; hastaların %21'inde ise ekspresyonun azaldığını (16/73) göstermiştir. Hasta gruplarında aynı analiz yapıldığında; MN1 ekspresyonunda translokasyon taşımayan hastaların %40'ında (12/30) artış, %23'ünde (7/30) azalma; TEL-AML1 pozitif olan hastaların %44'ünde (12/27) artış, %7'sinde azalma (2/27); MLL-AF4 pozitif olan hastaların %57'sinde (4/7) artış, %28'inde azalma (2/7); BCR-ABL pozitif olan hastaların ise %11'inde (1/9) artış, %55'indeyse azalma gözlenmiştir. İki kat veya üzerinde artış tespit edilen hasta grupları Şekil 9.3'de gösterilmiştir.



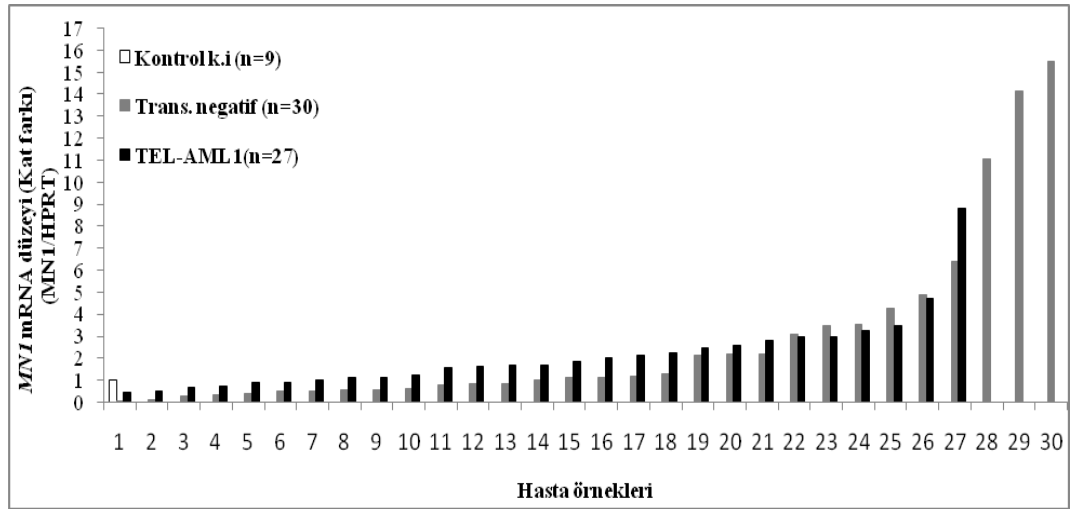
Şekil 9.3: Kontrol kemik iliği ortalamasına göre MN1 ifadesi 2 kat ve daha yüksek olan hastaların oranı (Her grupta, MN1 ifadesi 2 kat ve daha yüksek olan hasta yüzdesinin hesaplaması için kullanılan formül: $(n \geq 2 / n) * 100$).

İstatistiksel analizler (GraphPad Prism software; Mann-Whitney) sonucunda sadece t(12;21) TEL-AML1 pozitif olan hastalardaki artış kontrol kemik iliği örneklerine göre anlamlı bulunmuştur ($P=0.02$). Hasta grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise; t(12;21) hastalarındaki artış t(9;22) BCR-ABL grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P=0.001$). t(9;22) pozitif olan hastalarda, translokasyon negatif olan hasta grubuna göre MN1 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu belirlenmiştir ($P=0.04$). Anlamlı bulunan istatistiksel analiz sonuçları Şekil 9.4’de gösterilmiştir.



Şekil 9.4: Kontrol ve hastalardaki MN1 ifade düzeyinin Mann-Whitney analiz sonuçları (Sadece istatistiksel olarak anlamlı bulunan karşılaştırmalar gösterilmiştir).

MN1 ekspresyon seviyesi küçükten büyüğe sıralandığı zaman, TEL-AML1 pozitif olan hastalarda, translokasyon negatif olan hastalara oranla daha yüksek seviyede MN1 ekspresyonu olduğu gözlenmiştir (27 TEL-AML1 hastasının 22'sinde MN1 seviyesi daha yüksektir). Grafıksel olarak düzey farkları Şekil 9.5'te gösterilmiştir.



Şekil 9.5: TEL-AML-1 pozitif olan veya translokasyon taşımayan hastalarda MN1 ekspresyon seviyesi dağılımı (Küçükten büyüğe doğru sıralanmıştır).

Son olarak, hastalar, yaş ya da lökosit sayısı dikkate alınarak gruplandırıldığında, MN1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo 9.5).

Tablo 9.5: B-ALL hastalarında MN1 ekspresyon düzeyi ve yaş/beyaz kan hücresi sayısı arasındaki ilişki (Her grupta MN1 ekspresyonunun medyan (median) değeri gösterilmiştir).

	Hasta sayısı / (%)	MN1 ekspresyonu (medyan)	P değeri
YAŞ (n=73)			
≤1	2 (2.7)	3.44	0.590
1-10	56 (76.7)	2.22	
≥10	15 (20.5)	1.38	
WBC (n=67)			
1.000-10.000	18 (26.8)	1.44	0.468
10.000-50.000	29 (43.2)	1.81	
≥50.000	20 (29.8)	2.36	
t(4;11)			
positive	7	3.44	0.658
negative	30	1.57	
t(9;22)			
positive	9	0.73	0.042*
negative	30	1.57	
t(12;21)			
positive	27	2.55	0.258
negative	30	1.57	

10. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, tedaviye başlanmamış çocukluk çağı B-ALL hastalarının ve sağlıklı çocuk bireylerin kemik iliği ya da kan örnekleri toplanmış ve B lenfosit hücreleri izole edilmiştir. Hasta örnekleri translokasyon taşıyan ve taşımayan olarak iki ana grupta toplanmıştır. Translokasyon taşıyan lösemi hasta örnekleri de kendi içerisinde; t(4;11) (MLL-AF4), t(12;21) (TEL-AML1) ve t(9;22) (BCR-ABL) olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır. Tüm biyolojik örneklerin MN1 gen ifade düzeyleri RT-qPCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak gruplar arasında ve kontrol ile ayrı ayrı kıyaslanmıştır. Kontrol örneklerinin ortalaması 1 olarak kabul edilip tüm hasta örneklerinin MN1 ekspresyon düzeyi kontrole göre kat farkı olarak hesaplandığında t(12;21) (TEL-AML1) translokasyonunu taşıyan lösemi hastalarının MN1 gen ifade düzeylerindeki artış kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 9.4). MLL-AF4 taşıyan 7 hastadan 4'ünde de 2 kat veya üzerinde artış tespit edilmiştir ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Bu durum muhtemelen bu gruptaki ekspresyon seviyelerindeki değişkenlik ve hasta sayısının azlığından kaynaklanmaktadır. t(9;22) pozitif olan hastalarda ise MN1 ifadesinin TEL-AML1 pozitif veya translokasyon negatif olan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bu gruptaki 9 hastadan yalnızca birinde 2 kat üzerinde MN1 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. MN1 ifadesi ve hastaların yaşam süresi ya da relaps durumu karşılaştırıldığında, relaps veya ölüm gerçekleşen tüm hastalarda MN1 ifade düzeyinin 1'in altında olduğu gözlenmiştir.

MN1, akut miyeloid lösemilerde (AML) hasara uğrayan genler arasında olup, bu hasar ya dengeli t(12;22) kromozom translokasyonu sonucu oluşan anormal MN1-TEL füzyonu olarak ya da bazı AML alt gruplarında aşırı MN1 ekspresyonu olarak gözlenmektedir [Grosveld, 2007]. MN1'i yüksek miktarda eksprese eden karyotipik olarak normal AML hastaları, MN1'i daha az eksprese eden AML hastalarına oranla ATRA (all-trans retinoik asit) tedavisine direnç göstermektedir [Heuser et al., 2007]. Fizyolojik şartlarda, farklılaşmasını tamamlamış miyeloid hücrelere oranla hematopoetik farklılaşmasını tamamlamamış hematopoetik kök hücreler ve öncü miyeloid hücrelerde MN1 ekspresyonu daha yüksektir [Shikawa et al., 2003]. Epitel ve osteblast hücrelerinde çoğalmayı inhibe etmesine karşın,

MN1'in aşırı ekspresyonu immatür hematopoetik hücrelerin anormal olarak çoğalmasına yol açmaktadır. İnsan lösemi hücre hatlarında MN1'in ekspresyonunun baskılanması bu hücrelerin çoğalmasını engellemektedir [Liu et al., 2010]. Grubumuz daha önceki çalışmalarında, MN1'in gerek fare gerekse insan hematopoetik kök/öncü hücrelerinde retroviral vektörler aracılığı ile aşırı ekspresyonu sağlandığında bu hücrelerde miyeloid farklılaşmada inhibisyon oluştuğunu [Kandilci and Grosveld, 2009] farklılaşamayan bu hücrelerin aşırı miktarda çoğaldığını ve fare kemik iliği hücrelerinde MN1'in aşırı ekspresyonunun bu farelerde miyeloid lösemiye neden olduğunu göstermiştir [Carella et al., 2007].

Bugüne kadar yapılan araştırmalarda MN1'in lösemi ile ilişkisi ağırlıklı olarak AML'de incelenmiştir. Her ne kadar yakın zaman önce MN1 geninin aşırı ekspresyonunun in vitro koşullarda fare lenfoid projenitör hücrelerinin aşırı çoğalmasına sebep olduğu bir ön-veri olarak bildirilmiş olsa da [Heuser et al., 2011] bu durumun insanda akut lenfoblastik lösemi (ALL) gelişimi açısından biyolojik önemi henüz araştırılmamıştır. Literatürde, az sayıdaki B-ALL ve T-ALL (n=7) hastasına ait kemik iliği örneği ile AML hastalarına ait örneklerde MN1 ekspresyon seviyesi karşılaştırılmış ve B-ALL'de MN1'in daha yüksek seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir ancak bu çalışmada farklı ALL alt grupları ile MN1 ekspresyonu arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmamıştır [Liu et al., 2010].

Çekirdek bağlanma faktörü (core binding factor (CBF), AML1 (RUNX1) ve CBFb alt birimlerinden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. AML1, bu kompleksin DNA bağlama elemanıdır ve afinitesi, CBFb varlığında büyük ölçüde artmaktadır. Hayvan deneylerinde yapılan gen susturma çalışmaları, hematopoez için AML1 ve CBFb'nin gerekli temel elemanlar olduğunu göstermiştir. Translokasyonlar sonucu oluşan anormal füzyon proteinleri TEL-AML1 (B-ALL), AML1-ETO (AML) ve CBFb-MYH11 (AML)'in, CBF'in DNA'ya bağlanma/transkripsiyon aktivasyon fonksiyonunu transkripsiyon ko-repressörleri aracılığıyla baskıladığı gösterilmiştir [Hart and Foroni, 2002]. Bu füzyon proteinlerinin fare kemik iliğinde ektopik olarak ifade ettirilmesi anormal çoğalmayla ilişkili olmakla birlikte, lösemi oluşumu için yeterli değildir. Ancak fare kemik iliği hücrelerinde, CBFb-MYH11 varlığında ektopik olarak aşırı MN1 ifadesi sağlandığında AML gelişmektedir. Bu bulgu, MN1'in aşırı ifadesinin AML patogenezinde rolü olduğunu göstermektedir [Carella et al., 2007]. İlginç olarak, AML1-ETO ya da CBFb-MYH11 pozitif olan AML hastalarının kemik iliği hücrelerinin MN1'i aşırı ifade ettiği gösterilmiştir. Bu

tez çalışması kapsamında da, benzer durumun TEL-AML1 pozitif olan hastalarda da gözlemlendiği tespit edilmiştir (Şekil 9.3). Her üç füzyon proteini de iyi prognozla ilişkilidir. Standart kemoterapi ilaçları bölünen hücreleri hedef almaktadır. MN1 aşırı ifadesinin gerek miyeloid progenitör hücrelerinin [Carella et al., 2007] gerekse öncü B-lenfositlerinin aşırı çoğalmasına yol açtığı dikkate alınırsa [Numata et al., 2015], muhtemelen anormal MN1 ifadesi ile tetiklenmiş olan hücre bölünmesindeki artışın AML ve B-ALL’de tedaviye yanıtı arttırdığı dolayısıyla iyi prognozla ilişkili olduğu düşünülebilir. Yine bu tez çalışmasında, MN1 ifadesinin kontrol kemik iliğindeki değeri 1 olarak alındığında ve hastalar MN1 ifadesini 1’in altında veya 1’in üstünde ifade etmelerine göre gruplandığında, ölüm veya relaps görülen hastalarında MN1 ifadesinin 1’in altında olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar MN1 ifadesinin B-ALL hastalarında translokasyonlardan bağımsız bir prognostik faktör olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezin test edilmesini sağlamak için, klinik verileri tam olarak tutulmuş ve erişilebilen, daha uzun süreyle izlenen daha fazla sayıda hasta örneğinin çalışılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Aifantis I., Raetz E., Buonamici S., (2008), "Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma", *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 380–390.

Aplan P. D., (2006), "Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms", *DNA Repair*, 5(9), 1265–1272.

Badar T., Shetty A., Bueso-Ramos C., Cortes J., Konopleva M., Borthakur G., Pierce S., Huang X., Chen H., Daver N., Dinardo C., O'Brien S., Manero G., Kantarjian H., Ravandi F., (2015), "Bone marrow necrosis in acute leukemia: clinical characteristic and outcome", *American Journal of Hematology*, 90(9), 769–773.

Barnkob M. S., Simon C., Olsen L. R., (2014), "Characterizing the human hematopoietic CDome", *Frontier Genetics*, 8(5), 331.

Belson M., Kingsley B., Holmes A., (2007), "Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review", *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 138–145.

Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M. T., Flandrin G., Galton D. A., Gralnick H. R., Sultan C., (1976), "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.", *British Journal of Hematology*, 33(4), 451-8.

Bernitz J. M., Kim H. S., MacArthur B., Sieburg H., Moore K., (2016), "Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions", *Cell*, 167(5), 1296–1309.

Boyle P., Levin B., (2008), "World Cancer Report", Lyon, (1), 122.

Brenner S., Drewel D., Steinbart T., Weisel F., Pötzsch E. H., Welzel H., Brand A., Yu P., Mudde G. C., Schweizer A., Nitschke L., Winklera T. H., (2011), "A hypomorphic IgH-chain allele affects development of B-cell subsets and favours receptor editing", *Embo Journal*, 30(13), 2705–2718.

Brisson G. D., Alves L. R., Oliveira M. S., (2015), "Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review", *Ecancermedicalscience*, (9), 539.

Buijs A., Sherr S., van Baal S., van Bezouw S., van der Plas D., Geurts van Kessel A., Riegman P., Deprez L. R., Zwarthoff E., Hagemeijer A., (1995), "Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11", *Oncogene*, 10(8), 1511-9.

Buijs A., van Rompaey L., Molijn A. C., Davis J. N., Vertegaal A. C., Potter M. D., (2000), "The MN1-TEL fusion protein, encoded by the translocation (12;22)(p13;q11) in myeloid leukemia, is a transcription factor with transforming activity", *Molecular Cell Biology*, 20(12), 9281-9293.

Cambier J. C., Gauld S. B., Merrell K. T., Vilen B. J., (2007), “B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?”, *Nature Reviews Immunology*, 7(8), 633–643.

Cannas G., Thomas X., (2015), “Supportive care in patients with acute leukaemia: historical perspectives”, *Blood Transfusion*, 13(2), 205–220.

Carella C., Bonten J., Sirma S., Kranenburg T. A., Terranova S., Klein-Geltink R., Shurtleff S., Downing J. R., Zwarthoff E. C., Liu P. P., Grosveld G. C., (2007), “MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML”, *Leukemia*, 21(8), 1679-90.

Chanudet E., Adam P., Nicholson A. G., Wotherspoon A. C., Ranaldi R., Goteri G., Pileri S. A., Müller-Hermelink H. K., Du M., (2007), “Chlamydiae and Mycoplasma infections in pulmonary MALT lymphoma”, *British Journal of Cancer*, 97(7), 949–951.

Chen T., Wang F., Wu M., Wang.Z., (2015), “Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells”, *Journal of Cell Biochemistry*, 116(7), 1179–1189.

Chiaretti S., Gianfelici V., Ceglie G., Foa R., (2014), “Genomic Characterization of Acute Leukemias”, *Medical Principles and Practice*, 23(6), 487–506.

Cobaleda C., Sanchez-Garcia I., (2009), “B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin”, *Bioessays*, (31), 6.

Couto E., Chen B., Hemminki K., (2005), “Association of childhood acute lymphoblastic leukemia with cancers in family members”, *British Journal of Cancer*, (93), 1307-1309.

Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J. E., (2012), “Hematopoiesis: a human perspective”, *Cell Stem Cell*, 10(2), 120–136.

Dzierzak E. and Robin C., (2010), “Placenta as a source of hematopoietic stem cells”, *Trends In Molecular Medicine*, 16(8), 361–367.

Engel P., Gomez-Puerta J. A., Ramos-Casals M., Lozano F., Bosch X., (2011), “Therapeutic Targeting of B Cells for Rheumatic Autoimmune Diseases”, *Pharmacological Reviews*, 63(1), 127-156.

Esau D., (2017), “Viral Causes of Lymphoma: The History of Epstein-Barr Virus and Human T-Lymphotropic Virus”, *Virology*, (25), 8.

Fader S., O'Brien S., Pui C. H., Stock W., Wetzler M., Hoelzer D., Kantarjian H. M., (2010), “Adult Acute Lymphoblastic Leukemia, Concepts and Strategies”, *Cancer*, 116(5), 1165–1176.

Famili F., Wiekmeijer A., Staal F. J. T., (2017), “The development of T cells from stem cells in mice and humans”, *Future Science*, (3), 32-41.

Figueroa M.E., Lugthart S., Li Y., Erpelinck-Verschueren C., Deng X., Christos P.J., Schifano E., Booth J., van Putten W., Skrabanek L., Campagne F., Mazumdar M., Greally J.M., Valk P.J., Lowenberg B., Delwel R., Melnick A., (2010), "DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia", *Cancer Cell*, 17(1), 13–27.

G. Salazar E. G., Wertheim G. B., Biegel J. A., Hwang W., Tasian S. K., Rheingold S. R., (2015), "Mixed Phenotype Acute Leukemia with Low Hypodiploidy in a Pediatric Patient", *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 3(1), 24–28.

Golub T.R., Barker G. F., Bohlander S. K., Hiebert S. W., Ward D. C., Bray-Ward P., Morgan E., Raimondi S. C., Rowley J. D., Gilliland D. G., (1995), "Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia", *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, (92), 4917–4921.

Greuber E. K., Smith P., Wang J., Pendergast A. M., (2013), "Role of ABL Family Kinases in Cancer: from Leukemia to Solid Tumors", *Nature Reviews Cancer*, 13(8), 559–571.

Grisanzio C., Freedman M. L., (2010), "Chromosome 8q24-Associated Cancers and MYC", *Genes Cancer*, 1(6), 555-9.

Groffen J., Stephenson J. R., Heisterkamp N., Klein A., Bartram C. R., Grosveld G., (1984), "Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22", *Cell*, (36), 93–99.

Grosveld G. C., (2007), "MN1, a novel player in human AML", *Blood Cells Molecular Disease*, 39(3), 336–339.

Hanson C. A., Abaza M., Sheldon S., Ross C. W., Schnitzer B., Stoolman L. M., (1993), "Acute biphenotypic leukemia: immunophenotypic and cytogenetic analysis", *British Journal of Hematology*, (84), 49–60.

Hart S. M., Foroni L., (2002), "Core binding factor genes and human leukemia" *Haematologica*, 87(12), 1307-23.

Hattchouel J. H., Laplanche A., Hill C., (1995), "Leukaemia mortality around French nuclear sites", *British Journal of Cancer*, 71(3), 651–653.

Hebeisen M., Allard M., Gannon P. O., Schmidt J., Speiser D. E., Rufer N., (2015), "Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens", *Frontiers Immunology*, (6), 582.

Heisterkamp N., Stephenson J. R. , Groffen J., (1983), "Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukemia", *Nature*, (306), 239–42.

Heuser M., Argiropoulos B., Kuchenbauer F., Yung E., Piper J., Fung S., Schlenk R. F., Dohner K., Hinrichsen T., Rudolph C., (2007), "MN1 overexpression induces

acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML”, *Blood*, 110(5), 1639-1647.

Heuser M., Yun H., Berg T., Yung E., Argiropoulos B., Kuchenbauer F., Park G., Hamwi I., Palmqvist L., Lai C. K., (2011), “Cell of origin in AML: susceptibility to MN1-induced transformation is regulated by the MEIS1/AbdB-like HOX protein complex”, *Cancer Cell*, 20(1), 39-52.

Hirzel A. C., Cotrell A., Gasparini R., Sriganeshan V., (2013), “Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma with L3 Morphology, Philadelphia Chromosome, MYC Gene Translocation, and Coexpression of TdT and Surface Light Chains: A Case Report”, *Case Report Pathology*, (1), 67.

Hock H., Meade E., Medeiros S., (2004), “Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival”, *Genes Development*, 2336-2341.

Howell D. A., Warburton F., Ramirez A. J., Roman E, Smith A. G., Forbes L. J. L., (2015), “Risk factors and time to symptomatic presentation in leukaemia, lymphoma and myeloma”, *British Journal of Cancer*, 113(7), 1114–1120.

Howlader N., Noone A. M., Krapcho M., (2015), “Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2013”, National Cancer Institute, USA, (9), 44.

Hu R., Wu Y., Jiang X., Zhang W., Xu L., (2011), “Clinical symptoms and chemotherapy completion in elderly patients with newly diagnosed acute leukemia: a retrospective comparison study with a younger cohort”, *BMC Cancer*, (11), 224.

Huppi K., Pitt J. J., Wahlberg B. M., Natasha J. Caplen N. J., (2012), “The 8q24 Gene Desert: An Oasis of Non-Coding Transcriptional Activity”, *Frontier Genetics*, (3), 69-73.

Inaba H., Greaves M., Mullighan C. G., (2013), “Acute lymphoblastic leukaemia”, *Lancet*, 381.

Jaffe E. S., Harris N. L., Stein H., Vardiman J. W., (2001), “World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues” Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, (1), 75–87.

Jeha S., Pei D., Raimondi S. C., Onciu M., Campana D., Cheng C., Sandlund J. T., Ribeiro R. C., Jeffrey E., Scott C., Howard R., Pui C., (2009), “Increased Risk for CNS Relapse in Pre-B Cell Leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1”, *Leukemia*, 23(8), 1406–1409.

Kadia T. M., Ravandi F., O’Brien S., Cortes J., Kantarjian H. M., (2015), “Progress in Acute Myeloid Leukemia”, *Clinical Lymphoma Myeloma Leukemia Journal*, 15(3), 139–151.

Kandilci A., Grosveld G. C., (2009), “Reintroduction of CEBPA in MN1-overexpressing hematopoietic cells prevents their hyperproliferation and restores myeloid differentiation”, *Blood*, 114(8), 1596–1606.

Kang Z., Liu Y., Xu L., Long Z., Huang D., Yang Y., Liu B., Feng J., Pan Y., Yan J., Liu Q., (2016), “The Philadelphia chromosome in leukemogenesis” *Chinese Journal of Cancer*, (35), 48.

Kawagoe H., Grosveld G. C., (2005), “Conditional MN1-TEL knock-in mice develop acute myeloid leukemia in conjunction with overexpression of HOXA9”, *Blood*, 1(106), 4269-4277.

Kawagoe H., Grosveld G. C., (2005), “MN1-TEL myeloid oncoprotein expressed in multipotent progenitors perturbs both myeloid and lymphoid growth and causes T-lymphoid tumors in mice”, *Blood*, 106(13), 4278–4286.

Kuehl W. M., Bergsagel P. L., (2002), "Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions", *Nature Reviews Cancer*, (2), 175-187.

Lee H., Kim Y., Kim Y., Han K., (2015), “An Unusual Case of Myeloperoxidase-Positive Acute Megakaryoblastic Leukemia”, *Annals of Laboratory Medicine*, 35(4), 466–468.

Liedtke M. and Cleary M. L., (2009), “Therapeutic targeting of MLL”, *Blood*, 113(24), 6061–6068.

Lilleyman J. S., Hann I. M., Stevens R. F., Eden O. B., Richards S. M., (1986), “French American British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukaemia and its clinical importance”, *Journal of Clinical Pathology*, 39(9), 998–1002.

Lim W. F., Inoue-Yokoo T., Tan K. S., Lai M., Sugiyama D., (2013), “Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells”, *Stem Cell Research and Therapy*, (3), 4.

Linden M. H., Seslija L., Schneider P., Driessen E. M., Castro P. G., Roon D. S., Boer J., Williams O, Pieters R., Stam R. W., (2015), “Identification of Genes Transcriptionally Responsive to the Loss of MLL Fusions in MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia”, *PLoS One*, (3), 10.

Liu S, Liu Y, Zhang Q, Wu J, Liang J, Yu , Wei GH, White KP, Wang X., (2017), “Systematic identification of regulatory variants associated with cancer risk.”, *Genome Biology*, 18(1), 194-197.

Liu T., Jankovic D., Brault L., Ehret S., Baty F., Stavropoulou V., Rossi V., Biondi A., Schwaller J., (2010), “Functional characterization of high levels of meningioma 1 as collaborating oncogene in acute leukemia”, *Leukemia*, 24(3), 601-612.

Loh M. L., Goldwasser M. A., Silverman L. B., Poon W., Vattikuti S., Cardoso A., Neuberg D. S., Shannon K. M., Sallan S. E., Gilliland D. G., (2006), “Prospective

analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium“, *Blood*, 107(11), 4508–4513.

Lopez C. K., Malinge S., Gaudry M., Bernard O. A., Mercher T., (2017), “Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia: Multitasking Fusion Proteins and Oncogenic Cooperations.”, *Trends Cancer*, 3(9), 631-642.

Maial R. P., Wünsch V., (2013), “Infection and childhood leukemia: review of evidence”, *Revista Saude Publica*, 47(6), 1172–1185.

Mateos M. K., Barbaric D., Sutton B., Marshall G. M., (2015), “Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets”, *Translate Pediatric*, 4(2), 76–92.

Meester-Smoor M. A., Vermeij M., van Helmond M. J. L., Molijn A. C., van Wely K. H. M., Hekman A. C. P., Vermey-Keers C., Riegman P. H. J., Zwarthoff E. C., (2005), “Targeted Disruption of the *Mn1* Oncogene Results in Severe Defects in Development of Membranous Bones of the Cranial Skeleton”, *Molecular Cell Biology*, 25(10), 4229–4236.

Meffre E., and Nussenzweig M. C., (2002), “Deletion of immunoglobulin β in developing B cells leads to cell death”, *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, 99(17), 11334–11339.

Miyoshi M., Shimizu K., Kozu T., Maseki N., Kaneko Y., Ohki M., (1991), “t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, *AML1*”, *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, 88(23), 10431–10434.

Mullighan C. G., (2012), “Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia”, *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3407–3415.

Nemazee D., (2017), “Mechanisms of central tolerance for B cells”, *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 281–294.

Okkenhaug K., Burger J. A., (2016), “PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)”, *Current Topics Microbiology Immunology*, (393), 123–142.

Okuno Y., Iwasaki H., Huettner C. S., Radomska H. S., Gonzalez D. A., Tenen D. G., Akashi K., (2002), “Differential regulation of the human and murine *CD34* genes in hematopoietic stem cells”, *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, 99(9), 6246–6251.

Orkin S. H. and Zon L. I., (2008), “Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology”, *Cell*, 132(4), 631–644.

Paulsson K., Forestier E., Lilljebjörn H., Heldrup J., Behrendtz M., Young B., Johansson B., (2010), “Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute

lymphoblastic leukemia” Proceedings of The National Academy of Sciences USA, (50), 107.

Pearson S., Cuvertino S., Fleury M., Lacaud G., Kouskoff V., (2015), “In Vivo Repopulating Activity Emerges at the Onset of Hematopoietic Specification during Embryonic Stem Cell Differentiation”, Stem Cell Reports, 4(3), 431–444.

Polychronakis I., Dounias G., Makropoulos V., Riza E., Linos A., (2013), “Work-related leukemia: a systematic review”, Journal of Occupational Medicine and Toxicology, (8), 14.

Pone E. J., Xu Z., White C. A., Zan H., Casali P., (2012), “B cell Toll-like receptors and immunoglobulin class-switch DNA recombination”, Frontiers Bioscience, (17), 2594–2615.

Reckel S., Hamelin R., Georgeon S., Armand F., Jolliet Q., Chiappe D., Moniatte M., Hantschel O., (2017), “Differential signaling networks of Bcr–Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics”, Leukemia, 31(7), 1502–1512.

Reese D. M., (1998), “Fundamentals- Rudolf Virchow and modern medicine”, Western Journal Medical, 169(2), 105–108.

Romana S.P., Poirel H., Leconiat M., Flexor M. A., Mauchauffe M., Jonveaux P., Macintyre E. A., Berger R., Bernard O. A., (1995), “High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia”, Blood, (86), 4263–4269.

Safavi S., Olsson L., Biloglav A., Veerla S., Blendberg M., Tayebwa J., Behrendtz M., Castor A., Hansson M., Johansson B., Paulsson K., (2015), “Genetic and epigenetic characterization of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia” Oncotarget, 6(40), 42793–42802.

Salimi N., Fleri W., Peters B., Sette A., (2010), “Design and utilization of epitope-based databases and predictive tools”, Immunogenetics, 62(4): 185–196.

Santori F. R., (2015), “The immune system as a self-centered network of lymphocytes”, Immunology Letters, 166(2), 109–116.

Saultz J. N., Garzon R., (2016), “Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review”, Journal Clinical Medicine, 5(3), 33.

Schnerch D., Yalcintepe J., Schmidts A., Becker H., Follo M., Engelhardt M., Wasch R., (2012), “Cell cycle control in acute myeloid leukemia”, American Journal Of Cancer Research, 2(5), 508–528.

Sharrocks A. D., Brown A. L., Ling Y., Yates P.R., (1997), “The ETS-domain transcription factor family”, International Journal Biochem Cell Biology, 1371-1387.

Shikawa F., Livingston A. G., Minamiguchi H., Wingard J. R., Ogawa M., (2003), “Human cord blood long-term engrafting cells are CD34+ CD38-”, *Leukemia*, 17(5), 960-964.

Srivastava B. I., Rossowski W., Minowada J., (1983), “Cytochemical comparison of immunologically characterized human leukaemia/lymphoma cell lines representing different levels of maturation”, *British Journal of Cancer*, 47(6), 771–779.

Steinman L., Bar-Or A., Behne J. M., Benitez-Ribas D., Chin P. S., Clare-Salzler M., Healey D., Kim J. I., Kranz D. M., Lutterotti A., Martin R., Schippling S., Villoslada P., Wei C., Scott S. Zamvil S.S., Yeaman M. R., Smith T. J., (2016), “Restoring immune tolerance in neuromyelitis optica”, *Neurology*, (5), 33.

Stieglitz E., Loh M. L., (2013), “Genetic predispositions to childhood leukemia”, *Therapeutic Advances In Hematology*, 4(4), 270–290.

Tabe Y., Konopleva M., (2014), “Advances In Understanding The Leukemia Microenvironment”, *British Journal of Hematology*, 164(6), 767–778.

Tasian S. K., Loh M. L., Hunger S. P., (2015), “Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Integrating Genomics into Therapy”, *Cancer*, 121(20), 3577–3590.

Terwilliger T., Abdul-Hay M., (2007), “Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update”, *Blood Cancer Journal*, 7(6), 32-39.

Van Wely K. H., Molijn A. C., Buijs A., Meester-Smoor M. A., Aarnoudse A. J., Hellemons A., (2003), “The MN1 oncoprotein synergizes with coactivators RAC3 and p300 in RARRXR-mediated transcription”, *Oncogene*, (22), 699-709.

Vettermann C., Schlissel M. S., (2011), “Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms”, *Immunology Review*, 237(1), 22–42.

Vlierberghe P. V., Ferrando A., (2012), “The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia”, *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3398–3406.

Walter R. B., Othus M., Burnett A. K., Löwenberg B., Kantarjian H. M., Ossenkoppele G., Hills R., Montfort K. M., Ravandi F., Evans A., Pierce S. R., Appelbaum F., Estey E. H., (2013), “Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients”, *Blood*, 121(13), 2424–2431.

Wang L. D., and Wagers A. J., (2011), “Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(10), 643–655.

Whitehead T. P., Metayer C., Wiemels J. L., Singer A. W., Miller M. D., (2016), “Childhood Leukemia and Primary Prevention”, *Current Problems Pediatric Adolescent Health Care*, 46(10), 317–352.

Wiemels J., (2012), “Perspectives on the Causes of Childhood Leukemia”, *Chemical Biology Interaction Journal*, (3), 196.

Yan L., Qingyu X., Na L., Lili Wang, Hongmei Z., Xiuli W., Jing G., Chongjian C., Yonghui L., Li Y., (2017), “Clinical implications of genome-wide DNA methylation studies in acute myeloid leukemia”, *Journal Hematology Oncology*, (10), 41.

Zhang L., Samad A., Oliveira M. S., Scelo G., Smith M. T., Feusner J., Wiemels J. L., Metayer C., (2015), “Global Characteristics of Childhood Acute Promyelocytic Leukemia”, *Blood Reviews*, 29(2), 101–125.

Zhao X. F., Gojo I., York T., Ning Y., Baer M. R., (2010), “Diagnosis of biphenotypic acute leukemia: a paradigmatic approach”, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(1), 75–86.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Deniz Yener 1983 tarihinde Mersin’de doğdu. Lisans eğitimini 2001-2006 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü’nde tamamladı. Askerlik Görevini yedek subay olarak Gülhane Tıp Akademisi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yaptı. 2011 yılında Gebze Teknik Üniversitesi’nde (GTÜ), Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başlayan Mehmet Deniz Yener anatomi yüksek lisans eğitimini tamamlayıp, yine aynı bölümde doktora eğitimine devam etmektedir.

EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Yayınlar

Numata M., Yener M. D., Ekmekci S. S., Aydın M., Grosveld G., Cardone M., Terranova S., Geltink R. K., Ozbek U., Ozcelik E., Gülec C., Anak S., Karaman S., Ozturk G., Akbiyik M., Kandilci A., (2015), “High MN1 expression increases the in vitro clonogenic activity of primary mouse B-cells”, Leukemia Research., 39(8), 906-12.

Masashi Numata, Mehmet Deniz Yener, Sema Sirma Ekmekci, Muge Aydin Sayitoglu, Gerard Grosveld, Ugur Ozbek, Cagri Gulec, Sema Anak, Serap Karaman, Gulyuz Ozturk, Meral Akbiyik, Ayten Kandilci, “Pediatric TEL-AML1 positive acute lymphoblastic leukemia patients show increased MN1 expression”, (2015), 20th Congress of European-Hematology-Association, Haematologica, 100 (1), 633.

EK B: Telif Hakkı Bulunan Materyaller İçin Alınan İzinler

Şekil No	Lisans Tarihi	Lisans No	Telif Sahibi
3.1	03.01.2018	4261510062466	Cell, Elsevier
3.2	05.01.2018	4262420454523	Nature Publishing Group
4.1	05.01.2018	-	Aspet