ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

# PEDİATRİK ÖNCÜ B-ALL'DE ADAY PROGNOSTİK BİYOBELİRTEÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilara Fatma AKIN

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

2016

**ETİK BEYAN**

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Dilara Fatma AKIN

İmzası

**ONAY**

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ danışmanlığında, Dilara Fatma AKIN tarafından hazırlanan bu çalışma 23/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ İmza:

Üye: Prof.Dr. M.Nejat AKAR İmza:

Üye: Prof.Dr. A.Emin KÜREKÇİ İmza:

Üye: Doç.Dr. Işık YULUĞ İmza:

Üye: Yrd. Doç.Dr. Bala DEDEOĞLU İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Biyoteknoloji Enstitüsü, Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

Pediatrik Öncü B-ALL'de Aday Prognostik Biyobelirteç Genlerinin Araştırılması

Dilara Fatma AKIN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) çocukluk çağında en sık görülen malign hastalıktır. Bu hastalık yaklaşık 150 yıl önce tanımlanmıştır, ancak son 30 yıllık süreçte tedavide %90'lara varan bir başarı oranına ulaşılabilmiştir. Bu başarılı sonuçlara ulaşılmasında çoklu ilaç uygulamaları, santral sinir sistemi profilaksisi, idame ve destek tedavi uygulamaları etkili olmuştur. Tedavide bu kadar başarılı sonuçların alınmasına rağmen nüks ALL için bir risk olmaya devam etmekte ve ALL hastalarının %20'sinde görülmektedir. Tedaviden alınan farklı sonuçlar diğer bütün kanser tiplerinde olduğu gibi ALL'nin de heterojen bir yapıya sahip olduğunu işaret etmektedir. Bu nedenle erken, doğru bir teşhis ile daha etkin bir tedavinin ancak kişiye özgü (hastalık alt gruplarına) tedavi, yöntem ve müdahale stratejilerinin geliştirilmesi ile mümkün olabileceği öngörülmektedir. Bu kapsamda diğer bütün kanser tiplerinde olduğu gibi "lösemi genomunda" yapısal ve/veya işlevsel bozukluk gösteren genler, ALL tanısı, tedavisi ve nüksünün önlenebilmesi için yeni prognostik araçlar olabilme potansiyeli taşımaktadır. Bu genetik değişikliklerden füzyon genlere neden olan kromozomal translokasyonlar çocukluk çağı ALL ön tanısının konması ve risk sınıflandırılması sırasında prognostik olarak kullanılmaktadırlar. Hali hazırda kullanılmakta olan tedavi protokollerinde risk sınıflandırılması için kullanılabilecek genetik belirteçler sınırlıdır. Bu nedenle yeni biyobelirteçler tanımlayabilmek amacı ile son yıllarda öncü B-ALL'li hastalarda yürütülen genom/transkriptom ebatlı çalışmalarda, lenfoid serinin gelişiminde rol oynayan veya hücre döngüsünde görev alan çok sayıda gende kopya sayısı değişimleri, delesyonları, nokta mutasyonları ve ekspresyon farklılıkları gözlenmiştir. Bu çerçevede yürütülmüş olan birçok araştırmada B-ALL teşhisi, prognozu ve tedavisi için aday olabilecek birçok gene

işaret edilmektedir. Bilimsel literatürde 1993–2013 yılları arasında yapılmış olan sistematik bir taramada B-ALL hastalarını içeren toplam 60 adet genom ebadında çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda incelenen hasta grupları ve sonuçları incelendiğinde ***sitogenetik herhangi bir anomali taşımayan B-ALL*** hastalarında (*IKZF1, PAX5, EBF1, CREBBP, CRFL2, JAK2, ERG, CXCR4, ZAP70, VLA4, NF1, NR3C1, RB1, TSLP, ZNRF1, FOXO3A*) genlerinin olası prognostik biyobelirteçler olarak birbirinden bağımsız çalışmalarda işaret edildiği görülmektedir. Bu projede, 60 adet genom ebadındaki çalışma sonucunda tanımlanmış olan 66 gen sistematik bir değerlendirmeden sonra belirlenen toplam 16 gen, sitogenetik anomalisi olmayan ve farklı risk gruplarında bulunan 45 pediatrik öncü B-hücreli akut lenfoblastik lösemili hastasında analiz edilmiştir. Bu genlerden *ZAP70, TSLP, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5, EBF1, CREBBP, FOXO3, RB1, ZNRF1, NR3C1, NF1* ve *ERG'*de daha önce mutasyon ve değişim tanımlanmış ekzonlar yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak çalışılmış ve analiz edilmiştir. *ZAP70, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5, EBF1, CXCR4, VLA4, NF1, NR3C1, ERG*' de ise ifade düzeyi analizleri gerçekleştirilerek bağımsız çalışmalardaki B-ALL teşhisi, prognozu ve tedavisi için aday gösterilen genlerin **doğrulanması** gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda lösemi patogenezinde önemli yolakların saptanması moleküler biyolojisine dair önemli veriler içermenin yanı sıra pediatrik öncü B-ALL de yeni diagnostik, prognostik ve terapotik aday moleküller ortaya koymuştur. Ancak bu genlerin daha fazla sayıda örnek içeren çalışma grubu ile doğrulanması gerekmektedir.

2016, 249 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Pediatrik öncü B-hücreli ALL; prognostik faktör; aday gen; biyobelirteç; yeni nesil DNA dizileme

**ABSTRACT**

PhD Thesis

Screening of Candidate Prognostic Biomarker Genes in Pediatric Precursor B-ALL

Dilara Fatma AKIN

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Hilal OZDAG

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignant disease in childhood. This disease was identified almost 150 years ago, but in the last 30 years, treatment processes have achieved a success rate of up to 90%. These successful outcomes were supported by multi-drug treatments, central nervous system prophylaxis, maintainability and therapeutic applications. Although successful treatment outcome relapse continues to be a risk for ALL and is seen in 20% of patients with ALL. In this case, all other types of cancers as well as ALL have a structure that is heterogeneous. Therefore, individualized treatment methods are more effective than early accurate diagnosis, hence the development of individualised treatment methods and intervention strategies have become necessary. In this context, as in all other types of cancer the leukemia genome contain structural abnormalities several genes leading to their functional dysfunction. These genes have the potential to become novel biomarkers for diagnosis, prognosis, treatment and prevention of relapse. Chromosomal translocations are used as prognostic markers in classification of the diagnosis and during preliminary diagnosis. The current treatment protocols used for the risk classification genetic markers is quite limited. Also in recent years, genomewide studies conducted in patients with precursor B-ALL revealed a large number of genes which play role in the development of lymphoid cells or cell cycle. These genes were observed with copy number changes, deletions, point mutations and expression differences. In this context, many studies are carried out for candidate genes for the diagnosis, prognosis and treatment of B-ALL. Results of recent studies in pediatric precursor B-ALL without cytogenetic abnormalities refer to possible prognostic markers (*IKZF1, PAX5, EBF1, CREBBP, CRFL2, JAK2, ERG, CXCR4, ZAP70, VLA4, NF1, NR3C1, RB1, TSLP, ZNRF1, FOXO3A).*

In this project, our aim was to carry out mutation analysis of the selected exons of *ZAP70, TSLP, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5, EBF1, CREBBP, FOXO3, RB1, ZNRF1, NR3C1, NF1* and *ERG* genes by Next Generation Sequencing and the expression levels of *ZAP70, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5, EBF1, CXCR4, VLA4, NF1, NR3C1* and *ERG* genes by QRT-PCR in 45 patients with pediatric precursor B-ALL.

In our study, detection of leukemia pathogenesis related genes which is an important role in the formation of leukemia have put forward an important data about the molecular biology of pediatric precursor B-ALL. as well as new diagnostic, prognostic and therapeutic candidate molecules. However, these results need to be confirmed by further studies on a larger number of patients.

2016, 249 pages

**Key Words:** Pediatric Precursor B-ALL; prognostic factor; candidate gene;biomarker; next generation DNA sequencing

**TEŞEKKÜR**

Tez çalışmam ve doktora eğitimim süresi boyunca bana her zaman yol gösteren, iyi bir araştırmacı olmam yolunda beni yönlendiren, sabırla destekleyen ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a

Mesleğimi elime almamı ve bu alanda çalışabilme, bu enstitüde eğitim alma şansına sahip olmamı sağlayan, aktardığı, yaşattığı ve sunduğu birbirinden eşsiz bilimsel ve akademik deneyimlerin yanı sıra, karanlıkta kaldığımda hayatıma ışık olan değerli ve eşsiz hocam Prof. Dr. Nejat AKAR'a

Tez çalışmama biyolojik örneklerin sağlanmasında ve çalışma örneklerine ait klinik bilgilere ulaşmamda desteğini esirgemeyen, bilimsel yönü ile her zaman örnek aldığım Sayın hocam Prof. Dr. Emin KÜREKÇİ'ye

Özel Lösante Çocuk ve Yetişkin Hastanesi, Kanser Araştırma ve Genetik Laboratuvarı'nda deneylerimi gerçekleştirmemi ve laboratuvarın tüm imkânlarını kullanmamı sağlayan, tez çalışmam ve doktora eğitimim süresi boyunca benden desteklerini esirgemeyen Sayın hocam Dr. Üstün EZER'e

Bu uzun süreçte hoşgörülü tutumu, güler yüzü ve bilimsel anlamda bildiklerini cömertçe paylaşan, laboratuvarda çalışma sürecimde bana yardımcı olan sevgili Dr. Mine Mumcuğlu'na

İstatistik çalışmalarını gerçekleştiren Yrd. Doç.Dr. Beyza DOĞANAY ERDOĞAN'a,

Deneylerimin gerçekleştirilme sürecinde elinden gelen her şeyi yapan sevgili çalışma arkadaşım Uzm. Bio. Deniz AŞLAR ÖNER'e, uzun yıllardır birlikte çalıştığımız ve beraber olmaktan son derece keyif aldığım, sevgili çalışma arkadaşım Kadir SİPAHİ'ye

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde mali kaynağı sağlayan TÜBİTAK'a (Proje No: 114S030) ve Ankara Üniversitesi BAP'a (Proje No:14L0415002),

Hayatımın en zor, en mutlu günlerini birlikte geçirdiğim, bana her zaman destek olan, çıktığımız yolda birbirimize tutunarak yürümekten vazgeçmediğimiz yol arkadaşım, sevgili eşim Hüseyin'e ve hayatın sadece akademik kariyerden oluşmadığını bana annelik kariyerinde ilerlemeyi öğreten kimi zaman öğretmenim kimi zaman öğrencim olan canım kızım Zeynep'e

Aramızdaki uzaklıkların hiçbir zaman söz konusu olmadığı, yürek bağı ile sonsuza kadar bağlı olduğum, benim ben olmamı sağlayan, bana verdikleri her türlü desteği, emeği ve özveriyi asla ödemeyeceğim canım annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**İÇİNDEKİLER**

**ETİK BEYAN** ..... **İ**

**ÖZET** ..... **İİİ**

**ABSTRACT** ..... **V**

**TEŞEKKÜR** ..... **Vİİ**

**İÇİNDEKİLER** ..... **İX**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **XV**

**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **XX**

**SİMGELER DİZİNİ** ..... **XXİX**

**1. GİRİŞ** ..... **1**

**2. KURAMSAL TEMELLER** ..... **3**

**2.1. PEDİATRİK LÖSEMİLER** ..... **3**

2.1.1. PEDİATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ ..... 4

2.1.1.1. Epidemiyoloji ..... 4

2.1.1.2. Etyopatogenez ..... 5

2.1.1.3. Sınıflandırılması ..... 6

2.1.1.3.1. İmmünolojik Sınıflandırma ..... 7

2.1.1.4. B-Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi ..... 8

2.1.1.4.1. Öncü B-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi ..... 9

2.1.1.4.2. Öncü B-hücreli Akut Lenfoblastik Löseminin Moleküler Temeli ..... 10

**2.2. TANI, PROGNOZ VE TEDAVİ İÇİN PROGNOSTİK BİYO-BELİRTEÇLERİN TANIMLAMA ÇALIŞMALARI ..... 13**

2.2.1. PEDİATRİK ÖNCÜ B-ALL MOLEKÜLER TEMELİNDE GÖREV ALAN ADAY BİYOBELİRTEÇ GENLERİN SEÇİLMESİ ..... 13

2.2.1.1. Seçilen Aday Genlerinin Gruplandırılması ..... 19

2.2.1.1.1. Yaşamsal Faaliyetlerden Sorumlu Genler ..... 19

2.2.1.1.2. Sinyal İletim Mekanizması İle İlişkili Genler ..... 30

2.2.1.1.3. Gen İfadesi Kontrolünü Sağlayan Genler ..... 35

2.2.1.1.4. Epigenetik Regülasyon/ Tedaviye Cevapta Görev Alan Genler ..... 41

2.2.2. BİYOBELİRTEÇ TANIMLAMA İÇİN KULLANILACAK MOLEKÜLER TEKNİKLER ..... 45

2.2.2.1. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ..... 45

2.2.2.2. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR) ..... 47

**3. GEREKÇE VE AMAÇ ..... 49**

**4. MATERYAL VE YÖNTEM ..... 51**

**4.1. MATERYAL ..... 51**

4.1.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI ..... 51

**4.2. YÖNTEM ..... 53**

4.2.1. LÖSEMİ TANISINDA VE RİSK SAPTAMASINDA KULLANILAN PARAMETRELER ..... 53

4.2.2. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI ..... 53

4.2.3. MUTASYON ANALİZİ ..... 53

4.2.3.1. DNA İzolasyonu ..... 53

4.2.3.1.1. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi ..... 54

4.2.3.2. Mutasyon Analiz Çalışması İçin Kullanılacak Primer Çiftlerinin Tasarımı ..... 55
4.2.3.3. Amplikon Kütüphanesinin Hazırlanması ..... 58
4.2.3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ..... 58
4.2.3.3.2. Amplikon Pürifikasyonu ..... 59
4.2.3.3.3. Amplikon Kütüphanesinin Miktar Tayini ..... 60
4.2.3.4. Emulsion PCR (em-PCR) ..... 63
4.2.3.4.1. Emülsiyonun Kırılması ve Boncukların Geri Kazanımı ..... 64
4.2.3.4.2. Boncuk Sayımı ..... 65
4.2.3.5. Pico Titer Plate Yükleme ve Dizileme Hazırlık İşlemleri ..... 65
4.2.4. GEN İFADE ANALİZİ ..... 66
4.2.4.1. RNA İzolasyonu ..... 66
4.2.4.1.1. Kandan RNA İzolasyonu ..... 66
4.2.4.1.2. Hücrelerin Çözülmesi Kültür ve RNA İzolasyonu ..... 68
4.2.4.1.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi ..... 70
4.2.4.1.4. RNA Konsantrasyonlarının Ayarlanması ..... 70
4.2.4.2. cDNA Sentezi ..... 71
4.2.4.2.1. Referans Genin Belirlenmesi ..... 72
4.2.4.3. Gen İfade Analizinde Kullanılacak Olan Primer Çiftlerinin Tasarlanması ..... 72
4.2.4.3.1. Primer Çiftlerinin Optimizasyonu ..... 73
4.2.4.4. Kantitatif Eş Zamanlı PCR ..... 73
4.2.4.4.1. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Standartlarının Hazırlanması ..... 74

4.2.4.4.2. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Kurulumu ..... 75

**5. ARAŞTIRMA BULGULARI ..... 78**

**5.1. DEMOGRAFİK BULGULAR ..... 78**

**5.2. KLİNİK BULGULAR ..... 78**

5.2.1. HASTALARIN TANISAL ÖZELLİKLERİ ..... 78

**5.3. DENEYSEL BULGULAR ..... 80**

5.3.1. İZOLASYON SONUÇLARI ..... 80

5.3.1.1. DNA İzolasyon Sonuçları ..... 80

5.3.1.2. RNA İzolasyon Sonuçları ..... 80

5.3.1.2.1. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları ..... 81

5.3.2. MUTASYON ANALİZİ SONUÇLARI ..... 81

5.3.2.1. Primer-PCR Optimizasyon Sonuçları ..... 81

5.3.2.2. Örneklerin-Picogreen Flurometrik Ölçümlerinin Sonuçları ..... 82

5.3.2.3. Yeni Nesil Dizileme Çalışması Koşum Sonuçları ..... 83

5.3.2.4. Tespit Edilen Değişimlerin Protein-Gen Yapısındaki Gösterimleri ..... 88

5.3.2.4.1. ZNRF1 Geni ve Molekülü ..... 89

5.3.2.4.2. TSLP Geni ve Molekülü ..... 91

5.3.2.4.3. ERG Geni ve Molekülü ..... 92

5.3.2.4.4. CREBBP Geni ve Molekülü ..... 94

5.3.2.4.5. ZAP70 Geni ve Molekülü ..... 95

5.3.2.4.6. JAK2 Geni ve Molekülü ..... 96

5.3.2.4.7. IKZF1 Geni ve Molekülü ..... 97

5.3.2.4.8. NR3C1 Geni ve Molekülü ..... 99

5.3.2.4.9. EBF1 Geni ve Molekülü ..... 101

5.3.2.4.10. FOXO3A Geni ve Molekülü ..... 102

5.3.2.4.11. PAX5 Geni ve Molekülü ..... 104

5.3.2.4.12. RB1 Geni ve Molekülü ..... 105

5.3.2.4.13. CRFL2 Geni ve Molekülü ..... 107

5.3.2.4.14. NF1 Geni ve Molekülü ..... 110

5.3.2.5.Çalışma Örneklerinde Saptanan Değişimlerinin Dağılımının Şemasal Gösterimi 111

5.3.2.5.1. Saptanan Değişimlerin Yapısal Özelliklerine Göre Çalışma Gruplarında Gösterilmesi ..... 112

5.3.2.5.2. Saptanan Değişimlerin Fonksiyonel Sonuçlarına Göre Çalışma Gruplarında Gösterilmesi ..... 115

5.3.2.6. Mutasyon Analizinin İstatistiksel Değerlendirilmesi ..... 119

5.3.2.6.1.Saptanan Değişimlerinin Çalışma Gruplarında Dağılımının Değerlendirilmesi 119

5.3.2.6.2.Saptanan Değişimlerinin Tedavi ve İzlem Parametreleri ile Değerlendirilmesi 121

5.3.2.6.3. Risk Sınıflandırılmasına Göre Saptanan Değişimlerin Dağılımı ..... 155

5.3.3. GEN İFADE ANALİZİ SONUÇLARI ..... 157

5.3.3.1. Amplifikasyon Eğrileri ve Ortalama Cp Değerleri ..... 157

5.3.3.2. Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi ve Sonuçları ..... 157

5.3.3.3. Gen İfade Değişikliği Oranlarınn Hesaplanması ve Sonuçları ..... 157

5.3.3.4. Hasta ve Kontrol Grubunda Hedeflenen Genlerin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması ..... 158

5.3.3.5. Klinik Bulgular ile Hedeflenen Genlerin İfade Düzeyleri Arasındaki İlişki ..... 159

**6. TARTIŞMA VE SONUÇ ..... 166**

**6.1. TARTIŞMA ..... 166**

6.1.1. MUTASYON ANALİZİ ..... 167

6.1.2. GEN İFADE ANALİZİ ..... 173

**6.2. SONUÇ ..... 174**

**7. KAYNAKLAR ..... 176**

**8. EKLER ..... 194**

**9. ÖZGEÇMİŞ ..... 241**

**10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR ..... 242**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal hematopoezde lösemi ortaya çıkış basamakları (5) ..... 3

Şekil 2.2.0-14 Yaş Gruplarındaki Erkek Çocuklarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (12) ..... 5

Şekil 2.3.0-14 Yaş Gruplarındaki Kız Çocuklarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (12) ..... 5

Şekil 2.4.Pediatrik B-ALL'de görülmekte olan gen yeniden düzenlenmeleri, translokasyonlar ve mutasyona uğrayan genler (41) ..... 12

Şekil 2.5.Öncü B- ALL sinyal yolağı-1 (44) ..... 15

Şekil 2.6.Öncü B-ALL sinyal yolağı-II (44) ..... 15

Şekil 2.7. Aday genlerin seçilmesi için yapılan işlemlerin akış şeması ..... 16

Şekil 2.8. *VLA-4* kromozomal lokasyonu (48) ..... 20

Şekil 2.9. *CXCR4* kromozomal lokasyonu (48) ..... 21

Şekil 2.10.*ERG* kromozomal lokasyonu (48) ..... 23

Şekil 2.11.*FOXO3A* kromozomal lokasyonu (48) ..... 25

Şekil 2.12.*RB1* kromozomal lokasyonu (48) ..... 26

Şekil 2.13.*ZNRF1* kromozomal lokasyonu (48) ..... 28

Şekil 2.14.*NF1* kromozomal lokasyonu (48) ..... 28

Şekil 2.15.*ZAP70* kromozomal lokasyonu (48) ..... 30

Şekil 2.16.*CRLF2* kromozomal lokasyonu(48) ..... 32

Şekil 2.17.*TSLP* kromozomal lokasyonu (48) ..... 32

Şekil 2.18. *JAK2* kromozomal lokasyonu (48) ..... 34

Şekil 2.19.*IKZF1* kromozomal lokasyonu (48) ..... 35

Şekil 2.20. *PAX5* kromozomal lokasyonu (48) ..... 37

Şekil 2.21. *EBF1* kromozomal lokasyonu (48) ..... 39

Şekil 2.22.*CREBBP* kromozomal lokasyonu (48) ..... 41

Şekil 2.23. *NR3C1* kromozomal lokasyonu (48) ..... 43

Şekil 2.24.Yeni nesil dizileme teknolojisi çalışma prensibi (175) ..... 47

Şekil 4.1.Yeni nesil sekanslama sistemine uygun primer yapısı (179) ..... 55

Şekil 4.2. IDT veri tabanı aday primer özellikleri/ olası dimer yapıları ekran görüntüsü/ Blast veri tabanı ekran görüntüsü/ İn-silico PCR sonucu ekran görüntüsü (180, 181) ..... 56

Şekil 4.3. Amplikon kütüphanesi hazırlanması akışı ..... 58

Şekil 4.4.Standartların hazırlanması-seri dilüsyon aşamalar ..... 61

Şekil 4.5. Dilüsyon denklemi ..... 63

Şekil 4.6.Dilüsyon sırası ..... 63

Şekil 4.7.em- PCR aşamaları (179) ..... 64

Şekil 4.8.DNA bead Enrichment- Bead miktarı hesaplama (179) ..... 65

Şekil 4.9.Boncuk yükleme sırası ..... 66

Şekil 4.10.Pico titer Device – Dizileme Hazırlık işlemleri (179) ..... 66

Şekil 4.11.İfade oranı hesaplamak için gerekli olan formül ..... 74

Şekil 4.12. Seri dilüsyon hazırlanması ..... 74

Şekil 5.1.A EBF1 geni, B PAX5 geni PCR optimizasyon sonuçları temsili agaroz jel görüntüleri ..... 82

Şekil 5.2. **A.** Standartların konsantrasyon aralığı- **B**. Standart eğri..... 82

Şekil 5.3.Yeni Nesil Dizileme çalışması temsili çalışma sonucu..... 84

Şekil 5.4.Sequence Pilot Module SeqNext Patient yazılım programı temsili görüntüsü(188) ..... 85

Şekil 5.5. Okuma aralıklarına düşen değişim sayısı..... 85

Şekil 5.6. Tespit edilen değişimlerin yapısal özelliklerine göre dağılımı ..... 86

Şekil 5.7.Her bir gendeki tespit edilen değişim sayıları..... 86

Şekil 5.8. Her bir hastada tespit edilen değişim sayısı ..... 87

Şekil 5.9. Saptanan değişimlerin ZNRF1 gen ve protein yapısında gösterimi ve anahtarı . 89

Şekil 5.10.Saptanan değişimlerin TSLP gen ve protein yapısında gösterimi..... 91

Şekil 5.11.Saptanan değişimlerin ERG gen ve protein yapısında gösterimi ..... 92

Şekil 5.12.Saptanan değişimlerin CREBBP gen ve protein yapısında gösterimi..... 94

Şekil 5.13.Saptanan değişimlerin ZAP70 gen ve protein yapısında gösterimi ..... 95

Şekil 5.14.Saptanan değişimlerin JAK2 gen ve protein yapısında gösterimi..... 96

Şekil 5.15.Saptanan değişimlerin IKZF1 gen ve protein yapısında gösterimi ..... 97

Şekil 5.16.Saptanan değişimlerin NR3C1 gen ve protein yapısında gösterimi..... 99

Şekil 5.17.Saptanan değişimlerin EBF1 gen ve protein yapısında gösterimi..... 101

Şekil 5.18.Saptanan değişimlerin FOXO3A gen ve protein yapısında gösterimi ..... 102

Şekil 5.19.Saptanan değişimlerin PAX5 gen ve protein yapısında gösterimi..... 104

Şekil 5.20.Saptanan değişimlerin RB1 gen ve protein yapısında gösterimi..... 105

Şekil 5.21.Saptanan değişimlerin CRFL2 gen ve protein yapısında gösterimi..... 107

Şekil 5.22.Saptanan değişimlerin NF1 gen ve protein yapısında gösterimi ..... 110

Şekil 5.23. Hasta ve kontrol örneklerinde saptanan değişimlerin yapısal özelliklerine göre şemasal gösterimi. A. RB1, FOXO3A, ZNRF1, NF1, ERG Genleri. B. ZAP70, JAK2, TSLP, CRFL2 Genleri C. EBF1, PAX5, IKZF1 Genleri. D. NR3C1 ve CREBBP Genleri ..... 114

Şekil 5.24. Hasta ve kontrol örneklerinde saptanan değişimlerin fonksiyonel sonuçlarına göre şemasal gösterimi. A. RB1, FOXO3A, ZNRF1, NF1, ERG Genleri. B. ZAP70, JAK2, TSLP, CRFL2 Genleri C. EBF1, PAX5, IKZF1 Genleri. D. NR3C1 ve CREBBP Genleri ..... 117

Şekil 5.25.Risk sınıflandırılmasına göre standart risk grubuna dâhil hastalarda değişim görülmekte olan genler ..... 155

Şekil 5.26. Risk sınıflandırılmasına göre orta risk grubuna dâhil hastalarda değişim görülmekte olan genler ..... 156

Şekil 5.27. Risk sınıflandırılmasına göre yüksek risk grubuna dâhil hastalarda değişim görülmekte olan genler ..... 156

Şekil 5.28. Hasta ve Kontrol grubunda hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması ..... 159

Şekil 5.29.Hasta örneklerinde tedavi son durumlarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması ..... 160

Şekil 5.30.Hasta örneklerinde risk durumlarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması ..... 162

Şekil 5.31.Hasta örneklerinde glukokortikoid direnci göstermesine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması ..... 163

Şekil 5.32.Hasta örneklerinde tanılarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması ..... 164

Şekil 5.33.Hasta örneklerinde verilen tedavi protokollerine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması ..... 165

Şekil 8.1.Etik Kurul Kararı-ilk sayfa..... 194

Şekil 8.2.Etik Kurul Kararı-ikinci sayfa..... 195

Şekil 8.3. Genlere ait amplifikasyon eğrileri grafik görselleri ..... 233

Şekil 8.4.Genlere ait erime eğrileri (Melting Curve) görselleri ..... 237

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.ALL FAB sınıflaması (19) ..... 6

Çizelge 2.2. B-ALL patogenezi, immünolojik ve genetik sınıflandırma (14, 28, 29)..... 9

Çizelge 2.3. B-ALL alt tiplerine ait klinik, immünolojik ve genetik özellikler (28-30) ..... 9

Çizelge 2.4. B-ALL de görülmekte olan genetik anomalilerin karakterizasyonu (27, 31) ... 9

Çizelge 2.5. Çalışılması planlanan genlerin kromozomal lokalizasyonu, fonksiyonları, prognoz ile ilişkisi, anomali sıklığı, türü ve çalışma içerisinde gruplandırılması ..... 17

Çizelge 4.1.Hasta örneklerine ait dosyalarda taranmış demografik ve klinik parametreler 52

Çizelge 4.2.Genlere ait bilgiler ve çalışmaya dâhil edilen ekzon bölgeleri ..... 55

Çizelge 4.3.Yeni nesil dizileme çalışması için tasarlanan ve uygun bulunan primer listesi56

Çizelge 4.4.Yeni nesil dizileme çalışması PCR reaktif protokolü ..... 58

Çizelge 4.5.Yeni nesil dizileme çalışması termal döngü protokolü ..... 59

Çizelge 4.6.Standartların içerdiği DNA miktarı ..... 61

Çizelge 4.7.em- PCR Bileşenleri ..... 64

Çizelge 4.8.em-PCR termal döngü protokolü ..... 64

Çizelge 4.9.cDNA sentezi için gerekli reaktif miktarı ..... 71

Çizelge 4.10. cDNA sentezi için termal döngü koşulları ..... 72

Çizelge 4.11.qRT-PCR için tasarlanan primer çiftleri ..... 72

Çizelge 4.12.Optimize edilen bağlanma sıcaklıkları ..... 73

Çizelge 4.13.Kantitatif Eş Zamanlı PCR reaksiyon koşulları ..... 75

Çizelge 4.14. Kantitatif Eş Zamanlı PCR termal döngü koşulları..... 76

Çizelge 5.1.Çalışma grupları ..... 78

Çizelge 5.2.Çalışmaya dâhil edilen hasta ve kontrol grubu demografik özellikleri..... 78

Çizelge 5.3.Hastaların tedavi ve izlem özellikleri..... 79

Çizelge 5.4. Hasta ve kontrol örneklerine ait genomik DNA'ların spektrofotometrik okumaları..... 80

Çizelge 5.5.Çalışma örneklerine ait toplam RNA'ların spektrofotometrik okumaları..... 80

Çizelge 5.6.Hasta örneklerine ait 500 ng RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları ..... 81

Çizelge 5.7.Yeni nesil dizilme çalışması tüm örneklerin koşum sonuçları..... 84

Çizelge 5.8.Çalışma örneklerinin değişim taşıdığı genler ve değişim sayıları..... 87

Çizelge 5.9.ZNRF1 geninin insan da sırasıyla 18. ve 37. pozisyonlarında yer alan valin ve trizon aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması..... 90

Çizelge 5.10. ZNRF1 geninin insan da sırasıyla 75. ve 107. pozisyonlarında yer alan alanin ve glisin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması ..... 91

Çizelge 5.11. İnsan ERG geninin 16. pozisyonunda yer alan glutamik asit aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması..... 93

Çizelge 5.12. İnsan ERG geninin 53. pozisyonunda yer alan tirozin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması..... 93

Çizelge 5.13.IKZF1 geninin insan da sırasıyla 215., 225., 229., 231., 234., 235. ve 237. pozisyonlarında yer alan serin, asparajin, serin, glisin, treonin ve trizon aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması..... 98

Çizelge 5.14. İnsan NR3C1 geninin sırasıyla 12., 17. pozisyonlarında yer alan glutamik asit ve serin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri karşılaştırılması..... 100

Çizelge 5.15. İnsan NR3C1 geninin 413. pozisyonunda yer alan treonin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması ..... 100

Çizelge 5.16. İnsan FOXO3A geninin 5. pozisyonunda yer alan prolin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması ..... 103

Çizelge 5.17. İnsan PAX5 geninin 119. pozisyonunda yer alan lösin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması ..... 105

Çizelge 5.18. İnsan RB1 geninin sırasıyla 623., 650. ve 653. pozisyonlarında yer alan asparajin, fenilalanin ve lizin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizilerinin ile karşılaştırılması ..... 106

Çizelge 5.19. İnsan RB1 geninin 726. pozisyonunda yer alan treonin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması ..... 107

Çizelge 5.20. İnsan CRLF2 geninin sırasıyla 34., 37., 42. ve 43. pozisyonlarında yer alan izolösin, fenilalanin, valin ve glutamin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması ..... 109

Çizelge 5.21. İnsan CRLF2 geninin sırasıyla 45., 86.pozisyonlarda yer alan treonin ve lösin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması ..... 109

Çizelge 5.22. İnsan CRLF2 geninin sırasıyla 100., 101., 108. ve 115. pozisyonlarında yer alan arjinin, asparajin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması ..... 109

Çizelge 5.23. İnsan CRLF2 geninin 206. pozisyonunda yer alan valin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması ..... 110

Çizelge 5.24. İnsan NF1 geninin sırasıyla 821., 825. ve 855. pozisyonlarında yer alan serin ve arginin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması ..... 111

Çizelge 5.25. Saptanan yanlış anlam mutasyonların çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması ..... 119

Çizelge 5.26. Saptanan anlamsız mutasyonların çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması ..... 119

Çizelge 5.27.Saptanan sessiz mutasyonların çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması ..... 119

Çizelge 5.28.Saptanan indel değişimlerin çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması ..... 120

Çizelge 5.29. Saptanan delesyon değişimlerin çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması ..... 120

Çizelge 5.30.Saptanan duplikasyon değişimlerin çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması ..... 120

Çizelge 5.31.Saptanan insersiyon değişimlerin çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması ..... 121

Çizelge 5.32.Tedavi son durumu ve *ZNRF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 122

Çizelge 5.33.Risk durumu ve *ZNRF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ... 122

Çizelge 5.34.Tanı ve *ZNRF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 123

Çizelge 5.35.Tedavi protokolü ve *ZNRF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 123

Çizelge 5.36.Tedavi son durumu ve *TSLP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 124

Çizelge 5.37.Risk durumu ve *TSLP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 124

Çizelge 5.38.Tanı ve *TSLP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 125

Çizelge 5.39.Tedavi protokolü ve *TSLP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi 125

Çizelge 5.40. Tedavi son durumu ve *ERG* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 126

Çizelge 5.41. Risk durumu ve *ERG* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi..... 127

Çizelge 5.42. Tanı ve *ERG* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 127

Çizelge 5.43. Tedavi protokolü ve *ERG* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi 128

Çizelge 5.44. Tedavi son durumu ve *CREBBP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 128

Çizelge 5.45. Risk durumu ve *CREBBP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi 129

Çizelge 5.46.Tanı ve *CREBBP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 130

Çizelge 5.47. Tedavi protokolü ve *CREBBP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 130

Çizelge 5.48. Tedavi son durumu ve ZAP70 değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 131

Çizelge 5.49.Risk durumu ve *ZAP70* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi .... 132

Çizelge 5.50.Tanı ve *ZAP70* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi..... 132

Çizelge 5.51. Tedavi protokolü ve *ZAP70* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 133

Çizelge 5.52. Tedavi son durumu ve *JAK2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 133

Çizelge 5.53. Risk durumu ve *JAK2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 134

Çizelge 5.54. Tanı ve *JAK2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi..... 134

Çizelge 5.55.Tedavi protokolü ve *JAK2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi 135

Çizelge 5.56. Risk durumu ve *IKZF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi.... 136

Çizelge 5.57. Tanı ve *IKZF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 136

Çizelge 5.58. Tedavi son durumu ve *IKZF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 137

Çizelge 5.59. Tedavi protokolü ve *IKZF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 137

Çizelge 5.60.Tedavi protokolü ve *NR3C1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 138

Çizelge 5.61. Risk durumu ve *NR3C1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi... 139

Çizelge 5.62. Tanı ve *NR3C1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 139

Çizelge 5.63.Tedavi protokolü ve *EBF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi 140

Çizelge 5.64. Risk durumu ve *EBF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 140

Çizelge 5.65. Tanı ve *EBF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 141

Çizelge 5.66. Tedavi son durumu ve *EBF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 141

Çizelge 5.67. Tedavi son durumu ve *NR3C1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 142

Çizelge 5.68. Tedavi son durumu ve *FOXO3A* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 143

Çizelge 5.69. Tedavi protokolü ve *FOXO3A* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 144

Çizelge 5.70. Risk durumu ve *FOXO3A* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi 144

Çizelge 5.71. Tanı ve *FOXO3A* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi..... 145

Çizelge 5.72. Risk durumu ve *PAX5* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 145

Çizelge 5.73. Tanı ve *PAX5* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 146

Çizelge 5.74.Tedavi son durumu ve *PAX5* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 146

Çizelge 5.75. Tedavi protokolü ve *PAX5* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 147

Çizelge 5.76. Risk durumu ve *RB1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 148

Çizelge 5.77. Tanı ve *RB1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi..... 148

Çizelge 5.78. Tedavi son durumu ve *RB1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 149

Çizelge 5.79. Tedavi protokolü ve *RB1*değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi.. 149

Çizelge 5.80. Tanı ve *CRFL2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi..... 150

Çizelge 5.81.Tedavi son durumu ve *CRFL2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 151

Çizelge 5.82. Tedavi protokolü ve *CRFL2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 151

Çizelge 5.83. Tanı ve *NF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi..... 152

Çizelge 5.84. Tedavi son durumu ve *NF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 153

Çizelge 5.85. Tedavi protokolü ve *NF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi 153

Çizelge 5.86. Risk durumu ve *NF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi ..... 154

Çizelge 6.1.Mutasyon analizi yapılmış olan genlerin dâhil edildiği hücresel yolaklar..... 168

Çizelge 6.2.Gen ifade analizi yapılmış olan genlerin dâhil edildiği hücresel yolaklar ..... 173

Çizelge 8.1. 1993-2013 yılları arasında yapılmış olan DNA veya RNA boyutundaki çalışmalar ..... 196

Çizelge 8.2. Primer çiftlerinin 96 kuyulu çalışma platelerine yerleşim görüntüsü ..... 202

Çizelge 8.3. Çalışma örneklerinin çalışma platelerine yerleşimi ..... 203

Çizelge 8.4.Hasta ve kontrol grubu örneklerine ait demografik, klinik ve tanısal parametreler ..... 203

Çizelge 8.5.Pürifikasyon sonrası amplikon kütüphanelerinin picogreen ölçüm sonuçları 209

Çizelge 8.6.ZNRF1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı .....208

Çizelge 8.7.TSLP geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı.....209

Çizelge 8.8.ERG geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı.....210

Çizelge 8.9.CREBBP geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı.....211

Çizelge 8.10.ZAP70 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı..... 212

Çizelge 8.11.JAK2 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı.....213

Çizelge 8.12.IKZF1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı.....215
215

Çizelge 8.13.NR3C1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı ..... 218

Çizelge 8.14.EBF1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı.....221

Çizelge 8.15.FOXO3A geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı ..... 223

Çizelge 8.16.PAX5 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı..... 232

Çizelge 8.17.RB1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı..... 232

Çizelge 8.18.CRFL2 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı..... 232

Çizelge 8.19.NF1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı..... 232

Çizelge 8.20.Örneklerin ortalama Cp değerleri.....234

Çizelge 8.21.Örneklerin gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları.....238

## SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---|---|
| °C | Santigrat derece |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolite |
| ALL | Akut Lenfoblastik Lösemi |
| AML | Akut Miyeloblastik Lösemi |
| AKT | Alpha serine/threonine-protein kinase |
| ATP | Adenozin tri Fosfat |
| B-ALL | B hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi |
| Bç | Baz çifti |
| BFM | Berlin-Frankfurt-Munster |
| BCR-ABL1 | Break Point Cluster- Abelson fusion gene |
| CD | Cluster of Differantiation- Farklılaşma Kümeleri |
| CRFL2 | Cytokine Receptor-Like Factor 2 |
| CP | Crossing Point |
| COG | Children's Oncology Group |
| CREBBP | CREB Binding Protein |
| c-DNA | Complementary Deoksiribonükleik asit, Komplementer Deoksiribonükleik asit |
| CXCR4 | CXC Chemokine Receptor 4 |
| DD | Dimerizasyon Domain |
| DBD | DNA Bağlanma Domain |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| d-NTP | Deoksinükleotid trifosfat |
| dsDNA | double-strand Deoksiribonükleik asit |

| | |
|---|---|
| E | Efficiency |
| E2A | Transcription Factor 3 |
| EM-PCR | Emulsion Polimerase Chain Reaction |
| ERG | ETS-Related Gene |
| EDTA | Etilen Diamin Tetra Asetikasit |
| ETS | E26 transformation-specific |
| FAB | French-American-British |
| FERM | Family of 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin |
| FISH | Fluorescence In Situ Hybridisation- Floresan In Situ Hibridizasyon |
| FLT3 | FMS Like Tyrosine Kinase 3 |
| FN3 | Fibronectin type III |
| FOXO3A | Forkhead box class O 3A |
| GTP | Guanozin trifosfat |
| GDP | Guanozin difosfat |
| GRD | GAP-Related Domain |
| HAT | Histon asetil transferaz |
| HGMD | Human Genome Mutation Database |
| h-GR | human Glucocorticoid Receptor |
| HD | Homoeo Domain |
| IGH | Immunoglobulin Heavy Locus |
| IKZF1 | Ikaros Family Zinc Finger-1 |
| IL-7 | Interluekin-7 |
| IRA1-2 | Intramolecular regulator of ATP hydrolysis 1-2 |
| JAK2 | Janus Kinase |
| JMML | Juvenil miyelomonositik lösemi |
| KEGG | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes |

| | |
|---|---|
| MID | Multiplex Identifiers |
| MLL | Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia |
| MRD | Minimal Residual Disease |
| m-RNA | Messenger- Ribonükleik asit |
| miRNA | Mikro Ribonükleik asit |
| NF1 | Nörofibromatosiz Tip 1 |
| NR3C1 | Nuclear receptor subfamıly 3, group c1 |
| OD | Oktapeptid Domain |
| q-RT PCR | Quantitative Real Time PCR, Kantitatif Eş Zamanlı PCR |
| PD | Paired Domain |
| PAX5 | Paired Box Domain Gene 5 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polimerase Chain Reaction |
| PNT | Pointed Domain |
| PPi | Pirofosfat |
| RAS | Rat Sarcoma Virus |
| RB1 | Retinoblastoma 1 |
| RNA | Ribonükleik asit |
| RPLP0 | Ribosomal Protein, Large, P0 |
| SDF-1 | Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12-CXCL12 |
| SNP | Single Nucleotid Polymorphism |
| SSU | Small subunit |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins |
| t | Translokasyon |
| TAD | Transaktivasyon Domain |
| T-ALL | T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi |

| | |
|---|---|
| TE | Tris-Etilendiamintetraasetikasit |
| TM | Melting Temperature |
| TSLP | Thymic Stromal Lymphopoietin Protein |
| TSLPR | Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor |
| UTR | Un Translated Region |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule 1 |
| VLA4 | Very Late Antigen–4 |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |
| WD-40 | Tryptophan-aspartic acid |
| ZAP70 | Zeta-Chain (tcr)-Associated Protein Kinase 70 |
| ZNRF1 | Zinc And Ring Finger 1 |

# 1. GİRİŞ

Pediatrik (çocukluk çağı) kanserleri içinde dünyada ve ülkemizde birinci sırayı lösemiler almaktadır. Pediatrik lösemilerde geliştirilmiş risk değerlendirmeleri, yeni kemoterapötik ilaçların özellikle de hedefe yönelik ilaçların kullanımı ve destek tedavilerinin iyileştirilmesi sayesinde yaşam yüzdelerinde belirgin bir artış kaydedilmiştir. Lösemi de diğer kanser türleri gibi multigenik, multifaktöriyel, kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Sitogenetik bozuklukların ve bu sitogenetik bozukluklar sonucunda oluşan moleküler değişimlerin lösemilerin patogenezinde ve prognozunda belirleyici olduğu bilinen bir gerçektir. Hatta bazı sitogenetik bozuklukların ve bunların meydana getirdiği moleküler değişimlerin bilinmesi bu basamaklara etki eden tedavi seçeneklerinin bulunmasına ve bu sayede kemoterapiye dirençli ve nüks gösteren lösemilerin tedavi edilmesine de olanak sağlamaktadır. Sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'de tanımlanamayan alt tiplerinin sınıflandırılmasında ya da yeni alt tiplerin belirlenmesinde önemi yüksektir. Genel olarak bir hastalığın ve özelde bir kanser türünün genetik alt tiplerinin tanımlanmasının ardından yeni kişiselleştirilmiş tedavi (tanımlanmış hastalık alt gruplarına özgü) metotlarının geliştirilmesi, risk sınıflandırılmasının yapılması ve prognozun öngörülmesi mümkün olabilmektedir. Bu nedenle kanser kişiselleştirilmiş tedavinin en çok yarar gösterebileceği düşünülen hastalıklardan biridir.

Genom projesinin büyük ölçüde tamamlanması ile bu projenin paralelinde mikrodizin, yeni nesil dizileme gibi yeni teknolojiler ile biyoinformatik analiz yaklaşımların doğması ve araçlarının gelişmesi genetik alanındaki çalışmalara büyük bir hız kazandırmıştır. Bu artan bilgi ve gelişen teknolojiler sayesinde aynı anda yüzbinler hatta milyonlarca moleküler biyo-belirteç tanımlanabilmekte, bu analizler yüzler hatta binlerce kişi için aynı anda gerçekleştirilebilmekte ve analiz sonuçları biyoinformatik araçlarla kısa sürede ve doğru bir şekilde yorumlanabilmektedir. Bu nedenle günümüzde, kanser araştırma alanında bilimsel çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Artık herhangi bir alanın herhangi bir konusunda çok sayıda, birbirinden bağımsız yapılmış ve birbirinden farklı sonuçlara ulaşmış çalışmalara rastlanabilmektedir. Ancak, araştırmaların sayısının gün geçtikçe artmasıyla birlikte, bu araştırmaların sonuçlarının karşılaştırmalı olarak analiz edilmesinde güçlükler yaşanabilmektedir. Tüm bu kaynakların incelenmesi, bulgularının gözden geçirilmesi, sonuçlarının ve önerilerinin dikkate alınabilmesi bu nedenle bu bilgilerin bir

çatı altında düzenlenmesi, tekrar bir analiz sürecinden geçirilmesi ve yeni yorum ve kararlara varılması gereksinimi doğurmaktadır. Bu gereksinimlerin karşılanması için benzer olanlar karşılaştırılabilir ancak bağımsız araştırmaların sonuçlarının meta analize alınarak bu bulguların birbirlerini doğruluyabilirlikleri hesaplamalı olarak değerlendirilebilmektedir. Sunulmakta olan tez çalışmasında B-ALL'de tanımlanmış prognostik bilgi değeri olan gen mutasyon ve/veya gen ifade düzey farklılıklarını tanımlayan bağımsız çalışmaların verileri sistematik bir analiz alınmış ve bu analiz sonrası belirlenen aday moleküler belirteçler bağımsız bir hasta grubunda çalışılarak bu parametrelerin belirteç değerleri tek tek veya çoklu olarak sorgulanmıştır.

Bu tez çalışmasının gerekçe ve dayanaklarının yeterince aktarılabilmesi amacıyla bölümlerini oluşturan kuramsal temeller bölümünde pediatrik lösemilerinin tanımlanması, sınıflandırılması ve lösemi alt tipi olan pediatrik öncü B hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (B-ALL)'nin moleküler temelinin belirlenmesi incelendikten sonra, aday olarak belirlenmiş genlerle ilgili bugüne kadar yürütülmüş olan çalışmalara yer verilecektir.

Bölümün son kısmında ise çalışmanın DNA ve RNA boyutunda analizlerini sırasıyla oluşturacak olan aday genlerin seçilmesi, yeni nesil dizileme teknolojisi ve kantitatif Real Time PCR metodunun temelleri açıklanacaktır. Bu bölümün ardından araştırma metodolojisi, pediatrik öncü B-ALL moleküler analizi ve bulgulara yer verilecektir. Son olarak tez çalışması ile elde edilen veriler, literatürdeki veriler ışığında tartışılarak çeşitli sonuçlar sunulacaktır.

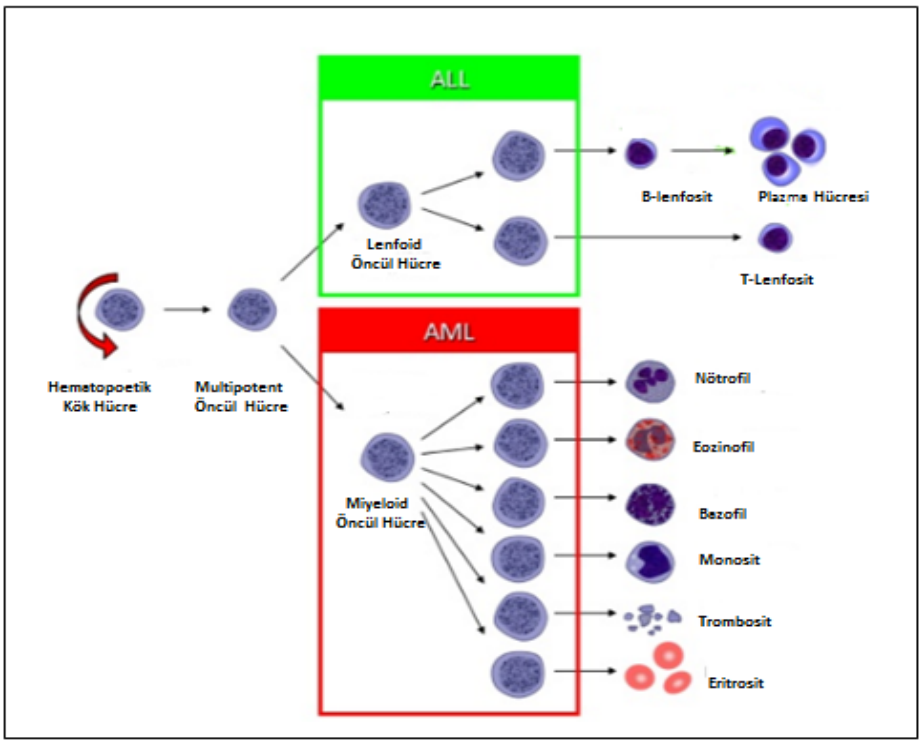
# 2. KURAMSAL TEMELLER

## 2.1. PEDİATRİK LÖSEMİLER

Lösemi, kemik iliğindeki progenitör hücrelerinin belli bir farklılaşma evresinde duraklaması ve klonal bir şekilde kontrolsüz çoğalması sonucu, başta kemik iliği olmak üzere tüm doku organların infiltrasyonu ile seyreden ve tedavi edilmediği zaman mutlak ölümle sonuçlanan, etiyolojisi kesin olarak bilinmeyen malign bir hastalık grubudur (1, 2).

Lösemi ilk olarak 1827 tarihinde Fransız hekim Alfred Velpeau tarafından tanımlanmıştır. Virchow 1847 yılında ise hastalığı yunanca kökenli beyaz anlamına gelen "leukos" ve kan anlamına gelen "haima" sözcüklerinden ''leukemia'' terimini türeterek tanımlamıştır (3).

Lösemik hücreler, kanser kök hücre kaynaklıdırlar, mutasyona veya kromozomal anomaliye sahip olup, genetik kararsızlık gösterirler, çoğalma, farklılaşma ve programlı hücre ölümü (apoptozis) gibi önemli hücresel fonksiyonlarda bozulma ve özellikle de farklılaşmadan kaçış göstermektedirler. Lösemik hücreler büyüme avantajı kazanmışlardır, klonal baskınlık ve yayılım ile karakterizelerdir (4).




Şekil 2.1. Normal hematopoezde lösemi ortaya çıkış basamakları (5)

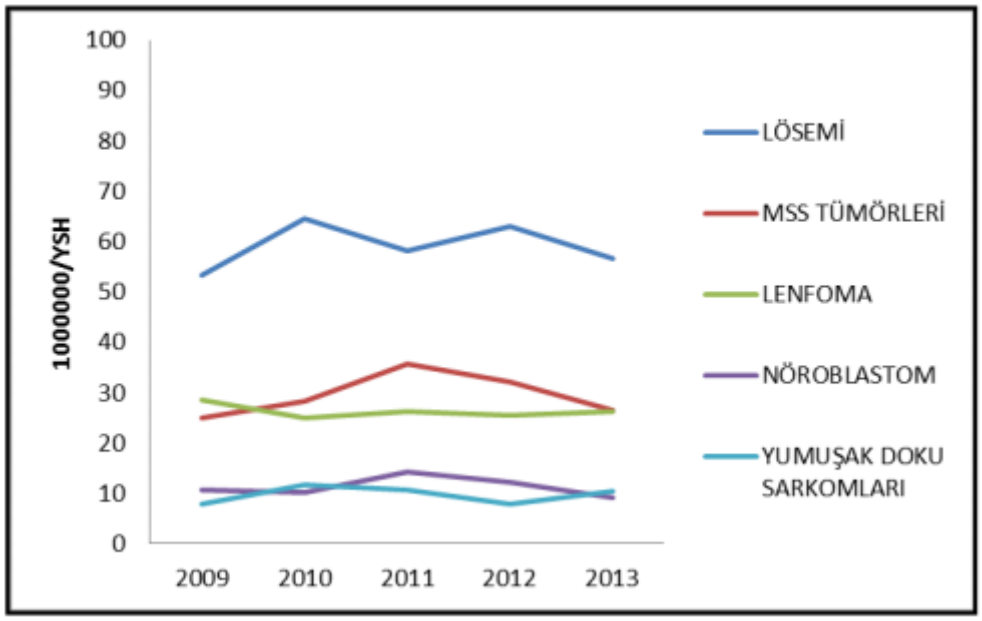
Lösemi, pediatrik dönemde en sık görülen kanser tipi olup, 15 yaş altındaki pediatrik kanserlerin %31'ini, 20 yaş altındaki kanserlerin ise %25'ini oluşturmaktadır. Pediatrik lösemiler, akut, kronik ve doğumsal olarak sınıflandırılmaktadırlar. Pediatrik lösemilerin %97'sini akut lösemiler oluşturmaktadır. Akut lösemilerde kemik iliğindeki blastlar, tüm çekirdekli hücrelerin %30'nu veya daha fazlasını oluşturmaktadırlar. Özellikle lenfoblastik ve miyeloblastik lösemi grupları klinik, hastalığın seyri ve tedaviye cevapları bakımından farklılıklar göstermektedir (6, 7).

### 2.1.1. PEDİATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

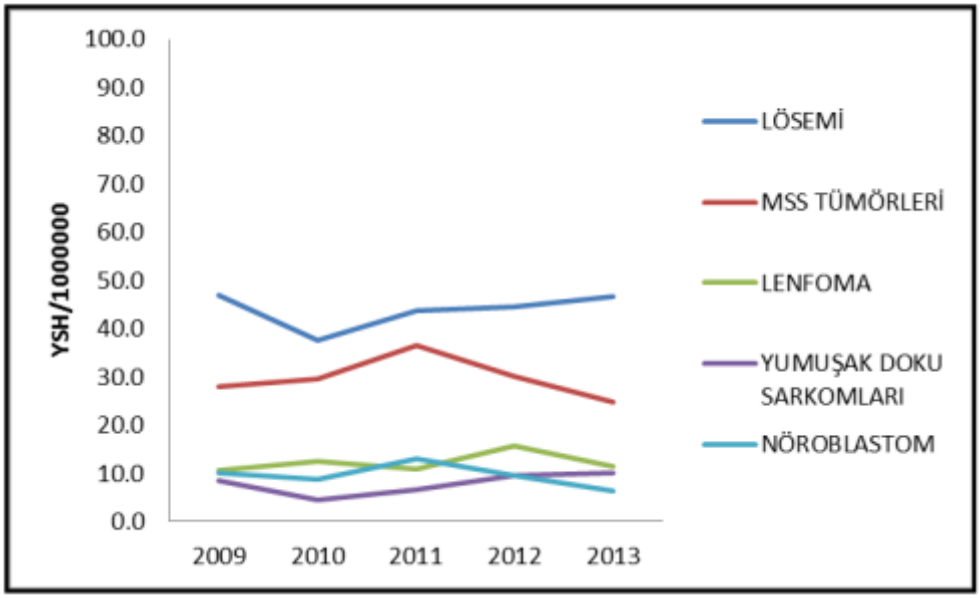
#### 2.1.1.1. Epidemiyoloji

ALL, pediatrik dönemin en sık görülen malign hastalığıdır. Pediatrik kanserlerin % 25-30'unu, tüm lösemilerin de % 75-85'ini oluşturur. En sık 1–4 yaş arasında saptanır. Kız/erkek oranı 1/1.2–1.3'tür. Erkek çocuklarda, T-hücreli ALL sıklığı daha yüksektir. Beyaz ırkta sarı ve siyah ırka göre daha sık saptanmaktadır. Terapötik ajanların son 20 yılda gelişmesiyle pediatrik ALL tedavisinde birçok ilerleme kaydedilmiştir, tedavide başarı oranı %80'lere ulaşmıştır ve hastalıkta nüks oranı %25 civarındadır (6, 8-11).

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı'nın verilerine göre tüm kanserlerin görülme sıklığı ülkemizde giderek artmaktadır. 2009–2013 yılları içerisinde elde edilen ve sunulan verilere göre, 0–14 yaş grubunda görülmekte olan pediatrik kanserlerde, lösemi kız ve erkek çocuklarda ilk sırayı almaktadır ve erkek çocuklarda sıklığı kız çocuklara göre daha yüksektir. (12).




Şekil 2.2.0-14 Yaş Gruplarındaki Erkek Çocuklarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (12)




Şekil 2.3.0-14 Yaş Gruplarındaki Kız Çocuklarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (12)

### 2.1.1.2. Etyopatogenez

Akut lösemilerin kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Lösemilerin patogenezinde, geçmiş yıllarda çevresel faktörler ön planda tutulurken günümüzde viral infeksiyonların, immün yetmezliklerin ve genetik faktörlerin de rol oynadığı görülmektedir. Lösemiler diğer kanser tiplerinden farklı olarak çok nadir şekilde ailevi karakter göstermekte ve bu da

olayın nedeninin tek gen defektinden çok multifaktöryel ilişkinin mevcut olduğunu düşündürmektedir.

Hematopoetik kökenli tümörlerin sebebi genellikle farklılaşmayı kontrol eden proto-onkogenlerin aktivasyonuna veya çoğalmasına neden olan spesifik kromozomal translokasyonlar sonucu oluşmaktadır. ALL'de sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin tanımlanması ile lösemi gelişiminin nedeni ve hastalığın riskinin belirlenmesinde ilerlemeler kaydedilmiştir. ALL'de anöploidiler ve kromozomal translokasyonlar tanı ve tedavi için büyük önem taşımaktadır. ALL hastaların %25'inde görülmekte olan ve kromozom sayısının 50'nin üzerinde olması ile birlikte gelişen hiperdiploidi, remisyon ve yaşam süresinin uzunluğu ile ilişkili iken, pseudodiploidi, hipodiploidi varlığı kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. ALL'lerin yaklaşık %75'inde kromozomal translokasyonlar mevcuttur (13, 14).

#### 2.1.1.3. Sınıflandırılması

Akut lösemilerin yaklaşık %80'ini ALL, %15'ini akut miyeloblastik lösemi (AML) oluşturmaktadır. Geriye kalan %5'lik grup ise morfolojik özellik bakımından ALL veya AML'ye benzemediği ya da her ikisinin özelliğini birlikte gösterdiği için sınıflandırılamayan bifenotipik lösemi olarak isimlendirilmektedir. Sınıflandırma morfolojik, immünolojik ve sitogenetik olarak yapılmaktadır (15-17).

ALL'yi morfolojik özelliklerine göre sınıflandırabilmek için, Fransız, Amerikalı, İngiliz (French-American-British, FAB) ortak çalışma grubunun oluşturduğu sınıflandırma kullanılmaktadır, bu sınıflandırma ile lenfoblastlar L1, L2, L3 olarak bilinen 3 gruba ayrılmaktadırlar (18).

Çizelge 2.1.ALL FAB sınıflaması (19)

| **Sitoloji** | **L1** | **L2** | **L3** |
|---|---|---|---|
| Hücre Boyutu | Küçük, homojen | Büyük, heterojen | Büyük, homojen |
| Nükleer Kromatin | Homojen | Değişken, heterojen | Noktalı ve homojen |
| Nükleous şekli | Düzgün kontörlü, bazen çentikli | Düzensiz, sıklıkla çentikli | Düzgün kontörlü, oval-yuvarlak |
| Nükleous | Görülme, silik veya küçük | ≥1, sıklıkla belirgin | Belirgin, ≥1, vakuoler |
| Sitoplazma | Dar | Değişken, sıklıkla büyük | Orta derecede büyük |
| Bazofilik Sitoplazma | Hafif orta, nadiren belirgin | Değişken, bazen koyu | Çok koyu |
| Sitoplazmik vakuol | Değişken | Değişken | Sıklıkla belirgin |

#### 2.1.1.3.1. İmmünolojik Sınıflandırma

Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin bariz bir hale gelmesi ve bunların prognostik önemlerinin belirlenmesiyle yeni bir sınıflandırma ihtiyacı doğmuştur. 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından akut lösemiler de dâhil olmak üzere hematopoetik ve lenfoid neoplazileri içeren yeni bir sınıflama yapılmıştır. Bu sınıflandırma lösemik blastların spesifik morfolojik ve sitokimyasal özelliklerden yoksun olmaları neden ile immünfenotipleme ile mümkün olabilmektedir. İmmünolojik sınıflandırmaya göre ALL dört tipe ayrılmaktadır (20).

**Erken Öncü (Prekürsör) B-hücreli ALL (Pro-B ALL):** Lenfoblastlar CD 10 (CALLA) adı verilen membran antijenini taşımaktadırlar. Membran ve intrasitoplazmik immünglobulin ile T hücre antijenleri yoktur. TdT pozitiftir. Çocukluk dönemi ALL'lerinin yaklaşık 2/3'ünü oluşturan bu grup bütün yaş gruplarında en uzun sağ kalım süresine sahiptir.

**Öncü (Prekürsör) B-hücreli ALL (Pre B-ALL):** Lenfoblastlar intrasitoplazmik immünglobulin taşımaktadır, TdT pozitiftirler ve pediatrik ALL'lerinin %20'sini oluştururlar. Kemik iliği ve Merkezi Sinir Sisteminde (MSS) nüks oranı Erken öncü B-ALL'ye göre daha fazla ve sağ kalım süresi daha kısadır.

**B-hücreli ALL (B-ALL):** Lenfoblastların işareti membran yüzey immünglobulinidir. TdT negatiftir ve blastlar FAB L3'ün morfolojik özelliklerini göstermektedirler. İmmünolojik olarak sİg, CD19, CD20, CD22, HLA-DR pozitifliği vardır. Burkitt lenfomasına özgü kromozom anomalileri taşıyabilirler. Pediatrik ve erişkin ALL'lerinin %1-2'sini oluşturur. MSS tutulum insidansı daha yüksek, tedaviye yanıt kötü ve sağ kalım süresi kısadır.

**T-hücreli ALL (T-ALL):** Lenfoblastlar T hücresine özgü yüzey antijenleri taşırlar. CD 10 (CALLA) genellikle negatiftir. TdT pozitiftir. Pediatrik ve erişkin ALL□lerinin %10-15'ni oluşturur. 1 yaşın altında ve 50 yaşın üstünde seyrek görülür. Çoğunlukla erkeklerde ve yüksek lökosit sayısı ile birliktedir. Hastaların %50-60'ında mediastinal kitle vardır ve MSS tutulumu diğer ALL tiplerinden daha yüksektir. Geleneksel tedaviyle remisyon süresi kısa olması ile karakterizedir (21-24).

Son yıllarda monoklonal antikorların kullanımı ve moleküler genotiplemenin gelişmesi ile blastların hem lenfoid, hem de miyeloid seriye ait özellikler taşıdığı görülmüş ve bu grup Bifenotipik veya Mixed Lineage Lösemi (MLL) olarak isimlendirilmiştir. Bu lösemi grubunun tanısı immünfenotipik, moleküler, karyotipik ve immünohistokimyasal çalışmalar ile konmaktadır (22).

#### 2.1.1.4. B-Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

B-ALL, B-hücre serisinin farklılaşmasının durdurulması ve blastik hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize bir hastalıktır. B-ALL kemik iliği kökenli bir hastalık olmasına rağmen yeni doğan ve pediatrik hastalarda biyolojik ve klinik olarak farklılıklar göstermektedir (25).

Pediatrik lösemi hastalarının yaklaşık %75'i immünglobulin gen yeniden yapılanmaları (rearanjman) ve hücre yüzey proteinlerindeki artışa bakılarak B-ALL alt tiplerinden herhangi bir sınıfın özelliklerini göstermektedirler. Hastalığın karyotipik ve moleküler genetik anormallikleri kapsamlı şekilde belirlenmiştir. Bu hastalığın nedenleri arasında apoptozise karşı direnç ve malign hücrelere büyüme avantajı kazandıran genlerde değişimler veya sitokin gibi dış faktörlerin etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Hastalarının yaklaşık olarak %30'unda, *TEL-AML1, MLL-AF4* ve *E2A-PBX* translokasyonları tespit edilmesine rağmen, büyük bir kısmında ise başka genetik anomaliler ve yaygın olmayan kromozom değişimlerini taşımakta oldukları düşünülmektedir (26).

Pediatrik onkoloji araştırmalarında ön planda bulunan Children's Oncology Group (COG) ve The International Berlin-Frankfurt-Münster Group (BFM) hastalığın gelişimindeki nedenlerini güncel çalışmaları ışığında araştırmaktadırlar. B-hücreli ALL alt grubunda yapılan bu çalışmalar sonucunda lenfoid gelişimi sağlayan hücresel yolaklarda görev alan genlerde, tümör baskılayıcı genlerde ve hücre döngüsü kontrolünü sağlayan IKZF1, CRLF2, PAX5 ve FLT3 gibi genlerde de genetik değişimler tespit edilmiştir. B-ALL'nin önemli bir alt grubu öncü B-ALL 'dir (27).

Çizelge 2.2. B-ALL patogenezi, immünolojik ve genetik sınıflandırma (14, 28, 29)

| B-ALL Patogenezi, İmmünolojik ve Genetik Sınıflandırılması | |
|---|---|
| **İmmünolojik belirteçler** | $CD19^+$, $CD20^+$, $CD79a^+$, $CD10^+$, HLA $DR^+$, T□$t^+$, nadiren $CD34^+$ |
| **Sitogenetik Özellikler** | Trizomi 4, 10,17; iyi prognoz<br>t (4;11) MLL-AF4, kötü prognoz<br>t (12;21) TEL-AML1, iyi prognoz<br>t(1;19) PBX-E2A, iyi prognoz<br>t (9;22) BCR-ABL, kötü prognoz<br>Hipodiploidi <50, kötü prognoz |
| **Klinik ilişkili özellikleri** | Lökosit sayısının yüksekliği (>30.000/mm3), yaş, tam yanıta ulaşma süresi (>4□hafta) ve t(9;22) varlığı. |
| **Alt tipleri** | Erken öncü (Pro) B-ALL /B-ALL /Öncü (Pre) B-ALL |

Çizelge 2.3. B-ALL alt tiplerine ait klinik, immünolojik ve genetik özellikler (28-30)

| Alt Tiplere Ait Klinik, İmmünolojik ve Genetik Özellikler | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Alt Tip** | **İmmünolojik belirteçler** | **Pediatrik Dönem (%) sıklık** | **İlişkili özellikle** | **Sitogenetik/ Moleküler genetik anomali** |
| **Erken Öncü (Pro) B-ALL** | $CD10^+$.$CD19^+$, $Tdt^+$ | %5 | Hem çocuk hem de erişkinlerde prognozu kötü | t(4;11), t(9;22), 6q-,del(12) |
| **Öncü (Pre) B-ALL** | $CD10^+$, $CD19^+$, Tdt+,cIg | %□6–20 | Yüksek lökosit sayısı, psödoploidi, siyah ırk | t(1;19), t(9;22), t(8;14),t(2;8),t(12;21) |
| **B-ALL** | $CD19^+$, $CD22^+$, CD79a+,$sIg^+yIgu^+$, $sIgK^+$, $sIg\lambda^+$ | %3 | Erken predominansı, tanıda, MSS lösemisi, abdominal kitle, renal tutulum | t(8;22) |

Çizelge 2.4. B-ALL de görülmekte olan genetik anomalilerin karakterizasyonu (27, 31)

| Genetik Anomalilerin Karakterizasyonu | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Sitogenetik/Moleküler genetik anomali** | **Sıklık□(%)** | **Prognoz** | **Alttiplerin karakterizasyonu** | **%5 Sağ Kalım yıllık** |
| t(9;22) BCR-ABL | 3-4 | Kötü | B-ALL, Erken Öncü B-ALL | 25-35 |
| t (4,11) AF4-MLL | 2-3 | Kötü | | 10-35 |
| t (12;21) TEL-AML1 | 16-29 | İyi | Öncü B-ALL | - |
| t (1;19) PBX-E2A | 6 | Kötü | | 70-80 |
| Hiperdiploidi>50 | 1 | İyi | Öncü B-ALL | - |

#### 2.1.1.4.1. Öncü B-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

Hematopoetik kök hücreden, B-hücre serisinin gelişimi, birden çok transkripsiyon faktörü, gen ve genlerin ilişkili olduğu hücresel yolaklar tarafından düzenlenmektedir. Öncü B-

ALL, heterojen bir lösemi alt grubudur. Bu nedenle öncü B-ALL'nin multigenetik, heterojen ve birden çok tanımlanmış alt grubunun olmasının yanı sıra henüz sınıflandırılması mümkün olmayan, prognostik faktörler ışığında sınıflandırılması yapılması muhtemel olan birden çok öncü B-ALL alt tipi mevcut olduğu da düşünülmektedir (27).

Öncü B-ALL, taşınılan sitogenetik-genetik anomaliler ve klinik değerlendirmeler ile birlikte çeşitli gruplara ayrılmaktadır. Bu gruplar hipodiploidi, hiperdiploidi<50, hiperdiploidi> 50, translokasyonlar ve pseudodiploidi'dir. Öncü B-ALL olgularında genetik olarak belirlenen klinik tabloların bazı özellikleri mevcuttur. Translokasyon t(4;11)(q21;q23)'un saptandığı olgularda, lenfoblastlar CD10, sıklıkla CD24 negatif iken ve CD15 pozitiftirler. Translokasyon t(1;19) ile birlikte olan grupta immünofenotipik olarak CD10 pozitif, CD34 ve CD20 negatif ya da zayıf pozitif olup genellikle sitoplazmik μ pozitiftir. t(12;21) içeren grupta ise CD10 pozitif ve $HLA^{-}DR^{+}$olup $CD19^{-}$, $CD20^{-}$ dir (32-34).

#### 2.1.1.4.2. Öncü B-hücreli Akut Lenfoblastik Löseminin Moleküler Temeli

Bir hücre malign değişime uğradığında; kendi kendine büyüyebilme, büyüme karşıtı sinyallere duyarsız kalma, sınırsız çoğalabilme, hücre olumunu sağlayan sinyallerden korunabilme, dokuları invaze etme ve metastaz yapabilme ve anjiogenezisi uyarabilme yeteneği kazanmaktadır. Kanıtlanmayan özellikleri ise; hücresel farklılaşmayı durdurabilme ve konakçı immün sisteminden kaçabilme yetenekleridir (35, 36).

Hücrenin büyümesini ve yaşamsal faaliyetlerini kontrol edebilen genler olarak bilinen proto-onkogenler, herhangi bir mutasyona uğradıklarında kanser oluşturma özelliği olan onkogenlere dönüşmektedirler. Bu malign değişim; nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları, yeniden düzenlenmeler ve insersiyon mutasyonları nedeni ile olmaktadır. Onkogenleri genel olarak ürettiği proteinlerin fonksiyonel ve biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırdığımızda; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri, sinyal iletim mekanizmalarında görev alan faktörler şeklinde ana gruplar altında toplanabilir (37).

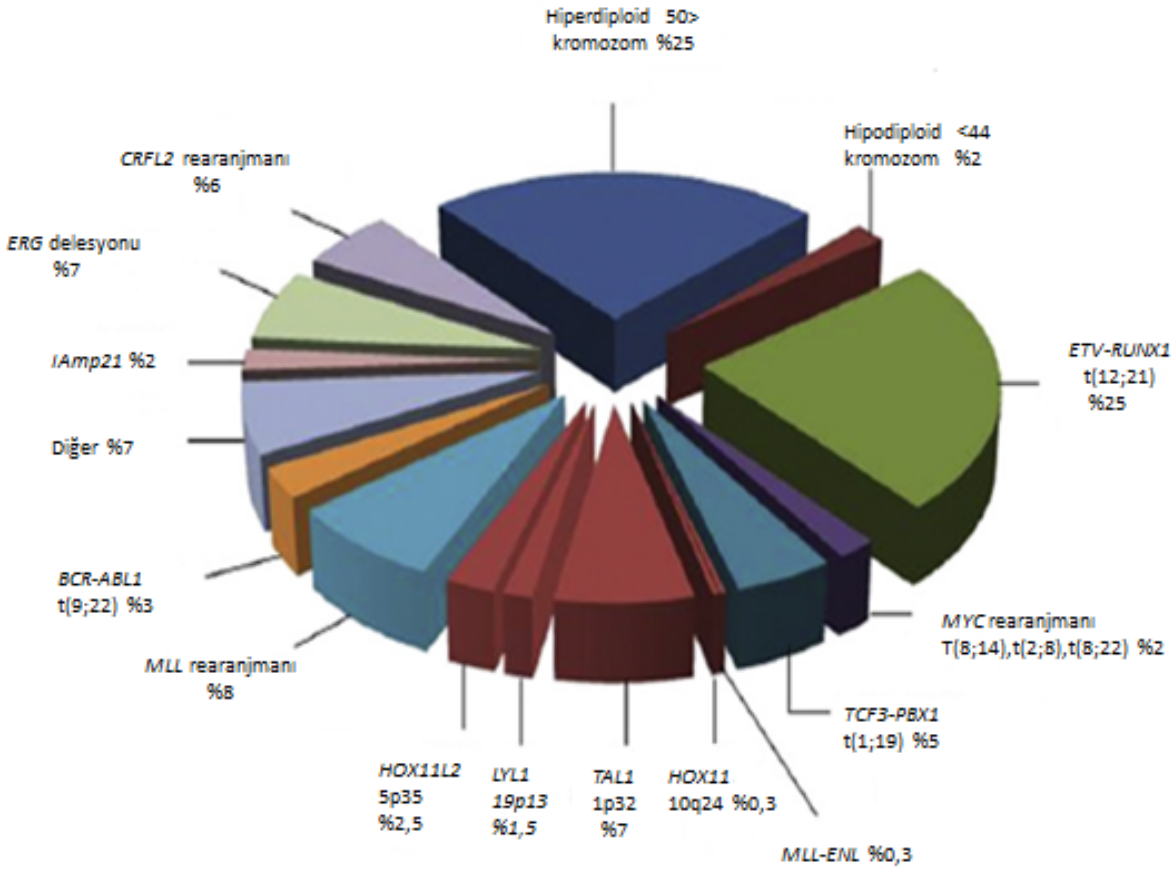
Karsinogenezde önemli rolü üstlenen ve onkogenlerin tersi olarak işlev sahibi olan tümör baskılayıcı genler, hücrede çoğalmayı baskılayıcı ve apoptozis uyarıcı özelliğe sahiptirler. Bu genlerin kaybı veya inaktive olması sonucu hücre çoğalmasında artış, hücresel ölüm mekanizmasında aksamalar gözlenir. Canlı da farklı yolaklarda görev alan bu genler transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri, kinaz inhibitörleri ve yapısal hücre bileşenleri olarak bilinmektedirler (38).

Hematolojik maligniteler içerisinde lösemiler, sitogenetik ve moleküler anormalliklerin sıklıkla görüldüğü bir grubu oluşturmaktadır. Sitogenetik ve moleküler anomalilerin tespiti için çalışmanın yapılması; löseminin tanısında, prognozun belirlenmesinde, tedavi seçeneğinin kararında ve hastalığın takibinde önem taşımaktadır. Akut lösemiler, tümör materyaline ulaşımdaki kolaylık ve sitogenetik-moleküler anomalilerin tanımlanmasında başarı nedeni ile iyi karakterize edilmiş hastalıklar arasındadır (39).

Fakat lösemilerin moleküler temeli halen tam olarak anlaşılabilmiş olmaması ile birlikte bütün diğer kanser tipleri gibi multifaktöriyel olduğu bilinmektedir. Gelişimdeki neden her ne olursa olsun, diğer kanser tiplerinde olduğu gibi programlanmış hücre ölümünde azalma ya da duraklama, farklılaşma aşamalarında duraklama, hücrenin büyüme uyarılarına karşı cevaplarındaki değişimler sonucunda kendi kendine çoğalan bir hücre popülasyonu ortaya çıkmaktadır. Bu değişimlerin en önemli nedenlerinden bir tanesi de gerek çevresel etmenlerle ortaya çıkan gerekse de doğumdan itibaren var olan genetik mutasyonlardır. Genetik mutasyonlar, malignite gelişimine neden olan onkogenlerin oluşumuna neden olabildikleri gibi, tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkarak da tümör oluşumunu engelleyen fonksiyonların ortadan kalkmasına yol açarak malignite gelişimine yol açabilirler. Bir mutasyon tek başına malign hücre gelişimine katkıda bulunamazken tekrarlayan mutasyonların varlığı bu malign dönüşümün hızlanmasına katkıda bulunmaktadır.

Hematopoetik hücrelerin gelişimi ve hücrelerin farklılaşması transkripsiyon faktörlerinin ve çeşitli sinyal ileti yollarının kontrolü altındadır. Hematopoetik kök hücrelerden farklılaşan genel lenfoid hücre serisinden, B hücre öncülleri oluşmaktadır. Bu hücreler kemik iliğinde karmaşık bir matürasyon sürecinden geçerler (pro-B hücre, pre-B hücre, immatür B hücre ve matür B hücre). Bu süreçte yüzey antijen reseptörleri eksprese ederler,

fonksiyonel/ fenotipik matürasyon ve santral tolerans kazanırlar (40). Erken B lenfosit gelişimi ve B lenfositlerine farklılaşması sırasında hücrelerin büyümesi, farklılaşması, çoğalması ve apoptozis için sinyal iletim mekanizmaları kullanılmaktadır. Bu gelişim evresi tirozin kinazlar (JAK2, IL-7R, FLT3), büyüme faktörler ve (*PU.1, E2A, EBF, IKZF1* ve *PAX5)* gibi transkripsiyon faktörlerinin kontrolü sonucu gerçekleşir (33, 41).




Şekil 2.4.Pediatrik B-ALL'de görülmekte olan gen yeniden düzenlenmeleri, translokasyonlar ve mutasyona uğrayan genler (41)

Yapılan güncel çalışmalardan elde edilen verilere göre lösemi patogenezi ile ilgili temel bir görüşe varılmıştır: Kazanılmış genetik değişimlerde hedef, lenfosit seri gelişiminden sorumlu hücresel yolaklar, hücre döngüsü kontrolü, tümör baskılanması, apoptozis ve ilaç direnci ile ilgili olan yolaklarda olmaktadır. Bu genetik anomaliler lösemi oluşumuna katkıda bulunurken aynı zamanda, hastalığın bireysel prognozunu belirlemekte, hastalığın seyri sırasında ortaya çıkmaları ya da kaybolmaları ile tedaviye verilen cevabın etkilenmesine neden olmakta, anomalilerin özellikleri ve sıklığı lösemilerin alt tipleri ile oldukça yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (10).

## 2.2. TANI, PROGNOZ VE TEDAVİ İÇİN PROGNOSTİK BİYO-BELİRTEÇLERİN TANIMLAMA ÇALIŞMALARI

B-ALL'nin alt tipleri arasında, bireysel lezyonların sıklığı ve yapısının önemli derece farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. B-ALL, normal lenfoid olgunlaşma sürecinin 3'te 2'sinde genetik değişimler nedeniyle bozulduğu bilinmektedir. Fakat bu genetik anomaliler löseminin biyolojik temelini ve tedaviye verilen cevaptaki farklılıkların ya da herhangi bir genetik anomali taşımayan bireylerin neden lösemi olduğunun açıklanmasında yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle yapılan gen ekspresyon profillemesi yaygın olarak transkriptom düzeyinde lösemik hücrenin anomalisini karakterize ederek, tanı ve teşhiste bunların bir araç olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar neticesinde, löseminin patogenezinin anlaşılmasını sağlayabilecek olan; tümör baskılayıcılarda, onkogenlerde, lenfosit seri gelişiminde ya da apoptozis kontrolünden sorumlu olan genlerde tanımlanmamış genetik değişimler ve önemli olan hücresel yolaklar belirlenmeye çalışılmaktadır. Aynı zamanda kişiye özel ilaç tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve en önemlisi de hastalığın prognoz seyrinin iyileştirilmesi sağlanabilecek prognostik biyobelirteçler belirlenmeye çalışılmıştır.

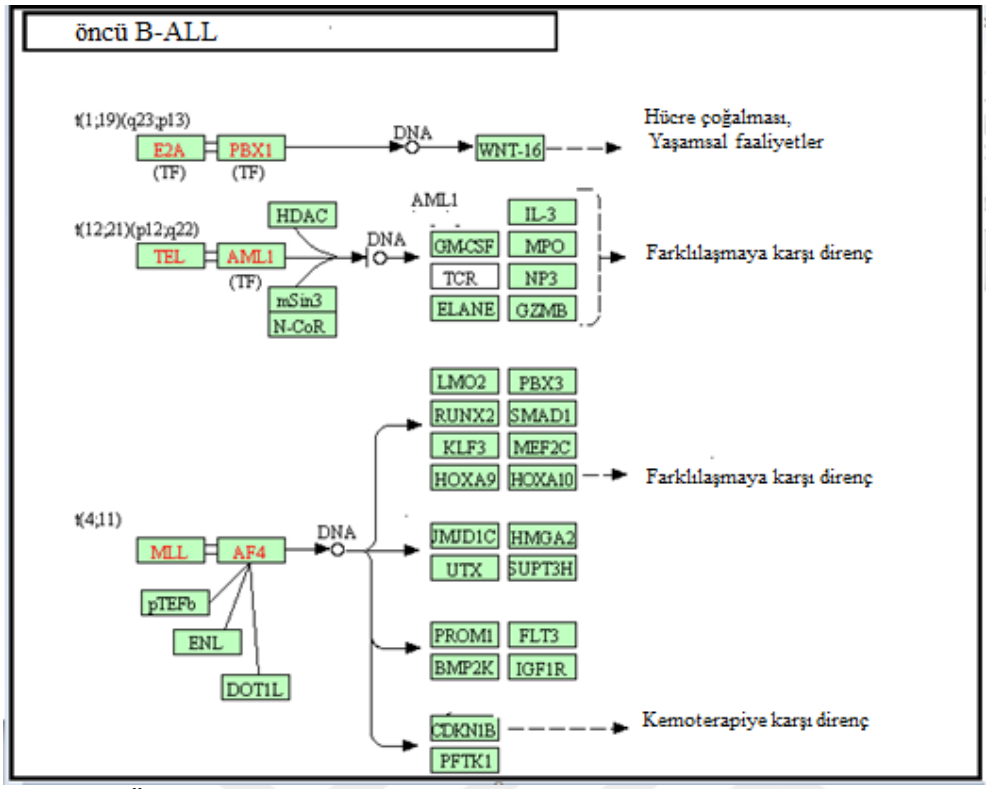
Biyobelirteç genel bir tanıma göre, belirli bir hastalığın klinik belirtileri ve sonuçları ile doğrudan bağlantılı bir biyolojik sürecin varlığının veya sonucunun bir göstergesi iken, daha özel bir tanıma göre ise; biyobelirteç, bir hastalık riski veya prognozu ile bağlantılı bir gen, transkript, protein veya biyomolekülün durum veya miktarındaki değişikliklerin belirtecidir (42, 43).

### 2.2.1. PEDİATRİK ÖNCÜ B-ALL MOLEKÜLER TEMELİNDE GÖREV ALAN ADAY BİYOBELİRTEÇ GENLERİN SEÇİLMESİ

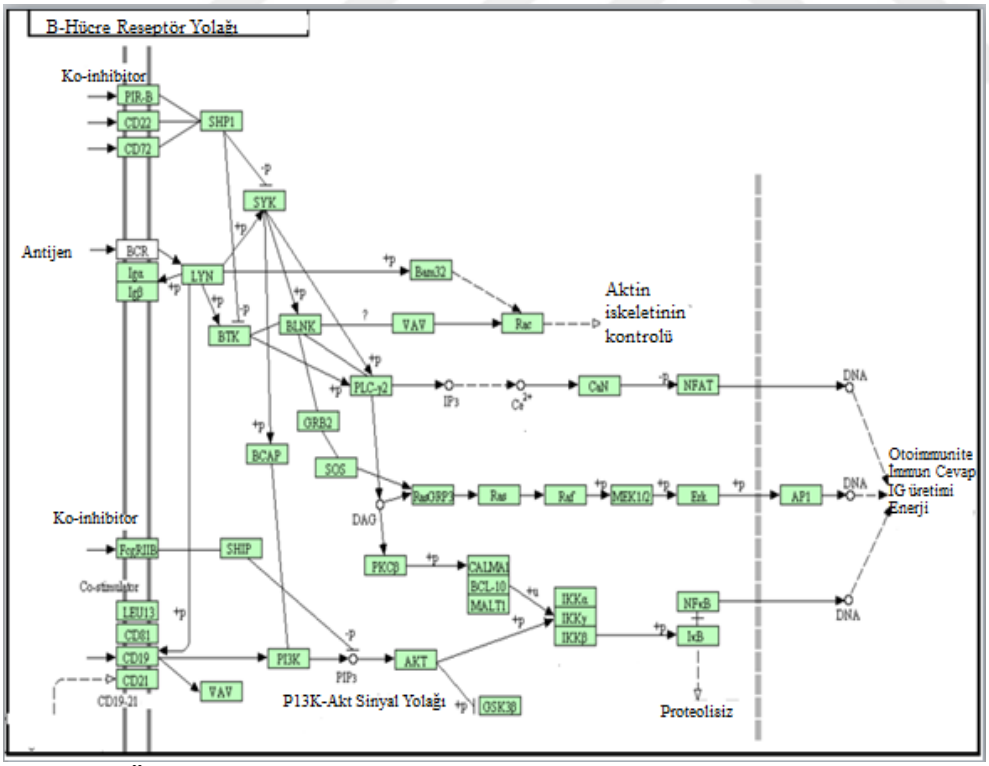
Bu tez çalışmasında, literatürde birbirinden bağımsız yapılan çalışmalar sonuçlarında öngörülen genetik prognostik faktörler olarak belirlenen genlerin, DNA ve RNA boyutundaki genetik ve fonksiyonel değişimlerinin, hasta grubumuzda analizi yapılarak, tek bir çalışmada değerlendirilmesinin yapılması hedeflenmiştir. Bu nedenle 2003–2013 yılları arasında yapılmış olan 60 çalışmayı incelediğimizde, 66 adet gen sitogenetik anomali taşımayan öncü B-ALL patogenezi ile DNA ve/veya RNA boyutunda ilişkilendirildi. Literatür çalışmaları ile ilgili hazırlanmış çizelge ek–2' de verilmiştir.

Bu 66 gen içinden doğrulama analizine alınacak genlerin belirlenmesinde kullanılan yaklaşım Şekil 2.7'de açıklanmıştır. Analitik bir ve aşamalı bir filtre olarak tanımlanabilecek olan bu yaklaşımda özetle, öncü B-ALL ile ilişkilendirilmiş 66 gen çalışma türlerine göre sınıflandırıldığında 23 gen sadece genom boyutunda (DNA), 51 gen sadece fonksiyonel boyutta (RNA), 13 gen hem DNA hem de RNA boyutunda çalışılmıştır. Bu genlerden öncü B-ALL hastalarında görülmekte olan sitogenetik ve moleküler genetik anomaliler ile ilişkilendirilmiş olan 20 gen analize alınmamıştır; zira çalışma grubu olarak sitogenetik ve moleküler genetik anomalileri olmayan bireyler çalışmamıza dâhil edilmemiştir. Literatürde kalan 46 genden 22 tanesinin yapılan çalışmalarda istatiksel olarak prognostik biyobelirteç olma özelliği gösterecek aralıkta olmadığı rapor edilmiştir. Geriye kalan 24 gen ontolojik ve biyolojik yolak analizlerine göre sınıflandırıldığında B-hücre serisi ile ilişkilerinin net olmadığı ya da dolaylı olduğunu gördüğümüz 8 gen çalışmaya alınmamıştır.

Bu basamaktaki analiz sırasında KEGG veri tabanında bulunan B-hücre serisi gelişimi ile ilgili yolaklar ve ilişkide bulundukları diğer yolaklar ile ilgili önemli olan transkripsiyon aktivatörler, hücre döngüsünde kilit görevi gösteren önemli proteinleri kodlayan genler, programlanmış hücre ölümünde görev alan proteinleri kodlayan genler, sinyal iletim mekanizmasında görev alan önemli proteinleri kodlayan genler ve/veya yolaklar ile ilişkisi bulunmayanlar KEGG veri tabanı temel alınarak çalışmadan çıkarılmıştır (44).

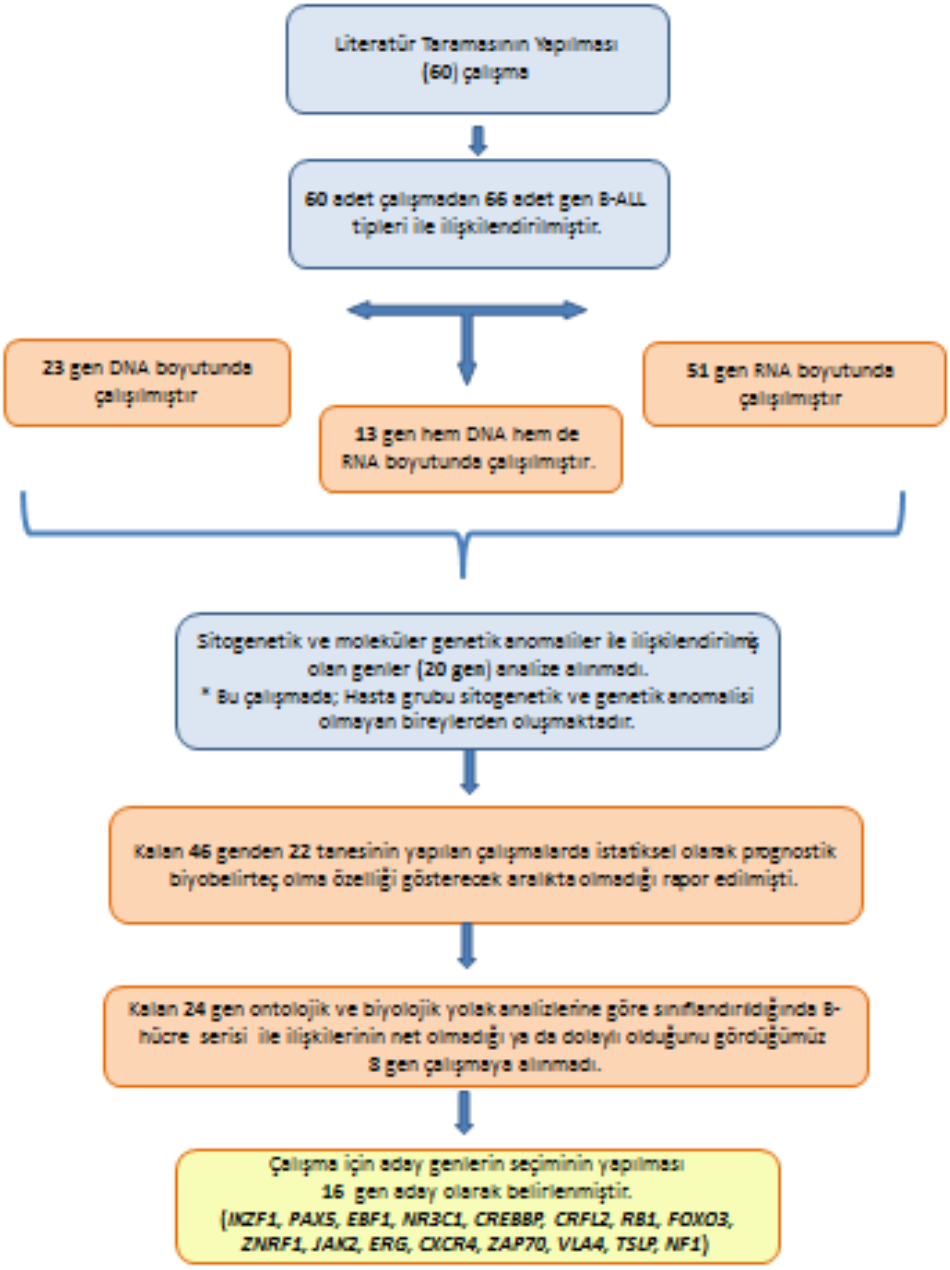



Şekil 2.5.Öncü B- ALL sinyal yolağı-1 (44)




Şekil 2.6.Öncü B-ALL sinyal yolağı-II (44)

Sonuç olarak 14 gende DNA boyutundaki değişimler, 11 gende ise RNA boyutunda ifade düzeyi, 8 tanesinde ise hem DNA hem de RNA boyutundaki, toplamda 16 gen çalışmamıza dâhil edilmiştir.




Şekil 2.7. Aday genlerin seçilmesi için yapılan işlemlerin akış şeması

Çizelge 2.5. Çalışılması planlanan genlerin kromozomal lokalizasyonu, fonksiyonları, prognoz ile ilişkisi, anomali sıklığı, türü ve çalışma içerisinde gruplandırılması

| **Yaşamsal Faaliyetlerden Sorumlu Genler** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Kromozom lokalizasyonu** | **Genin sembolü** | **Genin açık adı** | **Anomali sonucu oluşan patofizyolojik ve klinik durum** | **Anomali Sıklığı (%)** | **Değişim (Anomali) Türü** | **Grup** |
| 2q31.2 | *VLA4* | Very Late Antigen-4 | Kötü prognoz | - | İfadelenme seviyesinde artış | 1 |
| 2q22.1 | *CXCR4* | Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4 | Kötü prognoz | - | İfadelenme seviyesinde artış | 1 |
| 21q22.3 | *ERG* | Erythroblast Transformation-Specific Related | Kötü prognoz | %7 | Delesyon, ifadelenme seviyesinde artış | 1 |
| 6q21 | *FOXO3A* | Forkhead Boxo3A | -* | %5 | Nokta mutasyonları | 1 |
| 13q14.2 | *RB1* | Retinoblastoma 1 | iamp21 varlığında 30-39% kötü prognoz, | %6-40 | Delesyon, nokta mutasyonları | |
| 16q23.1 | *ZNRF1* | Zinc And Ring Finger 1 | Kötü prognoz | - | Fosforilasyon domain nokta mutasyonlar | 1 |
| q11.2 | *NF1* | Neurofibromin 1 | - | - | İfadelenme seviyesinde artış, Delesyon | 1 |
| **Sinyal iletim mekanizması ile ilişkili genler** | | | | | | |
| 9p24.1 | *JAK2* | Janus Kinase 2 | Kötü prognoz, | % 18-35 | Pseudokinaz ve kinaz domain bölgesel mutasyonlar, ifadelenme seviyesinde artış | 2 |
| Xp22.33 | *CRLF2* | Cyctokine receptor-like factor 2 | JAK mutasyonları ile birlikte kötü prognoz | %5-16 | Nokta mutasyonu, ifadelenme seviyesinde artış | 2 |
| 5q22.1 | *TSLP* | Thymic Stromal Lymphopoietin | - | - | Nokta mutasyonları | 2 |
| 2q11.2 | *ZAP70* | Zeta-Chain (TCR) Associated Protein Kinase 70kDa | Kötü prognoz | - | İfadelenme seviyesinde artış, nokta mutasyonları | 2 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gen ifadesi kontrolünü sağlayan genler** | | | | | | |
| 7p12.2 | *IKZF1* | IKAROS Family Zinc Finger 1 | BCR-ABL pozitifliğinde çok kötü prognoz | %15 | Nokta mutasyonu, bölgesel delesyonlar, ifadelenme seviyesinde artış | 3 |
| 9p13.2 | *PAX5* | Paired Box 5 | Lösemi oluşumu ile ilişkili, kötü prognoz | %5-30 | Nokta mutasyonu, bölgesel delesyonlar, ifadelenme seviyesinde artış | 3 |
| 5q34 | *EBF1* | Early B-Cell Factor 1 | Kötü prognoz | - | Delesyon | 3 |
| **Epigenetik regülasyon/ Tedaviye Cevapta Görev Alan Genler** | | | | | | |
| 16p1.3 | *CREBBP* | CREB Binding Protein | Kötü prognoz, nüks ve glukokortioid direnci ile ilişkili | %19 | Bölgesel delesyonlar, nokta ve çerçeve kayması mutasyonları | 4 |
| 5q 31.3 | *NR3C1* | Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 1 | Glukokortioid direnci ile ilişkili | - | İfadelenme seviyesinde farklılık, nokta mutasyonları | 44 |

#### 2.2.1.1. Seçilen Aday Genlerinin Gruplandırılması

1993-2013 yılları arasında yapılan genom ebadındaki 60 adet çalışma ek-1'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Bu çalışmaların sistematik analizi ile seçilen 16 gen, sitogenetik herhangi bir anomali taşımayan pediatrik öncü B-ALL 45 hastada, çalışılması planlanan prognostik belirteçler hücresel görevlerine göre 4 farklı gruba ayrıldı. Bu gruplandırma yapılırken, KEGG veri tabanın da bulunmakta olan, hücre döngüsü, farklılaşma, çoğalma, sinyal iletim yolu ve yolakları, transkripsiyonel mekanizma yolakları ve bunların dışında epigenetik regülasyonu sağlayan ve tedaviye cevapta etkili olan yol ve yolakları incelediğinde çalışma genleri birbirinden farklı fakat birbiri ile ilişkili gruplara ayrıldı.

• **1 Grup:** Yaşamsal faaliyetlerden sorumlu genler

• **2 Grup:** Sinyal iletim mekanizması ile ilişkili genler

• **3 Grup:** Gen ifadesi kontrolünü sağlayan genler

• **4 Grup:** Epigenetik regülasyon/ Tedaviye cevapta görev alan genler

##### 2.2.1.1.1. Yaşamsal Faaliyetlerden Sorumlu Genler

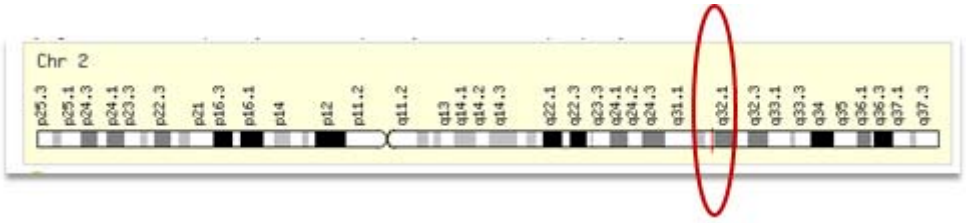
***VLA–4***

Hematopoez, hematopoetik hücrelerin kemik iliğindeki mikro çevrelerini oluşturan farklı özellikteki büyüme faktörleri, sitokinler ile kontrol edilmektedir. Farklı sinyal yolakları (*VLA-4* ve *PI3K/AKT*) ile aktive olmuş kemik iliği mikro çevresi, lösemik hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri ve kemoterapiye cevaplarında önemli rol oynamaktadır (45).

Kemik iliği mikro çevresi özellikle kemoterapi sonrası kemoterapiden kaçan hücrelere yaşam ortamı sağlayıcı niteliktedir ve (Minimal Kalıntı Hastalığı (Minimal Residual Disease, (MRD)) gelişimine ortam hazırlar. Özellikle lösemik hücreler kemik iliği stroma hücreleri ve ortam bileşenleri ile girdikleri etkileşim sonucu kemoterapiye karşı direnç kazanabilirler (46).

Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM–1); aktif endotel hücrelerinde, doku makrofajlarında, dendritik hücrelerde ve kemik iliği fibroblastlarında bulunur ve T-

lenfositlerin, monositlerin ve eozinofillerin endotel hücrelerine adezyonu ile görevlidir. Ligandı, beta integrin ailesinden Very Late Antigen–4 (VLA–4)'tür. Öncü B-ALL blastların üzerinde bulunan VLA-4'e bağlanmak üzere tasarlanmış monoklonal antikorlar, VLA–4 ligandı olan lösemik hücrelerin yaşaması için gerekli, stromal kemik iliği hücreleri üzerinde bulunan VCAM-1'ın etkilenmesi sonucunda lenfoid gelişimi engellemektedir. VLA–4 bağımlı adezyon VLA–4 'ün VCAM-1'e olan bağlanma ilgisine göre düzenlenmektedir. VLA–4 'ün yapısında olan konformasyonel değişiklikler ile farklı bağlanma ilgisine sahip olabilmektedir (47). *VLA-4* 2. Kromozomun uzun kolu üzerinde 31.3 te lokalize olmuştur ve 28 ekzondan oluşmaktadır (48).




Şekil 2.8. *VLA-4* kromozomal lokasyonu (48)

Hematolojik maliginitelerde, özellikle lösemide artmış *VLA–4* ifadelenmesi, nüks ve kötü prognoz ve tedaviye direnci etkilediği ile ilgili yapılmış olan çalışmalar mevcuttur. Shalapour (2011) yapmış oldukları çalışmada, klinik ve biyolojik olarak yüksek risk sınıflandırma parametreleri ile artmış *VLA–4* ifadelenmesinin ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (45).

Walter (2010) yapmış oldukları çalışmada pediatrik AML de artmış *VLA–4* ifadelenme seviyesinin nüks için moleküler ve sitogenetik faktörlerden bağımsız belirleyici bir risk faktörü olduğunu rapor etmişlerdir. *VLA–4*, AML blast hücrelerinin kemik iliği stromal elemanlara bağlanabilmesi ve özellikle hücre göçü, antiapoptatik sinyallerinin ve tedaviye olan cevabın düzenlenmesi gibi önemli görevlere sahiptir. Artmış *VLA–4* ifadelenmesi, kemoterapi duyarlılığını azaltmakta, MRD riskini artırmakta, hastalığın tekrar nüks etmesi, kötü prognoz ve kısa hayat süresi olarak ortaya çıkmakta olduğunu rapor etmişlerdir (49).

***CXCR4***

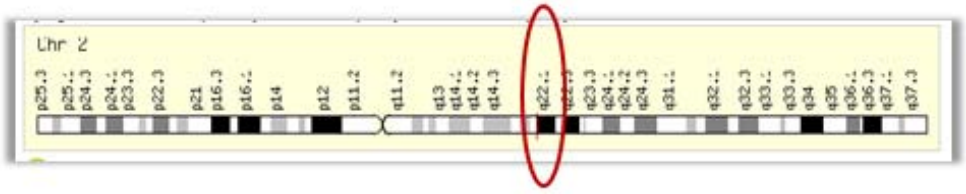
Kemokinler, 8-15 kDa gibi düşük moleküler ağırlıklı kemotaktik sitokinleri kapsayan bir ailedir. İmmün sistem hücrelerinin hareketi, embriyogenez, anjiogenez, hematopoez,

ateroskleroz, tümör büyümesi, metastazı ve Human Immunodeficiency Virus İmmün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu gibi biyolojik mekanizmaların çoğunda görev almaktadırlar. Kemotaktik sitokinler, görevlerine ve ifadelenme paternlerine göre homeostatik ve inflamatuar kemokinler olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadırlar (50).

*Homeostatik kemokinler*, bazı özel dokularda ifadelenen, hematopoietik ve immün sistemin homeostazının sağlanmasında görev alan proteinlerdir*, inflamatuar kemokinler* ise lokal proinflamatuvar sitokinler ile kontrol altında tutulan bir gruptur (51).

CXC alfa grubunda bulunan kemokinler, homeostatik çoğunlukla homeostatik grubu içine alan kemokinlerdir. Fizyolojik ve patolojik birçok biyolojik olayın başlatılmasından, sürdürülmesinde ve sonlandırılmasında önemli görevleri mevcuttur. Kemokinlerin büyük kısmı**,** lökositleri, CXCR ya da CCR olarak isimlendirilen, G proteinleri ile ilişkili transmembran reseptörlere bağlanarak aktive etmektedirler. Yapılan çalışmalarda yaklaşık 20 kemokin reseptörü tanımlanmıştır (52).

CXC Chemokine Receptor 4 (CXCR4) membran yerleşimli bir reseptördür. Bu reseptörü kodlayan gen 2. Kromozomun uzun kolunda 22.1 de lokalize ve tek ekzondan oluşmaktadır (48).




Şekil 2.9. *CXCR4* kromozomal lokasyonu (48)

HIV'in, $CD4^{+}$T lenfositleri enfekte etmesi sırasında kofaktör olarak görev alması ile ilk kez tanımlanmıştır. CXCR4'ün bu aşamadaki görevi viral membran ile konak membranın füzyonunu sağlamaktır. Ligandı olan Stromal Cell-Derived Factor 1 (CXCL12/SDF–1α) ise, ilk kez 1993 yılında mürin kemik iliğinde tanımlanmıştır (53).

Yapılan çalışmalarda, bu reseptörün birçok tümörün yüzeyinde ifadelendiği belirlenmiştir. Bu reseptör-ligand birlikteliğinin embriyogenez, kardiak ve nöral gelişim basta olmak üzere organogenez, kök hücre motilitesi, hematopoez, yeni damar oluşumu gibi temel

biyolojik süreçlerde rolü olduğu görülmüştür. *CXCR4* ifade eden tümör hücrelerinin, *CXCL12/SDF*-1α'nin yüksek oranda ifade edildiği dokulara akciğer, karaciğer, lenf nodu ve kemik iliğine metastaz yaptıkları bilinmektedir (54).

*CXCR4* hematopoetik kök hücrelerin yüzeylerinde ligandı SDF-1 bağlı şekilde ifadelenmektedir. Ligandında olan konformasyonel değişiklikleri ile sinyal yolağında SDF-1/ CXCR4 kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerin yuvanlamasında ve engrafmanında önemli göreve sahiptir. Aynı zamanda CXCR4 hematopoetik kök hücrelerinin kemik iliğine geçişini de kontrol etmektedir (55).

*CXCR4*'ün artmış ifadelenmesi, AML için bağımsız bir prognostik risk faktör adayı olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Miyeloid seri kaynaklı lösemi çalışmalarının aksine, lenfoblastik seriden köken alan lösemilerin çalışıldığı literatürde çok az çalışma mevcuttur. Lösemik hücrelerde ve malign epitel hücrelerde *SDF* bağlı *CXCR4* ifadelenmesi tümör hücrelerinin organ metastazı yapmasına neden olmaktadır. Van den Berk (2014) pediatrik B-ALL hastalarda *CXCR4-SDF-1* ifadelenmesinde istatistiksel olarak önemli artış olduğunu ($p<0.0001$) ve bu ifade artışının 5 yıllık sağ kalım, nüks gelişimi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu rapor etmişlerdir (56).

Crazzolara (2001) pediatrik B-ALL hastalarda yaptıkları çalışmada, artmış *CXCR4* ifadelenmesi olan bireylerde, düşük olan bireylere göre karaciğer veya dalakta belirgin infiltrasyon gözlenmiştir (57). Schneider (2002) pediatrik B-ALL hastalarda yapmış oldukları çalışmada ise Crazzolara (2001) çalışmasını doğrulayamamışlardır ancak artmış *CXCR4* ifadesine sahip olan bireylerde hastalıksız sağ kalım süresi kısalmış olduğunu rapor etmişlerdir (57, 58).

Konoplev (2011) 54 yetişkin B-ALL hastasında yapmış oldukları çalışma sonucunda, *CXCR4*'ün tek başına bağımsız bir prognostik belirteç olabileceğini rapor etmişlerdir (59).

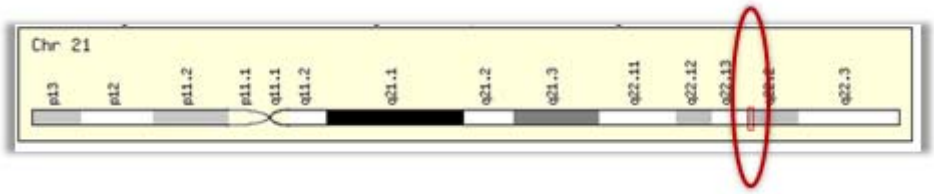
Ayrıca *CXCR4* pediatrik ALL ve AML de kemoterapiye direnç gelişimini kontrol eden en önemli faktörlerden biri olduğu rapor edilmiştir (60).

***ERG***

Erythroblast Transformation-Specific (ETS)-related gene (*ERG*) erken hematopoez ve hematopoetik kök hücrelerin devamlılığında önemli rol oynamakta olan bir onkogendir. Özellikle solid tümörlerde (prostat kanseri, Ewing Sarkoma) ve AML de füzyon protein oluşturmaktadır (61).

*ERG*'inde üyesi olduğu ETS ailesi transkripsiyon faktörleri, temel hematopoetik gelişimi düzenlemektedirler. Bu genlerin ifade eksiliği çeşitli hematolojik malignitelerin ve solid tümörlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Miyeloid ve lenfoid hücre serili lösemi gelişimine neden olması, hematopoezde görevli olan hücrelerin çoğalma kapasitelerini artırmasını düzenlemesi ile olmaktadır (62).

*ERG* 21. kromozomun uzun kolu üzerine konumlanmıştır ve 12 ekzondan oluşmaktadır (48). ERG ve aynı ailenin benzer üyeleri mitojenik sinyal çevirici yolakların düzenleyici olarak görev yapmaktadırlar. Embriyonik gelişim, hücre çoğalması, farklılaşma, anjiyojenez, inflamasyon ve apoptozis gibi yolakların düzenlemesinde önemli görev almaktadırlar. Transkripsiyon düzenleyici nüklear protein olan ERG, DNA ya pürince zengin bölgelerden bağlanır, platelet adezyonu ve hematopoezinin düzenlenmesinde görev alır. Erken miyelosit hücrelerinde, olgun lenfositlere göre daha fazla ifade edilmektedir. Bu nedenle ERG'nin erken hematopoetik hücrelerin farklılaşmasında düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir (63).




Şekil 2.10.*ERG* kromozomal lokasyonu (48)

Akut lösemide, artmış *ERG* ifadelenme seviyesi, bağımsız prognostik risk faktörü olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, *ERG* ifadelenmesinin, sitogenetik anomalisi bulunmayan yetişkin AML ve T-ALL vakalarında kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. *ERG*'in normal hematopoez için gerekli olduğu ancak *ERG* ifadelenmesinin bozulması sonucunda lösemi gelişimi ve ayrıca erken lösemik hücrelerde *ERG*'in kontrol

etmiş olduğu kinaz sinyal yolaklarının bozulması sonucunda kinaz inhibitörlerine karşı direnç gelişimine sebep olduğu bilinmektedir (62-65).

Pigazzi (2012) yapmış oldukları çalışmada, MLL pozitif, pediatrik AML hastalarında, artmış *ERG* ifadelenmesinin bağımsız, kötü prognoz ile ilişkili prognostik risk faktörü olarak tanımlamışlardır (66).

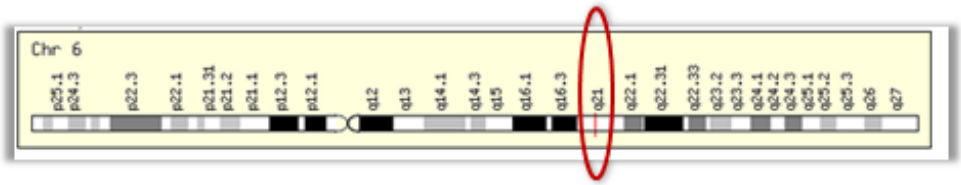
Artmış *ERG* ifadelenmesine sahip fare modelleri üzerinde yapılan çalışmada *ERG*'in onkogen olarak işlev gördüğü, fetal dönem hematopoez öncüllerinden lösemi gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. Benzer olarak artmış *ERG* ifadesi olan kemik iliği transplantasyonu yapılan yetişkin farelerde, *NOTC1* mutasyonu ve T hücre sayısında artış gözlenmiştir. Transplantasyon yapılan farelerin %30'u T-ALL, geri kalan farelerde 5 ay içerisinde AML gelişimi gözlemlenmiştir (67).

Güncel kemoterapi rejimleri *ERG* ifadelenmesi artmış olan, yüksek risk ALL hastalarında yetersiz kalmaktadır. Artmış *ERG* ifadelenmesi olan AML hastalarının% 81 inde, düşük *ERG* ifadelenmesi olanların ise %33'ünde 5 yıl içerisinde nüks gözlenmiştir (68).

***FOXO3A***

FOX transkripsiyon faktörleri, çatal başlı protein ailesi üyeleridir. FOX transkripsiyon faktörleri 2 büyük halka ya da kanatlar ile 3 tane α heliks yapı içeren DNA Bağlanma Domainine sahip olmasından dolayı 'winged helix' transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılmaktadırlar. Bu ailenin üyeleri "A" dan "S" ye kadar isimlendirilmişlerdir, bu üyelerden "O" alt grubunun, *FOXO1 (FKHR), FOXO2 (FOXO6), FOXO3A (FKHRL1)* ve *FOXO4 (AFX)* olmak üzere 4 üyesi mevcuttur. Bu alt grubun üyeleri memeli dokularında çeşitli oranlarda ifadelenmektedir. FOXO ailesi üyelerinin kanser gelişiminde rol oynadıkları ile ilgili çeşitli bulgular mevcuttur (69-71).

Forkhead box class O 3A (*FOXO3A*), 6 kromozomunun uzun kolu q21 de lokalize olmuştur ve 3 ekzondan oluşmaktadır (48).




Şekil 2.11.*FOXO3A* kromozomal lokasyonu (48)

*FOXO3A* üzerinde Forkhead olarak isimlendirilen 100 amino asitlik DNA bağlanma konsensüs Domaini ile (DBE) DNA'ya bağlanmaktadır. *FOXO3A* tümör baskılayıcı olarak bilinir, apoptozis tetikleyici ve hücre döngüsü bloke edici genlerin pozitif regülasyonundan sorumludur (70).

*FOXO3A* aktivasyon ve inaktivasyon mekanizması oldukça karmaşıktır, çok sayıda tirozin kinazı içeren (*AKT, ERK, IKKβ*) bir yolaktır. Her bir kinaz *FOXO3A* üzerindeki farklı bir bağlanma bölgesini, farklı seviyelerde tanımaktadır. Bu karmaşık yapıda en önemli kinaz AKT'dır. AKT mutasyonları çeşitli kanser tiplerinde sıklıkla rastlanmaktadır. *AKT* mutasyonları, AKT'ın negatif (*PTEN*) ya da pozitif (*PI3 Kinaz, RAS, FLT3*) olarak düzenlediği birçok genin içinde bulundu yolağı etkilemektedir. *FLT3-ITD* AML için kötü prognostik bir biyobelirteç olarak bilinmektedir. FOXO3A fosforilasyon seviyesi *FLT3-ITD* mutasyonu taşıyan AML hastalarında artmış olduğu bildirilmiştir (69, 72).

FOXO ailesi üyelerinin hedef genlerin ifadesini düzenleyen farklı hücresel fonksiyonları mevcuttur. Bölünmekte olan hücrelerde FOXO gen ifadesi seviyesinin artması, hücre döngüsünü durdurmaktadır. DNA tamir mekanizmasında görev alan GADD45 ve DDB1 gibi genlerin ifadesini transkripsiyon seviyesinde arıtarak bu mekanizmayı desteklemektedir. Bunun yanı sıra Reaktif oksijen türevleri (ROS) detoksifikasyonunda görev alan serbest radikal enzimlerinin ifadesini artırma özellikleri de mevcuttur. Apoptozis yolağını, *FASL* ve *BCL-2* üzerinden tetikleyerek apoptozisin başlatılmasını ve B-hücre serisi farklılaşmasında görev alan *BTG1* ile eritroid farklılaşmasını sağlamaktadır (73, 74).

FOXO proteinlerinin lösemi gelişimindeki rolünü konu alan çalışmalarda *FOXO3A* 'nın inaktivasyonun blast hücrelerinde anormal sitoplazmik lokalizasyon olduğu bildirilmiştir. *FOXO3A* 'nın ifade ve fosforilasyon seviyesi yüksekliği, AML de kötü prognostik faktör

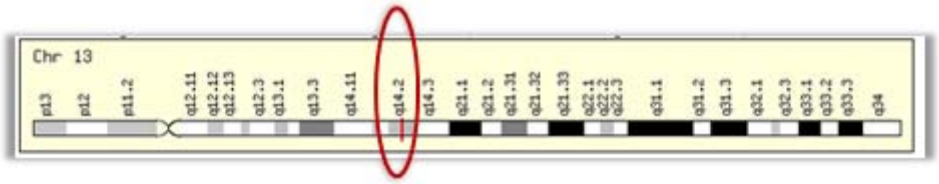
olarak bilinmesine ve artmış hücre çoğalması, tedaviye direnç ve sağ kalım süresinin kısalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (75).

Wang (2014) pediatrik lösemili bireylerde yapmış oldukları çalışmada FOXO3A geninin 3'UTR bulunmakta olan tek nükleotid değişiminin (rs4946936) ALL için yüksek risk getirdiğini ve bu değişimin 3'UTR miRNA bağlanma bölgesinde olduğu ve miRNA ve onun hedefi olan m-RNA'nın etkilendiğini rapor etmişlerdir (76).

Zhao (2013) yeni tanı 44 AML hastası ile 14 remisyon durumunda olan hasta ve sağlıklı bireylerdeki *FOXO3A* ifadelenme seviyesini karşılaştırmış, sağlıklı bireyler ile remisyonda olan bireylerin *FOXO3A* ifadelenme seviyesi birbirine benzer, yeni tanı AML hastalarında ise oldukça arttığı belirlenmiş ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (77).

***RB1***

13.kromozomun uzun kolu q.14 üzerinde lokalize olan *RB1* **(**Retinoblastoma 1) 27 ekzondan oluşmaktadır, 180 kb dir. Genin ürünü olan protein, 928 amino asit uzunluğunda ve 110 kDa ağırlığındadır (48).




Şekil 2.12.*RB1* kromozomal lokasyonu (48)

RB1, N terminal bölgesinde; A, B bölgelerini ve C terminal bölgesi olmak üzere 3 bölge içermektedir. Bu üç bölge, hücresel çoğalmanın, farklılaşmanın düzenlenmesi, viral ve hücreler proteinlerin etkileşimi ve transkripsyionel kontroldür. Bu biyolojik etkisini transkripsiyonel seviyede negatif ve pozitif regülasyon ile düzenlemektedir (78-80).

Retinoblastoma gen yolağında CDKN (Ink4a), D tipi siklinler, siklin bağımlı protein kinazlar (cdk4, cdk6), RB cep proteinleri ailesi (RB, p107, p130) ve E2F transkripsiyon faktör ailesi (E2F1-8'in heterodimerleri, DP1 ve DP2) olmak üzere beş protein ailesi yer almaktadır. Retinoblastoma tümör baskılayıcı proteini (pRb) hücre döngüsünde, G1-S geçişinde kontrol noktası olarak rol oynamaktadır. Rb proteinin aktivitesini belirleyen proteinin fosforilasyon durumudur; hücre dinlenme safhasındayken, E2F transkripsiyon

faktörlerine bağlı bulunur. E2F familyası spesifik bir DNA dizisine sahip olup transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hücre regülasyon döngüsünde birçok genin ekspresyon seviyesini ve zamanlamasını düzenler (Hücre siklusuna bağımlı kinazlar tarafından fosforile edildiğinde, E2F serbestleşir ve hücre çoğalmaya başlamaktadır (78, 81).

Hücre döngüsündeki görevinin ötesinde *RB1*, DNA replikasyonu, mitoz, kromatin yapısı, hücre metabolizması, hücresel farklılaşma ve hücre ölümü gibi fonksiyonları da düzenlemektedirler. Bu yolak büyümeyi baskılayıcı sinyallerin yanı sıra, büyümeyi uyaran sinyaller ile onun bileşenlerinin aktive olması ya da inhibe olması ile hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Bugüne kadar RB1 geninde 900'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (82).

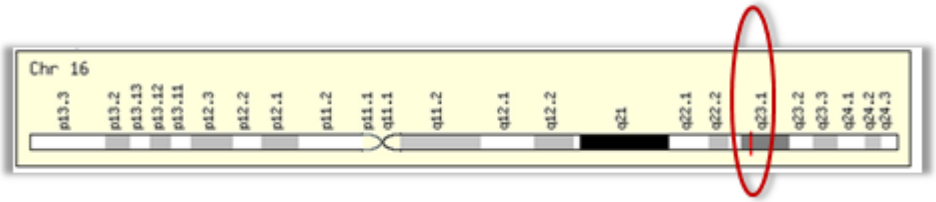
Gende büyük delesyonlar mevcuttur. Bu delesyonlar 18-26 ekzonlarını içermektedir.13q delesyonları nüks gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (33). Birçok çalışmada, AML hastalarında RB1 geninde büyük delesyonlar ve translokasyonlar olduğu rapor edilmiştir (83).

***ZNRF1***

Ubiquitin-proteozom yolu hücre içindeki hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa-ömürlü proteinlerin yıkımda önemli roller oynayan proteolitik yoldur. Sadece proteinlerin yıkımı değil aynı zamanda bazı transkripsiyon faktörlerinin (NF-κB) kısmi yıkılmasında (işlenerek olgunlaşmasında) ve aktivasyonundan da sorumludur. Ubiquitin, yıkılacak olan proteinlere bağlanmadan önce ilk olarak ubiquitin aktive edici enzim olan (E1)'e transfer edilir. Aktive edilen ubiquitin daha sonra benzer şekilde E1 enziminden ubiquitin konjugasyon enzimindeki (E2) bir sistin amino asitine aktarılır. Bu E2 enzimleri yıkılacak olan proteinlere ubiquitin molekülünü ubiquitin ligaz (E3) enzimi yardımı ile direkt aktarır veya ubiquitin E3 enzimine aktarıldıktan sonra substrat proteinlere aktarılır (84).

Zinc And Ring Finger 1 (*ZNRF1)*, E3 ubiquitin ligaz ailesi üyesidir. 16. kromozomun uzun koluna lokalize ve 5 ekzondan oluşmaktadır (48). E3 uniquitin ligaz proteinini kodlayan bu gen, nöron hücrelerinin farklılaşmasında görev almaktadır. Korunmuş çinko parmak kombinasyonundan oluşan C-terminal bölgesi taşımaktadır. *ZNRF1*, schwan hücrelerinin farklılaşmasında, tubulin aracılığı ile nöronların oluşumunun düzenlemesinde, *CRPM2*

fosforilasyonunu indüklenmesi, AKT inhibisyonunu sağlanması ve Wallerin dejenerasyonuna neden olur. AKT ailesinin üyesi olan Serin-Treonin protein kinazlar, hücre davranışlarının belirlenmesinde, hücre çoğalması, hayatta kalması ve tümör oluşumunda görev almaktadır (85).



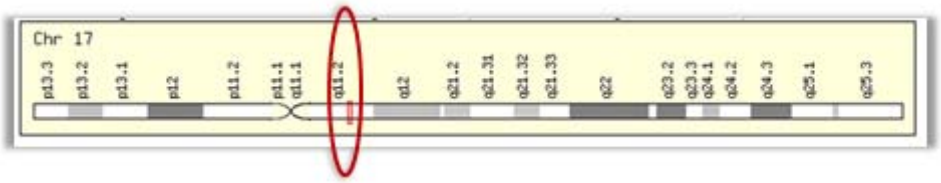

Şekil 2.13.*ZNRF1* kromozomal lokasyonu (48)

Sentrozom çoğalması hem solid tümörlerde hem de hematolojik kanserlerde sıklıkla görülmektedir. Sentrozom çoğalmasının, kanser hücrelerinde kromozom stabilitesini etkileyen en büyük faktör olduğu düşünülmektedir (86).

Sentrozom birbirine dik yerleşmiş, amorf bir sentriyol çevre maddesi ile çevrelenmiş, bir çift sentriyol içermektedir. Sentriyoller dokuz adet üçerli mikrotübülden oluşan silindirik yapılardır. *ZNRF1,* sentrozomun yapısında bulunan tubülin proteini yıkımı aşamasında da görev almaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde *ZNRF1* 'nin direkt lösemi ile ilişkisini belirten kesin kanıtlar yoktur. Ancak *PAX5* delesyonları ile birlikte lösemi gelişimine neden olabileceğini bildiren tek çalışma mevcuttur (87).

***NF1***

Neurofibromin 1 (*NF1*), 17. kromozomun q11.2 bölgesinde lokalize olmuştur ve 11-13 kilobazlık olan gen, 60 ekzon içeren m-RNA kodlamaktadır (48, 88).




Şekil 2.14.*NF1* kromozomal lokasyonu (48)

*NF1* ifadesi, vücutta yaygın olarak görülmekle birlikte özellikle sinir sisteminde ifadelenme düzeyi yüksektir. *NF1* ürünü, sitoplazmik protein "nörofibromin" dir. NF1 evrimsel süreç boyunca korunmuş bir proteindir. *NF1*, GAP Related Domain (GRD), genin fonksiyonel açıdan en önemli bölgesidir. Nörofibromin, GRD ile RAS-GTP'yi GDP' ye çevirerek inaktivasyon yapmaktadır. Nörofibrominin kaybı hücrede mitojenik RAS sinyal yolağının devamlı aktivasyonuna neden olarak ve kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açmaktadır.

*NF1*, RAS ile etkileşimi sebebi ile tümör baskılayıcı olarak bilinmektedir. RAS-GTP düzeyinin ve RAS yolağı sinyalinin, *NF1* ilişkili tümörlerde arttığı belirlenmiştir (89, 90).

RAS proteini, hücrenin yaşamsal döngüsü için önemli olan *Raf/MEK/ERK* ve *PI3K/Akt* yolaklarını kontrol etmektedir Bu iki yolak, hücre çoğalması, farklılaşması, sağ kalım ve apoptozis gibi fonksiyonları düzenlemektedir. Ras sinyalinin aşırı uyarılması durdurulamayan bölünme, invazyon, metastaz ve apoptozisin engellenmesine yol açar (89).

*NF1* üzerinde birçok mutasyon türü birden görülebilmektedir, özellikle splice bölgesi mutasyonları en çok görülen mutasyon türü olup, proteini oluşturan m-RNA'nın erken sonlanmasına neden olarak işlevsiz proteinlerin oluşumuna neden olmaktadır. Diğer görülen ve genin tamamında etkili olan mutasyon türü ise mikrodelesyonlardır. Oluşan mikrodelesyonlar içerisinde lösemilerinde bulunduğu malignant tümör riskini artırmaktadır. Lösemik hücrelerde *NF1* heterozigotluk kaybı söz konusudur. *NF1* mutasyonlarının JMML (Juvenil miyelomonositik lösemi) ve AML gelişimi ile ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur (91-93).

Hematopoetik hücrelerdeki *NF1*'in somatik inaktivasyonunun miyeloproliferatif hastalık oluşumuna neden olduğu gösterilmiş, bu sonuç *NF1*'in tümör baskılayıcı gen olarak rol oynadığını doğrulamıştır (94).

Balgobind (2008) pediatrik AML ve T-ALL hastalarında yapmış oldukları çalışmada, inaktive *NF1* allelinin hem teşhis hem de nüks örneklerinde, remisyonda olan hastalara göre varlığı gösterilmiştir (95). *NF1* mutasyonlarının nükse işaret edebileceğini ve nüks takibinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği, klonal olarak *NF1* mutasyonu taşıyan hücrelerin nüks durumunda atasal olarak davrandığı rapor edilmiştir (96).

#### 2.2.1.1.2. Sinyal İletim Mekanizması İle İlişkili Genler

***ZAP70***

Zeta-Chain (tcr)-Associated Protein Kinase 70 (ZAP70), T hücre aktivasyonunun erken aşamalarında önem taşıyan sitoplazmik, 70 kDa ağırlığında bir protein tirozin kinazdır (PTK). *ZAP70* 2.kromozomun uzun kolunda q11.2 de lokalize olmuştur ve 14 ekzondan oluşmaktadır. Fosforilasyonun olması ile proteinin aktif hale gelmesini sağlayan Kinaz SH2 domainleri mevcuttur (48, 97).




Şekil 2.15.*ZAP70* kromozomal lokasyonu (48)

*ZAP70*'in çoğunlukla, T-lenfositler ve doğal öldürücüler (Naturel Killer) hücrelerde ifadelendiği bilinmektedir. T-hücre sinyalizasyonunun başlatılmasında kritik bir role sahiptir. T lenfositler, T hücre reseptörü (THR)'leri antijen sunan hücrelerin (makrofaj, dendritik hücre ve B-hücre vb.) sunmuş oldukları antijen parçalarının uzantıları ile etkileşime girince aktive olmaktadır. Aktivasyonun ardından, tirozin kinaz hücre içinde bulunan CD3 kompleksini fosforile ederek aktifleştirir. CD3- zeta ZAP70 ile bağlanan, CD3 ailesinin önemli bir parçasıdır. ZAP70'in SH2 bölgesi ZAP70'in transmembran proteinini fosforile eder, bu sayede CD3-zetanın immünoreseptörtirozin-temel aktivasyon motifleri (ITAMs) çift fosforilenmiş olur. Fosforile olmuş T hücre aktivasyon bağlayıcısının sinyal proteinleri bağlanması bu sayede değişir ve T hücre farklılaşması, çoğalması ile ilgili hedef genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (97-101).

Sağlıklı B hücrelerde *ZAP70* olmamasına rağmen, B lenfositlerde ifadelenen Syk protein tirozin kinazı *ZAP70* ile %73 homoloji göstermektedir, bu proteinler T ve B hücre serisinin antijen tanıma yolağında homolog görevler yapmaktadırlar. Bazı çalışmalarda Syk eksikliği olan B hücrelerde bu görevi *ZAP70*'in üstlendiğini bildirmişlerdir (102).

*ZAP70* ifadelenmesi kemik iliğinde B hücre serisinin, pro-B den pre-B hücre geçiş aşamasında oldukça önemlidir. Genetik olarak inaktive edilmiş *ZAP70* taşıyan pre-B-hücre

reseptörünün kontrol ettiği hücre çoğalması, farklılaşması gibi işlevlerin bozulmasına neden olmaktadır (103).

*ZAP70,* kronik lenfosittik lenfomanın farklı formlarında prognostik faktör olarak kullanılmaktadır. *ZAP70* ifadelenmesi sadece kronik lenfoblastik lenfomada görülmemekte aynı zamanda, öncü-B ALL ve Diffüz büyük B-hücreli lenfoma gibi diğer hematolojik hastalıklarda da görülmekte olduğu rapor edilmiştir ve *ZAP70* ifadelenmesinin kötü prognostik risk faktörü olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (102, 103).

*ZAP70,* B hücreli kronik lenfoblastik lösemili grupta yüksek miktarda ifadelenmektedir. Bu ifadelenmenin, ağır zincir immünologlobin genindeki somatik mutasyonların eksikliği ile bağlantılı olduğu ve yine *ZAP70* ifadelenmesinin hastalığın prognozu ve sağ kalım ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. *ZAP70* ifadelenmesi ve agresif seyreden hastalığın arasındaki ilişki henüz aydınlatılmamıştır. Fakat yapılan araştırmalarda lösemik hücrelerde *ZAP70* 'in, B- Hücre Reseptörü (BHR) sinyalinin arttırdığı gösterilmiştir (104).

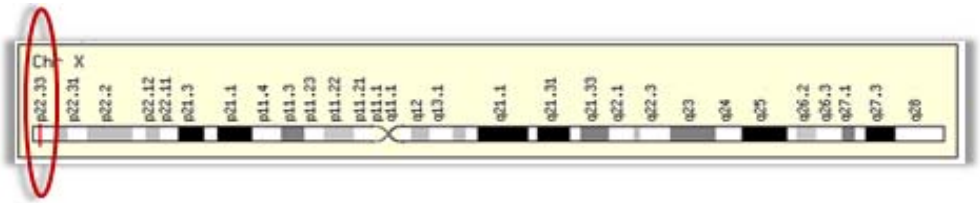
Ebeid (2008) yeni tanı B-ALL tanısı almış 50 çocuk hastada, *ZAP70* ifadelenmesinin prognostik risk faktörleri üzerindeki etkisini incelemeyi amaçlamışlar ve *ZAP70* ifadelenmesi ile hastalıksız sağ kalım ve artmış nüks oranı arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir (105).

Wandroo (2008) 12 pediatrik öncü B-ALL hastasının örnekleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada *ZAP70* ifadelenmesinin artmış olduğu, bu nedenle tanı ve tedavi aşamasında prognostik risk faktörü olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (106).

Literatürde T-ALL de ekzon 3,12 ve 13 te ZAP70 protein fonksiyonlarını bozan nokta mutasyonları tanımlanmıştır. İmmün yetersizlik ile ilişkilendirilmiş 5-UTR bölgesinde olan mutasyonların B-ALL örneklerinde olmadığı fakat *ZAP70* ifadelenmesinin artmış olduğu gözlenmiş farklı mutasyonların olabileceği öngörülmüştür (107).

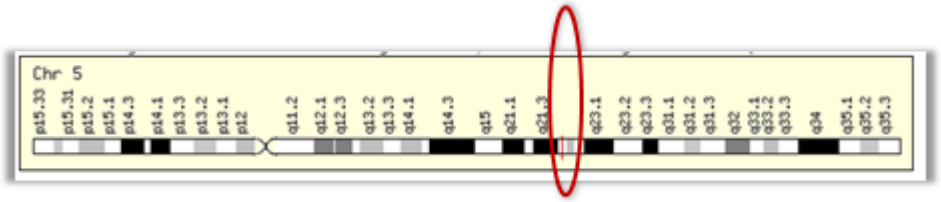
***CRLF2 ve TSLP***

Sitokinler ve reseptörleri, hematopoezde hücre canlılığı, çoğalması ve farklılaşması gibi önemli görevlerde rol oynarlar. Cytokine Receptor-Like Factor 2 (*CRLF2*), X kromozomunun kısa kolunda p22.3 te lokalizedir ve 8 ekzondan oluşmaktadır (48, 108).




Şekil 2.16.*CRLF2* kromozomal lokasyonu(48)

Thymic stromal lymphopoietin receptor (TSLPR) proteini, B-ALL de proto-onkogen olarak da bilinmektedir. CRLF2, IL7 alt ünitesi olan IL7R ile kompleks oluşturan ligandı Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 'e bağlanır. TSLP, inflasmasyon bölgesinde epitel hücreler tarafından üretilir, üretilen TSLP miyeloid dendritik hücreler ile Th2 cevabını aktive eder. Ayrıca TSLP, erken dönem B-hücre gelişimini desteklediği ve in-vitro çalışmalarda B-ALL gelişimine neden olduğu bildirilmiştir. 5. kromozomun uzun kolunda q22.1 de lokalize olan *TSLP,* 5 ekzondan oluşmaktadır. TSLP, interleukin-2 sitokin aile üyesi tip 1 sitokindir (48, 109, 110).




Şekil 2.17.*TSLP* kromozomal lokasyonu (48)

TSLP sinyalizasyonu, IL7α ve TSLP reseptör alt ünitesi γ zincirinden oluşan heterodimerik reseptör kompleksi aracılığı ile olmaktadır. *TSLP* kas hücrelerinde, akciğer fibroblastlarında ifadelenmektedir, organ seviyesinde ise kalp, akciğer, karaciğer, dalak ve prostatda bulunmaktadır. Farelerde, TSLP'nin $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerini aktive etmekte, insanda ise B-hücre serisi çoğalması ve farklılaşmasını sağlamakta olduğu bildirilmiştir (111).

Reseptör kompleksine bağlanması ile TSLP birçok sinyal yolağını aktive edebilir özellik kazanmaktadır, JAK2 STAT, AKT1, ERK1/2, JAK2, Ribozomal protein S6 ve 4E-BP1 gibi proteinleri içeren sinyal yolakları TSLP uyarılması ile aktifleşmektedir. TSLP sinyalizasyonu için IL7R ve CRLF2 nin heterodimerik reseptör kompleksi oluşturması gereklidir ve kompleks oluşması ile JAK2'ların fosforilazyonu ve aktive olması sağlanır. Sadece JAK'ların değil aynı zamanda AKT1, ERK1/2, JNKs, ribosomal protein S6 kinase

ve 4E-BP1 gibi diğer proteinlerinde aktive olması TSLP sinyalizasyonu içerisinde bulunmaktadır (111-113).

Scheeren (2010) yaptıkları çalışmada TSLP'nin fetal insan öncül B-hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını tetiklediğini, *TSLP*'nin insan fetal karaciğer kök hücresinde, pro-B ve pre-B hücrelerinde ifade edildiği rapor etmişlerdir (113).

Yoda (2010) *TEL, MLL, TCF3* ve *BCR-ABL* translokasyonları yokluğunda, *CRLF2* ifadelenmesinin önemli ölçüde artması kötü prognoz ile karakterize olduğunu pediatrik ve yetişkin B-ALL de rapor etmişlerdir. *CRLF2* ifadesinin artmış olması, hastalığın yüksek risk olarak sınıflandırılmasına neden olduğu ve bu ifade artışının çocuklarda ve yetişkinlerde benzer etkileri klinik olarak gösterdiğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda *FLT3* mutasyonun varlığının klinik için karar verme noktasında olduğu gibi, B-ALL de artmış *CRLF2* ifadesi allojenik kök hücre naklinin yapılıp yapılmamasına ya da kemoterapinin devam edilip edilmeyeceğine karar verilmesinde anahtar rol oynayabileceği bildirilmiştir (114).

Pediatrik ve yetişkin öncü B-ALL'de *CRLF2* mutasyon sıklığı %6 olarak bildirilmiştir (41). BCR-ABL pozitif hastaların %50 si CRLF2 geninde kromozomal translokasyonlar taşımaktadır. Bu translokasyonların büyük çoğunluğu CRFL2-P2Y8 ile CRLF2-IGH lokusu arasında olmaktadır (115).

Çoğu protoonkogenin aktif hale gelmesinde tek bir genetik anomali söz konusu olurken, *CRLF2'*nin aktifleşmesinde 2 genetik anomali mevcut olduğu düşünülmektedir. Birincisi gende olan delesyonlar, ikincisi ise *CRLF2, JAK2,STAT* yolağında olan somatik mutasyonların birlikteliği olarak sıralanabilir (116).

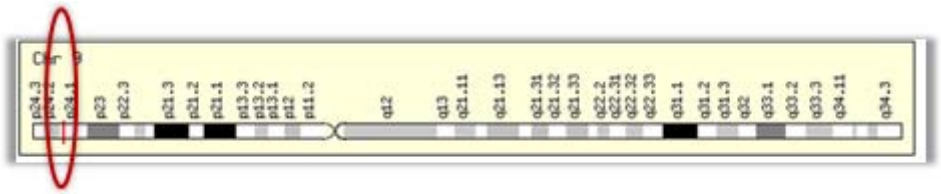
Artmış ifadelenme seviyesi *CRLF2* ve *JAK2* mutasyonlarının birlikteliği, hematopoetik hücrelerin transformasyonuna ve B-ALL oluşumuna neden olabileceği çalışmalarda rapor edilmiştir (117).

Tanımlanmış olan *CRFL2*-F232C mutasyonu, hematolojik ve non-hematolojik tümörlerde sitokin reseptör dimerizasyonunu bozmaktadır. Bu mutasyonun varlığı JAK2 enzimatik inhibitörlüğüne ve JAK2'nin fosforilasyonunun engellenmesine neden olur. F232C aktif mutasyonun lösemi ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur. *CRLF2* ifadelenmesinde artış ve

*JAK2* mutasyonlarının birlikteliği JAK-STAT yolağının kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır (118).

***JAK2***

*JAK2* (Janus Kinase) 9 kromozomun kısa kolunda 9p24 te lokalizedir, 25 ekzondan oluşmaktadır ve 4 farklı üyesi ( Tyk2, JAK1, JAK2 ve JAK3) bulunan JAK ailesinin üyesidir (48).



Şekil 2.18. *JAK2* kromozomal lokasyonu (48)

JAK aile üyeleri, JH1 ve JH2 olarak isimlendirilen ve birbirlerine yapısal olarak oldukça benzemekte olan 2 farklı bölgeden oluşmaktadırlar. JH1 Domain, fonksiyonel kinaz aktivitesine sahip, JH2 Domain ise diğer bölgelerin görevlerini düzenleyici rol oynamaktadır. Bu bölgelerin dışında bir SRC homoloji 2 Domain (SH2) ve tip 1 sitokin reseptörlerinin bağlandığı bir amino terminal FERM (Family of 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin) homoloji Domain içermektedirler (119, 120).

Signal Transducer and Activator of Transcription Protein (STAT)'ler hücre büyümesi, farklılaşması, programlanmış hücre ölümü, fetal gelişim, transformasyon, inflasmasyon ve immün cevap gibi değişik önemli biyolojik olaylara aracılık etmektedirler. STAT' lar 7 (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) farklı transkripsiyon faktöründen oluşmaktadırlar ve tüm STAT proteinleri aynı yapıya sahiptir. STAT'lar transaktivasyon bölgelerinde sakladıkları tirozin rezidüllerinin, JAK aracılığı ile fosforilasyonu sonucu, aktive olurlar ve hedef gen transkripsiyonunu arttırmak için hücre içinde dimerleşir ve translokasyona uğrarlar (121, 122).

JAK-STAT sinyal ileti yolu, hematopoez için özellikle önemlidir. Reseptör, liganı olan sitokin ile bağlandığında, her iki JAK domaini birbirlerini fosforile edebilecek şekilde yakınlaştıran konformasyonel değişime uğramaktadır. JAK2 proteininin tirozin rezidüleri fosforile olur ve reseptörde SH2 bölgesi bulunduran proteinler ile etkileşime girebilecek bölgeler ortaya çıkmaktadır. Bu tirozin rezidülerine bağlanabilen, SH2 bölgesi taşıyan

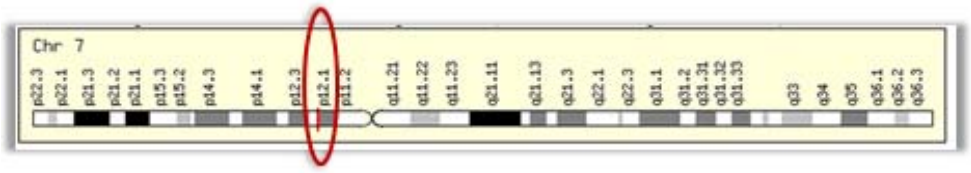
STAT'lar reseptörde birikir ve bunlarda JAK2 tarafından tirozin fosforilasyonuna uğrayarak aktive olurlar. Aktive olan STAT proteinleri homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılır ve hücre çekirdeğinde birikerek DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek, hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Anormal STAT aktivasyonunun apoptozis, dirençli, büyüme faktörlerinden bağımsız hareket eden, düzensiz hücre çoğalması sonucu, lösemi gelişimindeki olaylar zincirine katkısı olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (120, 123, 124).

Sitokin reseptör ve JAK ailesi üyeleri, B-ALL çalışmalarında büyük önem kazanmaya başlamışlardır. *JAK* mutasyonları, öncü B-ALL'de %10 olarak rastlanmaktadır. Özellikle BCR-ABL benzer B-ALL de, *JAK* mutasyonlarının *IKZF1* ve *CDKN2A/B* değişimleri birlikteliği, lenfoid gelişimi, tümör baskılanmasını, tirozin kinaz aktivasyonlarını dâhil olmak üzere birçok hücresel yolakta görev alan genlerde olan genetik lezyonlar ile bağlantılıdır. *JAK2* mutasyonlarının, Down-sendromlu ALL'de *CRLF2* rearanjmanları ile birlikteliği %60 civarındadır (125).

#### 2.2.1.1.3. Gen İfadesi Kontrolünü Sağlayan Genler

***IKZF1***

7.kromozomun kısa kolu 7p12.2 de lokalize olan *IKZF1* (Ikaros Family Zinc Finger-1) 8 ekzondan oluşmakta olan bir transkripsiyon faktörüdür. IKAROS ailesi, N- ve C-Terminal uçlarında yüksek korunmuşluğa sahip olan Çinko parmak bölgeleri taşıyan Krupple tip Çinko parmak proteinlerindendir (48, 126).




Şekil 2.19.*IKZF1* kromozomal lokasyonu (48)

4 adet korunmuş Zn parmaktan oluşan N-Terminal uçtaki Zn parmak bölgesi ekzon 3 ve 5 tarafından kodlanarak diziye özel DNA bağlanma bölgesinin oluşumu sağlanır. N-Terminal bölgede 2. ve 3. çinko parmaklar tarafından sağlanan A/GGGAA DNA dizisi özel bağlanma motifi lenfosit farklılaşması aşamasında gereklidir. 2 adet korunmuş Zn parmaktan oluşan C-Terminal uçtaki Zn parmak bölgesi ise ekzon 8 tarafından kodlanır,

kendisinin ve diğer aile üyelerinin oligomerizasyonu için gereklidir. Oligomerizasyonun, *IKZF1* DNA bağlanma aktivitesini artırdığı in-vitro ve in-vivo çalışmalar ile gösterilmiştir (126-128).

*IKZF1*, normal lenfoid gelişiminde önemli olan IKAROS transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır, aynı zamanda bu faktör eritroid ve miyeloid serinin farklılaşmasında da görev alır. Normal lenfoid seri gelişiminde, *IKZF1* hücre döngüsünde görev alan transkripsiyon düzenleyici genler olan *CKN1Ave CDKN1B* aracılığı ile hücre döngüsünde G1-S geçişini durdurur. *CK2* (Casein Kinaz II) ile fosforile olan IKAROS'un DNA bağlanma kapasitesi azaltılır ve hücrenin S fazında ilerlemesi sağlanır (129).

Winandy (1995) *IKZF1* heterozigot mutant fareler üzerinde yapılan çalışma sonucunda, embriyonik dönemde lenfosit gelişiminin normal olduğu gözlenirken, doğumdan hemen sonra hücre çoğalmasının arttığı ve farklılaşmanın olmadığı ve doğumdan sonraki 3 ay içinde lösemi-lenfoma geliştiği gözlemlenmiştir (130).

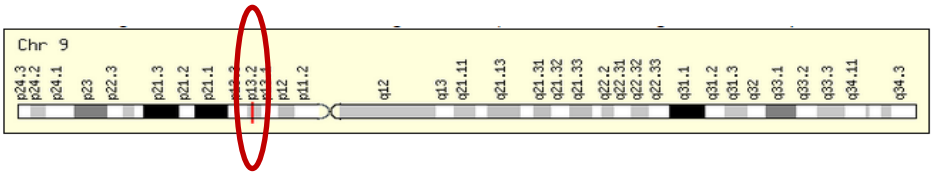
*IKZF1* delesyonları, pediatrik öncü B-ALL risk sınıflandırılması amacı ile kullanılması düşünülen prognostik biyobelirteçler arasındadır (131). Gende olan delesyon veya mutasyonlar BCR-ABL negatif, pediatrik öncü B-ALL de kötü prognoz ile karakterizedir (132). *IKZF1* delesyonları, *BCR-ABL* pozitif B-ALL de %70, *BCR-ABL1* negatif grupta ise %40 ilişkilidir ve her iki gruptada artmış nüks riski ve azalmış yaşam ömrü ile karakterizedir. Lenfosit farklılaşmasında temel düzenleyici olduğu bilinen *IKZF1*'in bu gelişimsel sisteme 2 önemli katkısı olduğu bilinmektedir. Bunlardan birincisi erken hematopoetik öncülerin lenfosit seriye farklılaşma potansiyelini sağlamasıdır, diğer önemli katkısı ise T ve B öncü hücre serilerinin çoğalma ve farklılaşma aşamasında, bu hücrelerin antijen repertuvarlarının seçimi ve kombinasyonlarının oluşumuna aracılık etmesidir. IKZF1 aktivitesinin kaybı sonucunda, B ve T öncü hücre lenfosit serisinin farklılaşma hataları nedeni ile lösemi oluşumu gerçekleşmektedir (131, 132).

Dai (2014) yapmış oldukları 165 çalışmanın dâhil edildiği meta analiz çalışması sonucunda, Avrupa popülasyonu için, *IKZF1* üzerinde bulunan rs4132601 ve rs11978267 numaralı değişimlerin pediatrik öncü B-ALL oluşumuna neden olabileceğini rapor etmişlerdir (133).

*IKZF1*'in lenfoid seri farklılaşmasında olan görevi iyi bilinmesine rağmen, miyeloid serideki görevi henüz tamamıyla aydınlatılmamıştır, fakat miyeloid farklılaşmada görev aldığını belirten çeşitli işaretler söz konudur. Erken miyeloid seri öncüllerinde, *IKZF1* fonksiyon kaybı öncül hücrelerin yaşam sürelerini uzatmaktadır. Eritropoez sırasında, *IKZF1* eritroid seri hücrelerinin canlılığını ve farklılaşmasını desteklemektedir (134).

***PAX5***

Transkripsiyon faktörü olan Paired Box Domain Gene 5 (*PAX5),* B hücre serisinin gelişiminde rol oynayan önemli bir gendir. Transaktivatör ve baskılayıcı bölgesi olması nedeniyle, hedef genleri hem aktive etme hem de baskılama özelliği mevcuttur. Bu nedenle, B-hücre gelişiminde rol oynayan önemli genleri aktive ederken, diğer hücre serilerinin gelişiminde önemli genlerin baskılanmasını sağlamaktadır. B hücre lenfopoiezinin başlangıç aşamasında, *EBF* tarafından *PAX5* ifadelenmesinin baskılanması gerçekleşir, bu başlangıç aşamasının sonucunda B-lenfoid serisi gelişimi ve olgunlaşması için *PAX5* ifadelenmesinin baskılanması ortadan kalkar ve erken B-hücrelerinden plazma hücresi oluşum aşamasına kadar görev ifadelenmesi devam eder. Bu nedenle *PAX5*'in B hücre gen ifadelenmesinde anahtar gen olduğu düşünülmektedir (135).*PAX5*, 9. kromozomun kısa kolu 9.p13 te lokalize olmuştur, 10 ekzondan oluşmaktadır (48, 87).




Şekil 2.20. *PAX5* kromozomal lokasyonu (48)

*PAX5*, N terminal ucunda bulunan Paired Box Domain (PBD), Oktapeptid Domain (O), Homeo Domain (HD) ile hedef genlerinin aktive olmasını sağlayan "prolin, serin ve threonin açısından zengin Domain (PST), Transaktivasyon Domain (TD) ve hedef genlerinin baskılanmasını sağlayan Inhibitory Domainden (I)" oluşmaktadır. PBD, B hücre gelişimi, B hücre serinin farklılaşması ve diğer hematopoetik serilerinin baskılanmasında önemli görev almaktadır. *PAX5* inaktivasyonunda, olgun B hücrelerinin pro-B aşamasına

geri döndüğü, bu aşamadan sonran sitokinler ile uyarılmaları sonucu farklı hücre serilerine farklılaşabildikleri (transdifferansiyon) bildirilmiştir (136).

*PAX5*, öncü B-serisi spesifik genlerinin transkripsiyon aktivasyonu kontrol ederek, diğer lenfoid serilerinin baskılanmasını ve olgun B-serisinin oluşumunun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Hematopoetik kök hücreler ve öncül lenfoid seri hücrelerdeki kontrolsüz *PAX5* ifadelenmesi T hücrelerinin azlığına, B hücrelerinin aşırı çoğalmasına neden olmaktadır. *PAX5,* öncül lenfoid hücrelerin hematopoetik hücre serilerine farklılaşmasını engelleyip bu öncül hücrelerin B hücrelerine yönlendirilmesini sağlayan özgün bir yazılım faktörü olması açısından B lenfositleri için çok önemlidir (137).

*PAX5,* B–ALL oluşumundaki somatik mutasyonların ana hedefidir. Öncü B-ALL'nin %30'unda *PAX5* monoallelik kayıp veya nokta mutasyonları içermektedir. *BCR*-ABL negatif yüksek risk öncü B-ALL'nin %31,7 sinde genomik delesyonlar tespit edilirken, bu rakam *BCR-ABL1* pozitif grup için yaklaşık %33 olarak belirlenmiştir. Yeniden düzenlenmeler ise %2–3 sıklık ile görülmektedir (138). *PAX5* delesyonları, *PAX5* inaktivasyonun asıl nedeni olarak gösterilmişlerdir. Bu delesyonlar *PAX5* haploinsuffiency 'ne ve/veya DNA bağlanma bölgesi bozulan *PAX5* ifadelenmesine neden olmaktadır. *PAX5* haploinsuffiency *STAT5* veya *BCR-ABL1* aktivasyonuna sebep olarak ALL başlamasına neden olabilmektedir (139, 140).

Mullighan (2009) yaptıkları çalışmada 242 pediatrik B-ALL hastasının %32'sinde *PAX5* mutasyonu tespit edilmiştir (132). Familiades (2009) 119 yetişkin Pro B-ALL hastasında yaptığı çalışmada, hastaların %30'un da *PAX5* mutasyonu tespit edilmiştir (141).

Shang (2013) pediatrik ve yetişkin B-ALL hastalarında, PAX-5 gen değişimleri taşıyan bireylerde, *ZNRF1* ifadelenmesinin önemli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir ve *PAX5* değişimleri taşıyan hastalarda *ZNRF1*'in lösemi gelişimine neden olabileceği görüşünü bildirmişlerdir (87).

Shah (2013) öncü B-ALL örneklerinde 2 farklı aileyi oluşturan bireylerde, eksom sekanslama tekniği ile PAX5 geninde tekrarlayan germline bir mutasyon (p.Gly183Ser) tanımlamışlardır, bu mutasyon genin octapeptid bölgesinde olup, bu mutasyonun öncü B-ALL patogenezinde önemli olduğu rapor etmişlerdir. Mutasyon tanımlanması ardından

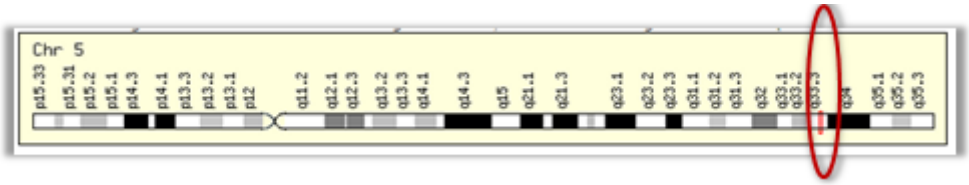
yapılan fonksiyon ve gen ifadelenmesi belirleme çalışma sonucunda mutasyonun transkripsiyonel aktivasyon özelliğini azaltıcı etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (142).

Fazio (2015) pediatrik ve yetişkin öncü B-ALL hasta örneklerinde, PAX5 geni ile 5 yeni füzyon transkript (*PAX5-CHFR/PAX5-SOX5/PAX5-POM121C/PAX5-MLLT3/PAX5-AUTS2*) tanımlamışlardır (143).

Füzyon transkriptler PAX5 geninin transaktivayon bölgesi ve baskılayıcı bölgesinin inaktivasyonuna neden olacak şekilde oluşmakta olduğu ve anormal transkripsyon faktör olarak çalışmaya başladığını rapor etmişlerdir. Her biri hastalığın prognozu açısından oldukça önem taşımaktadır, PAX5-AUTS2 füzyon transkriptinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu Denk (2012) yaptığı çalışmada bildirilmiştir. Yüksek heterojenlik gösteren *PAX5* füzyon transkriptlerinin, her birinin lösemi gelişimi üzerinde olan katkısını anlamak oldukça zordur, fakat her bir füzyon transkript lösemi gelişiminin oluşma nedenini aydınlatıcı bir işaret olabileceği düşünülmektedir (143, 144).

***EBF***

İnsan EBF transkripsiyon faktör ailesinin 4 üyesinden biri olan Early B cell factor 1 (EBF1), B hücre serinin farklılaşmasında anahtar olarak görev yapmaktadır. *EBF1* CD79a promotörüne, DNA bağlanma bölgesi aracılığı ile bağlanarak, CD79a transkripsiyonel aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. *EBF1*, 5.kromozomun uzun kolu q.34 üzerinde lokalize ve 17 ekzondan oluşmaktadır (48).




Şekil 2.21. *EBF1* kromozomal lokasyonu (48)

N-terminal bölgesinde oldukça yüksek korunmuşluğa sahip DNA Bağlanma Domain (DBD) bulundurmaktadır, DBD'i takip eden Ig-like/Plexins/Transcription Factors (IPT) Domain ile arasında bulunan RRARR motifi nükleer lokalizasyon sinyalini sağlamaktadır. *EBF1*'nin homo ve heterodimerizasyonu Helix-Loop-helix (HLH) Domain ile sağlanmaktadır, son olarak C-terminal bölgesinde transaktivasyon bölgesini bulunmaktadır (145).

EBF ailesi proteinlerinin, diğer DNA bağlanma transkrisyon faktörleri gibi yapısı ve fonksiyonu iyi tanımlanmıştır. DNA bağlanma bölgesi diğer türler arasında %75 ten fazla korunmuşluk göstermekte olan diziden oluşmaktadır (146). Daha az korunmuş olan C-terminal bölgesi transkripsiyonel aktivasyonda büyük rol oynamaktadır. Bu bölgede olan delesyonlar, transkripsiyonel aktivasyonunu bozmaktadır (147, 148).

DBD, IPT ve TIG bölgelerinde olan missense mutasyonları genin fonksiyonunu bozmaktadır. *EBF1*, B-hücre serisi gelişimde görev alan, *PAX5* transkripsiyon faktörü gibi genlerin ifadelenmesine katılmaktadır. *EBF1, PAX5* promotörüne bağlanarak *PAX5* ifadesini artırmaktadır, B-hücre farklılaşma aşamasında ve diğer hücre serilerinde ifadelenen genlerin baskılanmasını *PAX5, E2A* ve *EBF1* birlikte sağlamaktadır (139). *PAX5* mutant pro B-hücrelerinde kontrolsüz *EBF1* ifadelenmesi transkripsiyonel faktörler olarak bilinen birçok (C/EBPα, PU.1, ve ID2) genin down regülasyonuna neden olmaktadır (146).

Yapılan çalışmalarda, pro-B hücrelerinde aktive edilmiş ya da baskılanmış birçok genin olduğu, *EBF1*'nin bu epigenetik değişiklikleri başlatıcı konumda olduğu ortaya çıkarılmıştır. *EBF1*'i diğer transkripsiyon faktörlerinden ayıran en önemli fark, B hücre serinin gelişiminde kromatinin epigenetik yeniden düzenlenmesini aktive edebilmesidir. EBF1, direkt olarak kromatin yeniden düzenlenme kompleksleri olan SW1/SNF ve ko-aktivatörleri ile ilişki içerisindedir. Erken B-hücresi spesifik *CD79a* promotörüne, *EBF1*'nin bağlanması ile DNA metilasyonun azalması ve kromatin açılmasının artması gerçekleşmektedir (148).

Prasad (2015) EBF1 geninin DNA tamir mekanizmasından sorumlu birçok (RAD51, SMC2, RAD51AP1) genin transkripsiyonel düzenlemesinde görev aldığını bildirmişlerdir. Bu genlerden biri olan *RAD51*'in downregülasyonu DNA tamir mekanizmasında işlev kaybına ve çift zincirde kırıklar oluşmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Öncül B-hücrelerde *EBF1* heterozigotluğu lösemiden kaynaklanan hayatta kalma süresi %87 iken, *PAX5* birlikteliği ile bu süre 40 için %25'e düşmektedir (149).

Györy (2012) yapmış oldukları, genom tabanlı ilişkilendirme çalışmasında *EBF1* B-hücrelerinin erken ve geç gelişim evrelerinde birçok genin (*IRF4, IRF8, TCF3 (E2A),*

*PAX5, AİOLOS (IKZF3), IKAROS (IKZF1), MYB ve MYBL2)* transkripsiyonel aşamada kontrolünü sağladığını rapor etmişlerdir (150).

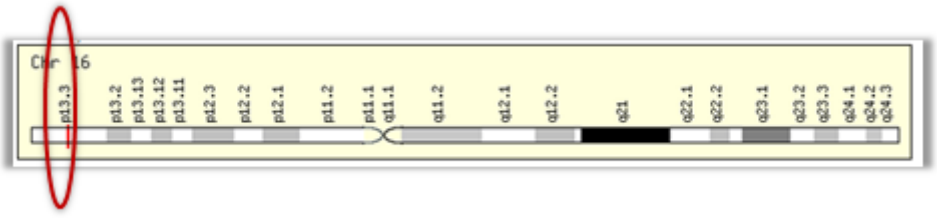
Sonuç olarak çalışmalardan elde edilen verilere göre, *EBF1'*in B-hücre gelişiminin tüm aşamalarında en önemli gen olduğu bildirilmiştir.

#### 2.2.1.1.4. Epigenetik Regülasyon/ Tedaviye Cevapta Görev Alan Genler

***CREBBP***

CREB Binding Protein **(**CREBBP) hücre çoğalmasında, farklılaşmasından ve sağ kalımından sorumlu genlerin etkinliğini düzenleyen, birçok nüklear proteinin ifadelenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörüdür. Bu görevinin yanı sıra CREBBP'nin, histonasetiltransferaz fonksiyonu da olduğu bilinmektedir ve bir dizi histonik olmayan proteinin asetillenmesinde görev almaktadır (151).

CREBBP ve paraloğu olan EP300; embriyonik gelişim, hematopoez, homoestazın düzenlenmesi, büyüme kontrolü biyolojik fonksiyonlarında kilit noktasındadır (152). 16. kromozomun kısa kolu 13.3 te lokalize olan *CREBBP*, 31 ekzondan oluşmaktadır (48).CREBBP, bir kinaz uyarılabilir bölge (KID), 2 adet glutamin zengin bölge ve bir bazik lösin fermuar bölgesi içeren bir proteindir. KID ve glutamin zengin bölgeler CREBBP in transaktivasyon ve fosforilasyonu için önemlidirler. Genom tabanlı yapılan çalışmalarda CREBBP'in yaklaşık 4000 promotör bölgesi ile ilişkili olduğu ve en önemlilerinin hücre döngüsünde görev alan RAS, siklin, ısı şok proteinleri olarak rapor edilmiştir (153).




Şekil 2.22.*CREBBP* kromozomal lokasyonu (48)

Hücre çoğalması, hayatta kalması ve farklılaşması gibi önemli hücresel fonksiyonları düzenleyen transkripsiyon faktörü olan *CREBBP* literatürde çoğu çalışmaya konu olmuştur. ALL ya da AML hastalarına ait kemik iliği örneklerinde *CREBBP*

ifadelenmesinin artmış olduğu çalışmalarda gösterilmiş ve özellikle AML hastaları için bu ifade artışının kötü prognoz olarak tedavide seyrettiği bilinmektedir (153).

Nüks etmiş ALL'nin biyolojik mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Son yıllarda genom ebadına yapılan çalışmalarda, tanıdan nükse kadar olan evrede birden çok genetik anomalinin olduğu ortaya konulmaktadır. Mullighan (2011) ALL'li hasta örneklerinde yapmış oldukları çalışmada, transkripsiyonel faktör olan *CREBBP*'in tanı ve nüks örneklerinde somatik mutasyonlar taşıdığını, bu mutasyonların *CREBBP*'in histon asetilasyon, transkripsiyonel düzenleme ve glukokortikoid tedaviye olan cevapta olan görevlerini bozduğunu rapor etmişlerdir (154).

Malinowska (2015) hiperdiploidi taşıyan 151 pediatrik ALL hastasında, *CREBBP* ve *KRAS* mutasyonlarının birlikteliğinin lösemik klon geliştirmek için yüksek risk getirebileceğini rapor etmişlerdir. Bu birlikteliğin hastalığın yüksek risk sınıflandırmasında girdiğini ve MRD için risk getirebileceğini rapor etmişlerdir. *CREBBP* mutasyonları taşıyan pediatrik ALL hastalarda nüks geliştirme riski %18-30 aralığında değişmekte olduğu rapor edilmiştir (155).

*CREBBP* ALL tanı örneklerinde artmış ifadenleme seviyesi gösterirken, remisyonda ya da lösemik olmayan hücrelerde ifadelenme seviyesinin artmadığı rapor edilmiştir. Bu nedenle artmış CREBBP seviyesi, hedef genlerin uyarılmasına, sonuç olarak hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Yapılan in vitro çalışmalarda *CREBBP* mutasyonlarının büyük çoğunluğunun genin HAT Domain üzerinde olduğu ve bu mutasyonların genin fonksiyonunu bozduğu, glukokortikoid direncini etkilediği ve nüks ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (156).

Ma (2015) 20 pediatrik B-ALL hastasının tanı ve nüks örnekleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada NT5C2, CREBBP, WHSC1, TP53, USH2A, NRAS ve IKZF1 genlerinde olan mutasyonların nüks geliştirme riskini artırdığını rapor etmişlerdir (157).

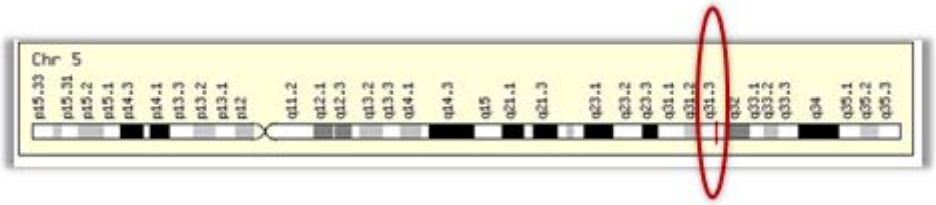
Huether (2014) 1000 (21 farklı kanser türü) pediatrik kanser hastasının örnekleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada, epigenetik düzenleyici proteinleri kodlayan 633 geni dizilemişler ve en sık mutasyon gördükleri *H3F3A, PHF6, ATRX, KDM6A, SMARCA4,*

*ASXL2, CREBBP, EZH2, MLL2, USP7, ASXL1, NSD2, SETD2, SMC1A ve ZMYM3* belirlemişlerdir (158).

Yapılan son çalışmalar göstermektedir ki, epigenetik mekanizmaların lösemi gelişiminde ve tedaviye verilen cevapta önemli olduğu bildirilmiştir. Epigenomun kontrolünü etkileyen birçok gende mutasyonlar tanımlanmış ve bu genlerin kodladığı proteinler DNA ya da kromatin paketlenmesinde önemli görevlere sahiptirler.

***NR3C1***

Nuclear receptor subfamıly 3, group c1 (NR3C1), streoid ailesi üyesi, 98kDa' luk sitoplazmik bir proteindir. 5.kromozomun uzun kolu q31.3 te lokalizedir ve 9 ekzondan oluşmaktadır (48).




Şekil 2.23. *NR3C1* kromozomal lokasyonu (48)

NR3C1'nin N-terminal ucunda, değişken transaktivasyon bölgesi, iki adet "zinc finger" taşıyan DNA bağlanma Domain (DBD), C-terminal ucunda ise ligand bağlama özelliği olan (LBD) bulunmaktadır (159). N-terminal transaktivasyon bölgesi, hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonundan sorumlu AF1 bölgesini içermektedir. İlk zinc finger bölgesi de reseptörünün transkiripsiyonel inaktivasyondan sorumlu AF1 ve nüklear faktör KB bağlanma bölgelerini taşımaktadır. İkinci zinc finger bölgesi reseptör dimerizasyonu ve glukokortikoid cevap elementinin aktivitesini sağlamaktadır (160).

İnsan glukokortikoid reseptörünün (hGR): hGR-α (fonksiyonel) ve hGR-β (hormon bağlamayan) olmak üzere 2 izoformu mevcuttur. Her iki izoformu aynı genden alternatif kesim yöntemi ile üretilmektedir. Bu iki izoform 727 a.a'e kadar identik'tir. 728–777 arasındaki a.a'ler GRα oluştururken, 728-742 arası a.a'ler GRβ oluştururlar. Ancak sadece hGR-α hormon bağlama özelliğine sahip iken, hGR-β fonksiyonu üzerinde çalışılmaktadır. Transkripsiyonel olarak inaktif olmasına rağmen, gen ifadelenmesini düzenleyici fonksiyonu olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. GR-β inaktif GR-α'ya bağlanarak

sinyal iletim mekanizmasını baskılama özelliği mevcuttur, fakat bu fonksiyonları henüz doğrulanabilmiş değildir (161).

hGR-β'nin hGR-α üzerinde negatif dominant etkisi olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Hücre içerisinde inaktif olan reseptör, hücre sitoplazmasında bazı proteinlere (hsp90, hsp70, FKBP2) bağlı halde bulunmaktadır. Bu proteinler, reseptörün inaktif haldeyken nükleusa geçmesini engellemektedir. Herhangi bir glukokortikoidin bağlanması ile bu proteinlerin reseptörden ayrılması ve böylece reseptörün aktive olması gerçekleşir. Son tanımlanan izoform ise hGR-γ dir, fonksiyonu henüz tam olarak belirlenememiştir (162, 163).

Glukokortikoidler etkilerini reseptörleri aktive ederek göstermektedirler. Aktif reseptörlerin *"transaktivasyon"* ve *"transrepresyon"* adı verilen 2 temel etki mekanizmaları bulunmaktadır. Transaktivasyonda aktif reseptör sitoplazmadan nükleusa geçmektedir. Burada DNA'nın Glukokortikoid Reseptör element bölümüne bağlanarak bazı genlerin ekspresyonunu arttırır ve azaltmaktadır. Transrepresyonda aktif reseptör sitoplazmadan nükleusa geçer. Burada NF-κB ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek özellikle immün sistemle ilgili bazı genlerin ekspresyonunu baskılar anti-enflamatuar etkiyi gerçekleştirmektedir (164, 165).

Glukokortikoid tedavi anti-inflamatuar ve immünsupressif etkinliği nedeniyle pediatrik dönemde oldukça sık kullanılmaktadır. Glukokortikoid tedavi ile hücre döngüsünün durdurulması sonucu hücre çoğalmasının engellenmesi sağlanmaktadır. Glukokortikoidler lösemi tedavisinde çok büyük önem taşırlar, lösemi hastaların önemli bir çoğunluğunda glukokortikoid direnci gelişmesi sonucunda, tedavi kür oranları etkilenmektedir. Glukokortikoidlerin hücresel litik etkileri glukokortikoid reseptörü aracılığı ile olmaktadır (166).

Pediatrik ALL hastalarının %10'u tedavi sırasında, glukokortikoid direnci ya da duyarlılığı geliştirmektedir. BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) gubunun belirlemesine göre glukokortikoid uygulamasına alınan ilk yanıt önemli bir prognostik faktör olmaktadır. Glukokortikoid uygulamasına direnç gelişmesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (167).

Yapılan çalışmalarda pediatrik ALL' de hGR-α ifadelenmesi ile klinik cevap arasında ilişki olduğu belirlenmiştir, fakat reseptör ifadelenme seviyelerinin, klinik kullanımda halen sınırlar mevcuttur. Glukokortikoid reseptöründe tanımlanan mutasyonlar genin iki farklı bölgesinde yoğunlaşma göstermiştir. Mutasyonlar genellikle, mikrodelesyon, nokta mutasyonu çerçeve kayması (frame shift) mutasyonu şeklindedir. Lösemili hastalarda gelişen glukokortikoid direncinin artmış GRβ ekspresyonu ve azalmış GRα / GRβ oranını ile ilişkili olduğu bildiren çalışmalar mevcuttur (166-168).

Longui (2000) T-ALL'li hasta grubunda yapmış oldukları çalışmada, klinik glukokortikoid direnci pozitifliği ile GRα/β oranı düşüklüğü arasında paralellik mevcut olduğu rapor edilmiştir (164). Haarman (2002) pediatrik lösemili hasta grubunda yapmış oldukları çalışmada, GR izoformları olan, GR-α, GR-β ve GR-γ Glukokortikoid direnci ile olan ilişkisini araştırmışlardır. GR-α, protein ve m-RNA düzeyinde ifadelenme seviyesi tüm lösemi alt gruplarında yüksek iken, T-ALL ve başlangıç aşamasındaki AML de düşük olduğun sonucuna varmışlar ve literatürde yapılan çalışmalar ile sonuçlarını karşılaştırarak doğrulamışlardır (169).

Labuda (2010) 310 pediatrik ALL hastada yapmış oldukları çalışmada NR3C1 geninde bulunan 4 polimorfizmi taramışlar ve bu polimorfizmlerin sağ kalım üzerinde etkisi olduğunu rapor etmişlerdir (p=0.03) (170).

Tissing (2006) pediatrik ALL hastalarında glukokortikoid reseptör promotor transkriptlerinin (1A1,1A2,1A3,1B ve 1C) glukokortikoid direnci ile ilişkisini incelemişlerdir ve sonuç olarak promotorda olan ifade farklılıklarının glukokortikoid direnci gelişmesi ile ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir (171).

## 2.2.2. BİYOBELİRTEÇ TANIMLAMA İÇİN KULLANILACAK MOLEKÜLER TEKNİKLER

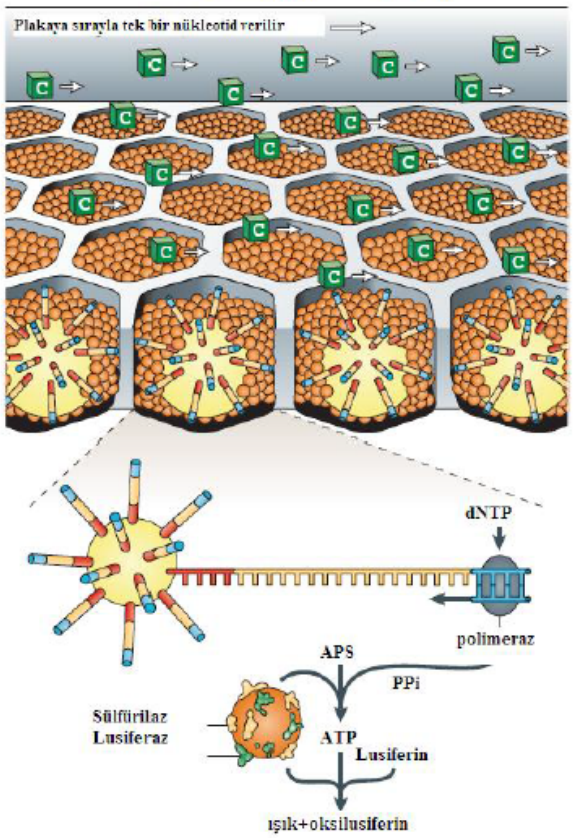
### 2.2.2.1. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi

Geliştirilen teknolojilerin uygulama alanları her geçen gün artmakta ve bu durum neticesinde bilimsel çalışmalardan elde edilen bilgilerin genişlemesi sağlanmaktadır. Yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılması ile insan, bakteri, bitki, virüs gibi pek çok farklı organizmanın genomunun hızlı ve doğru bir şekilde dizilenebilmesi sağlanmaktadır. (172).

Genom boyu nükleotid dizilemesini gerçekleştirebilen yüksek işlem hacimli yöntem "yeni nesil dizileme" olarak adlandırılmaktadır. Günümüzde tüm dünyada yaygın olarak kullanılan birkaç adet farklı yeni nesil dizileme platformu mevcuttur. Illumina®, GS-Junior, FLX 454, Applied Biosystems Inc, LifeTechnologies ve Pacific Bioscience gibi kuruluşların farklı platformları farklı dizileme yöntemleriyle yüksek verimli okuma yapmaktadır.

SBS (sequencing-by-synthesis: sentezleyerek sekanslama) olarak adlandırılan yeni nesil sekanslama yöntemi, sentez esnasında dizileme ve pirodizileme esasına dayanmaktadır. Pirodizileme, DNA polimeraz aktivitesinin kemiluminesan bir enzim aracılığıyla tespiti prensibine dayanmaktadır. Dizileme reaksiyonu tek iplikli DNA (ssDNA) dizisinin üzerine tamamlayıcı dizinin sentezlenmesi ile gerçekleştirilir. Öncelikle çift iplikli DNA molekülünün nebulizasyon ya da sonikasyon işlemi ile 300-800 bç'lik dizilere parçalanması sağlanır. Mikro reaktörler içerisinde, adaptörleri taşıyan amplikonların, emülsiyon yağı bazlı klonal amplifikasyonu (emPCR) gerçekleştirilir. Bu aşama sonucunda yaklaşık 10 milyon kopyaya ulaşmış olan DNA dizileri, yaklaşık 3,6 milyon kuyu içeren bir plate üzerinde sentez yoluyla dizileme tekniği kullanılarak dizilenmektedir. Dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı üzerinde tamamlayıcı sarmalının sentezlenmesi şeklinde kendini gösterir. Dizileme primeriyle tek sarmallı kalıp olarak sabitlenen DNA üzerine A, C, G, T nükleotidleri ardışık olarak verilir, verilen nükleotidinin kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olması durumunda ortamda bir ışık oluşmaktadır. Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotidin bağlanması sırasında oluştuğu cihaz tarafından tespit edilir. Nükleotid akışı sırasında tek sarmalın tamamlayıcı nükleotidinin gelmesi ile DNA polimeraz, pirofosfat (PPi) açığa çıkmasını sağlar. ATP sülfürilaz enzimi bu PPi'yi ATP'ye dönüştürür ve ATP, lusiferaz enzimi aracılığıyla lusiferinin oksilusiferin'e dönüşmesini sağlar bu reaksiyon sonrasında oksilusiferin görülebilir ışık yaratmaktadır. Bu ışığın şiddeti ATP miktarıyla doğru orantılıdır ve bu ışık cihazda bulunan bir CCD kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar programı yardımıyla flograma dönüşür. Nükleotid akışı sırasında eşleşmeyen nükleotidler ve ortamdaki ATP, apiraz tarafından parçalanır ve reaksiyon yeni bir tur nükleotid akışıyla devam eder Amplikon kütüphanelerinin hazırlığı, amplifikasyon ve sekanslama 2-4 gün süren bir çalışma gerektirmektedir. Dizileme sırasında görüntünün eş zamanlı olarak takip edilebildiği bu sistemin okuma uzunluğu 400 baz-çiftidir (173-175).

Yeni nesil dizileme teknolojileri; üretilen bilgi miktarı, hız ve maliyet açısından çok önemli avantajlara sahiptir. Bu teknolojiler sayesinde hücre içerisindeki tüm genom kompozisyonu anlaşılabilmekte ve analiz edilebilmektedir. Hedeflenen bölgeler hızlı bir şekilde taranarak doğru ve geniş perspektifli bir bakış açısı yakalanabilmektedir.




Şekil 2.24.Yeni nesil dizileme teknolojisi çalışma prensibi (175)

### 2.2.2.2. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR)

Eş Zamanlı *(Real Time)* PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemidir. Kantitatif Eş Zamanlı PCR, biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme Eş Zamanlı PCR'ın en çok kullanılan alanını oluşturmaktadır.

Kantitatif Eş Zamanlı PCR, başlangıç miktarına göre oluşan son PCR ürününün özgün, hassas ve diğer metotlara göre daha kolay tespit edilebildiği ve gen ifadelenme oranlarının niceliksel olarak tayininin yapıldığı bir tekniktir. Bu yöntemde; her bir PCR döngüsünde oluşan flouresan ışınımı aracılığı ile son ürün miktarı eş zamanlı olarak tespit edilebilir. Bu

teknikte özgün (işaretli problar) ya da özgün olmayan işaretleyiciler (SYBR Green vb.) kullanılmaktadır. Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan bu yöntem ile floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak "real-time" PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. "SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşididir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenmektedir. Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve tasarımı iyi yapılmış uygun primerler ile hedef gen veya genlerin çoğaltılmasına olanak vermektedir. Floresan işaretli problara ihtiyaç duyulmayan bir teknik olduğu için maliyet ucuz fakat bunun yanı sıra dezavantajları olan bir yöntemdir. İstenmeyen PCR ürünlerinin çoğalması sonucunda da floresan açığa çıkacağı ya da primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda oluşan "primer dimer"leri oluşumu ile de çift zincirli DNA bölgeleri ortaya çıkmasından dolayı da floresan açığa çıkması sonucu yanlış pozitif sonuçlar almak mümkündür. Bu nedenle her elde edilen sonuç istenilen kalıp DNA'nın çoğalttığı anlamına gelmemektedir. Çoğaltılan bölgenin istenilen hedef olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi (melting curve) analizlerinin yapılması çalışmanın doğruluğu açısından önemlidir (176).

Eşik döngü değeri (*threshold cycle = Ct; Crossing point= Cp*) kantitatif eş zamanlı PCR uygulamalarında önemli bir değişkendir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında saptanan floresan ışımanın eşik değerinin aşıldığı döngü sayısı olarak tanımlanmaktadır. Üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı göstermektedir. Kantitatif Eş Zamanlı PCR yönteminde önemli konulardan bir diğeri de normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ifadelenme düzeyinin değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç duyulmasıdır. Özellikle farklı bireylerden ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ifade düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ifadesi değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü olan mRNA ile normalizasyon yapılması gerekmektedir. İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin ifade düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç ifade düzeyi farklılıklarını ve deneysel hataları normalize etmektir (177, 178).

## 3. GEREKÇE VE AMAÇ

1993-2013 yılları arasında yapılmış olan DNA ve RNA boyutundaki çalışmalarda verilen genler ve bu genlerin ürünleri olan proteinlere benzer literatürde B-hücreli lenfoblastik lösemi ile ilişkilendirilmiş olan birden çok prognostik belirteç bulunmaktadır. Fakat bu birbirinden bağımsız çalışmalardaki prognostik belirteç olarak bildirilen gen ve gen ürünleri tek başına ya da birlikte öncü B-ALL'li hastalarda ifadelenme düzeyi ve mutasyon değerlendirilmesi açısından nasıl farklılık göstermektedir, hastalar farklı prognoz göstermelerine rağmen aynı prognostik belirteçlere nasıl cevap vermektedir, tedaviye verilen yanıt nasıl değişmektedir, bu prognostik belirteçlerin nüks üzerindeki etkisi nasıldır, gibi soruların yanıtları aynı çalışma içerisinde değerlendirilmemiştir.

Yapılan bu tez çalışması ile sitogenetik anomalisi olmayan yani klinisyen doğru ve hedefe yönelik tedavi için **"araçsız"** bırakan pediatrik öncü B-ALL grubu için çeşitli sorulara yanıt aranmıştır.

- Hastalığın teşhisinde ve tedavisinde kullanılabilecek aday prognostik biyobelirteçler tanımlanabilir mi?

- Tanımlanabilecek olan aday biyobelirteçler, kişiye özel tedavi protokollerinin geliştirilmesini, tedaviye verilen yanıtın ve nüksün öngörülebilir olabilmesini sağlayabilecek midir?

Bu amaçla 45 pediatrik öncü B-ALL hastası ve çalışma verilerinin doğrulanabilmesi açısından 10 çocuktan oluşan kontrol grubu olmak üzere 2 grup oluşturulmuştur. Gruplardaki bireylerin DNA ve RNA boyutundaki analizleri yapılarak gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Bu çalışmada, literatürde birbirinden bağımsız yapılan çalışmaların sonuçlarında öngörülen genetik prognostik faktörler olarak belirtilen genlerin, DNA ve RNA boyutundaki genetik ve fonksiyonel değişimlerinin hasta grubumuzda analizi yapılarak, tek bir çalışmada değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler; pediatrik öncü B-ALL gibi heterojen bir lösemi alt grubunun teşhis ve tedavisinde

biyobelirteçler bulunmasına yardımcı olabilecek ön çalışma niteliğinde ilk olma özelliğindedirler.

# 4. MATERYAL VE YÖNTEM

## 4.1. MATERYAL

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Özel LÖSANTE Çocuk ve Yetişkin Hastanesi ve GATA Çocuk Hematoloji Bilim Dalı katılımı ile Özel LÖSANTE Çocuk ve Yetişkin Hastanesi, Kanser Araştırma ve Genetik Laboratuvarı'nda, TÜBİTAK 3001 Başlangıç Ar-Ge destekleme programı ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Programından destek alınarak gerçekleştirilmiştir.

### 4.1.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Bu tez çalışması için, Özel LÖSANTE Çocuk ve Yetişkin Hastanesi'nde öncü B-ALL tanısı almış 1–15 yaş arasında, kromozomal anomali, translokasyon gibi sitogenetik ve genetik anomalilere sahip olmayan 45 bireyden (25 kız–20 erkek) periferik kan ve kemik iliği örneği toplanmıştır.

Ayrıca çalışmanın doğrulama basamağında kullanılmak üzere GATA Çocuk Hematoloji Bilim Dalından toplam 10 sağlıklı çocuk bireyden periferik kan örneği toplanmış ve kontrol grubunu oluşturulmuştur. Kan örnekleri alınan bireylerin ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onam formu alınmış ve çalışmamız için Ankara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu **22 Eylül 2013** tarihi **14-543-13** sayılı karar ile onay izni alınmıştır ve etik kurul karar formu ek-**2**'de verilmiştir.

Çalışmaya alınan pediatrik öncü B-ALL'li bireylerden oluşan hasta grubu için çalışmaya dâhil edilme ve edilmeme kriterleri aşağıda verilmiştir

**Dâhil olma kriterleri:**

- 1-15 yaş arası çocuk
- Öncü B-ALL tanısı almış olma
- Kromozomal anomali, translokasyon gibi sitogenetik ve genetik anomalilere sahip olmama

**Dâhil olmama kriterleri:**

- Pediatrik lösemilerinden farklı bir lösemi alt grubu ile tanı almış olma
- 1-15 yaş arasında olmama
- Kromozomal anomali, translokasyon gibi sitogenetik ve genetik anomalilere sahip olma

Çalışmaya alınan sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu için çalışmaya dâhil edilme ve edilmeme kriterleri aşağıda verilmiştir

**Dâhil olma kriterleri:**

- 1-15 yaş arası çocuk,
- Herhangi bir kan hastalığı tanısı almamış olması

**Dâhil olmama kriterleri:**

- 1-15 yaş arası arasında olmama,
- Herhangi bir kan hastalığı tanısı almış olması.

Çalışmaya dâhil edilen hastaların dosyaları aşağıda Çizelge 4.1.'de verilen bilgiler yönünden taranmıştır.

Çizelge 4.1.Hasta örneklerine ait dosyalarda taranmış demografik ve klinik parametreler

| **Demografik ve Klinik Parametreler** |
|---|
| Yaş |
| Cinsiyet |
| Doğum yeri ve tarihi |
| Tanı anında bakılan beyaz küre sayısı |
| Lösemi Tipi |
| Hastaların Risk Değerlendirmesi |
| Almış oldukları tedavi protokolleri |
| Hastalığın tekrarlanması (Nüks) durumu |
| Hastanın Son durumu |
| SSS tutulumu |
| Glukortikoid Direnç mekanizması |
| Sağ kalım süresi |

## 4.2. YÖNTEM

### 4.2.1. LÖSEMİ TANISINDA VE RİSK SAPTAMASINDA KULLANILAN PARAMETRELER

Lösemi tanısı ve risk grubu tayini tanı aşamasında periferik yayma, tam kan sayımı, kemik iliği aspirasyon incelemeler (morfolojik değerlendirme, immünfenotiplendirme sitogenetik ve moleküler genetik analizler) sonucunda yapılmıştır.

Prognozda ve risk grubu tayininde önemli olan kromozomal anomaliler kemik iliği örneğinin sitogenetik, FISH ve moleküler genetik analiz yöntemleri çalışılması neticesinde saptanmıştır. Hasta grubu için 11q23, 14q32 anormaliği, t(9;22), t(12;21), t(1;19) monozomi 10, monozomi 4, monozomi 17, trizomi 10, trizomi 4, trizomi 17, cMYC gen aktivasyonu analizleri yapılmıştır.

### 4.2.2. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Çalışma grubunu oluşturan hasta ve sağlıklı bireylerden, mutasyon analizi çalışmaları için, 2ml %2'lik etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere 2 ml periferik kan örneği alınmıştır. Gen ifade analizi için, PaXGene Blood RNA tüplerine (PreAnalytiX GmbH, İsviçre, Katalog No:762165) 2,5 ml periferik kan örneği alınmıştır.

### 4.2.3. MUTASYON ANALİZİ

Mutasyon analizi kısmında 45 hasta ve 5 sağlıklı kontrolün ZAP70, TSLP, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5, EBF1, CREBBP, FOXO3, RB1, ZNRF1, NR3C1, NF1 ve ERG genlerinde bulunan olası mutasyonlarının saptamak için yeni nesil dizileme tekniği kullanılmıştır. Yeni Nesil DNA Dizi Analizi GS Junior (Roche Applied Science-Almanya) sistemi kullanılarak yapıldı ve elde edilen sonuçlar Sequence Pilot Module SeqNext Patient (JSI medical systems GmbH-Almanya) yazılımı ile analiz edildi.

#### 4.2.3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu hastalar ile sağlıklı bireylerden alınan kandan MagNa Pure otomatik izolasyon sistem ve Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Applied

Science, Almanya, Katalog No:03730964001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir.

**Başlamadan önce:** MagNA Pure Compact Cihazı nükleik asitleri otomatik olarak ham numune materyallerinden ayırabilen robotik bir çalışma istasyonudur. Bir çalışma sırasında, 8 örneğe ait izolasyon eş zamanlı olarak yapılabilmektedir. Cihaz açıldıktan ve otomatik test tamamlandıktan sonra, kullanıcı ara yüzünden uygun izolasyon protokolü olan " DNA İsolastion_ blood _100_400" seçilir.

1. Her birey için 400 ul kan örneği, kit içerisinde bulunan 2.0 ml'lik hasta bilgileri ile etiketlenmiş numune tüplerine transfer edilir ve cihaz içerisinde ilgili bölgeye yerleştirilir.
2. Oda koşullarında saklanmakta olan reaktif kartuşları kullanım için, 5–6 kez ters düz edilerek reaktiflerinin karışması sağlanır. Reaktif kartuşları üzerinde bulunan barkod, barkod tarayıcı ile okutulur, sırasıyla cihaz içerisinde bulunan kartuş raflarına yerleştirilir. Reaktif kartuşları yerleştirme işleminin tamamlandığı, kullanıcı ara yüzünde bulunan pencerenden onaylanır.
3. Her birey için kullanılacak olan uç dizileri, cihazın içerisinde bulunan uç rafına yerleştirilir. Uç dizilerinin yerleştirme işleminin tamamlandığı, kullanıcı ara yüzünde bulunan pencerenden onaylanır.
4. Elüsyon tüpleri, cihazın son işlemi olan izole edilmiş DNA materyalini transfer edebilmesi için elüsyon tüp rafına yerleştirilir. Elüsyon tüplerinin, yerleştirme işleminin tamamlandığı, kullanıcı ara yüzünde bulunan pencerenden onaylanır. Hastalara ait demografik bilgiler yazılarak hazırlık işlemi tamamlanır.
5. Cihaza hazırlık işlemlerinin tamamlandığı ve ara yüze kaydedilen hasta bilgilerinin doğruluğunun onayı verilir. Cihaz, Isınma–Parçalama-Yıkama-Bağlanma-Elüsyon aşamalarını sırasıyla gerçekleştirir.
6. 400 ul başlangıç örneğinden, elüsyon hacmi 100- 200 ul arasında ve 10 ug kadardır.

#### 4.2.3.1.1. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi

DNA izolasyonu yapılan örnekler, nicelik analizi spektrofotometrik teknikle çalışan Nanodrop UV Spektrometre (Thermo Scientific-ABD) cihazı kullanılarak ölçülür. Nanodrop, nükleik asit ve proteinlerin miktar tayininde rutin olarak kullanılan ve otomatik

olarak hesaplama yapmaya gerek kalmadan sonucu vermektedir. DNA örnekleri 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında okunmaktadır. Bunun için homojen hale getirilmiş DNA örneğinden 2µl alınarak cihazda ölçüm yapılmaktadır.

#### 4.2.3.2. Mutasyon Analiz Çalışması İçin Kullanılacak Primer Çiftlerinin Tasarımı

Yeni Nesil DNA Dizi Analizi cihazı (GS Junior Roche Applied Science-Almanya) çalışma sistemine uygun olarak kullanılan primer dizileri 26 bazlık adaptör A ve B dizisi, 4 bazlık anahtar dizi (TCAG) ve adaptör diziden sonra MID (Multiplex Identifiers) adı verilen barkod görevi yapan 8 ayrı örnek için tasarlanmış, her örneğe kimlik kazandırılarak, amplifikasyon, havuz oluşturma ve okuma aşamalarında örneklerin birbirinden ayırt edilmesini sağlaması amacı ile bu şekilde tasarlanmıştır.



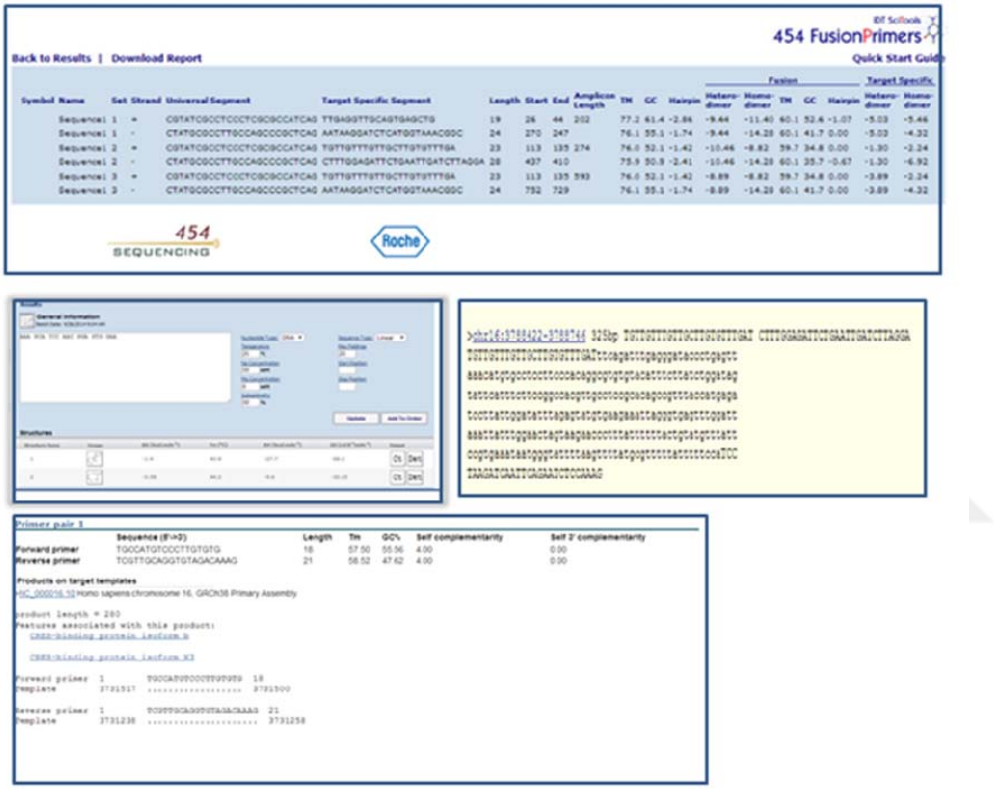

Şekil 4.1.Yeni nesil sekanslama sistemine uygun primer yapısı (179)

Çizelge 4.2.Genlere ait bilgiler ve çalışmaya dâhil edilen ekzon bölgeleri

| Gen adı | Kromozom lokalizasyonu | Toplam ekzon sayısı | Çalışmaya dâhil edilen ekzonlar |
|---|---|---|---|
| ***CREBBP*** | 16p.13.13 | 31 | 26-30 |
| ***IKZF1*** | 7 p 12.2 | 8 | 4-5-7-8 |
| ***PAX5*** | 9p13.2 | 10 | 2-3-5-6-7-8-9-10 |
| ***EBF*** | 5q 34 | 16 | 1-15 |
| ***CRLF2*** | Xp 22.33 | 8 | 1-2-3-4-5 |
| ***JAK2*** | 9 p 24.1 | 25 | 12-14-15-16 |
| ***NF1*** | 17 q11.2 | 58 | 4-22-39-40 |
| ***NR3C1*** | 17p13.1 | 10 | 1-2-3-9 |
| ***RB1*** | 13q14.2 | 27 | 19-20-21-25 |
| ***TSLP*** | 5q 22.1 | 5 | 2-4 |
| ***ZAP70*** | 2 q11.2 | 14 | 4-5-11-12 |
| ***ZNRF1*** | 16q 23.1 | 5 | 1a/b |
| ***ERG*** | 21 q 22.3 | 16 | 1-2-3-4 |
| ***FOXO3A*** | 6 q21 | 3 | 1a/b |

Ensembl veri tabanından çalışmaya dâhil edilen genlere ait sekans bilgileri alınmıştır. Literatürden, mutasyon sıklığı yüksek olan ekzonlar seçilmiş, bu ekzonlar gen ait sekans bilgileri içerisinde belirlenmiştir. www.idtdna.com veri tabanı kullanılarak primerler

tasarımı ve tasarlanan aday primerlerin heterodimer, homodimer analizleri www.idtdna.com/oligoanalyzer veri tabanı kullanılarak yapılmıştır, şekil 4.2'te gösterilmektedir (180, 181). Tasarlanan aday primerlerin BLAST veri tabanı kullanılarak, genomda, çoğaltılması planlanan amplikonlar dışında farklı bir bölgeye yerleşip yerleşmediği, non-spesifik bağlanmayı engellemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Aday primer çiftleri, BLAT veri tabanı in silico PCR tekniği ile teorik olarak seçilen bölgelerin çoğaltımını doğru olması beklenmiştir. Veri tabanları kullanılarak yapılan değerlendirmeler ardından aday primer çiftleri belirlenmiştir (Çizelge 4.3.) (182, 183).



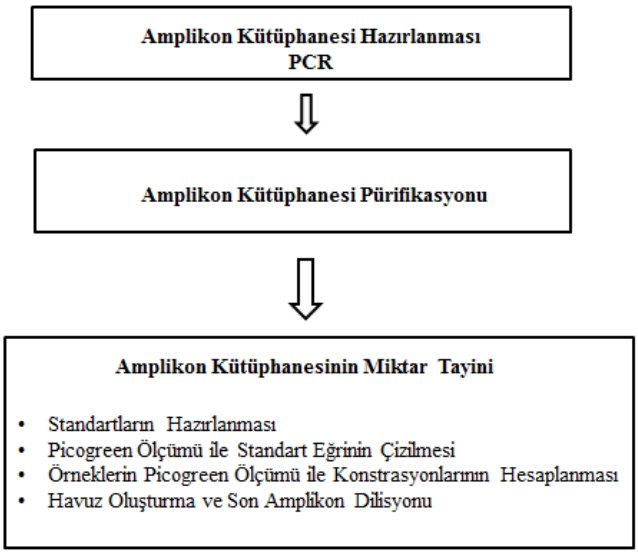

Şekil 4.2. IDT veri tabanı aday primer özellikleri/ olası dimer yapıları ekran görüntüsü/ Blast veri tabanı ekran görüntüsü/ İn-silico PCR sonucu ekran görüntüsü (180, 181)

Çizelge 4.3.Yeni nesil dizileme çalışması için tasarlanan ve uygun bulunan primer listesi

| No | Gen Adı | Forward Primer | Reverse Primer | Amplikon Boyutu |
|---|---|---|---|---|
| 1 | CREBBP 26. Ekzon | TTGAGGTTGCAGTGAGCTG | AATAAGGATCTCATGGTAAACGGC | 202 bç |
| 2 | CREBBP 30. Ekzon | TGCCATGTCCCTTGTGTG | TCGTTGCAGGTGTAGACAAAG | 241 bç |
| 3 | EBF-1 1. Ekzon n | TTTCGGGTTATCGCTCAGTTTT | ACTCCGTTGGATGCTTTCC | 211 bç |
| 4 | EBF-1 15 Ekzon | TCTTTGCTTCAGGATGCCAT | TGTTCCCGTTGGTGCTG | 208bç |
| 5 | PAX5 2. Ekzon | TGTTCCCGTTGGTGCTG | TTTAAAGTGCTCTGCGTGTGA | 305 bç |
| 6 | PAX5 3. Ekzon | TTGCCAATATCCACTTTACTGGTT | ACCTGTTGATGGAACTGACG | 215 bç |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 7 | PAX5 6. Ekzon | AACTTACCAGCAGGTGACC | ACAAGTCTCCCCGCATCT | 222 bç |
| 8 | PAX5 5. Ekzon | GTACTCCATCAGCGGCAT | AATGCCACAGTCTCACCC | 246 bç |
| 9 | PAX5 8. Ekzon | ACTGCCTATGACCGTCACT | ATGGATAGTCAGACAGCTGGA | 305 bç |
| 10 | PAX5 9. Ekzon | TGTGGACCTGACTTGCTTTT | AACCTCCAGGAGTCGTTGTA | 181 bç |
| 11 | PAX5 10. Ekzon | CTGCAAACCAATAGACTGTCCT | AGGTCTAAGATGTCCGGTGAT | 203 bç |
| 12 | IKZF1 4. Ekzon | AGAAAATGAATGAATGGCTCCCACA | AAACATGCTCAGAACACAAGGA | 208 bç |
| 13 | IKZF1 5. Ekzon | TTCTCACCAGCTCTCCTCT | AACAGCTCACACCCGATG | 302 bç |
| 14 | IKZF1 7. Ekzon | ACTGAACCCTTTAAACATAAGCCTT | TTGCATCTAAAACACCCACATAGT | 201 bç |
| 15 | IKZF1 8. Ekzon | TTTTGTTTGAGTTGGTTGATTGGG | TTAGCACAGGGTAGAGCAC | 203 bç |
| 16 | CRFL2 1. Ekzon | TTCCTGCCTGTAATCATTTCCC | AAAGAAGAAAGAAACCTCCATGCT | 280 bç |
| 17 | CRFL2 2. Ekzon | AAATAGAGTTGCCTCACCGTG | CACTTTTGTTCTCAAGCATTCCC | 200 bç |
| 18 | CRLF2 3. Ekzon | CAGTGCACCAACTACCTTCT | AATCATGGATCCGGCGATTT | 205 bç |
| 19 | CRLF2 4. Ekzon | ACGTCGCTTCCGTTATTTCTT | ATGAAACAGCGAATCCCACA | 200 bç |
| 20 | CRLF2 5. Ekzon | ACTCTGGACAGACAGGTTACA | ACAAGCATTACCCCGAATCTC | 265 bç |
| 21 | JAK2 15. Ekzon | GTACTCCATCAGCGGCAT | AGCAAGAATGCCACAGTCTC | 250 bç |
| 22 | JAK2 16. Ekzon | ATGCTCCAGTACTTGTGGACT | ACCACTGCCCAAGTAAAGC | 208 bç |
| 23 | JAK2 12. Ekzon | CCAGCCCATTTGTAACTTTATTGT | TTCTGCAACATACTCCCCAG | 212 bç |
| 24 | JAK2 14. Ekzon | ACCAAAGCACATTGTATCCTCAT | AGCTGTGATCCTGAAACTGAATTT | 265 bç |
| 25 | NF1 4. Ekzonn | TCTAGGTGGTGTGATAGTAAGGT | AATTCCGAAGTTCAGCTGCA | 203 bç |
| 26 | NF1 39-40 Ekzon | TTTGCCAAGTGTCTTTTCTCCA | TGATGGTCATTGTTATCAGCTTGT | 234 bç |
| 27 | NF1 22. Ekzon | TGCTGAAAGCCTTCACAAGA | CCATGGGTGGGCTATAGGTT | 200 bç |
| 28 | NR3C1 1. Ekzon | CATGTGTCCAACGGAAGC | ATTTCCTAGTTCAGCTCAGAGC | 216 bç |
| 29 | NR3C1 2. Ekzon | AGAAAACCCCAGCAGTGTG | CAAAAGCTTTAAGTCTGTTTC | 288 bç |
| 30 | NR3C1 3. Ekzon | ACTATGAAGTGAGAAGCT | ACACTACCTTCCACTGCTCT | 219 bç |
| 31 | NR3C1 9. Ekzon | AGTTTGTCCTGTAGAGGTTTTGTT | TGGTTTAGGTGCCATCCTTC | 201 bç |
| 32 | RB1 19. Ekzon | TCCCAGCTTGCATTTAAATAGTCT | TGACTTGCCCAGTAATGT | 345 bç |
| 33 | RB1 20. Ekzon | TCTGTATCCCTTGTAATATGCCTCA | AGGTGAAGTGCTTGATTTTCTTACT | 318 bç |
| 34 | RB1 21. Ekzon | GAACAAAACCATGTAATAAAATTCTG | TGAATAAATGAGATCAAATGAATTACC | 243bç |
| 35 | RB1 25. Ekzon | AGGAACCAGGACTTGCAGA | AGTGTTTCATAGTTAGCAACCTCAA | 202 bç |
| 36 | TSLP 2. Ekzon | TTCAACAACACCGTCTCTTGT | AGTTCCCAATTTGCCTTTCCT | 223 bç |
| 37 | TSLP 4. Ekzon | AAGCAAAAGTAGGTGGGTACAG | TTGTGACACTTGTTCCAGACATT | 224 bç |
| 38 | ZAP70 4. Ekzon | GAAAACCTGCCTAACACGC | ATACAGGAACTTGCCGTCG | 259 bç |
| 39 | ZAP 70 5. Ekzon | TCATCAGCAGATCTGGAGGT | AGGTAGTGGTACACCGTCTT | 204 bç |
| 40 | ZAP 70 11 Ekzon | GCTAGTCTTCTCCCAGCTGA | AGTGTAGTAGCTGTCGTCGG | 236 bç |
| 41 | ZAP 70 12 Ekzon | ACCCGAATGCATCAACTTCC | TTGCCCTGCTCGATGAAG | 206 bç |
| 42 | ZNRF1 1. Ekzon 1a | TCTTCCACCGATGACAGC | CCGTCTCCTGGTAACCATT | 231 bç |
| 43 | ZNRF1 1. Ekzon -1b | ACCATAGAGACGGGATGCT | ATCCCATTTATCCCTTGGCATC | 203 bç |
| 44 | ERG-1 1 Ekzon | AATAGATTATGTTGCTCGGCCTTAA | GAAGTTTTCGTTTCTACGCGA | 300 bç |
| 45 | ERG-1 2. Ekzon | TTGCTTCATAATGCTGGGCT | GTCATTTGTCTTGCTTTTGGTCA | 222 bç |
| 46 | ERG-1 3. Ekzon | ACGTACCTAGAGGATGCCTT | TGCTATCCATGAAAACCTAGGC | 259 bç |
| 47 | ERG-1 4. Ekzon | TCGTTGTTTGAGTGTGCCT | TTGCAAAGGATAGGAAAATGGGA | 203 bç |
| 48 | FOXO3 1 Ekzon 1a | TTCAGGTCCTCCTGTTCCT | TGCCTCTGCCATCTTCG | 239 bç |
| 49 | FOXO3 1 Ekzon 1b | GCTCACTCTGTCCCAGATCTA | TCATTCACCCCTCCGAGA | 250 bç |

#### 4.2.3.3. Amplikon Kütüphanesinin Hazırlanması




Şekil 4.3. Amplikon kütüphanesi hazırlanması akışı

##### 4.2.3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) spesifik bir DNA dizisinin in-vitro ortamda çoğaltılması yöntemidir. İlk olarak 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem, bir DNA polimeraz enzimi ile reaksiyon gerçekleşmesinden dolayı, polimeraz zincir reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu işlem Fast Start High Fidelity PCR Kiti (Roche Applied Science, Kat No: 03553400001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4.Yeni nesil dizileme çalışması PCR reaktif protokolü

| **Bileşen** | **Miktar** |
|---|---|
| Steril saf su | 17,8 ul |
| FastStart High Fidelity Reaksiyon Buffer +MgCl2 | 2,5 ul |
| Nükleotid karışımı | 0,5 ul |
| FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 U/µl) | 0,1 ul |
| Primer Forward | 1 ul |
| Primer Reverse | 1 ul |
| DNA (50- 80 ng) | 2 ul |
| Her örnek için PCR hacmi | 25 ul |

Çizelge 4.5.Yeni nesil dizileme çalışması termal döngü protokolü

| Sıcaklık | Süre | Döngü |
|---|---|---|
| 95 °C | 3 dakika | 1 döngü |
| 95 °C | 30 saniye | 35 döngü |
| Tm sıcaklığı°C | 30 saniye | |
| 72 °C | 50 saniye | |
| 72°C | 7 dakika | 1 döngü |
| 4 °C | Sonsuz | - |

Optimize edilen bağlanma sıcaklıklarına göre mutasyon analizi yapılacak olan genler, deneysel kolaylık ve maliyeti azaltmak amacı ile 96 kuyulu platelere toplanmıştır, ek-3' te ayrıntılı olarak yerleşim şekilleri verilmiştir.

#### 4.2.3.3.2. Amplikon Pürifikasyonu

Pürifikasyon içerisinde manyetik beadler (boncuklar) bulunan Agencourt Ampure XP 60 ml (Beckman Coulter, ABD) (Katalog No:A63880) kiti ile 96 kuyulu magnetic separator (Invitrogene, ABD) üzerinde, üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Her örnek için pürikasyon işlemi 2 kez tekrar edilmiştir.

**Başlamadan önce**

Her örnek için 400 ul %70 lik etanol kullanıldı, bu nedenle %70'lik etanol çalışma öncesi hazırlanır. Agencourt Ampure XP +4°C de saklanan bir ürün olması nedeni ile çalışmaya başlamadan 30 dakika öncesinde oda sıcaklığına çıkartılır. Her örnek için PCR son ürün miktarı 25 ul kadardır, üzerlerine 20 ul steril saf su eklenir, plate vorteks yapılır ve ardından masa üzeri plate santrifüjde 900 g 30 saniye santrifüj edilir.

**Protokol aşamaları**

1. Her örnek üzerine 34 ul Agencourt Ampure XP eklenir, 10 kez pipetleme işlemi yapılır.
2. Homojenize olmuş örnekler 5 dakika oda sıcaklığına bekletilir.
3. Plate 96 kuyulu magnetic separator üzerine yerleştirilir ve magnetik boncukların solüsyondan gözle görülür bir ayrımı sağlaması için 2 dakika beklenir

4. Plate içerisinde kalan solüsyon plate çeperine yapışmış olan pellet şeklindeki boncuklara dokunmadan, pipetle çekilir ve atılır.

5. 200 ul %70'lik etanol her bir örnek üzerine eklenir ve 30 saniye oda sıcaklığında bekletilir.

6. Etanol pipetle çekilir ve atılır.

7. 200 ul %70'lik etanol her bir örnek üzerine tekrar eklenir ve 30 saniye oda sıcaklığında beklenir.

8. Etanol pipetle kuyuda kalmayacak şekilde çekilir ve atılır

9. Plate magnetic separator üzerinden kaldırılır ve üzeri şeffaf sealing ile kaplanır

10. Masa üzeri plate santrifüjde 900 g 30 saniye santrifüj edilir

11. Plate tekrar magnetic separator üzerine yerleştirilir. 2 dakika oda sıcaklığında bekletilir, kalan alkol kuyudan pipetle çekilerek uzaklaştırılır.

12. Plate 2-5 dakika arası kurumaya bırakılır.

13. Plate magnetic separator üzerinden kaldırılır ve her örnek üzerine 10 ul steril saf su eklenip, 10 kez pipetleme işlemi yapılır.

14. Plate tekrar magnetic separator üzerine yerleştirilir, 1 dakika boncukların ve solüsyondan ayrılması için beklenir.

15. Son elüsyon hacmi 8-10 ul her örnek ilk PCR plate deki şeklini koruyarak yeni bir plate transfer edilir.

16. Plate'in üzeri seal ile kaplanır ve kantitasyon işlemine kadar - 15°C ile - 25°C arasında buzdolabında saklanır.

#### 4.2.3.3.3. Amplikon Kütüphanesinin Miktar Tayini

Kütüphane miktar tayini işlemi Quant-iT PicoGreen dsDNA Test kiti (Invitrogene-ABD) kullanılarak Light Cycler 480 II (Roche Applied Science, Almanya) cihazı ile ölçülmüştür. Öncelikle standart eğrinin oluşturulabilmesi için 1'den 8'e kadar numaralandırılmış olan tüplerde standartlar hazırlanmıştır. Standart eğri oluşturarak örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır. İşlem üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir.

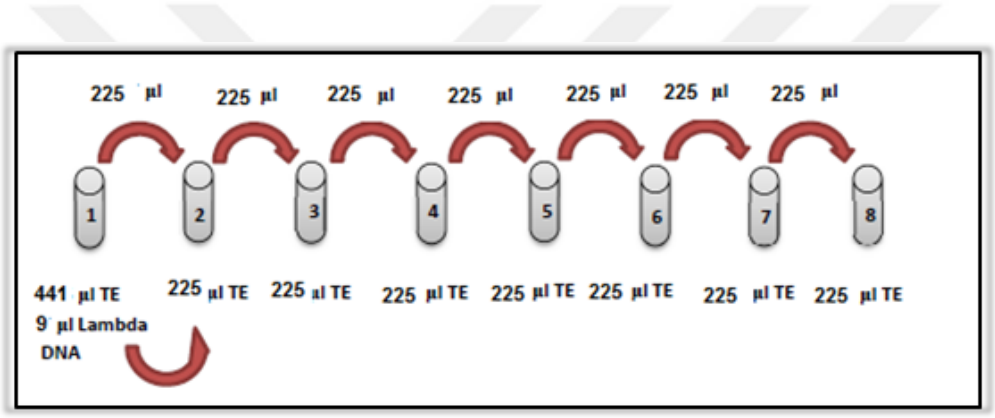
***Standartların Hazırlanması***

1.7 ml'lik eppendorf tüpler 1'den 8'e kadar numaralandırılır. Quant-iT PicoGreen dsDNA Test kiti (Invitrogene-ABD) içerisinden çıkan Lambda DNA standardının tüpü vortekslenir ve spin edilir. Tüplerin içerisine aşağıdaki miktarlar kadar 1x TE eklenir.

a. Tüp 1: 441 TE+ 9 µl Lambda DNA standardı

b. Tüp 2-8: 225 µl TE eklenir.

c. Tüp 1'den 225 µl Tüp 2'ye eklenir ve 10 saniye vortekslenir. Tüp 2'den 225 µl Tüp 3'ye eklenir ve 10 saniye vortekslenir. Bu seri dilüsyon işlemi Tüp 7'ye gelene kadar, bir önceki tüpten bir sonraki tüpe 225 µl eklenerek devam edilir. 10 saniye vortekslenir. Tüp 8'de DNA kontrolü bulunmamaktadır.




Şekil 4.4.Standartların hazırlanması-seri dilüsyon aşamalar

Çizelge 4.6.Standartların içerdiği DNA miktarı

| **Tüp adı** | **Kuyu** | **DNA miktarı** |
|---|---|---|
| Tüp 1 | A12 | 100.00 ng |
| Tüp 2 | B12 | 50.00 ng |
| Tüp 3 | C12 | 25.00 ng |
| Tüp 4 | D12 | 12.50 ng |
| Tüp 5 | E12 | 6,25 ng |
| Tüp 6 | F12 | 3,125 ng |
| Tüp 7 | G12 | 1.562 ng |
| Tüp 8 | H12 | - |

***Picogreen Ölçüm İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi***

1. Amplikon PCR yapıldığı plate'in -20° C de saklanmasından dolayı oda ısısına gelmesinin sağlanabilmesi için oda ısısında 20 dakika bekletilir, ısı sağlandıktan sonra 30 saniye 900x g de santrifüj edilir.

2. Pürifiye Amplikon DNA örneklerinin her birinden 1µl, PCR plate ile aynı şekilde etiketlenmiş 96 kuyulu yeni bir plate in uygun kuyularına transfer edilir. Her bir örnek için yeni bir pipet ucu kullanılır.

3. Çok kanallı pipet kullanarak, platenin uygun kuyularına 1x TE bufferdan 99 µl transfer edilir, 5-6 kez pipetleme yapılarak karışmaları sağlanır.

4. 15 ml falkon tüp içerisine, 1x TE bufferdan 8756 ml TE aktarılır ve üzerine 44 µl eritilmiş olan Quant-iT PicoGreen dsDNA reaktifi (1:200 dilüsyon yapılıyor) eklenir ve vortekslenir. Hazırlanan boya karışımını ışıktan uzak tutmak için alüminyum folyoya sarılır.

5. Pürifiye amplikon DNA örneklerinin ve 1x TE buffer eklenmiş olduğu plateden ve standartlardan her kuyudan 20 µl alınarak Light Cycler 480 Multiwell plate (Roche Applied Science-Almanya, Kat No: 04719749001) aktarılır ve üzerlerine 1:200 dilüye edilen PicoGreen reaktifinden 20 µl çok kanallı pipet yardımıyla eklenir, 5–6 kez pipetleme yapılarak karışmaları sağlanır.

6. Sealing ile plate üzeri kapatılır, masa üzeri plate santrifüjde 900 g 30 saniye santrifüj edilir.

7. Ölçüm işlemi, Gs Juniıor amplicon quantification analiz yöntemi kullanılarak Light Cycler 480 II (Roche Applied Science-Almanya) cihazında gerçekleştirildi.

8. Okuma sonucunda, her kuyuya ait floresan değerleri cihazın yazılımından alınır. Excel dosyası haline getirilir.

9. Örnekler, standartların bilinmekte olan değerlerine göre ng olarak hesaplanır.

10. Standart eğrinin R2 değerinin doğruluğu en az 0.98 olmalıdır. Sonuçlar konsantrasyon ng/µl şeklinde hesaplanır.

*Amplikon Örnek Havuzlaması ve Son Dilüsyon*

Hesaplama işlemleri sonucunda belirlenen 1x TE miktarlarına göre her örnek eşit $1x10^9$ molekül/µL şekilde son dilüsyon haline getirilir ve her plate bulunan örneklerden 1,7 ml' lik tüplerde örnek havuzu oluşturulur 1,7 ml'lik tüplerde 15 ml'lik tek tüpte son olarak birleştirilir. Dilüsyon için şekil 4.5'te verilen denklem kullanılır.

$$Z = \frac{\text{Molecule/ul}}{10^9} - 1$$

Şekil 4.5. Dilüsyon denklemi

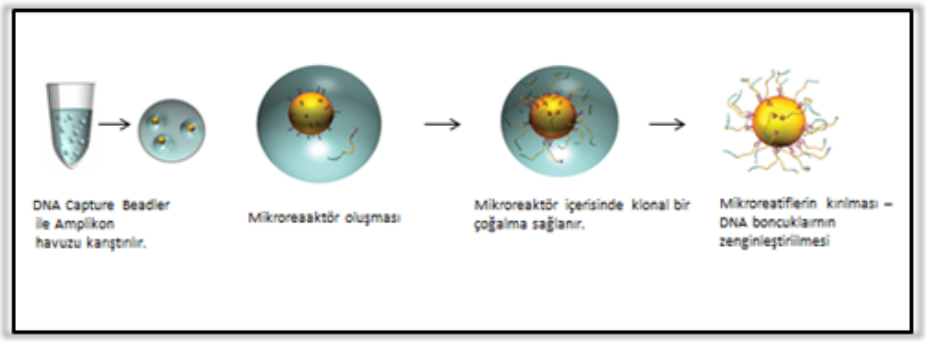
Bu dilüsyonun amacı her amplikon örneğinden eşit oranda alınarak havuz oluşturmaktır. 1ul örnek ile yukarıda denklemde hesaplanan Z ul kadar TE karıştırılıp $1x10^9$ molekül/boncuk 'a dönüştürülür. Daha sonra havuzun son konsantrasyonu $1x10^7$ olacak şekilde 1/100 dilüsyon yapılır. Dilüe edilen örnekten 1/10 dilüsyon ile $1x10^6$ çalışma havuzu elde edilir.

$1x10^9$ molekül/boncuk $\xrightarrow{198\ \mu l\ ddH_2O/\ 2\ \mu l}$ $1x10^7$ molekül/boncuk $\xrightarrow{45\ \mu l\ ddH_2O/\ 2\ \mu l}$ $1x10^6$ molekül/boncuk

Şekil 4.6.Dilüsyon sırası

### 4.2.3.4. Emulsion PCR (em-PCR)

Amplikon kütüphaneleri hazırlanmasından sonra emulsion PCR adı verilen basamak gerçekleştirilmiştir. Adaptör dizi taşıyan DNA sarmalları denatüre edilir ve tek zincir haline dönüştürülür. Amplifikasyon boncukları tarafından denatüre edilmiş ve spesifik adaptör dizi taşıyan amplikonlar yakalanır ve her amplikon ayrı bir mikro reaktörün içinde olacak şekilde klonal olacak şekilde çoğaltılır. Bu basamakta emPCR kit (Roche Applied Science- Almanya, Katalog No: 05 996 538 001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir.




Şekil 4.7.em- PCR aşamaları (179)

Çizelge 4.7.em- PCR Bileşenleri

| **Bileşenler** | **Amplifikasyon Mix A-B** |
|---|---|
| ddH20 | 205 ul |
| Additive | 260 ul |
| Amp Miks | 135 ul |
| Amp primer A-B | 40 ul |
| Enzim miks | 35 ul |
| Pipiase | 1 ul |
| Toplam | 676 ul |

Çizelge 4.8.em-PCR termal döngü protokolü

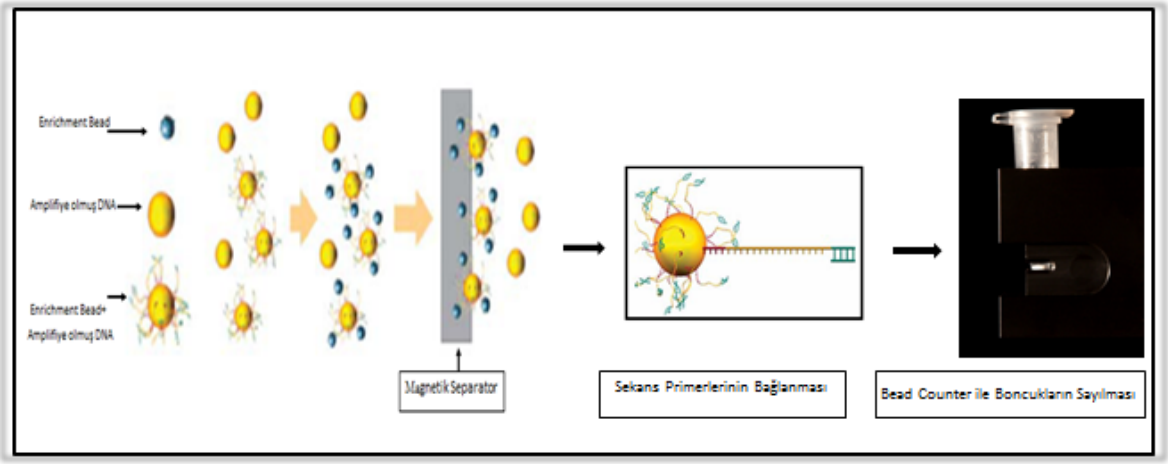
| **Sıcaklık** | **Süre** | **Döngü Sayısı** |
|---|---|---|
| 94 °C | 4 dakika | 1 döngü |
| 94 °C<br>Değişken<br>Tm °C<br>68 | 30 saniye<br>10 dakika<br>30 saniye | 35 döngü |
| 10 °C | ∞ | - |

#### 4.2.3.4.1. Emülsiyonun Kırılması ve Boncukların Geri Kazanımı

Her amplikonun teorik olarak ayrı mikro reaktörlerde çoğalmış olduğu em-PCR basamağı sonrasında, amplikonlar emPCR Oil and Breaking Kit (Roche Applied Science- Almanya Katalog No: 05 996 511 001) ile toplanmıştır. Bu aşamadan sonra amplikonlara DNA boncukları adı verilir. Yıkama basamaklarından sonra boncukların geri kazanımı için emPCR Kit Bead Recovery Reagents kiti (Roche Applied Science- Almanya Katalog No: 05 996 490 001) kullanılmıştır. Ortama verilen zenginleştirme boncukları magnetik bir ayrım ile klonal olarak çoğaltılmış olan DNA boncuklarının geri kazanımı sağlanır. Bu basamağın ardından dizileme primerlerinin bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.3.4.2. Boncuk Sayımı

Elde edilen zenginleştirilmiş ve primerlerin bağlanmış olduğu DNA boncukları, GS Junior emPCR Bead Counter (Roche Applied Science-Almanya, Kat No: 05996635001) üzerine yerleştirilerek kalitatif bir sayım yapılır. Bead Counter sisteminin ölçüm penceresinin alt sınırı 500.000, üst sınırı 2.000.000 boncuk arasındadır. Dizileme işlemi için elimizde 500.000 adet boncuk olması gerekli olduğundan, elde ettiğimiz boncuk miktarı bu aralık içinde olmalıdır, 500.000 boncuktan az ise protokolün başına, örneklerin PCR işlemlerine geri dönülmelidir. 2.000.000 boncuk üzerinde ise em-PCR protokolüne geri dönüp DNA hacmi azaltılarak çalışma tekrarlanmalıdır. Picotiter Plate'in (Roche Applied Science-Almanya, Kat No: 05996619001) her kuyucuğa tek bir amplifiye olmuş DNA boncuğunun girmesini sağlamak ve her kuyucuktan tek bir dizinin okunmasını sağlamak nedeni ile 500 molekül/boncuk oranı ideal olarak belirlenmiştir.



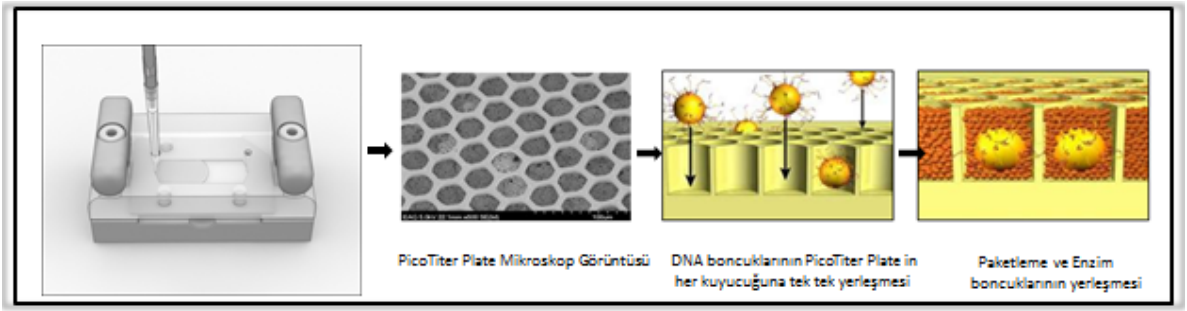

Şekil 4.8.DNA bead Enrichment- Bead miktarı hesaplama (179)

#### 4.2.3.5. Pico Titer Plate Yükleme ve Dizileme Hazırlık İşlemleri

Zenginleştirilmiş ve 500 molekül/boncuk şeklinde hazır olan DNA boncukları ve farklı boncuk katmanları Picotiter Plate (Roche Applied Science-Almanya, Kat No: 05996619001) yüklenir. Diğer katmanlar boncukların plate üzerinde paketlenmesi ve dizileme işlemlerinin gerçekleşebilmesi için bir dizi enzim içermektedir. Dizileme işlemi GS Junior 454 Sequencing (Roche Applied Science-Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

| | |
|---|---|
| 1. Boncuk Katmanı | Enzim Boncukları (İlk Katman) |
| 2. Boncuk Katmanı | DNA ve Kontrol Boncukları |
| 3. Boncuk Katmanı | Enzim Boncukları (İkinci Katman) |
| 4. Boncuk Katmanı | Ppiaz Boncukları |

Şekil 4.9.Boncuk yükleme sırası




Şekil 4.10.Pico titer Device – Dizileme Hazırlık işlemleri (179)

### 4.2.4. GEN İFADE ANALİZİ

Gen ifade analizi kısmında 45 hasta,10 sağlıklı kontrol ve çalışmamızı normalize etmek için kullandığımız IM9 miyeloma hücre hattının ZAP70, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5,EBF1, NR3C1, CXCR4, VLA4, NF1, ERG hedef genleri ile RPLP0 referans geninin ifadelenme oranlarını hesaplamak için kantitatif eş zamanlı PCR tekniği kullanılmıştır. Kantitatif eş zamanlı PCR analizi Light Cycler 480 II (Roche Applied Science-Almanya) sistemi ile gerçekleştirildi.

#### 4.2.4.1. RNA İzolasyonu

##### 4.2.4.1.1. Kandan RNA İzolasyonu

Gen ekspresyon analizleri için çalışma grubundan oluşturan hasta ve kontrol RNA'ları, PaXGene Blood RNA tüplerine ( PreAnalytiX GmbH, İsviçre, Katalog No:762165) RNA izolasyon işlemi için 2,5 ml kan alınarak toplandı. -80 C de saklanmaktadır. RNA izolasyonu BiOstic Stabilized Blood RNA isolation Kiti (Mobio, ABD, Kat No: 12231-100) kullanılmıştır.

PaxGene tüplere alınan kan örnekleri üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda en az 3-4 saat oda ısısında bekletildikten sonra-20 °C de bir gece inkübe edilip daha sonra -80 °C'ye

kaldırılmıştır. Bu şekilde kademeli olarak dondurularak RNA'nın zarar görmesi engellenmeye çalışılmıştır. Protokol üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. -80 °C de saklanmakta olan PAX gene RNA kan tüpleri çalışmaya başlamadan 2 saat önce oda sıcaklığına getirilir.
2. Başlamadan önce tüpler 10 kez ters düz edilir
3. Tüpler 2500 x g de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırılır.
4. Pelleti yıkamak için 4 ml PX1 solüsyonu eklenir, tüpler maksimum hızda vortekslenir ve pelletin çözünmesi sağlanır.
5. Tüpler 2500 x g de 10 dakika santrifüj edilir, süpernatant uzaklaştırılır. Tüplerin içeresindeki sıvının tamamını uzaklaştırabilmek amacıyla tüpler ters olarak kağıt havlu üzerinde bekletilir.
6. Pellet üzerine 300 ul PX2 solüsyonu eklenir ve 1–2 dakika maksimum hızda vorteks yapıldıktan sonra tüp içeriğinin tamamı 2 ml toplama tüpüne transfer edilir.
7. 40 µl Proteinase K (20 mg/ml) ve 300 µl solüsyonu PX3 eklenir, 10 saniye maksimum hızda vorteks yapılır ve 55 ° C çalkalayıcı su banyosunda inkübe edilir
8. Her bir örnek için DNA Shearing Kolon hazırlanır. DNA Shearing Kolon temiz bir 2ml colletion tüp üzerine yerleştirilir, içerisine Carbide Boncuk Tüpe transfer edilir.
9. Çalkayıcı su banyosundan alınan örneklerin her biri hazırlanan ve etiketlenen DNA Shearing Kolona transfer edilir.
10. 16.000 x g de 3 dakika santrifüj edilir.
11. DNA Shearing filtresi atılır ve 2 ml toplama tüpüne toplanmış olan sıvı üzerine 350 ml PX4 solüsyonu eklendi ve vortekslenir.
12. Her örnekten 600 ul Spin Filtre (mavi) üzerine transfer edilir ve 10.000 x g de 1 dakika santrifüj edilir.
13. Filtrenin toplama kısmında biriken sıvı atılır, her örnekten kalan miktarlar Spin Filtre (mavi) üzerine tekrar transfer edilir.
14. 400 µl PX5 solüsyonu eklenir ve 10.000 x g de 1 dakika santrifüj edilir. Filtrenin toplama kısmında biriken sıvı atılır, 10.000 x g de 2 dakika bir kez daha santrifüj edilir. DNA ase I muamelesinden önce PX5 solüsyonu kalıntılarının ortamdan tamamen uzaklaştırılması gerekmektedir.

15. Santrifüj sonucu filtrenin toplama kısmında biriken sıvı atılır, 50 µl DNase I solüsyonu (45 µl solüsyonu PX6 ve 5 µl DNase I) filtrenin membran merkezine transfer edilir ve oda koşullarında 15 dakika inkübe edilir.
16. 400 µl PX5 solüsyonu spin filtre üzerine eklenir, 10.000 x g de 1 dakika santrifüj edilir ve filtrenin toplama kısmında biriken sıvı atılır.
17. 500 µl PX7 solüsyonu spin filtre üzerine eklenir, 10.000 x g de 1 dakika santrifüj edilir ve filtrenin toplama kısmında biriken sıvı atılır.
18. 500 µl PX7 solüsyonu 10.000 x g de 1 dakika bir kez daha santrifüj edilir ve ardından tamamen kurumanın sağlanabilmesi için 10.000 x g de 2 dakika santrifüj edilir.
19. Spin filtre yeni bir 2 ml toplama tüpü üzerine yerleştirilir, 50 µl PX8 solüsyonu spin filtre membran merkezine eklenir, 10.000 x g de 1 dakika santrifüj edilir.
20. Bir kez daha, 50 µl PX8 solüsyonu, spin filtre membran merkezine eklenir, 10.000 x g de 1 dakika santrifüj edilir.
21. Spin filtre atılır ve tüp içerisinde kalan RNA dan konstrasyon tayini yapıldıktan sonra -80 °C de kullanım aşamasına kadar saklanır.

#### 4.2.4.1.2. Hücrelerin Çözülmesi Kültür ve RNA İzolasyonu

Çalışmamızda elde edilen ifadelenme değerlerini normalize etmek için kullanılmış olan B-lenfoblastik hücre hattı (IM9 myeloma) kullanılmıştır.

-196°C'de cryo tüp içerisinde bekleyen hücreler azot tankından çıkarılıp, +37°C'ye kadar yükselen su banyosunun içerisinde hücreler çözülür.100 ml'lik petri içerisine hazırlanmış olan besi yeri kompleksi 10 ml olacak şekilde yayılır. Çözülmüş olan hücreler besi yeri içerisine her yere eşit gelecek şekilde yayılır ve petri inkübatöre kaldırılır. Ertesi gün taze besi yeri eklenir.

İnkübatörden çıkarılan hücrelerin besi yerleri aspire edilir, 10ml PBS ile yıkanır. PBS aspire edilerek ölü hücreler uzaklaştırılır. 1 ml tripsin-EDTA solusyonu petrinin her yerine gelecek şekilde ilave edilir. Hücreler inkübatöre kaldırılır ve 1-2 dakika kadar beklenir. İnkübatörden çıkarılan hücreler mikroskopta incelenir. Kalkmış olan hücrelerde fazlaca agregatlar varsa petrilere nazikçe vurularak yapışan hücrelerin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Hücreler 10 ml besi yeri içerisinde falkon tüplere toplanır. Soğutmalı santrifüjde +4ºC'de 1500 rpm de 5 dakika santrifüjlenir. Pelleti almamaya dikkat ederek süpernatant

kısmı alınır ve hücrelerin üzerine 10 ml tamamlayacak şekilde yeni besi yeri ilave edilir. Thoma lamına yaklaşık 200-300 µl kadar karıştırılarak hücrelerden konularak sayım yapılır. Thoma lamında sayım sonucu A x SF x 10.000 formülü ile hesaplanır. Burada A = 16 büyük karede sayılan hücre adedi, SF ise seyreltme faktörüdür. 10.000 ise 0,1 mm3' deki sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir (1 ml = 1 cc = 1 cm3 = 10,000 X 0,1 mm3). Hücre sayımında seyreltme (dilüsyon) besi yeri ile yapılır. Ölü hücrelerin sayımında daha parlak görünenler ölü hücrelerdir. Göz alışması ile bu kısımdaki karışıklık aşılabilir. Çalışmamız sırasında elde ettiğimiz hücre sayısı 5.2 $x10^6$ olarak sayılmıştır. Bu sırada pasaj için petriler hazırlanır. Petrilerin altlarına hücre tipi, pasaj numarası, besi yerlerinin adı, tarih ve deneyi kim yaptıysa o kişinin adı yazılır. Petrilere yeni besi yerleri ilave edilir. Hücreler birkaç defa pipetaj yapılarak (petri çeperine çarptırarak) tüm hücrelerin toplanması sağlanır.

Hücreler RNA izole edilme işlemine kadar -80°C'de dondurularak saklanmıştır. Hücreler daha sonra tüm hücre RNA'larının izolasyonu işlemine tabi tutulmuştur. Tüm aşamalarda çalışma tüpleri buz içerisinde saklanmıştır. RNA izolasyonu için gerekli malzemeler sterilize edildikten sonra kullanılmıştır. Hücrelerden RNA izolasyonu TRI Reagent Solution (Applied Biosystem-ABD, Kat No: AM9738) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre yapılmıştır. Hücre sayısı toplam hücre ($5.2 \times 10^{6)}$ hücre sayısından yarıya indirilerek kullanılmıştır.

1. TRI Reagent solusyonunda 2.5 $x10^6$ hücre 1 ml TRI Reagent solusyonu eklenir.
2. Homojen hale getirilmiş olan hücre- TRI Reagent karışımı 5 dakika oda ısısında inkübe edilir.
3. 12,000 x g de 10 dakika 4°C de santrifüj edilir ve süpernatant temiz tüpe aktarılır.
4. 200 ul kloroform eklenir. İyice karıştırılır (15 saniye) ve oda ısısında 5-15 dakika arasında inkübe edilir.
5. 12,000 x g de 10 dakika 4°C de santrifüj edilir ve süpernatant temiz tüpe aktarılır. RNA süpernatantdadır DNA ve proteinler arafazda ve organik fazda kalırlar.

6. 500 ul isopropanol eklenir 5-10 saniye vortekslenir ve oda ısısında 5-15 dakika arasında inkübe edilir.

7. 12,000 x g de 8 dakika 4°C de santrifüj edilir ve süpernatant pellet dağıtılmadan uzaklaştırılır. Presipite RNA beyaz pellet görülmeli.

8. 1 ml %75 etanol eklenir ve RNA pelleti yıkanır.

9. 7,500 x g 5 dakika 4 °C santrifüj edilir. Alkol uzaklaştırılır ve kalan etanol için spin yapılır ve uzaklaştırılır. Alkolun tamamen uçması için 3-5 dakika peçete üzerinde kurutulur.

10. RNA nükleaz içermeyen 100 ul su ile pipetaj yaparak çözdürülmesi sağlanır.

#### 4.2.4.1.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi

Elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için Nanodrop UV spektrofotometre (Thermo Scientific-ABD) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. RNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınmaktadır. 260 nm DNA'nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyunu ifade etmektedir. A260/A280 oranının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Fenol, protein veya benzeri diğer safsızlıkların olması durumunda bu oranlar belirtilen aralığın dışında çıkmaktadır. Bunun için homojen hale getirilmiş RNA örneğinden 2µl alınarak cihazda ölçüm yapılmıştır.

#### 4.2.4.1.4. RNA Konsantrasyonlarının Ayarlanması

Nanodrop UV spektrofotometre (Thermo Scientific-ABD) aracılığıyla konsantrasyonları belirlenen RNA örnekleri, c-DNA sentezinde kullanılmak üzere son hacimde 500 ng RNA olacak şekilde tüplere bolünmüş ve -80°C'ye kaldırılmıştır. Prosedüre başlamadan önce elde edilen RNA konsantrasyonları değerlendirilmeli ve uygun bir konsantrasyon belirlenerek prosedüre başlanmalıdır. Yaptığımız optimizasyon çalışmalarına göre başlangıç konsantrasyonu olarak 500 ng olarak belirlenmiş ve tüm örnekler için bu konsantrasyon değeri kullanılmıştır.

#### 4.2.4.2. cDNA Sentezi

İzolasyon sonrası elde edilen RNA molekülü tek zincirli yapısı sebebiyle kırılgandır, kolay degrade olabilir. Sonraki aşamalarda yapılacak işlemler içinse dayanıklı, sağlam bir moleküle ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaç doğrultusunda yapılan işlem bu RNA molekülünden, ters transkriptaz (Reverse Transcriptase, RT) enzimiyle DNA kopyasının sentezi işlemi yani DNA tamamlayıcı (complementary DNA, cDNA) sentezidir. cDNA sentezi, First Strand Transkiriptör cDNA sentez kiti (Roche Applied Science, Almanya Kat No:5081955) kullanılarak üretici firmanın önerdiği aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

**Başlamadan önce;**

- Kit reaktiflerinin buz üzerinde erimesi sağlanır.
- Çizelge 4.9'da miktarları verilen reaktifler karıştırılır.

Çizelge 4.9.cDNA sentezi için gerekli reaktif miktarı

| Bileşenler | Miktar |
|---|---|
| 10x RT Tamponu | 4 µl |
| d-NTP Karışımı | 2 µl |
| Randomize primerler | 2 |
| Transkriptaz | 0,5 |
| RNAase inhibitör | 0,5 |
| Nükleazdan arındırılmış dH20 | 1 |
| Toplam hacim | 10 µl |

1. Hazırlanan karışım buz üzerinde tutulur ve nazikçe karıştırılır

2. Karışım her tüpte 10 µl olacak biçimde dağıtılır.

3. 10 µl RNA örnekleri karışıma eklenir, pipetaj ve sonrasında spin yapılır. (Başlangıç RNA miktarının 500 ng olması gerekmektedir. Örnek konsantrasyonuna uygun RNA eklendikten sonra 10 µl'ye $dH_20$ ile tamamlanır.)

4. Örnekler termal döngü cihazına (Biometra T1-Almanya) yerleştirilir. Çizelge 4.10'da belirtilen program uygulanır.

5. cDNA son reaksiyon hacmi 20 µl dir ve sentez işlemi tamamlandıktan sonra 80 µl DNaz/RNaz free su ile son hacim 100 µl'ye tamamlanır.

6. Elde edilen c-DNA, -20 °C'de saklanır.

Çizelge 4.10. cDNA sentezi için termal döngü koşulları

| **Sıcaklık (°C)** | **Süre** |
|---|---|
| 25 | 10 dakika |
| 37 | 120 dakika |
| 85 | 5 saniye |
| 10 | ∞ |

#### 4.2.4.2.1. Referans Genin Belirlenmesi

Referans genler her dokuda eşit miktarda ekspresyonunun olduğu bilinen hücresel yasam fonksiyonlarından sorumlu genler arasından seçilmektedir. Referans gen olarak kan dokusunda stabil ekspresyon gösterdiği bildirilmiş olan RPLP0 (Human acidic ribosomal protein) geni kullanılmıştır (184).

### 4.2.4.3. Gen İfade Analizinde Kullanılacak Olan Primer Çiftlerinin Tasarlanması

Bu primerler esas olarak kantitaitif eş zamanlı PCR işlemlerinde kullanılacağı için primer tasarımında dikkat edilen en önemli husus ileri ve ters primerlerin genin farklı ekzonlarında olacak biçimde tasarlanmış olmasıdır. Bu sayede, m-RNA senteziyle intronlarından arınmış olan genin amplifikasyonu esnasında ortamda DNA kontaminasyonunun olup olmadığı kontrol edilebilmektedir. Çizelge 4.11'da kantitatif eş zamanlı PCR için tasarlanan ve deneylerde kullanılan primerlere ait diziler mevcuttur.

Çizelge 4.11.qRT-PCR için tasarlanan primer çiftleri

| **NO** | **Gen** | **Primer Forward** | **Primer Reverse** | **Ürün Boyutu** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | ***ZAP70*** | ACGCCAAGATCAGCGACTTT | GGGTGCGTACCACTTGAGC | 104 bç |
| 2 | ***NF1*** | GCTTTCGTATAAGCCCTCACAA | GCGGAATTGGTGATGATTCGATG | 118 bç |
| 3 | ***IKZF1*** | CATCAGCCCGATGTACCAGC | CCTCGTTGTTGCTCTCGGT | 188 bç |
| 4 | ***CXCR4*** | ACTACACCGAGGAAATGGGCT | CCCACAATGCCAGTTAAGAAGA | 133 bç |
| 5 | ***JAK2*** | TCTGGGGAGTATGTTGCAGAA | AGACATGGTTGGGTGGATACC | 130 bç |
| 6 | ***EBF1*** | AAAGCATCCAACGGAGTGGAA | GCCCTGTCTGTCGTAGAGG | 221 bç |
| 7 | ***NR3C1*** | TGCCGCTATCGAAAATGTCTT | GGGTAGGGGTGAGTTGTGGT | 172 bç |
| 8 | ***PAX5*** | ACTTGCTCATCAAGGTGTCAG | TCCTCCAATTACCCCAGGCTT | 127 bç |
| 9 | ***CRFL2*** | AGTGACGGTGACGTGTTCTG | CTATGGTGACGTTGCAGGTATT | 119 bç |
| 10 | ***ERG*** | TGAGGACCAGTCGTTGTTTG | TTTTGATGGTGACCCTGGCT | 94 bç |
| 11 | ***VLA-4*** | CACAACACGCTGTTCGGCTA | CGATCCTGCATCTGTAAATCGC | 139 bç |
| 12 | ***RPLP0*** | CAGATTGGCTACCCAACTGTT | GGAAGGTGTAATCCGTCTCCAC | 97 bç |

#### 4.2.4.3.1. Primer Çiftlerinin Optimizasyonu

Primer çiftlerinin en etkin çalıştıkları bağlanma sıcaklıklarını bulmak için primerler 55°C-65°C sıcaklık aralığında denenmiştir. Bu reaksiyonlarda hasta ve kontrol örneklerine ait c-DNA'lar kullanılmıştır.

Çizelge 4.12.Optimize edilen bağlanma sıcaklıkları

| No | Gen | Optimum Bağlanma Sıcaklığı Tm °C |
|---|---|---|
| **1** | *ZAP70* | 62°C |
| **2** | *NF1* | 57°C |
| **3** | *IKAROS* | 60°C |
| **4** | *CXCR4* | 57°C |
| **5** | *JAK2* | 56°C |
| **6** | *EBF1* | 58°C |
| **7** | *NR3C1* | 57°C |
| **8** | *PAX5* | 55°C |
| **9** | *CRFL2* | 59°C |
| **10** | *ERG* | 58°C |
| **11** | *VLA-4* | 59°C |
| **12** | *RPLP0* | 56°C |

### 4.2.4.4. Kantitatif Eş Zamanlı PCR

Genlere özgü tasarlanmış primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının tespitinin ardından sıra nükleik asit miktarı belirlenmesi aşamasına gelmiştir. İfade oranlarındaki değişimin kopya sayısı düzeyinde hesaplanabilmesi için mutlak ölçüm yapıldı. Real Time çalışmasında hesaplar Pffal'ın metoduna göre yapıldığı için reaksiyondan bir verim (Efficiency_E) değeri elde edilmesi gerekmektedir. E değeri 2 veya 2'ye çok yakın olursa, o reaksiyondan aşağıdaki formülle kat değişimleri hesaplanabilmektedir. E değerinin eldesi için Şekil 4.12.'de verildiği gibi seri dilüsyon yapılması gerekmektedir. E değeri cihaz tarafından otomatik olarak verilen seri dilüsyondan ölçüm hesaplanması sonrası saptanmaktadır. E değeri Şekil 4.11'te verilen formül ile hesaplanmaktadır (185).

$$R = \frac{(E_{hedef})^{\Delta CP_{hedef}\,(\text{Kontrol-Örnek})}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{referans}\,(\text{Kontrol-Örnek})}}$$

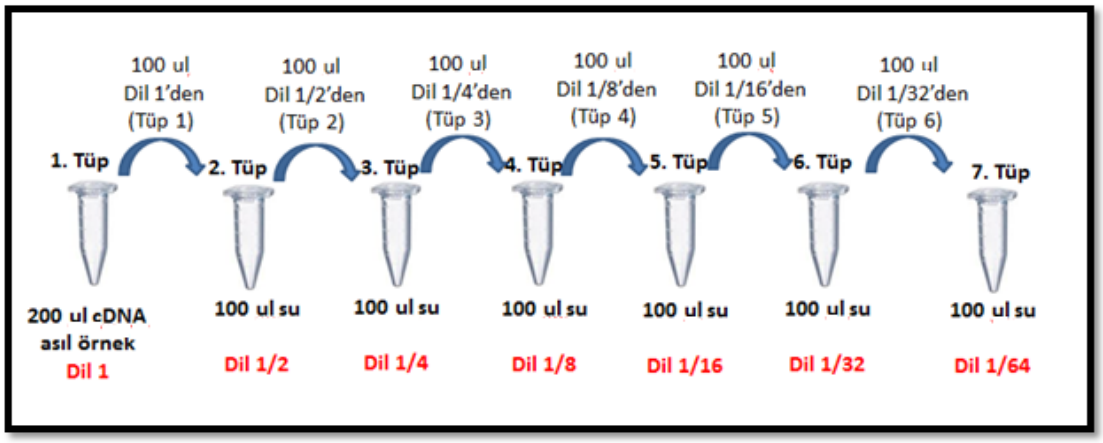
Şekil 4.11.İfade oranı hesaplamak için gerekli olan formül

Kantitatif eş zamanlı PCR da hedef genlere ait ifade oranları hesaplayabilmek için şekil 4.11 de verilen bileşenlerin her biri oldukça önemlidir. Korelasyon kat sayısı (R) elde edilen değerlerin seri dilüsyonlar ile çizilen standart eğriye uygun olup olmadığını göstermektedir. Standart eğrinin doğrusallığı ideal olarak R=1 olarak beklenmektedir.

İdeal olarak kantitatif PCR da beklenen her bir üstsel artış sırasında reaksiyonun %100 verimle (E) çalışarak tamamlanmasıdır. Deneysel hatalar, amplifikasyon bölgesinin uzunluğu, sekonder yapılar ve GC (Guanin-Sitozin) varlığı gibi faktörler verimliliği etkileyebilmektedir.

Eşik döngü değeri ise (*threshold cycle = Ct; Crossing point= Cp*) kantitatif eş zamanlı PCR da önemli bir değişkendir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında saptanan floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısı olarak tanımlanmaktadır yani üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı göstermektedir (186).

#### 4.2.4.4.1. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Standartlarının Hazırlanması




Şekil 4.12. Seri dilüsyon hazırlanması

Seri dilüsyon örneği çalışmaya dâhil edilen kontrol örneklerinden seçilerek yapılmaktadır.

#### 4.2.4.4.2. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Kurulumu

Hasta ve kontrol cDNA'ları ile aşağıdaki protokole uygun olarak, Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science-Almanya, Kat No:4707904) kullanılarak üretici firmanın önerdiği aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

Çizelge 4.13.Kantitatif Eş Zamanlı PCR reaksiyon koşulları

| ***Bileşenler*** | ***Miktar*** |
|---|---|
| SYBR Green Master Mix | 5 µl |
| Primer Forward | 1 µl |
| Primer Reverse | 1 µl |
| Nükleazdan arındırılmış $dH_20$ | 1 µl |
| Toplam hacim | 8 µl |

1. Kit reaktiflerinin buz üzerinde erimesi sağlanır.
2. Çizelge 4.13'te miktarları verilen reaktifler karıştırılır.
3. Hazırlanan reaksiyon karışım (örnek sayısı x birim reaksiyon karışımı) Light Cycler 480 Multiwell plate (Roche Applied Science-Almanya, Kat No: 04719749001) içerisine her bir kuyucukta 8 µl olacak biçimde dağıtılır.
4. Kuyulardaki reaksiyon karışımlarının her birine 2 µl örnek c-DNA'sı eklenir ve böylelikle son hacim 10 µl'ye tamamlanır.
5. Reaksiyon kurulumunun ardından plate şeffaf, LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Applied Science-Almanya Katalog No: 04729757001) yardımıyla üzeri kaplanır.
6. Plate masa üzeri plate santrifüjde 900 g 30 saniye santrifüj edilir.
7. Light Cycler 480 II (Roche Applied Science-Almanya) cihazına yerleştirilir. Cihaz Çizelge 4.14'te belirtilen termal döngü koşullarına uygun biçimde ayarlanır.
8. Deney protokolünün sonlanmasının ardından sonuçlar cihazın yazılımında bulunan programlar doğrultusunda analiz edilir.

Çizelge 4.14. Kantitatif Eş Zamanlı PCR termal döngü koşulları

| | **Sıcaklık °C** | **Süre** | **Döngü Sayısı** |
|---|---|---|---|
| **Denatürasyon** | 95<br>95 | 10 dakika<br>15 saniye | 1 |
| **Amplifikasyon** | Değişken ( Tm)<br>72 | 30 saniye<br>30 saniye | 45 |
| **Erime Eğrisi** | 95<br>65<br>95 | 10 saniye<br>1 dakika<br>∞ | 1 |
| **Soğuma** | 40 | 1 dakika | 1 |

Her örnek 3 tekrar şeklinde çalışılmış ve bu şekilde platelere yerleştirilmiştir. Çalışma örneklerinin çalışma platelerine yerleşimi ile ilgili ayrıntılı şekil ek-4'te verilmiştir.

### 4.2.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler genel olarak DNA ve RNA boyutunda gerçekleştirildi.

DNA boyutunda yapılacak analizlerde, ortaya konulan mutasyonların ve gen değişimlerinin ne kadar risk getirdiğinin saptanması amacıyla ‘’IBM SPSS Statistics 20 for Chi-Square” programı kullanılmıştır. Chi-Square tablolarında farklılık var mı sorusunu test ederken %5 yani 0,05 yanılma payı ile çalışılarak anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

RNA boyutunda yapılacak analizlerde ise pediatrik öncü B-ALL grubu için hesaplanacak Ct değerleri referans değer olarak alınacak 1’e karşı tek örneklem t-testi ile incelenmiştir. Amplifikasyon verimliliğinin hesaplaması Real Time-PCR analizinde önemli aşamasıdır. Bağıl kantitasyon ölçümünde bu yöntem örneklerin karşılaştırmalı ifadelenme düzeyinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

Hastaların ve kontrollerin relatif m-RNA düzeylerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Mann-Whitney U testi niceliksel ölçekli gözlemleri verilen iki örneğin aynı dağılımdan gelip gelmediğini incelemek için kullanılan bir parametrik olmayan istatistik testidir.

Pediatrik öncü B-ALL hastalarının risk grupları arasında gen ifade anlatımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olup olmadığını analiz etmek için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi, birbirinden bağımsız iki ya da daha fazla grubun bağımlı bir değişkene ilişkin ölçümlerinin karşılaştırılarak iki dağılım arasında anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek amacı ile kullanılmıştır.

Bütün analizler IBM SPSS 20.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (185, 187).

# 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Tez çalışmamızda, Özel LÖSANTE Çocuk ve Yetişkin Hastanesi'nde öncü B-ALL tanısı almış 1–15 yaş arasında, kromozomal anomali, translokasyon gibi sitogenetik ve genetik anomalilere sahip olmayan 45 bireyden alınmış olan (25 kız–20 erkek) periferik kan ve kemik iliği örnekleri kullanıldı. Kontrol grubu olarak GATA Çocuk Hematoloji Bilim Dalından toplam 10 sağlıklı çocuk bireyden alınan periferik kan örneği kullanıldı.

Çizelge 5.1.Çalışma grupları

| Grup | Dâhil edilme sayıları n(%) |
|---|---|
| **Hasta grubu** | 45 (81,8) |
| **Kontrol grubu** | 10 (18,2) |

## 5.1. DEMOGRAFİK BULGULAR

Hasta örneklerinin yaş dağılımı 1-15 arasındadır, ortalama yaş 7,5 olarak bulunmuştur. Kontrol örneklerinin yaş dağılımı 1-15 arasındadır, ortalama yaş 8,5 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak gruplar arasında yaş dağılımı bakımından anlamlı fark olmadığı görülmüştür (p=0,231).

Hasta örneklerinin cinsiyet dağılımı incelendiğinde, 45 olgunun %55 (n=25 kız), % 44'ü (n= 20) ise erkektir. Kontrol örneklerinin cinsiyet dağılımına bakıldığında, 10 olgunun %60 (n=6 kız), %40'ı (n=4) erkektir.

Çizelge 5.2.Çalışmaya dâhil edilen hasta ve kontrol grubu demografik özellikleri

| Grup | Cinsiyet n(%) | | Yaş Dağılımı Ortalama |
|---|---|---|---|
| | Kız | Erkek | |
| **Hasta Grubu** | 25 (56) | 20 (44) | 7,5 |
| **Kontrol Grubu** | 6 (60) | 4 (40) | 8,5 |

## 5.2. KLİNİK BULGULAR

### 5.2.1. HASTALARIN TANISAL ÖZELLİKLERİ

Hastalar pediatrik öncü B-ALL alt tiplerine göre tanı almışlardır. Miyeloid antijen (+) öncü B-hücreli ALL 37, erken öncü ve öncü B-ALL tanısı alan ise 8 olgu mevcuttur. 1 olgunun (18 numaralı) remisyon döneminde nüks ettiği, 1 olguda (16 numara) ise SSS tutulumu

olduğu gözlemlenmiştir. 45 olgunun 40'ında glukokortikoid direnci gözlenmemiş, 4 olguda gözlemlenmiş 1 olgu hakkında da bilgiye ulaşılamamıştır. Hastaların risk değerlendirilmesine sınıflandırılması yapıldığında 9 olgu yüksek risk, 20 olgu orta risk ve 16 olgu standart risk olarak belirlenmiştir. 1 olguya (37 numara) kemik iliği nakli yapılmıştır. Hastaların son durumlarına bakıldığında 32 olgunun tedavisi tamamlanmış, 12 olgunun tedavisi devam ettiği kaydedilmiş, 1 olgu hakkında da bilgiye ulaşılamamıştır. Hastalara verilen tedavi protokollerine göre 39 olgu ALL BFM 95, 5 olgu ALL IC- BFM tedavisi almıştır. 1 olgu hakkında da bilgiye ulaşılamamıştır. Hastaların tedavi ve izlem özelliklerine ait bilgiler çizelge 5.3' te verilmiştir. Tüm hasta olguları kromozomal anomali, translokasyon gibi sitogenetik ve genetik anomaliler açısından normaldir. Hasta ve kontrol grubu örneklerine ait demografik, klinik ve tanısal parametrelerde ek- 3 'te verilmiştir.

Çizelge 5.3.Hastaların tedavi ve izlem özellikleri

| **Grup** | **Tedavi Son Durum** | | **Risk Değerlendirmesi** | | | **Tedavi protokolleri** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Tedavisi Biten n (%)** | **Tedavisi Devam n (%)** | **Yüksek Risk n (%)** | **Orta Risk n (%)** | **Standart Risk n (%)** | **ALL BFM 95 n (%)** | **ALL IC-BFM 2009 n (%)** |
| **Hasta grubu** | 33 (73) | 12(27) | 9 (20) | 20 (44) | 16(36) | 39 (87) | 5 (13) |

| **Grup** | **Glukokortikoid Direnci** | | **Kemik İliği Nakli** | | **Son Durum** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Duyarlı n (%)** | **Dirençli n (%)** | **Yapıldı** | **Yapılmadı** | **Sağ n (%)** | **Ex n (%)** |
| **Hasta grubu** | 40 (89) | 4 (9) | 1 (99,1) | 44 (0,9) | 43 (96) | 2(4) |

## 5.3. DENEYSEL BULGULAR

### 5.3.1. İZOLASYON SONUÇLARI

Hasta ve kontrol bireylere ait biyolojik örneklerden izole edilen DNA ve RNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop UV spektrofotometre (Thermo Scientific-ABD) cihazında ölçülmüştür.

#### 5.3.1.1. DNA İzolasyon Sonuçları

Tez çalışması için planlanan örnek sayısının tamamına ulaşılmıştır. 45 hasta örneğinin ve 10 sağlıklı kontrolün DNA izolasyonu materyal ve yöntemler bölümünde belirtildiği şekilde yapılmıştır. Aşağıda örnek kalitesiyle ilgili spektrofotometrik okuma bilgileri verilmiştir.

Çizelge 5.4. Hasta ve kontrol örneklerine ait genomik DNA'ların spektrofotometrik okumaları

| | **Maksimum-Minimum Konsantrasyon ng/ul** | **Maksimum-Minimum 260/280** | **Maksimum-Minimum 260/230** |
|---|---|---|---|
| **Hasta** | 32,9-150,9 | 1,82-1,96 | 1.3-2,11 |
| **Kontrol** | 60,7-162-2 | 1,92-1,97 | 1,83-1,87 |

#### 5.3.1.2. RNA İzolasyon Sonuçları

Tez çalışması için planlanan örnek sayısının tamamına ulaşılmıştır. 45 hasta örneğinin, 10 sağlıklı kontrolün ve ifadelenme değerlerini normalize etmek için kullanılmış olan B-lenfoblastik hücre hattının (IM9 miyeloma) RNA izolasyonu materyal ve yöntemler bölümünde belirtildiği şekilde yapılmıştır. Aşağıda örnek kalitesiyle ilgili spektrofotometrik okuma bilgileri verilmiştir.

Çizelge 5.5.Çalışma örneklerine ait toplam RNA'ların spektrofotometrik okumaları

| ***Grup*** | **Konsantrasyon ng/ul (Minimum-Maksimum)** | **260/280 (Minimum-Maksimum)** | **260/230 (Minimum-Maksimum)** |
|---|---|---|---|
| **Hasta** | 32,5-394.1 | 1,70-2,2 | 1,80-1,89 |
| **Kontrol** | 38,8-175,5 | 2,15-2,16 | 1,89-1,76 |
| **B -lenfoblastik hücre hattı-1** | 101,53 | 1,99 | 1,68 |

#### 5.3.1.2.1. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları

Tez çalışmamızın gen ifade analizi bölümündeki amacımız, örneklerdeki hedef gen ifade değişikliklerinin tespiti olduğu için, başlangıçtaki transkript sayısının eşit olması büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerin her biri, başlangıç RNA miktarı 500 µg olacak biçimde ayarlandı ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten izolasyon sonucu elde edilen RNA ana stoğundan cDNA sentezi için ne kadar alınması gerektiği maksimum ve minimum şekle getirilerek çizelge 5.7.'de mevcuttur.

Çizelge 5.6.Hasta örneklerine ait 500 ng RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

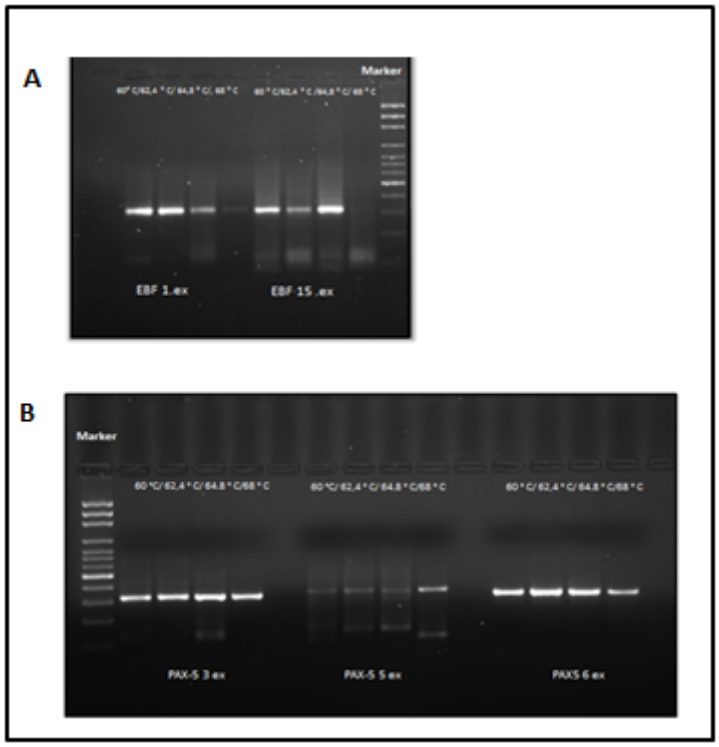
| | **Stok RNA konsantrasyonu (ng/µl)** | **Alınması gereken RNA miktarı (µl)** |
|---|---|---|
| **Maksimum** | 394.1 | 1.26 |
| **Minimum** | 32.5 | 15.3 |

### 5.3.2. MUTASYON ANALİZİ SONUÇLARI

Yeni nesil dizilme çalışmaları için tasarlanmış olan primerlerin optimum çalışma aralığını belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Amplikon PCR sırasında kullanılan primer dizilerinde adaptör diziden sonra ise MID adı verilen barkod görevi yapan 45 ayrı örnek için 8 farklı diziye sahip bir oligonükleotit dizisi bulunması şeklinde tasarım yapılmıştır. Bu şekilde her DNA örneğinin amplifikasyon ürünü birbirinden ayırt edilecek hale getirilmesi sağlanmıştır. Bu işlemin sebebi, pürifikasyon sonrası yapılan ölçümün ardından bütün amplikonların tek bir havuz haline getirilerek diğer işlemlere devam edilecek olmasıdır.

#### 5.3.2.1. Primer-PCR Optimizasyon Sonuçları

49 amplikon için optimizasyon işlemleri yapılmıştır, örnek sayısı ve çoğaltılması planlanan bölge çok fazla olduğu için temsili olarak EBF1 ve PAX-5 genlerinin ekzonlarına ait PCR optimizasyon sonuçları verilmiştir. Şekil 5.1 A.'da verilmekte olan EBF1 1 ekzonu için 211 bç'lik 15. ekzonu için ise 208 bç'lik bölgeler çoğaltılmıştır. Şekil 5.1.B'de verilmekte olan PAX5 geni 3,5 ve 6. ekzonları sırasıyla 215, 246, 222 bç'lik bölgeler de başarı ile çoğaltılmış ve %2'lik Agaroz jel görüntüleri verilmiştir.



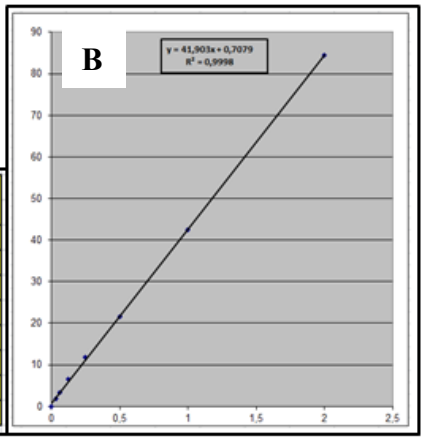

Şekil 5.1.A EBF1 geni, B PAX5 geni PCR optimizasyon sonuçları temsili agaroz jel görüntüleri

### 5.3.2.2. Örneklerin-Picogreen Flurometrik Ölçümlerinin Sonuçları

Pürifikasyon sonrasında yapılan flurometrik ölçüm ile ürünlerin pürifikasyon sonrası konsantrasyonları ölçülmüş ve hepsinin eşit konsantrasyonda havuza katılacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır. Amplikonların konsantrasyonlarını hesaplamak için kullanılan standartların konsantrasyonları ve elde edilen standart eğri şekil 5.2'te verilmiştir. Pürifikasyon sonrası amplikon kütüphanelerinin picogreen ölçüm sonuçları ek 6' da verilmiştir.

**A**

| Kapiller | Standartların Konstrasyonu ng/ul | Floresan |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 84,472641 |
| 2 | 1 | 42,48356755 |
| 3 | 0,5 | 21,6692496 |
| 4 | 0,25 | 11,73648492 |
| 5 | 0,125 | 6,560034308 |
| 6 | 0,0625 | 3,257508024 |
| 7 | 0,03125 | 1,785128334 |
| 8 | 0 | 0 |




Şekil 5.2. **A.** Standartların konsantrasyon aralığı- **B**. Standart eğri

#### 5.3.2.3. Yeni Nesil Dizileme Çalışması Koşum Sonuçları

Hasta örnekleri için ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamını, 6 koşum şeklinde yeni nesil dizileme yapılması planlanmıştır.

Birinci koşumda toplamda 4,210,73 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 74.710 olarak gözlenmiştir. Birinci koşumda toplamda 18.253.574 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz gen bölgesinin tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 74.710 olarak gözlenmiştir.

İkinci koşumda toplamda 10.008,779 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 212,036 olarak gözlenmiştir.

Üçüncü koşumda toplamda 24.251,956 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 178,709 olarak gözlenmiştir.

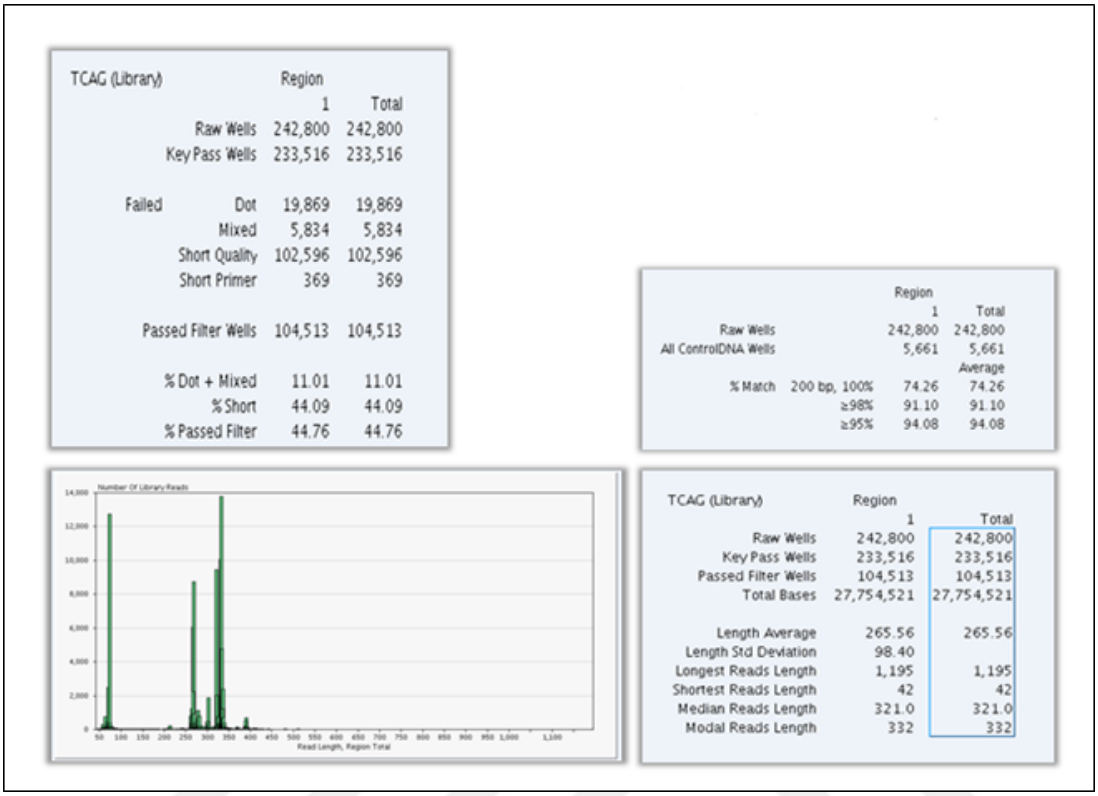
Dördüncü koşumda toplamda 27.754.521 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 233,516 olarak gözlenmiştir.

Beşinci koşumda toplamda 17.253,512 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 110,180 olarak gözlenmiştir.

Altıncı koşumda toplamda 12.452,343 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 194,777 olarak gözlenmiştir. Yeni nesil dizilme çalışması tüm örneklerin koşum sonuçları çizelge 5.8'de verilmiştir.

Kontrol örnekleri için ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamını, tek koşum şeklinde yeni nesil dizileme yapılması planlanmıştır. Kontrol örnekleri için yapılan bu koşumda toplamda 7.275,703 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz 49 gen bölgesinin tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 122,400 olarak gözlenmiştir. Koşum

sonuçları GS Junior Genom Browser (Roche Applied Science- Almanya) ile analiz edildiğinde temsili görüntü Şekil 5.3.'te görüldüğü gibidir.

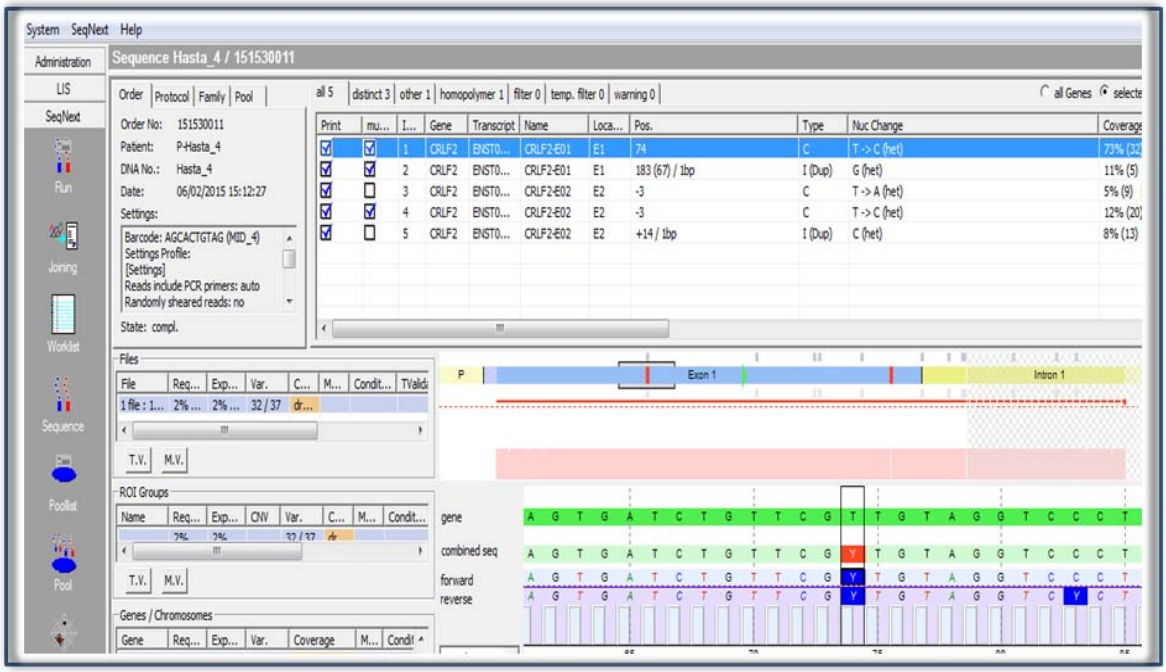



Şekil 5.3.Yeni Nesil Dizileme çalışması temsili çalışma sonucu

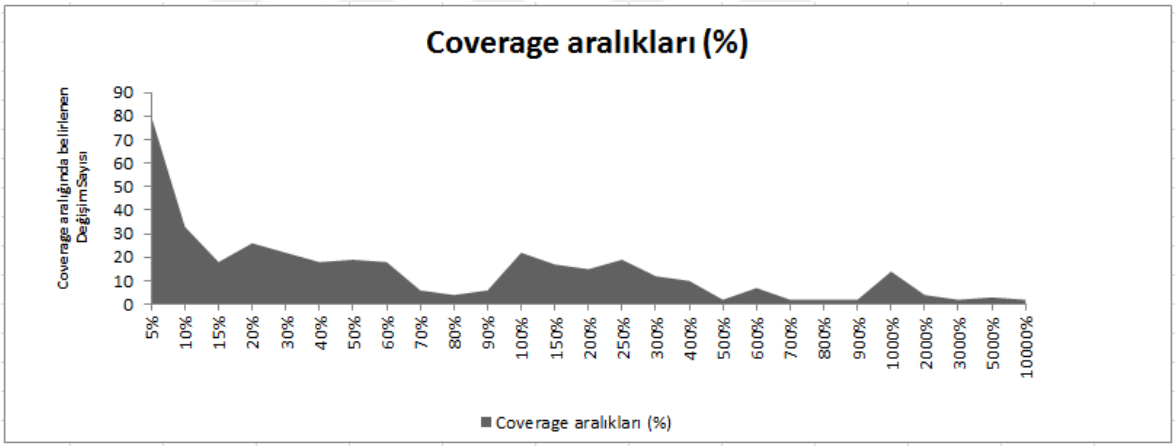
Çizelge 5.7.Yeni nesil dizilme çalışması tüm örneklerin koşum sonuçları

| Koşum Grubu | Toplam Okunan Baz Sayısı | Ham Veri | Analiz Edilebilir Fragman | Ortalama Amplikon Uzunluğu | Ortalama Coverage |
|---|---|---|---|---|---|
| H1-H8 | 4,210,73 | 85,921 | 74,710 | 152,92 | 400 |
| H9-H16 | 10,008,779 | 223,911 | 212,036 | 247,98 | 375 |
| H17-H24 | 24,251,956 | 187,446 | 178,709 | 305,15 | 450 |
| H25-H32 | 27,754,521 | 242,800 | 233,516 | 265,56 | 300 |
| H33-H40 | 17,253,512 | 118,574 | 110,180 | 214,17 | 450 |
| H41-H45 | 12,452,343 | 206,513 | 194,777 | 136,39 | 325 |
| K1-K5 | 7,275,703 | 130,060 | 122,400 | 284,16 | 500 |

Çalışma koşum sonuçları Sequence Pilot Module SeqNext Patient (JSI medical systems GmbH-Almanya) yazılımı kullanılarak mutasyon analizleri yapılmıştır. Sequence Pilot Module SeqNext Patient (JSI medical systems GmbH-Almanya) yazılımı aracılığı ile genlerde olan nükleotid değişimi, insersiyon, delesyon ve indel tespiti yapılabilmiştir (188). Şekil 5.6.'da tespit edilen değişimlere ait grafik verilmiştir. Değişimlerin okunma aralığı "coverage" Şekil 5.5'te verilmiştir. >%5 olacak şekilde okuma aralığı düzenlenmiş, <%5 den küçük olan okuma aralıkları cihaz okuma hatası olarak kabul edilmiştir.

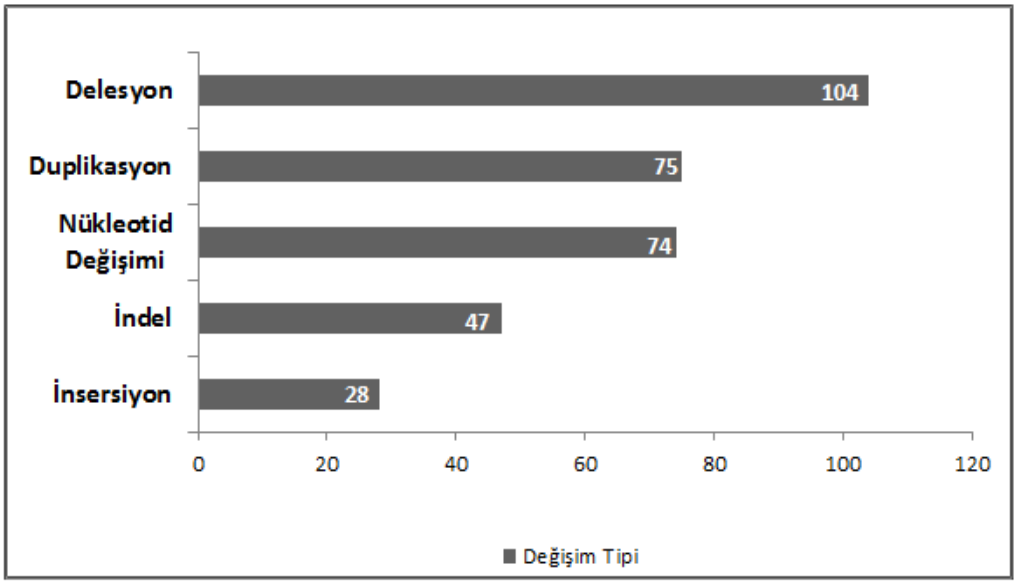



Şekil 5.4.Sequence Pilot Module SeqNext Patient yazılım programı temsili görüntüsü(188)

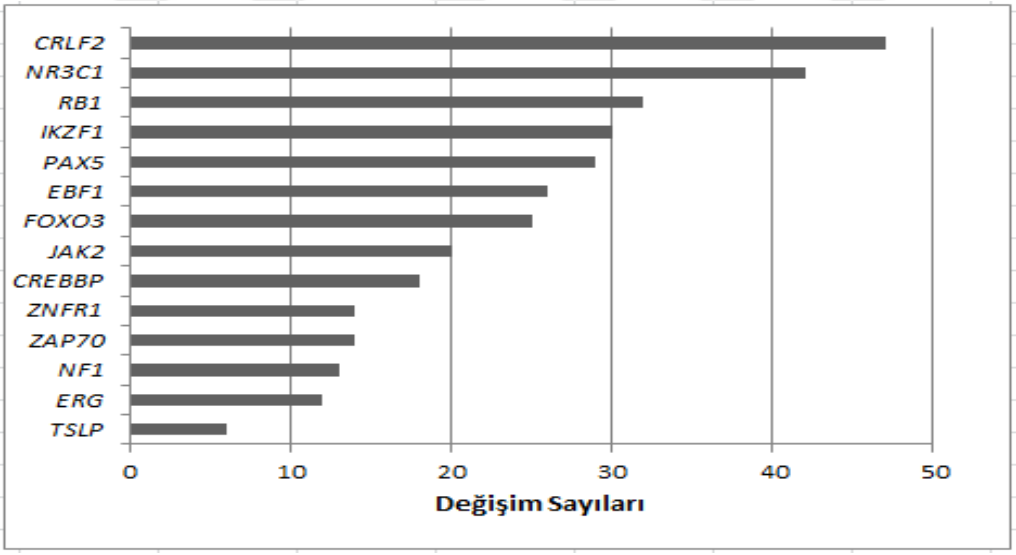



Şekil 5.5. Okuma aralıklarına düşen değişim sayısı

Okuma aralıklarına düşen değişim sayısının en fazla %5-10 aralığında olduğu görülmüştür. Çalışma örneklerinin tamamında 328 değişim tespit edilmiştir (28 adet insersiyon, 47 adet indel, 74 adet nükleotid değişimi, 75 adet duplikasyon ve 104 adet delesyon) Şekil 5.6'da tespit edilen değişimlere ait rakamlar grafikleştirilmiştir.

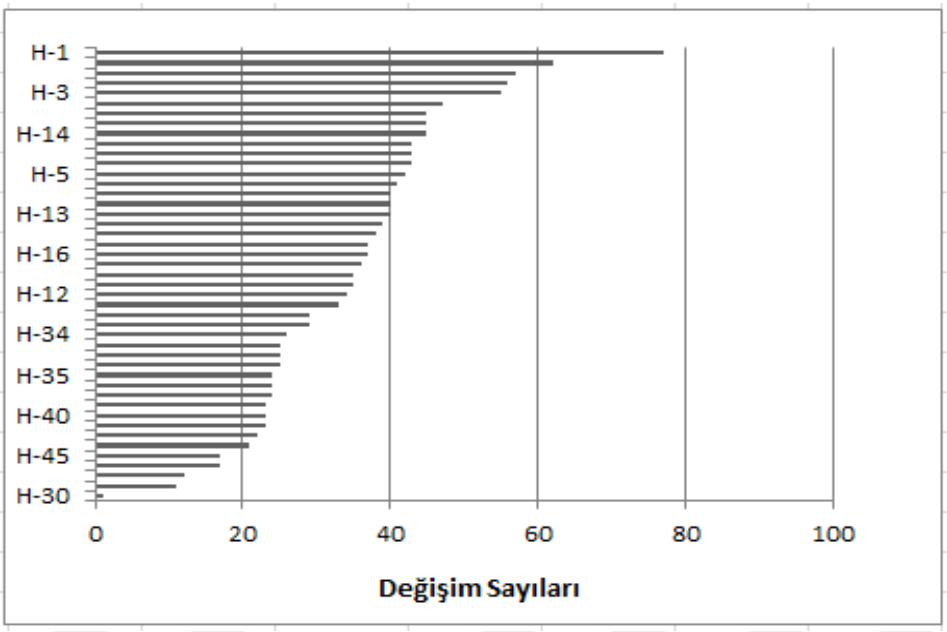



Şekil 5.6. Tespit edilen değişimlerin yapısal özelliklerine göre dağılımı




Şekil 5.7.Her bir gendeki tespit edilen değişim sayıları

Tespit edilen değişimlerin genlere göre dağılımında CRLF2 (47) en çok değişim görülmekte olan gen iken TSLP (6) en az değişim görülen gen olarak belirlenmiştir.




Şekil 5.8. Her bir hastada tespit edilen değişim sayısı

H-1 numaralı çalışma örneğinin en çok değişim taşımakta olduğu (77 adet), H-30 numaralı örneğin ise en az (1 adet) değişim taşımakta olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.8.). Çalışma örneklerinin değişim taşıdığı genler ve her örneğin toplam kaç değişim taşıdığını göstermekte olan ayrıntılı çizelge 5.9'da verilmektedir.

Çizelge 5.8.Çalışma örneklerinin değişim taşıdığı genler ve değişim sayıları

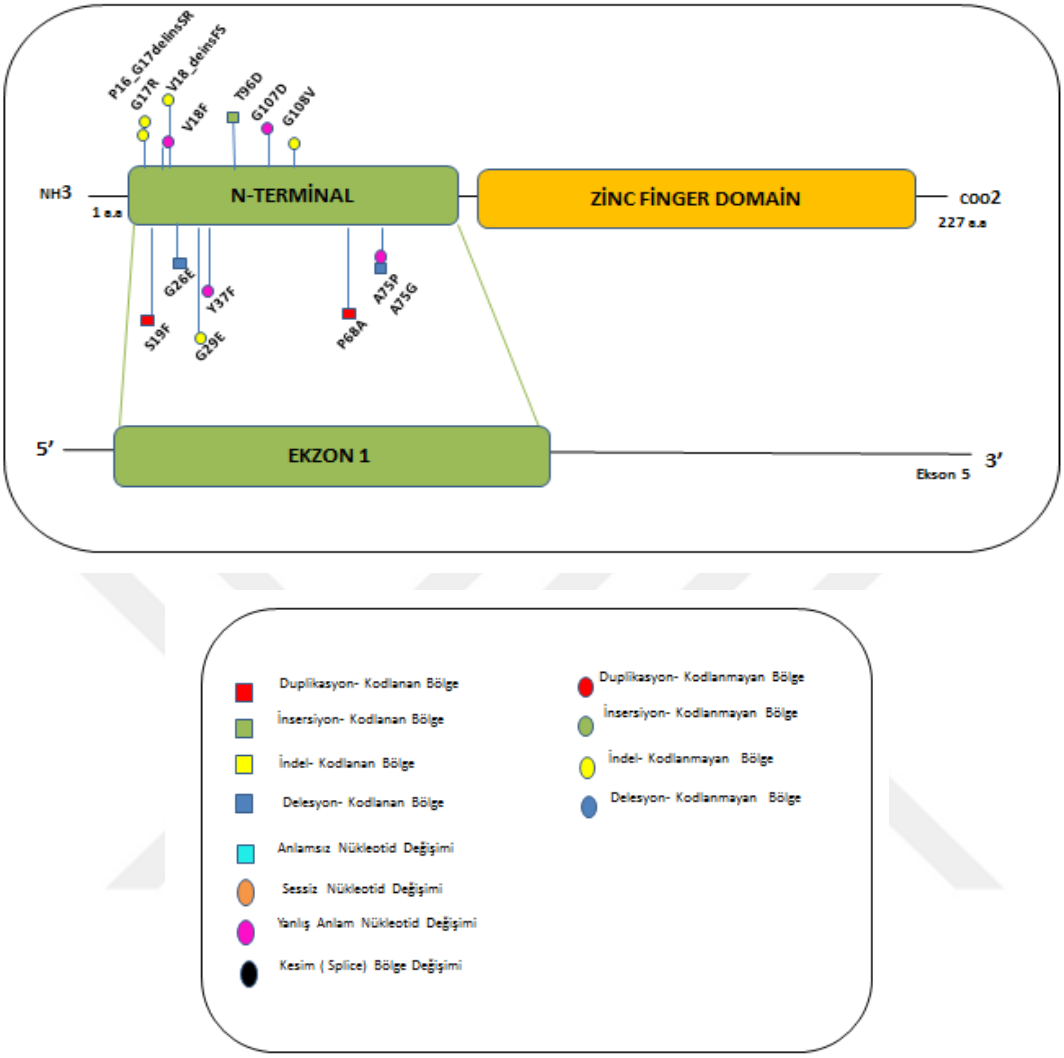
| ***Örnek Numarası*** | ***Değişim Taşıdığı Genler*** | ***Değişim Görünen Gen sayısı*** | ***Taşıdığı Toplam Değişim Sayısı*** |
|---|---|---|---|
| **H-1** | *CREBBP, CRFL2, EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70, ZNRF1* | 12 | 77 |
| **H-2** | *CREBBP, ERG, FOXO3, NF1, NR3C1, PAX5, ZNRF1* | 7 | 23 |
| **H-3** | *FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZNRF1* | 8 | 55 |
| **H-4** | *CRFL2, EBF1, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, ZAP70, ZNRF1* | 10 | 47 |
| **H-5** | *EBF1, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, ZAP70, ZNRF1* | 9 | 42 |
| **H-6** | *EBF1, ERG, FOXO3,IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70,ZNRF1* | 11 | 43 |
| **H-7** | *RB1, EBF1, FOXO3, IKZF1, JAK2, NR3C1, NF1, ZAP70, ZNRF1* | 9 | 41 |
| **H-8** | *CRFL2, EBF1, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70, ZNRF1* | 11 | 57 |
| **H-9** | *ERG, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70* | 7 | 43 |
| **H-10** | *EBF1, ERG, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, TSLP, ZAP70,* | 8 | 29 |
| **H-11** | *CREBBP, CRFL2 EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 12 | 43 |
| **H-12** | *CREBBP, CRFL2, EBF1, IKZF1, NR3C1, NF1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 10 | 34 |
| **H-13** | *CREBBP, CRFL2, EBF1, ERG, IKZF1, NR3C1, NF1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 11 | 40 |
| **H-14** | *CREBBP, CRFL2, EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 12 | 45 |
| **H-15** | *CRFL2, EBF1, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 9 | 33 |
| **H-16** | *CRFL2, EBF1, ERG, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, TSLP, ZAP70* | 9 | 37 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **H-17** | *CRFL2, EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70, ZNRF1* | 13 | 62 |
| **H-18** | *CRFL2, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, ZAP70, ZNRF1* | 9 | 35 |
| **H-19** | *CREBBP, CRFL2, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, ZAP70, ZNRF1* | 11 | 40 |
| **H-20** | *CREBBP, CRLF2, EBF1, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, TSLP, ZAP70, ZNRF1* | 11 | 45 |
| **H-21** | *CRLF2, EBF1, FOXO3, IKZF1, JAK2, NR3C1, PAX5, TSLP, ZAP70, ZNRF1* | 10 | 45 |
| **H-22** | *CRLF2, ERG, EBF1, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5,ZAP70, ZNRF1* | 11 | 38 |
| **H-23** | *CRLF2, EBF1, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, ZAP70, ZNRF1* | 10 | 39 |
| **H-24** | *CRLF2, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, TSLP, PAX5, ZAP70* | 8 | 25 |
| **H-25** | *EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70* | 10 | 24 |
| **H-26** | *IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70* | 7 | 11 |
| **H-27** | *CRLF2, EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, NF1, NR3C1, RB1, ZAP70, ZNRF1* | 10 | 36 |
| **H-28** | *CRLF2, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70, ZNRF1* | 9 | 21 |
| **H-29** | *EBF1, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70, JAK2* | 8 | 24 |
| **H-30** | *IKZF1* | 1 | 1 |
| **H-31** | *CRLF2, EBF1, IKZF1, NR3C1, RB1* | 5 | 22 |
| **H-32** | *IKZF1, RB1* | 2 | 12 |
| **H-33** | *CRLF2, EBF1, ERG, ,FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 12 | 56 |
| **H-34** | *CRLF2, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70* | 10 | 26 |
| **H-35** | *ERG, IKZF1, NR3C1, NF1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 8 | 24 |
| **H-36** | *EBF1, ERG, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 10 | 29 |
| **H-37** | *CRLF2, EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 11 | 37 |
| **H-38** | *CREBBP, CRLF2, EBF1, NR3C1, PAX5, RB1* | 6 | 17 |
| **H-39** | *CREBBP, IKZF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 7 | 25 |
| **H-40** | *EBF1, FOXO3, JAK2, PAX5, RB1, ZAP70* | 6 | 23 |
| **H-41** | *CRLF2, EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1,TSLP, ZAP70* | 12 | 40 |
| **H-42** | *CRFL2, ERG, FOXO3, IKZF1, NF1, NR3C1, PAX5, TSLP, ZAP70* | 9 | 25 |
| **H-43** | *FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 9 | 23 |
| **H-44** | *CRLF2, FOXO3, IKZF1, JAK2, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 9 | 35 |
| **H-45** | *CRFL2, FOXO3, IKZF1, NF1, NR3C1, TSLP, ZAP70* | 7 | 17 |
| **K-1** | *CREBBP, CRFL2, EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1,TSLP, ZAP70, ZNRF1* | 14 | 84 |
| **K-2** | *CRFL2, EBF1, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, RB1, TSLP, PAX5, ZAP70, ZNRF1* | 13 | 95 |
| **K-3** | *CRFL2, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 11 | 68 |
| **K-4** | *CRFL2, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, TSLP, ZAP70* | 11 | 63 |
| **K-5** | *CRFL2, ERG, FOXO3, IKZF1, JAK2, NF1, NR3C1, PAX5, RB1, ZAP70* | 10 | 39 |

#### 5.3.2.4. Tespit Edilen Değişimlerin Protein-Gen Yapısındaki Gösterimleri

Tespit edilen değişimlerin gen ve protein yapısında hangi lokalizasyonda olduğu ya da hangi tip değişim olduğu genin ve genin ürünü olan molekülün fonksiyonu için oldukça önemlidir. Şekillerde verilmekte olan değişim tiplerini gen-protein yapısı üzerinde gösterebilmek için şekil 5.9.'da verilen anahtar kullanılmıştır.

#### 5.3.2.4.1. ZNRF1 Geni ve Molekülü




Şekil 5.9. Saptanan değişimlerin ZNRF1 gen ve protein yapısında gösterimi ve anahtarı

Çalışma örneklerinin tamamında, 5 ekzonlu ZNRF1 geninin birinci ekzonu taranmıştır, 14 adet değişim saptanmıştır. Değişimlerin tamamı ZNRF1 molekülü, N-Terminal bölgesini kodlayan nükleotid dizisindedir. Bu değişimlerden 2'si insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren "Human Genome Mutation Database" (İnsan Genom Mutasyon Veri tabanı) (HGMD) e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu daha önce tanımlanmıştır. Ek-4'te verilen 6 numaralı değişim ZNRF1 geninin birinci ekzonunda tirozinin fenilalanine dönüşümüne neden olan bir A>T değişimi saptanmış olup bu değişimin HGMD bildirilmiş olan Tyr37Phe yanlış anlamlı mutasyonu (rs149929766) olduğu belirlenmiştir. Söz konusu değişim H-8 ve H-22 numaralı çalışma örneklerinde heterozigot durumda saptanmıştır.

Ek-7'de verilen 11 numaralı değişim ZNRF1 geninin birinci ekzonunda çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesine ve dolayısıyla ZNRF1 gen ürünü olan 227 amino asitlik ZNRF1 molekülünün translasyon sırasında 111. amino asitte erken sonlanmasına neden olması açısından önemlidir. Bu değişim HGMD bildirilmiş (rs372749787) olduğu belirlenmiştir. Söz konusu değişim K-2 numaralı kontrol örneğinde heterozigot durumda saptanmıştır.

Diğer saptanan 12 adet değişimin literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir. Ek-5'te verilen 1, 2, 7, 9, 8, 10, 11, 12, 13 ve 14 numaralı mutasyonlar, 5 ekzonlu ZNRF1 geni ürünü olan ZNRF1 molekülünün translasyon sırasında birinci ekzon gibi erken bir evrede sonlanmasına neden olması açısından önemlidir. Erken evrede gerçekleşen bu sonlanmanın işlevsiz ZNRF1 molekülü oluşumuna neden olacağı şüphesizdir.

NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan "Homolog Gene- Multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Val18Phe, Tyr37Phe, Ala75Gly ve Gly107Asp mutasyonlarının evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki noktalarda bulundukları belirlenmiştir (189).

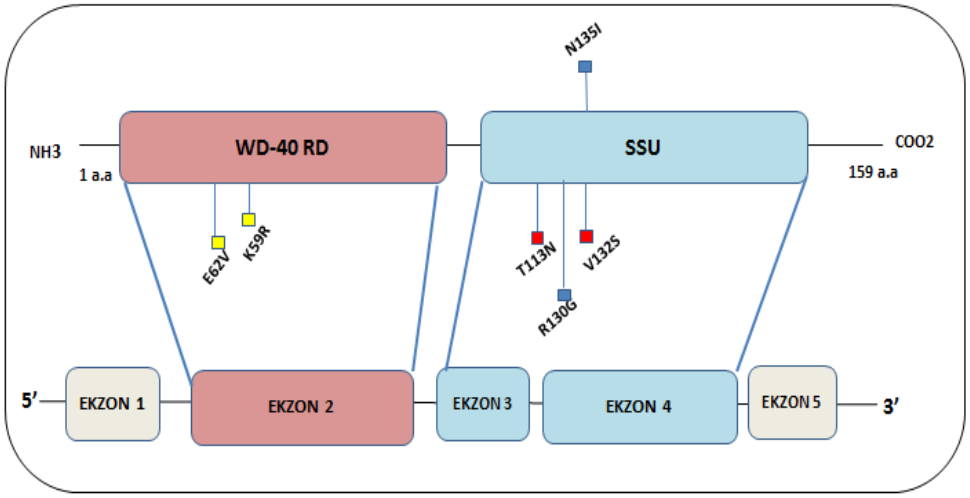
Çizelge 5.9.ZNRF1 geninin insan da sırasıyla 18. ve 37. pozisyonlarında yer alan valin ve trizon aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| İnsan | RTGGGAMGLRSRSVSVAGMGDPSTAGGVPFGLYTPASRGTGDSERAPG |
| Şempanze | RTGGGAMGLRSRSVSVAGMGDPSTAGGVPFGLYTPASRGTGDSERAPG |
| Domuz | RTGGGAMGLRSRSVSVAGMGDPSTAGGVPFGLYTPASRGTGDSERAPG |
| Sığır | RAGGGAMGLRSRSVSVAGMGDPSSAGGVSFGLYTPASRGAGDAERAPG |
| Fare | RTGGGAMGLRSRSVSVAGMGDPSTAGGVPFSLYTPASRGTGDSERAPG |

Çizelge 5.10. ZNRF1 geninin insan da sırasıyla 75. ve 107. pozisyonlarında yer alan alanin ve glisin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| İnsan | GGGSASDSTYAHGNGYQETGGGHHRDGMLYLGSRASGADALPLHIAPRWF |
| Şempanze | GGGSASDSTYAHGNGYQETGGGHHRDGMLYLGSRASGADALPLHIAPRWF |
| Domuz | GGGSASDSTYAHGNGYQETGGGHHRDGMLYLGSRASGADALPLHIAPRWF |
| Sığır | SGGSASDSTYAHGNGYQETGGGHHRDGMLYLGSRASGADALPLHIAPRWF |
| Fare | GGGSASDSTYAHGNGYQETGGGHHRDGMLYLGSASGADALPLHIAPRWF |

### 5.3.2.4.2. TSLP Geni ve Molekülü



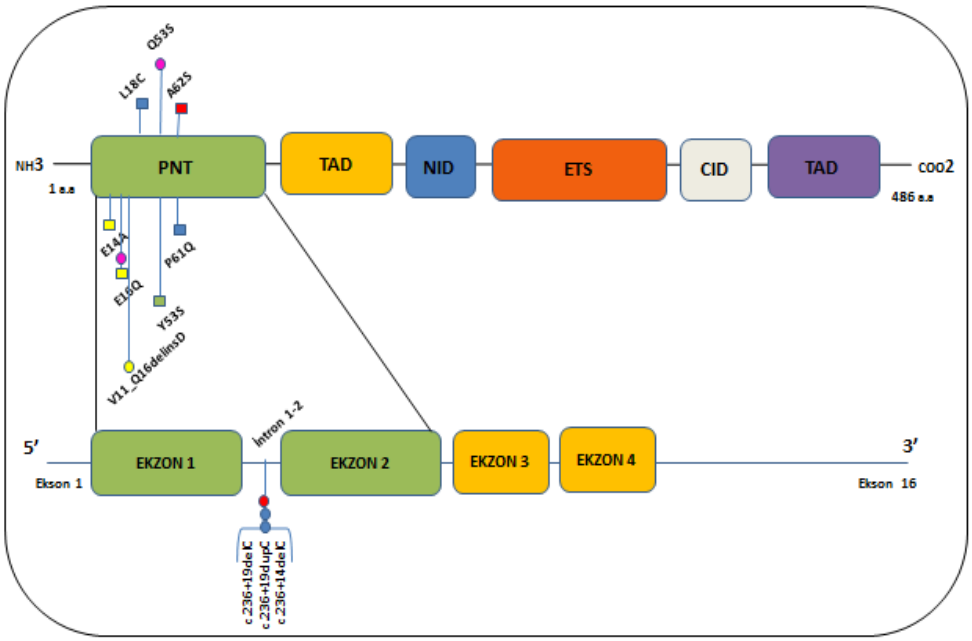

Şekil 5.10.Saptanan değişimlerin TSLP gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında 5 ekzonlu TSLP genine ait 2 ve 4. ekzonlar taranmış ve 6 adet değişim saptanmıştır. 2 değişim Tryptophan-aspartic acid Domain (WD-40 R), 4 değişim ise Small Subunit Domain (SSU) kodlayan nükleotid dizilerindedir.

Ek-8'de verilen 5 numaralı değişim TSLP geninin 3. ekzonunda çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesine ve dolayısıyla TSLP gen ürünü olan 159 amino asitlik TSLP molekülünün translasyon sırasında 70. amino asitte erken sonlanmasına neden olması açısından önemlidir. Bu değişim HGMD bildirilmiş (rs12048764) olduğu belirlenmiştir. Söz konusu değişim H-2 ve H-20 numaralı hasta örneklerinde heterozigot durumda saptanmıştır.

Ek-8'de verilen değişimlerin tamamı TSLP gen ürünü olan TSLP molekünün translasyonun erken evrede sonlanmasına neden olmaktadırlar. Diğer değişimlerin tamamının insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

### 5.3.2.4.3. ERG Geni ve Molekülü




Şekil 5.11.Saptanan değişimlerin ERG gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında, 16 ekzonlu ERG genine ait 1, 2, 3 ve 4 numaralı ekzonları taranmış ve 12 adet değişim saptanmıştır. 9 değişim Pointed Domaini (PNT) kodlayan nükleotid dizilerinde, 3 değişim ise intron 1-2 bölgesinde saptanmıştır.

Ek-9'da verilen değişimlerden 3, 4, 5, 6, 8 ve 12 numaralı değişimler ERG geninin birinci ve ikinci ekzonu nükleotid dizisinde, çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesi ve dolayısıyla sonlanma kodonu oluşması sebebi ile ERG gen ürünü olan 486 amino asitten oluşan ERG molekülünün translasyonunun erken evrede sonlanmasına sebep olmaktadırlar.

Tanımlanan değişimlerin tamamının insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan "Homolog Gene-Multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Gln16Glu ve Tyr53Ser mutasyonlarının evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki noktalarda bulundukları belirlenmiştir (189).

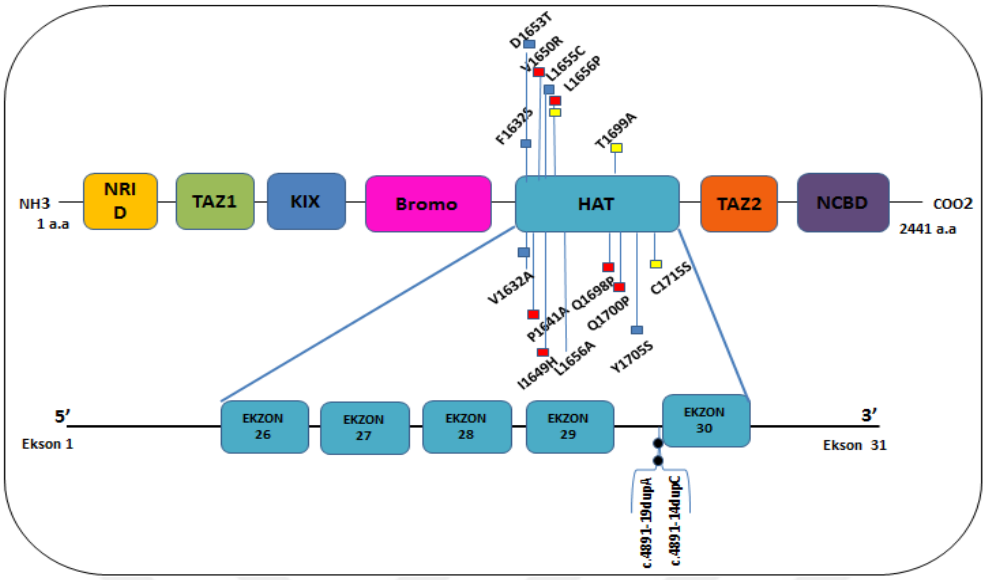
Çizelge 5.11. İnsan ERG geninin 16. pozisyonunda yer alan glutamik asit aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| İnsan | --MIQTVPDPAAHIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTEMTASSSSDY |
| Şempanze | --MIQTVPDPAAHIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTEMTASSSSDY |
| Domuz | ----------MASTIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTEMTASSSSDY |
| Sığır | ----------MASTIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTDMTASSSGDY |
| Fare | ----------MASTIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLPKTDMTASSSGDY |

Çizelge 5.12. İnsan ERG geninin 53. pozisyonunda yer alan tirozin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| Insan | GYTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNP-SQVNGSRNSPDECSVAKG |
| Şempanze | GYTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNP-SQVNGSRNSPDECSVAKG |
| Domuz | GYTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNP-SQVNGSRNSPDECSVAKG |
| Sığır | GYTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNP-NQVNGSRNSPDECSMAKG |
| Fare | GYTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNP-NQVNGSRNSPDECSMAKG |

### 5.3.2.4.4. CREBBP Geni ve Molekülü




Şekil 5.12.Saptanan değişimlerin CREBBP gen ve protein yapısında gösterimi

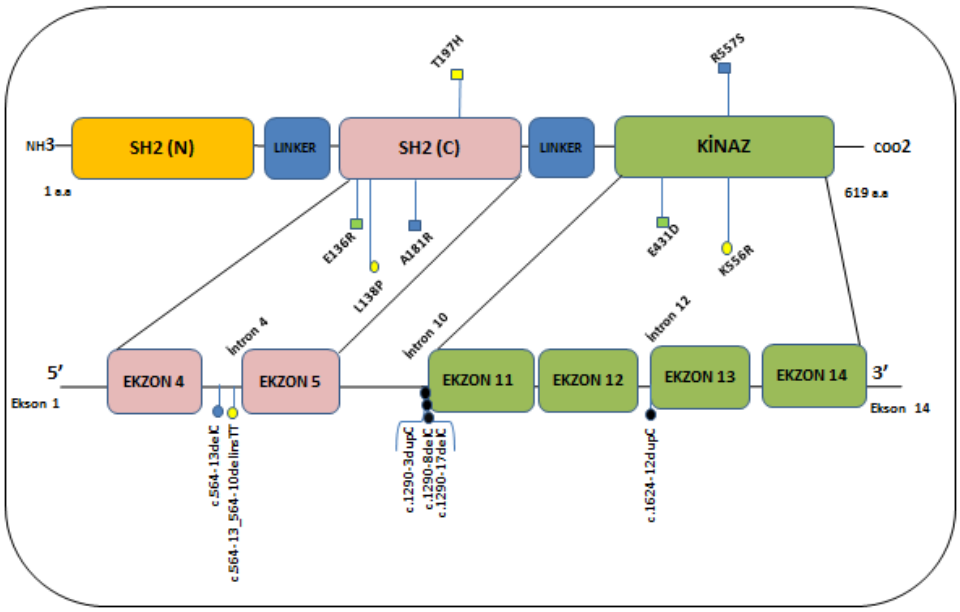
Çalışma örneklerinin tamamında, 31 ekzonlu CREBBP genine ait 26. ve 30. ekzonları taranmış ve 18 adet değişim saptanmıştır. Değişimlerin tamamı, Histon asetil transferaz Domaini (HAT) kodlayan nükleotid dizilerinde, 2 değişim ise ayıklama bölgesi (splice site) saptanmıştır.

Ek-10'da verilen değişimler CREBBP geninin 26. ve 30. ekzonları nükleotid dizisinde, çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesi ve dolayısıyla sonlanma kodonu oluşması sebebi ile CREBBP gen ürünü olan CREBBP molekülünün translasyonun erken evrede sonlanmasına sebep olmaktadırlar.

2 mutasyon ise CREBBP geninin 29. ekzonunun bitimini takip eden 29. intron bölgesi ayıklama dizilerinde saptanmıştır. İntronların büyük kısmı 5'-3' yönünde GT dizisi ile başlamakta ve AG dizisi ile bitmektedir. Bu diziler sırasıyla splice donor (Ayıklama verici) ve splice acceptor (ayıklama alıcı) bölgeler olarak tanımlanır. Genlerin çoğunda bu diziler mevcuttur ve splice-ayırıcı bölge görevini görürler. Bu nedenle GT ya da AG dizisinde meydana gelecek bir değişim ayıklama mekanizmasını etkileyerek transkriptin farklı şekilde ayıklama olmasını sağlayacak ve proteinin yapı ve fonksiyonunu değiştirebilecektir (190).

Tanımlanan değişimlerin tamamının insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

#### 5.3.2.4.5. ZAP70 Geni ve Molekülü




Şekil 5.13.Saptanan değişimlerin ZAP70 gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında, 14 ekzonlu ZAP70 genine ait 4 ekzon (4-5-11-12) taranmış ve 14 adet değişim saptanmıştır. Değişimler SH2 C-terminal ve Kinaz Domainlerini kodlayan nükleotid dizilerinde saptanmıştır.

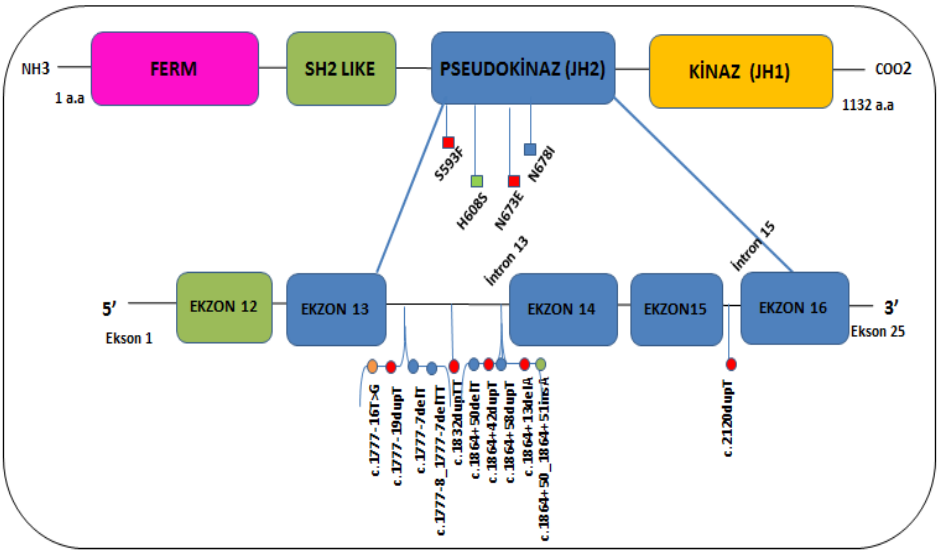
Ek-11'de verilen değişimler ZAP70 geninin ekzonlarının nükleotid dizisinde, çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesi ve dolayısıyla sonlanma kodonu oluşması sebebi ile ZAP70 gen ürünü olan ZAP70 molekülünün translasyonun erken evrede sonlanmasına sebep olmaktadırlar. Özellikle ekzon 4 ve 5 bölgesinde saptanan değişimler 619 amino asitlik ZAP70 molekülünün 170-190 amino asit aralığında oldukça erken sonlanmasına neden olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca analiz sonucunda saptanan bir değişim 4. intron ile 5. ekzonun başlangıç noktası arasında olmasından dolayı ayırıcı mekanizmadan etkilenmemekte ve proteinde herhangi bir değişime neden olmamaktadır.

10. intronun bitimi 11. ekzonun başlangıcında bulunan ayıklama bölgesi dizilerinde değişimler saptanmıştır bu değişimler ayıklama mekanizmasını etkileyebileceği ve bu nedenle transkript yapısını değiştirerek proteinin fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir

Tanımlanan değişimlerin tamamının insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

#### 5.3.2.4.6. JAK2 Geni ve Molekülü




Şekil 5.14.Saptanan değişimlerin JAK2 gen ve protein yapısında gösterimi

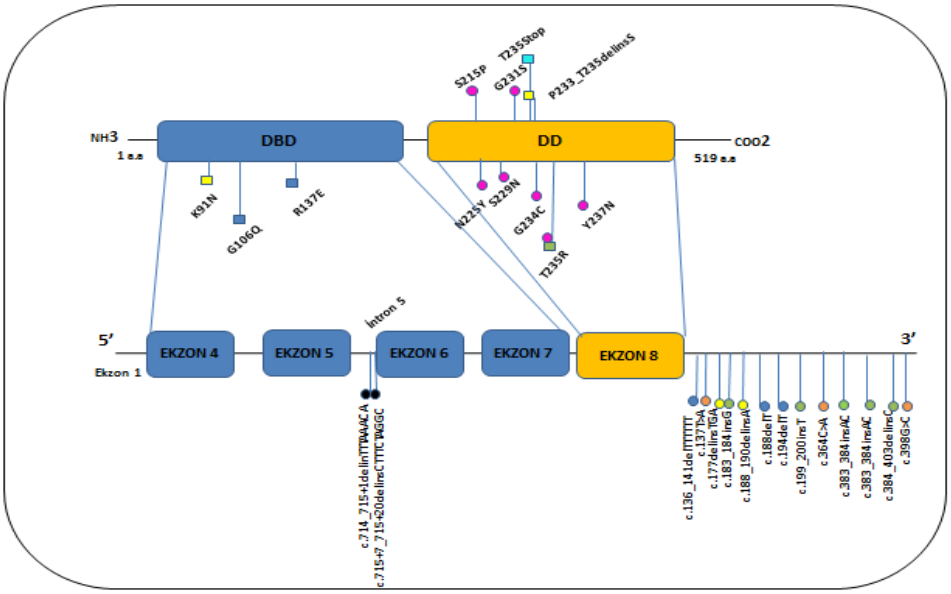
Çalışma örneklerinin tamamında 25 ekzonlu JAK2 genine ait 4 ekzon (12, 14, 15, 16) taranmış 20 adet değişim saptanmıştır. Değişimlerden 4'ü JAK2 molekülü Pseudokinaz Domaini kodlayan nükleotid dizilerinde saptanmıştır ve bu değişimler sonlanma sonlanma kodonu oluşması sebebi ile JAK2 gen ürünü olan JAK2 molekülünün translasyonunun erken evrede sonlanmasına sebep olmaktadırlar.

Ek-12'de verilen 20 numaralı JAK2 geninin 14. ekzonunda 1820. ile 1821. nükleotidler arası T nükleotid insersiyon değişimi ile çerçeve kayması mutasyonuna neden olarak okuma çerçevesinin değişmesi ve dolayısıyla sonlanma kodonu oluşması sebebi ile JAK2 gen ürünü olan 1132 amino asitlik JAK2 molekülünün 642. amino asitte translasyonun sonlanmasına sebep olmaktadırlar. Saptanmış olan değişim insan genlerinde tanımlanmış

mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu daha önce (rs121912472) tanımlanmıştır. Söz konusu değişim K-1, K-2, K-3 ve K-4 numaralı kontrol örneklerinde heterozigot durumda saptanmıştır.

Diğer saptanan 19 adet değişimin literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

#### 5.3.2.4.7. IKZF1 Geni ve Molekülü




Şekil 5.15.Saptanan değişimlerin IKZF1 gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında 8 ekzonlu IKZF1 genine ait 4 ekzon (4, 5, 7, 8) taranmış ve 30 adet değişim saptanmıştır. Değişimler DNA Bağlanma Domain'ini (DBD), Dimerizasyon Domain'ini (DD) kodlayan, 5.intronun bitiminde bulunan ayıklama bölgesini oluşturan ve genin translasyon gerçekleşmeyen 3'UTR bölgesini oluşturan nükleotid dizilerinde saptanmıştır.

5. ekzonun bitimini takip eden 5. intron bölgesi başlangıcında bulunan ayıklama bölgesi dizilerinde 2 delesyon değişimi saptanmıştır, bu değişimler ayıklama mekanizmasını etkileyebileceği ve bu nedenle transkript yapısını değiştirerek proteinin fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir. Ek-13'te 13 ve 14 numaralı olarak verilen değişimler hasta ve kontrol örneklerinde heterozigot durumda saptanmıştır.

Ayıklama bölgesi değişimlerinin tamamının insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

IKZF1 geni DNA bağlanma bölgesini kodlayan nükleotid dizilerini içeren 4, 5, 6 ve 7. ekzonlarda mevcut olan değişimler, çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesine ve dolayısıyla IKZF1 gen ürünü olan 519 amino asitlik IKZF1 molekülünün translasyon sırasında erken sonlanmasına neden olmaları açısından önemlidir.

Söz konusu değişimler, hasta ve kontrol örneklerinde heterozigot durumda saptanmış olup, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatür de daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

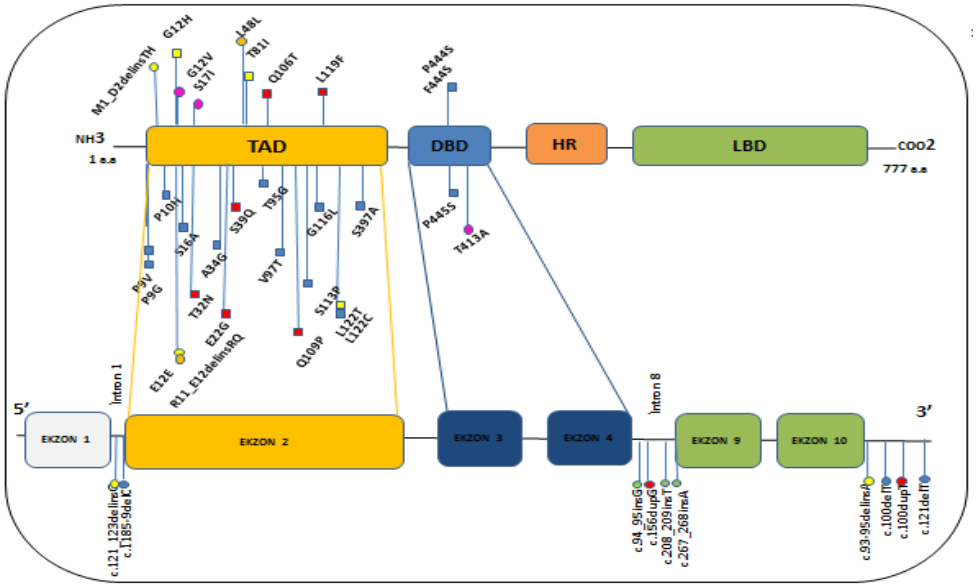
Dimerizasyon Domaini kodlayan nükleotid dizilerinde 9 değişim saptanmıştır ve bu değişimlerden 7 tanesi yanlış anlam mutasyonu, 1 tanesi anlamsız mutasyon ve 1 tanesi translasyonun erken sonlanmasına neden olan indel değişimdir.

NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan " Homolog Gene-multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Ser215Pro, Asn225Tyr, Ser229Asn, Gly231Ser, Gly234Cys, Thr235Arg ve Tyr237Asn, mutasyonlarının evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki noktalarda bulundukları belirlenmiştir (189).

Çizelge 5.13.IKZF1 geninin insan da sırasıyla 215., 225., 229., 231., 234., 235. ve 237. pozisyonlarında yer alan serin, asparajin, serin, glisin, treonin ve trizon aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| İnsan | ---VGKPHKCGYCGRSYKQRSSLEEHKERCHNYLESMGLPGTLYPVIKEE |
| Şempanze | SPGFGKPHKCGYCGRSYKQRSSLEEHKERCHNYLESMGLPGTLYPVIKEE |
| Domuz | ---VGKPHKCGYCGRSYKQRSSLEEHKERCHNYLESMGLPGTLYPVIKEE |
| Sığır | ---VGKPHKCGYCGRSYKQRSSLEEHKERCHNYLQSMGLPGTMYPVIKEE |
| Fare | ---VGKPHKCGYCGRSYKQRSSLEEHKERCHNYLQSMGLPGTLYPVIKEE |

### 5.3.2.4.8. NR3C1 Geni ve Molekülü




Şekil 5.16.Saptanan değişimlerin NR3C1 gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında 10 ekzonlu NR3C1 genine ait 4 ekzon (1, 2, 3, 9) taranmış ve 41 adet değişim saptanmıştır. Değişimler Transaktivasyon Domain'ini (TAD), DNA Bağlanma Domain'ini (DBD) kodlayan nükleotid dizilerinde, 1. ve 8. intron dizilerinde ve genin translasyon gerçekleşmeyen 3'UTR bölgesini oluşturan nükleotid dizilerinde saptanmıştır.

Ek-14'de verilen 36 numaralı değişim NR3C1 geninin 3. ekzonunda prolinin alanine dönüşümüne neden olan timinden sitozine değişim saptanmış olup bu değişimin HGMD bildirilmiş olan Thr413Ala yanlış anlam mutasyonu (rs145046100) olduğu belirlenmiştir. Söz konusu değişim H-17 ve H-27 numaralı hasta örneklerinde heterozigot durumda saptanmıştır.

Değişimler genellikle genin, Transaktivasyon Domain'ini (TAD) kodlayan nükleotid dizilerini içeren 2. ekzonunda saptanmıştır. Bu ekzon üzerinde tespit edilen 26 adet değişimin 20 tanesi çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesine ve dolayısıyla NR3C1 gen ürünü olan 777 amino asitlik NR3C1 molekülünün translasyon sırasında, özellikle 26. amino asit gibi oldukça erken evrede sonlanmasına neden olmaları açısından önemlidir.

Söz konusu değişimler, hasta ve kontrol örneklerinde heterozigot durumda saptanmış olup, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatür de daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan " Homolog Gene-multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Glu12Val, Ser17Ile ve Thr413Ala mutasyonlarının evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki noktalarda bulundukları belirlenmiştir (189).

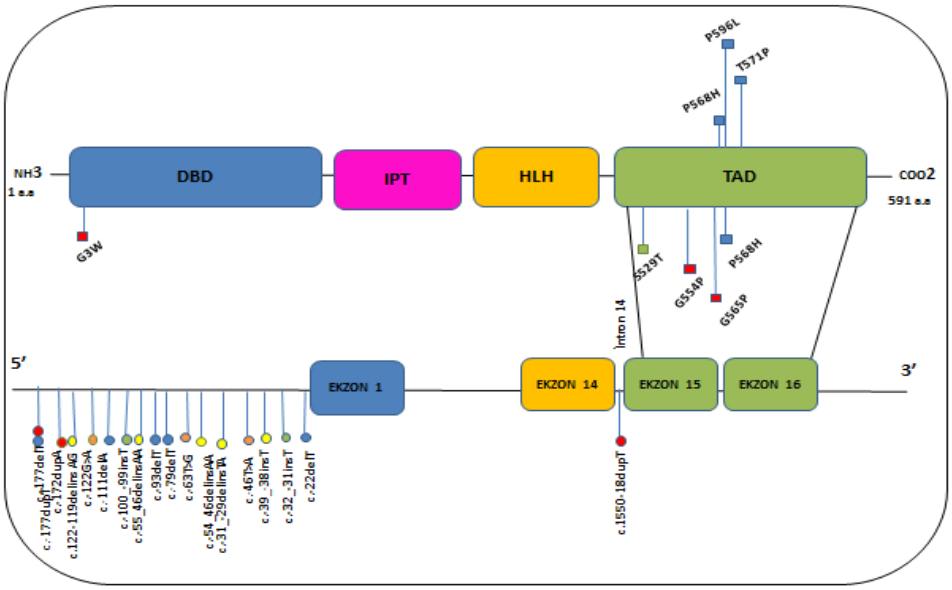
Çizelge 5.14. İnsan NR3C1 geninin sırasıyla 12., 17. pozisyonlarında yer alan glutamik asit ve serin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| Insan | MDSKESL-T-PGREENPSSVLAQERGD-VMDFYKTLRGGA---TVKVSAS |
| Şempanze | MDSKESL-T-PGREENPSSVLAQERGN-VMDFYKTLRGGA---TVKVSAS |
| Domuz | MDSKESL-T-PSREENPSSVLAQERGN-VMDFYKTLRGGA---TVKVSAS |
| Sığır | MDSKESLSP-PSKEEIS SSVLGRERGN-VMDFYKTLRGGA---TVKVSAS |
| Fare | MDSKESLAP-PGRDEP..SSLLGRGRGS-VMDLYKTLRGGA---TVKVSAS |

Çizelge 5.15. İnsan NR3C1 geninin 413. pozisyonunda yer alan treonin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| Insan | SSPPSSSSTATTGPPPKLCLVCSDEASGCHYGVLTCGSCKVFFKRAVEGR |
| Şempanze | SSPPSSSSTATTGPPPKLCLVCSDEASGCHYGVLTCGSCKVFFKRAVEG- |
| Domuz | SSPPSSSSTATTGPPPKLCLVCSDEASGCHYGVLTCGSCKVFFKRAVEG- |
| Sığır | SSPPSSS.AATGPPPKLCLVCSDEASGCHYGVLTCGSCKVFFKRAVEGR |
| Fare | SSPPSSSS-AATGPPPKLCLVCSDEASGCHYGVLTCGSCKVFFKRAVEG- |

### 5.3.2.4.9. EBF1 Geni ve Molekülü




Şekil 5.17.Saptanan değişimlerin EBF1 gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında, 16 ekzonlu EBF1 genine ait 1. ve 15. ekzonları taranmış ve 26 tane değişim saptanmıştır. Değişimler TAD Domaini kodlayan ve genin 5'UTR bölgesinde bulunan promotor özelliğe sahip nükleotid dizilerinde saptanmıştır.

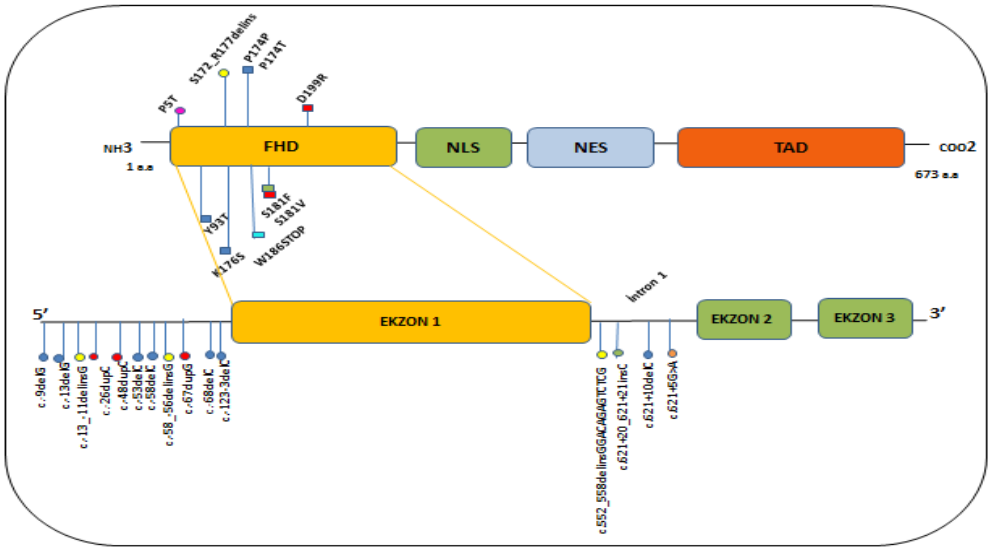
Ek-15'te verilen değişimlerden 1, 9, 11, 12, 16, 17, 19 ve 25 numaralı değişimler EBF1 geninin 1. ve 15. ekzonlarının nükleotid dizilerinde, çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesi ve dolayısıyla sonlanma kodonu oluşması sebebi ile EBF1 gen ürünü olan 591 amino asitten oluşan EBF1 molekülünün translasyonunun erken evrede sonlanmasına sebep olmaktadırlar.

Söz konusu bu değişimlerin, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatür de daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

Saptanan değişimlerden 17 tanesi EBF1 geninin 5' UTR promotor bölgesindedir. Bu değişimlerden ek-15'te verilen 3 numaralı değişim daha önce literatür de tekli nükleotid polimorfizm (SNP) olarak bildirilmiş (rs5872586) ve çalışmamızda H1 numaralı hasta örneğinde heterozigot olarak saptanmıştır.

Ek-15'te verilen 14 numaralı değişimde literatür de daha önce bildirilmiş ve c-63T>C olarak ensemble veri tabanında isimlendirilmiş ve SNP (rs79510724) olarak bildirilmiştir. Söz konusu değişim çalışmamızda 10 hasta örneğinde heterozigot olarak saptanmıştır.

#### 5.3.2.4.10. FOXO3A Geni ve Molekülü




Şekil 5.18.Saptanan değişimlerin FOXO3A gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında, 3 ekzonlu FOXO3A genine ait birinci ekzon taranmış ve 25 tane değişim saptanmıştır. Değişimlerin genin promotor özelliğe sahip 5'UTR bölgesinde bulunan, ForkHead Domaini (FH) kodlayan ve birinci ekzon bitiminde bulunan 1.intron bölgesini oluşturan nükleotid dizilerinde oldukları belirlenmiştir.

FH Domaini kodlayan nükleotid dizilerinde olan değişimlerden 2'si insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu daha önce tanımlanmıştır. Ek-16'da verilen 21 numaralı değişim FOXO3A geninin birinci ekzonunda prolinin alanine dönüşümüne neden olan Sitozinden Guanine bir değişim saptanmış olup bu değişimin HGMD bildirilmiş olan Pro5Ala yanlış anlam mutasyonu (rs757315159) olduğu belirlenmiştir. Söz konusu değişim H-1, H-2 numaralı hasta örneklerinde ve K-1 numaralı kontrol örneğinde homozigot durumda saptanmıştır.

İkinci tanımlanmış ve ek-16'da 23 numaralı değişim analiz sonucu, 522. nükleotidde Timine Guaninden Adenine bir değişim saptanmış olup bu değişimin daha önce HGMD

bildirilmiş olan Pro174Pro sessiz mutasyonu (rs149189425) olduğu belirlenmiştir. Bu değişim proteinde herhangi bir aminoasit değişikliğine neden olmamaktadır. Bu değişim H-3 ve H-5 numaralı hasta örneklerinde homozigot durumda saptanmıştır.

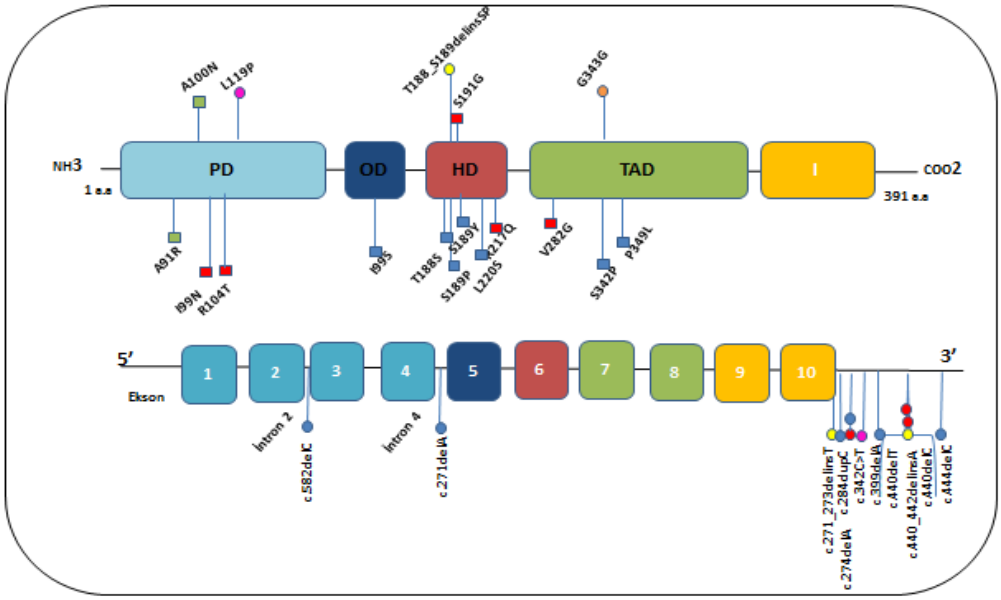
FH Domaini kodlayan nükleotid dizilerinde olan değişimler FOXO3A geninin birinci nükleotid dizilerinde, çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesi ve dolayısıyla sonlanma kodonu oluşması sebebi ile FOXO3A gen ürünü olan 391 amino asitten oluşan FOXO3A molekülünün translasyonunun erken evrede sonlanmasına sebep olmaktadırlar.

NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan " Homolog Gene-Multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması Pro5Thr mutasyonunun evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktada bulunduğu belirlenmiştir (189).

Çizelge 5.16. İnsan FOXO3A geninin 5. pozisyonunda yer alan prolin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| Insan | MAEA**P**ASPAPLSPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQASPAKPSGE |
| Şempanze | MAEA**P**ASPAPLSPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQASPAKPPGE |
| Domuz | MAEA**P**ASPAPLSPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQASPAKPSGE |
| Sığır | MAEA**P**ASPGPLSPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQGSPAKPSGE |
| Fare | MAEA**P**ASPAPISPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQGSPAKPSGE |

### 5.3.2.4.11. PAX5 Geni ve Molekülü




Şekil 5.19.Saptanan değişimlerin PAX5 gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında 10 ekzonlu PAX5 genine ait 8 ekzon (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10) taranmış ve 29 adet değişim saptanmıştır. Değişimler Paired Domain (PD), Oktapeptid Domain (O), Homeo Domain (HD) ve Transaktivasyon Domainlerini (TAD) kodlayan nükleotid dizilerinde ve 2.intron, 4.intron, 3'UTR nükleotid dizilerinde saptanmıştır.

Saptanan değişimlerden 28 tanesi insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatür de daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

Ek-17'de verilen 24 numaralı değişimin analiz sonucu, 1029. nükleotidde Guaninden Adenine bir değişim saptanmış olup bu değişimin daha önce HGMD bildirilmiş olan Gly343Gly sessiz mutasyonu (rs35469494) olduğu belirlenmiştir. Bu değişim proteinde herhangi bir aminoasit değişikliğine neden olmamaktadır ve değişim H-43 ve K-3 numaralı hasta örneklerinde heterozigot durumda saptanmıştır.

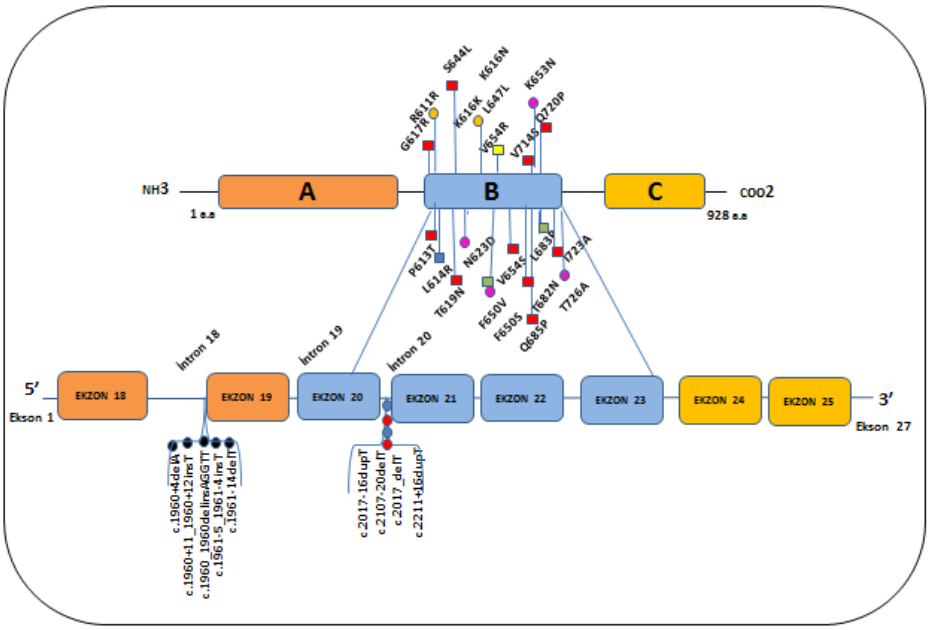
NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan "Homolog Gene-Multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin

karşılaştırılması Leu119Pro mutasyonunun evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktada bulunduğu belirlenmiştir (189).

Çizelge 5.17. İnsan PAX5 geninin 119. pozisyonunda yer alan lösin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| Insan | EYKRQNPTMFAWEIRDRL**L**AERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKVQQPPNQP |
| Şempanze | EYKRQNPTMFAWEIRDRL**L**AERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKVQQPPNQP |
| Domuz | EYKRQNPTMFAWEIRDRL**L**AERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKVQQPPNQP |
| Sığır | EYKRQNPTMFAWEIRDRL**L**AERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKVQQPPNQP |
| Fare | EYKRQNPTMFAWEIRDRL**L**AERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKVQQPPNQP |

### 5.3.2.4.12. RB1 Geni ve Molekülü




Şekil 5.20.Saptanan değişimlerin RB1 gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında, 27 ekzonlu RB1 genine ait 4 ekzon (19, 20, 21, 25) taranmış ve 32 adet değişim saptanmıştır. Değişimler genin B Domain'ini kodlayan nükleotid dizilerinde, 18.intronun bitimi 19. ekzonun başlangıcında bulunan ayıklama bölgesini ve 20. intronu oluşturan nükleotid dizilerinde saptanmıştır.

18.intronun bitimini takip eden 19.ekzon başlangıcında bulunan ayıklama bölgesi dizilerinde 5 değişim saptanmıştır, bu değişimler ayıklama mekanizmasını etkileyebileceği

ve bu nedenle transkript yapısını değiştirerek proteinin fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir. Söz konusu değişimler hasta ve kontrol örneklerinde heterozigot durumda saptanmıştır.

Ek-18'de 31 numarada verilmiş olan ayıklama bölgesi dizisindeki değişim, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren "Human Genome Mutation Database" (HGMD) e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatür de daha önce bildirilmiş (rs483352690) olduğu belirlenmiştir.

B domaini kodlayan ekzon 20, 21, 22, 23'ün nükleotid dizilerinde 22 tane değişim saptanmıştır. 14 değişim çerçeve kayması mutasyona neden olarak okuma çerçevesinin değişmesine ve dolayısıyla RB1 gen ürünü olan 928 amino asitlik RB1 molekülünün translasyon sırasında erken evrede sonlanmasına neden olmaları açısından önemlidir. 4 sessiz mutasyon, 4 tane yanlış anlam mutasyonu saptanmıştır.

Söz konusu değişimler, hasta ve kontrol örneklerinde heterozigot durumda saptanmış olup, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatür de daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan " Homolog Gene-multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması Asn623Asp, Phe650Ser, Lys653Asn ve Thr726Ala mutasyonlarının evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktada bulundukları belirlenmiştir (189).

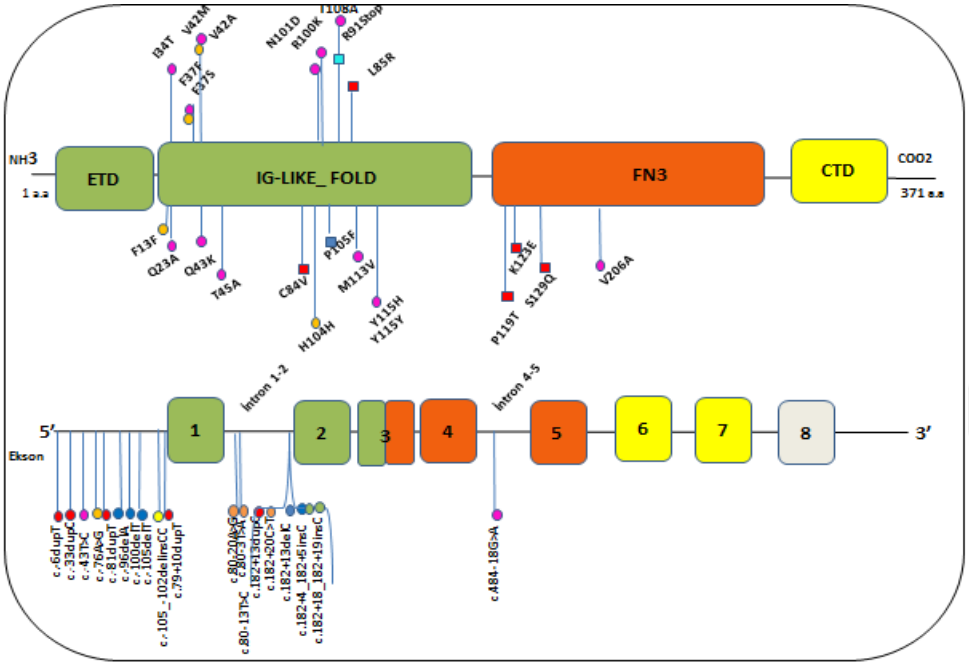
Çizelge 5.18. İnsan RB1 geninin sırasıyla 623., 650. ve 653. pozisyonlarında yer alan asparajin, fenilalanin ve lizin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizilerinin ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| İnsan | VRSPKK-KGSTTRVNSTANAETQATSAFQTQKPLKSTSLSLFYKKVYRLA |
| Şempanze | VRSPKK-KGSTTRVNSTANAETQATSAFQTQKPLKSTSLSLFYKKVYRLA |
| Domuz | VRSPKK-KGSTIRVNSTVNTEAQATSAFQTQKPLKSTSLSLFYKKVYRLA |
| Sığır | VRSPKK-KGPTPRVNSTPNSEAQATSAFQTQKPLKSTSLSLFYKKVYRLA |
| Fare | LRSPKK-RTSTTRVNSAANTETQAASAFHTQKPLKSTSLALFYKKVYRLA |

Çizelge 5.19. İnsan RB1 geninin 726. pozisyonunda yer alan treonin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| Insan | YGICKVKNIDLKFKIIVTAYKDLPHAVQETFKRVLIKEEEYDSIIVFYNS |
| Şempanze | YGICKVKNIDLKFKIIVTAYKDLPHAVQETFKRVLIKEEEYDSIIVFYNS |
| Domuz | YGICKVKNIDLKFKIIVTAYKDLPHAVQETFKRVLIREEEYDSIIVFYN |
| Sığır | YGICKVKNIDLKFKIIVTAYKDLPHAVQETFKRVLIREEEYDSIIVFYNS |
| Fare | YGICKVKNIDLKFKIIVTAYKDLPHAAQETFKRVLIREEEFDSIIVFYNS |

### 5.3.2.4.13. CRFL2 Geni ve Molekülü




Şekil 5.21.Saptanan değişimlerin CRFL2 gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında, 8 ekzonlu CRFL2 genine ait 4 ekzon (1, 2, 3, 4, 5) taranmış ve 48 adet değişim saptanmıştır. Değişimler genin IG_Like_Fold Domain'ini, FN3 Domain'ini (Fibronectin type III) kodlayan nükleotid dizilerinde, 1.intron bölgesi ve 4.intron bölgesini oluşturan nükleotid dizilerinde ve promotor özelliğe sahip 5'UTR bölgesinde bulunan nükleotid dizilerinde saptanmıştır.

Değişimlerin büyük çoğunluğu IG_Like Domain'ini kodlayan nükleotid dizilerinde saptanmıştır. FN3 Domain'ini kodlayan nükleotid dizilerinde ise 4 tane değişim saptanmıştır. Tespit edilen değişimlerden 12 tanesi yanlış anlam mutasyonu, 11 tanesi sessiz mutasyon, 1 tanesi anlamsız mutasyon ve 8 tanesi stop kodon oluşmasına neden olan çerçeve kayması mutasyonudur.

IG_Like Domain ve FN3 Domainini kodlayan nükleotid dizilerinde olan değişimlerden sonlanma kodonu oluşumuna sebep olan değişimler nedeniyle CRLF2 gen ürünü olan 371 amino asitten oluşan CRLF2 molekülünün translasyonunun erken evrede sonlanmasına sebep olmaktadırlar.

Saptanan değişimlerden 3 tanesinin, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatür de daha önce bildirilmiş olduğu belirlenmiştir.

Ek-19'da verilen 23 numaralı değişim analiz sonucu, 33. nükleotidde Sitozinden Guanine bir değişim saptanmış olup bu değişimin daha önce HGMD bildirilmiş olan Ala11Ala sessiz mutasyonu (rs140859855) olduğu belirlenmiştir. Bu değişim proteinde herhangi bir aminoasit değişikliğine neden olmamaktadır ve değişim H-17, H-22, H-37 ve K-2 numaralı hasta ve kontrol örneklerinde heterozigot durumda saptanmıştır.

Saptanan değişimlerden HGMD bildirilmiş olan diğer bir değişim CRLF2 geninin 5' UTR promotor bölgesindedir. Değişim daha önce literatüre tekli nükleotid polimorfizm (SNP) olarak bildirilmiş (rs150166261) ve çalışmamızda H-4, H-8, H-17, H-20, H-27, H34 ve H-37 numaralı hasta örneklerinde ve K-2 numaralı kontrol örneğinde heterozigot olarak saptanmıştır.

NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan "Homolog Gene-Multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması Ile34Thr, Phe37Ser, Val42Met, Thr45Ala, Val42Ala, Leu86Pro, Glu43Lys, Arg100Lys, Asn101Asp, Thr108Ala, Tyr115His ve Val206Ala mutasyonlarının evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktada bulundukları belirlenmiştir (189).

Çizelge 5.20. İnsan CRLF2 geninin sırasıyla 34., 37., 42. ve 43. pozisyonlarında yer alan izolösin, fenilalanin, valin ve glutamin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| İnsan | MGRLVLLWG-AAVFLLGGWMALGQGGA-----AEGVQIQIIYFNLETVQV |
| Şempanze | ----------EGVQIQIIYFNLETVQV |
| Domuz | MRTVLLPWASAAVFLLVTVTVSGDEAL-----EGVLQLQMINFNFEAVQV |
| Sığır | MRHVFLPWAAAAVLLLGRANASGKTKP-----GSALQLQVINFNFETVQV |
| Fare | -----MAWALAVILLPRLLAAAAAAAAAVTSR-GD---VTVVCHDLETVEV |

Çizelge 5.21. İnsan CRLF2 geninin sırasıyla 45., 86.pozisyonlarda yer alan treonin ve lösin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| Insan | TWNA-SKYSR--TNLTFHYRFNG--DEAYDQCTNYLLQEG-HTSGCLLDA |
| Şempanze | TWNA-SKYSR--TNLTFHYRFDG--DEAYDQCTNYLLQEG-HTSGCLLDA |
| Domuz | TWNA-SQYSG-----TNLTFLYKLTS--DETDSQCSNYILQQS-RTAGCLLEA |
| Sığır | TWNS-SAYAG-----INFTFIYKFHT--KEEYRPCPDYILQHG-YRAGCLLEV |
| Fare | TWGPGSAHHGLSANLSLEFRY-G--NQVPQPCPHYFLLDS-VRAGCV--LPM |

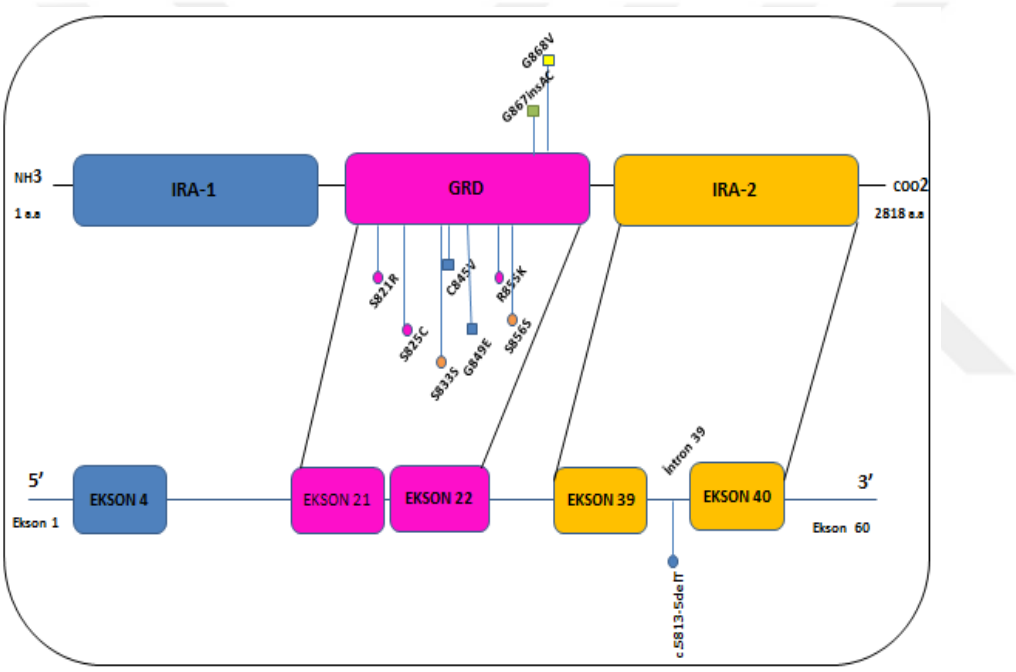
Çizelge 5.22. İnsan CRLF2 geninin sırasıyla 100., 101., 108. ve 115. pozisyonlarında yer alan arjinin, asparajin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| İnsan | EQRDDILYFSIRN-GTHPVFTASRWMVYYLKPSSPKHVRFSWHQD-AVTV |
| Şempanze | EQRDDILYFSIRN-GTHPVFTASRWMVYYLKPSSPKHVRFSWHQD-AVTV |
| Domuz | KEDEILCFSIWN-GTRLLLNKCQWIS--AYLKPSSPKDLNFQWHQE-AITV |
| Sığır | -QRDGPLYFSIRN-GTEPLLTKDLAIS--TYLKPRSPGALNFQWREE-AVTV |
| Fare | -GK-GLLEVVLRE-GGGKLFSRKKKAS-AWLRPRPPWNVTLSWVGD-TVAV |

Çizelge 5.23. İnsan CRLF2 geninin 206. pozisyonunda yer alan valin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| Insan | FWVRVKAMEDVYGPDTYPSDWSEVTCWQRGEIRDACAETPTP--PKPKLS |
| Şempanze | FRARVKTMESSYGPDTYPSDWSEVIHQQKGELRDSCQEKKLF--P----- |
| Domuz | FRARVKALEFAYGSETYPSDWSEVTYQQRGELRDSCWENSLF--P----- |
| Sığır | FRVRASPRAAHYGLEAQPSEWTAVTRLSGAASAASCTASPAP-SPALAPP |
| Fare | FRVRATPQDFYYGPEARPSKWTGVASLQGVGPTGSCTGPTLPRTPGTPTP |

### 5.3.2.4.14. NF1 Geni ve Molekülü




Şekil 5.22.Saptanan değişimlerin NF1 gen ve protein yapısında gösterimi

Çalışma örneklerinin tamamında, 60 ekzonlu NF1 genine ait 4 ekzon (4, 22, 39, 40) taranmış ve 13 adet değişim saptanmıştır. Değişimler genin GR Domain'ini (GAP-Related) kodlayan nükleotid dizilerinde ve 39.intron bölgesini oluşturan nükleotid dizilerinde saptanmıştır. Ek-20'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Değişimlerden 13 tanesi GR Domain'ini kodlayan nükleotid dizilerindedir, 3 yanlış anlam mutasyonu, 2 tanesi sessiz mutasyon ve 6 tanesi stop kodon oluşmasına neden olan çerçeve kayması mutasyonlardır.

GR Domainini kodlayan nükleotid dizilerinde olan değişimlerden sonlanma kodonu oluşumuna sebep olan değişimler nedeniyle NF1 gen ürünü olan 2818 amino asitten oluşan NF1 molekülünün translasyonunun erken evrede sonlanmasına sebep olmaktadırlar. Erken evrede gerçekleşen bu sonlanmanın işlevsiz NF1 molekülü oluşumuna neden olacağı şüphesizdir.

Değişimlerin tamamının insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren "Human Genome Mutation Database" (HGMD) e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış oldukları belirlenmiştir.

NCBI e-veri tabanı içerisinde yer alan "Homolog Gene-Multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz sığır ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması Ser821Arg, Ser825Cys ve Arg855Lys mutasyonlarının evrimsel süreç boyunca türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktada bulundukları belirlenmiştir (189).

Çizelge 5.24. İnsan NF1 geninin sırasıyla 821., 825. ve 855. pozisyonlarında yer alan serin ve arginin aminoasitlerinin diğer türlerdeki aminoasit dizileri ile karşılaştırılması

| | |
|---|---|
| İnsan | VSGGGSIDLSDTDSLQEWINMTGFLCALGGVCLQQRSNS--GLATYSPPM |
| Şempanze | VSGGGSIDLSDTDSLQEWINMTGFLCALGGVCLQQRSNS--GLATYSPPM |
| Domuz | VSGGGSIDLSDTDSLQEWINMTGFLCALGGVCLQQRSNS--GLATYSPPM |
| Sığır | VSGGGSIDLSDTDSLQEWINMTGFLCALGGVCLQQRSSS--GLATYSPPM |
| Fare | VSGGGSIDLSDTDSLQEWINMTGFLCALGGVCLQQRSSS--GLATYSPPM |

### 5.3.2.5. Çalışma Örneklerinde Saptanan Değişimlerinin Dağılımının Şemasal Gösterimi

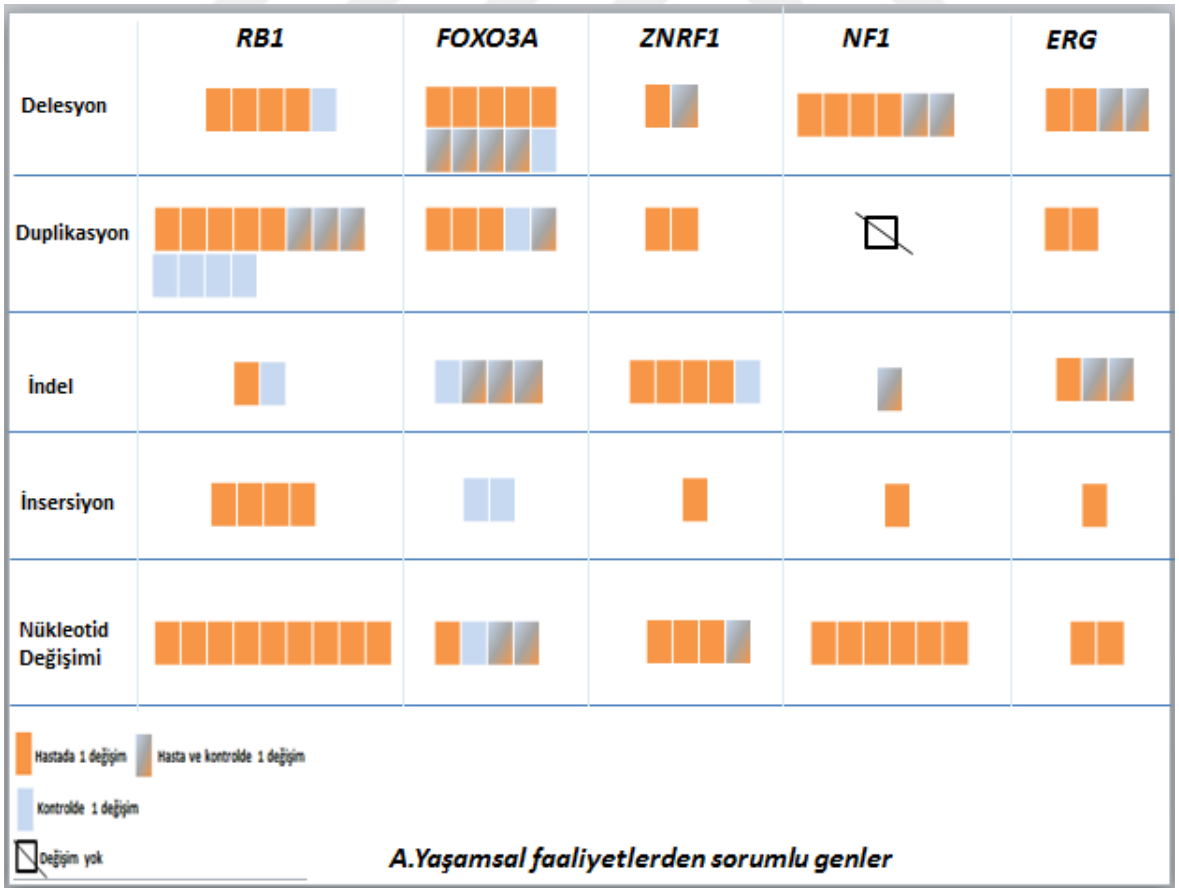
Hasta ve/veya kontrol örneklerinde saptanan değişimlerin dağılımı, değişimlerin yapısal özelliklerine ve fonksiyonel sonuçlarına göre şemasal gösterimi ile detaylandırılmıştır.

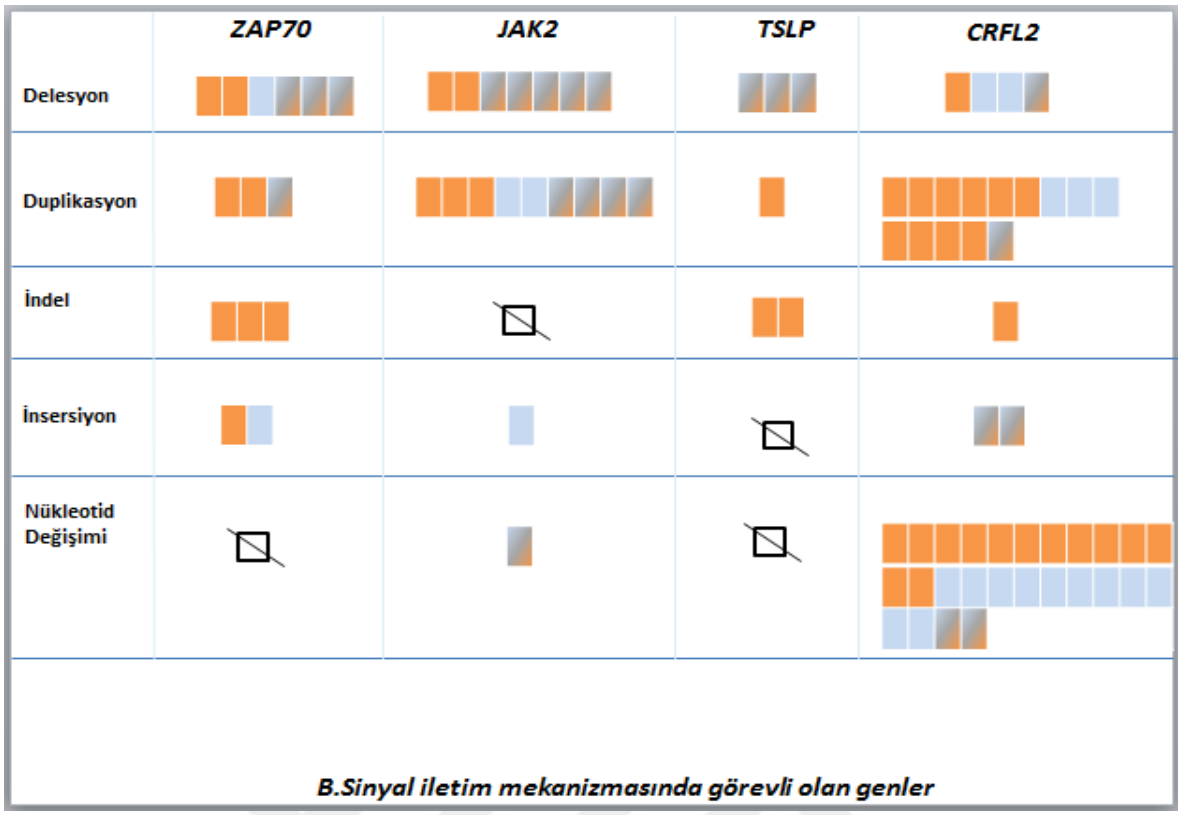
#### 5.3.2.5.1. Saptanan Değişimlerin Yapısal Özelliklerine Göre Çalışma Gruplarında Gösterilmesi

Saptanmış olan değişimlerin yapısal tiplerine göre (delesyon, duplikasyon, indel, nükleotid değişimi, insersiyon) çalışma gruplarında değerlendirilmiş ve sonuçların anlaşılabilirliğini artırabilmek için şemasal şekilde detaylandırılmıştır.

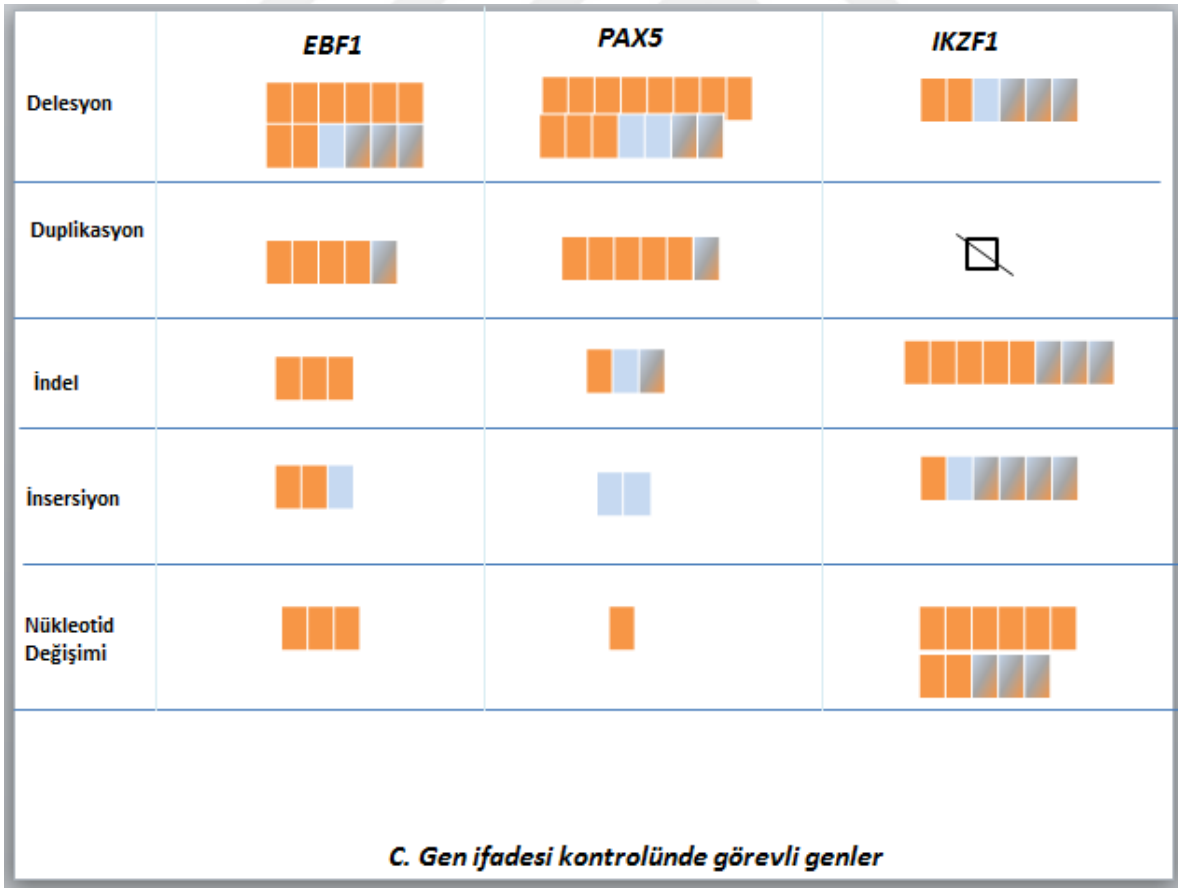
Şekil 5.23'e genel olarak bakıldığında TSLP, ERG ve NF1 genlerinde hem hasta grubunda hem de hasta-kontrol grubunun her ikisinin de taşıdığı değişimler saptanmıştır, fakat bu saptanan değişimlerden sadece kontrol grubunun taşıdığı mevcut değildir.

Hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde ortak en çok değişim görülmekte olan gen IKZF1'dir. IKZF1 değişimlerinden 13 tanesi hem hasta hem de kontrol örneklerinde saptanmıştır. CRFL2 ise hasta grubundan bağımsız sadece kontrol örneklerin taşıdığı en çok değişimin saptanan gendir ve 16 değişim tespit edilmiştir. Şekil 5.23'te her bir turuncu kutu bir hastada olan değişimi, her bir mavi kutu bir kontrolde olan değişimi, karışık renkli bir kutu 1 hasta ve 1 kontrolü ve değişim saptanmayan şeklinde temsil edilmektedir.

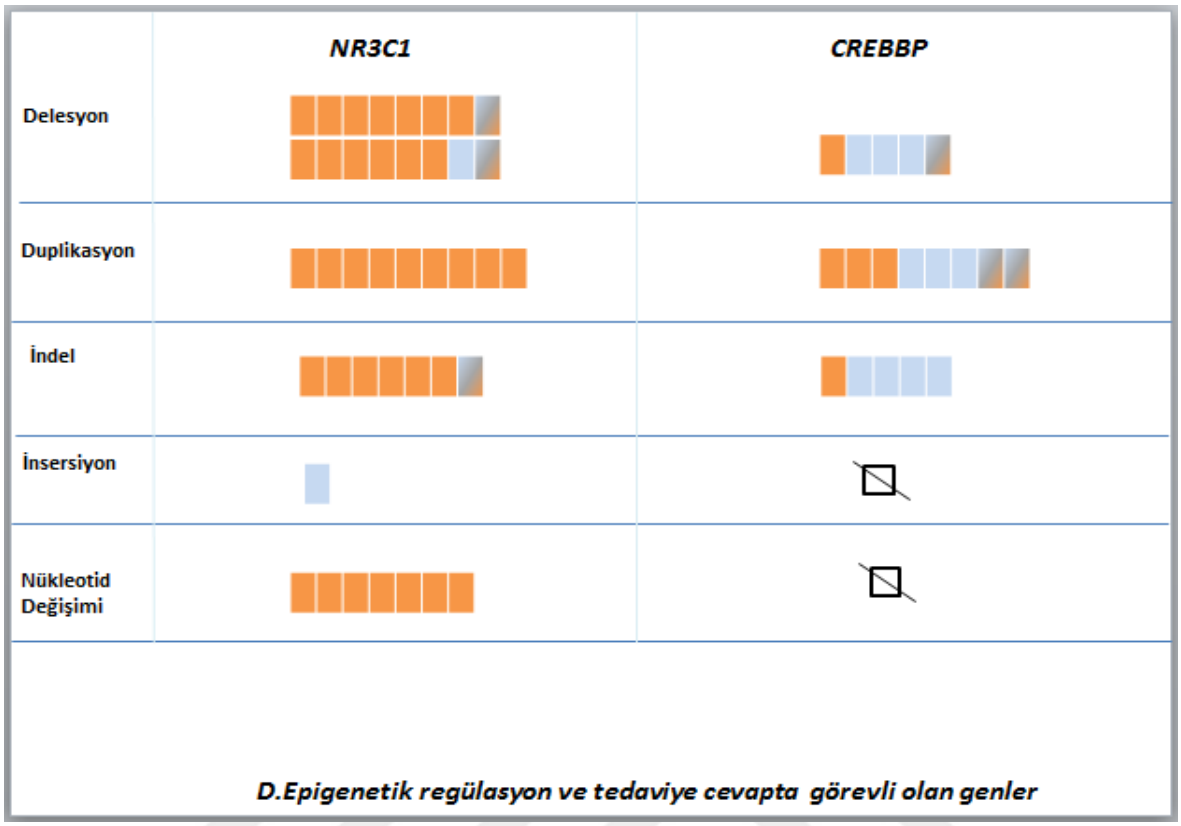





*B.Sinyal iletim mekanizmasında görevli olan genler*




*C. Gen ifadesi kontrolünde görevli genler*




Şekil 5.23. Hasta ve kontrol örneklerinde saptanan değişimlerin yapısal özelliklerine göre şemasal gösterimi. A. RB1, FOXO3A, ZNRF1, NF1, ERG Genleri. B. ZAP70, JAK2, TSLP, CRFL2 Genleri C. EBF1, PAX5, IKZF1 Genleri. D. NR3C1 ve CREBBP Genleri

Şekil 5.23 A'da hücresel yolaklar şeklinde olan gruplandırma yapılan genlerden *yaşamsal faaliyetlerden sorumlu* olan genlere ait değişim sayılarını ifade eden kümeler verilmektedir. Bu grupta en çok RB1 ve FOXO3A geninde en az değişim ise ERG geninde saptanmıştır.

Şekil 5.23 B'de hücresel yolaklar şeklinde olan gruplandırma yapılan genlerden *sinyal iletim mekanizmasında* görevli olan genlere ait değişim sayılarını ifade eden kümeler verilmektedir. Bu grupta en çok CRFL2 geninde en az değişim ise TSLP geninde saptanmıştır.

Şekil 5.23.C'de hücresel yolaklar şeklinde olan gruplandırma yapılan genlerden *gen ifadesinin kontrolünde* görevli olan genlere ait değişim sayılarını ifade eden kümeler

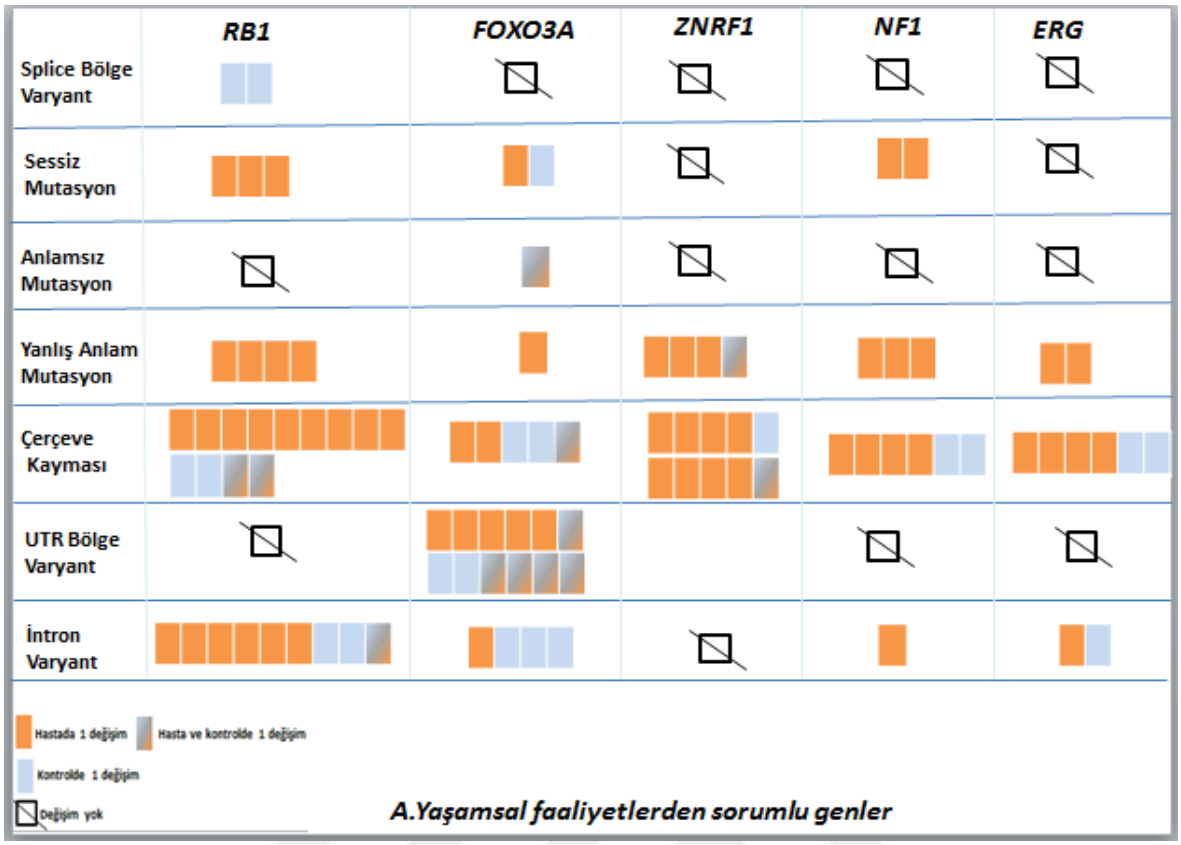
verilmektedir. Bu grupta en çok IKZF1 geninde en az değişim ise EBF1 geninde saptanmıştır.

Şekil 5.23.D'de hücresel yolaklar şeklinde olan gruplandırma yapılan genlerden *epigenetik regülasyon ve tedaviye cevapta* görevli olan genlere ait değişim sayılarını ifade eden kümeler verilmektedir. Bu grupta en çok NR3C1 geninde en az değişim ise CREBBP geninde saptanmıştır.

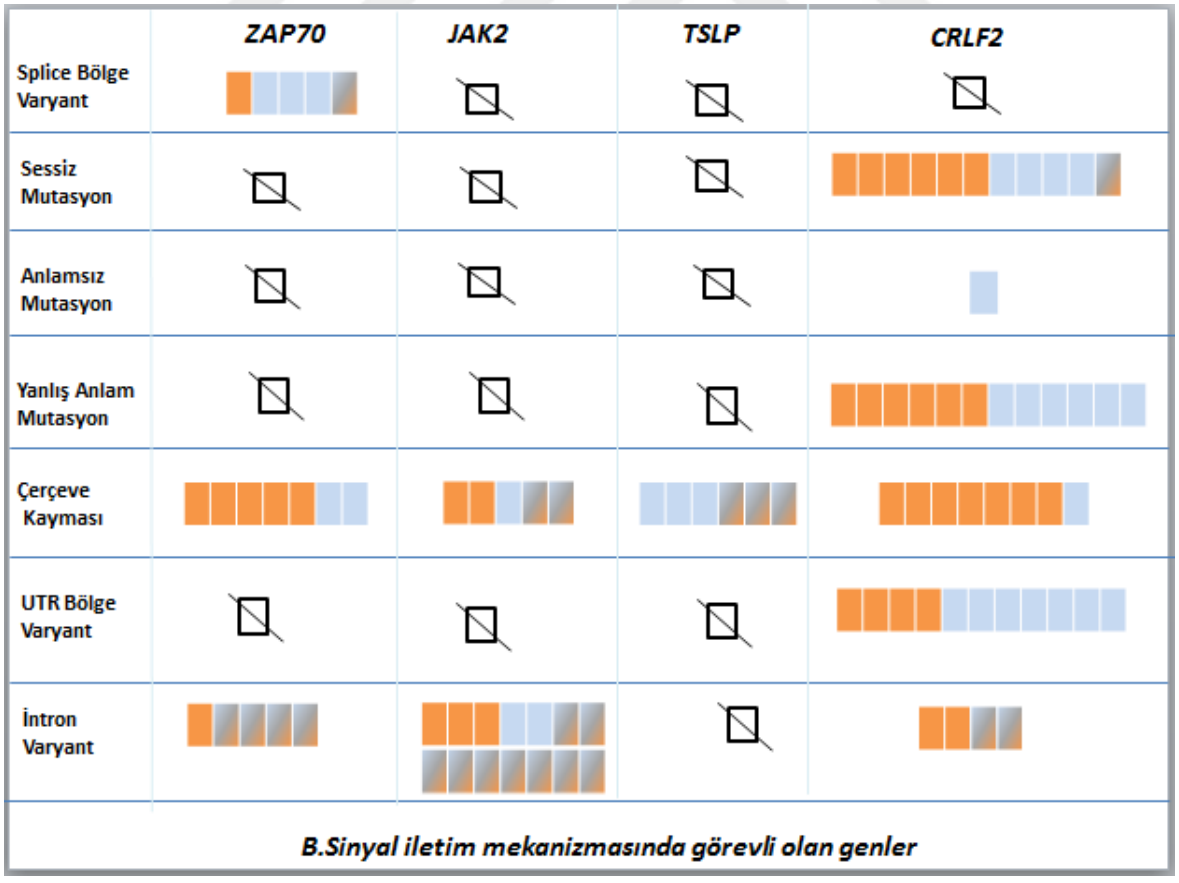
#### 5.3.2.5.2. Saptanan Değişimlerin Fonksiyonel Sonuçlarına Göre Çalışma Gruplarında Gösterilmesi

Bölüm 5.3.2.4.' te verilemekte olan genlerde saptanan değişimlerin çalışma grubunda karşılaştırılabilmesi ve analiz sonuçlarının değerlendirilmesini kolaylaştırabilmek için şemasal gösterimi ile değişimler fonksiyonel sonuçlarına göre görselleştirilmiş ve detaylandırılmıştır. Şekil 5.24'e genel olarak bakıldığında, *ZAP70, RB1, IKZF1* ve *CREBBP* ayıklama bölgesi dizilerinde değişim saptanan genlerdir. Çalışma genlerinin tamamında okuma çerçevesinin değişmesine neden olan çerçeve kayması mutasyon saptanmıştır. En çok çerçeve kayması mutasyon saptanmış olan gen NR3C1, en az tespit edilen ise *JAK2*' dir. Amino asit değişikliğine neden olarak oluşan son molekülün yapı ve fonksiyonu etkileyebilen yanlış anlam mutasyonları 9 gende tespit edilmiş ve bu genler içinde ise en çok CRFL2 geninde, en az ise PAX5 ve FOXO3A genlerinde saptanmıştır.Sonlanma kodonu oluşmasına neden olarak translasyonun erken bitmesine neden olan anlamsız mutasyonlar ise FOXO3A, IKZF1 ve CRFL2 genlerinde saptanmıştır.

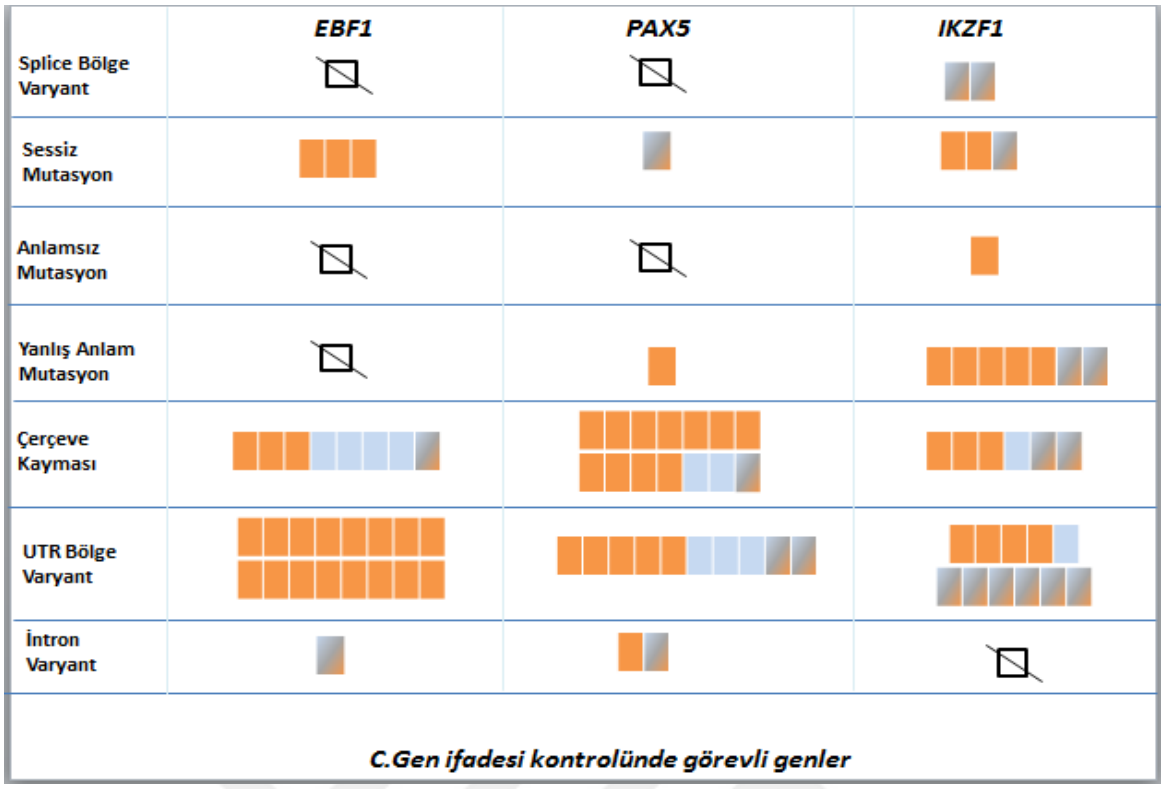
UTR bölge değişimleride EBF1, FOXO3A, PAX5 ve CRFL2 genlerinde saptanmıştır. EBF1, FOXO3A, CRLF2 genlerinde değişimler genin promotor bölge olarak tanımlanan 5'UTR bölgesinde iken PAX5 geninde ise değişimler 3'UTR bölgesinde saptanmıştır.

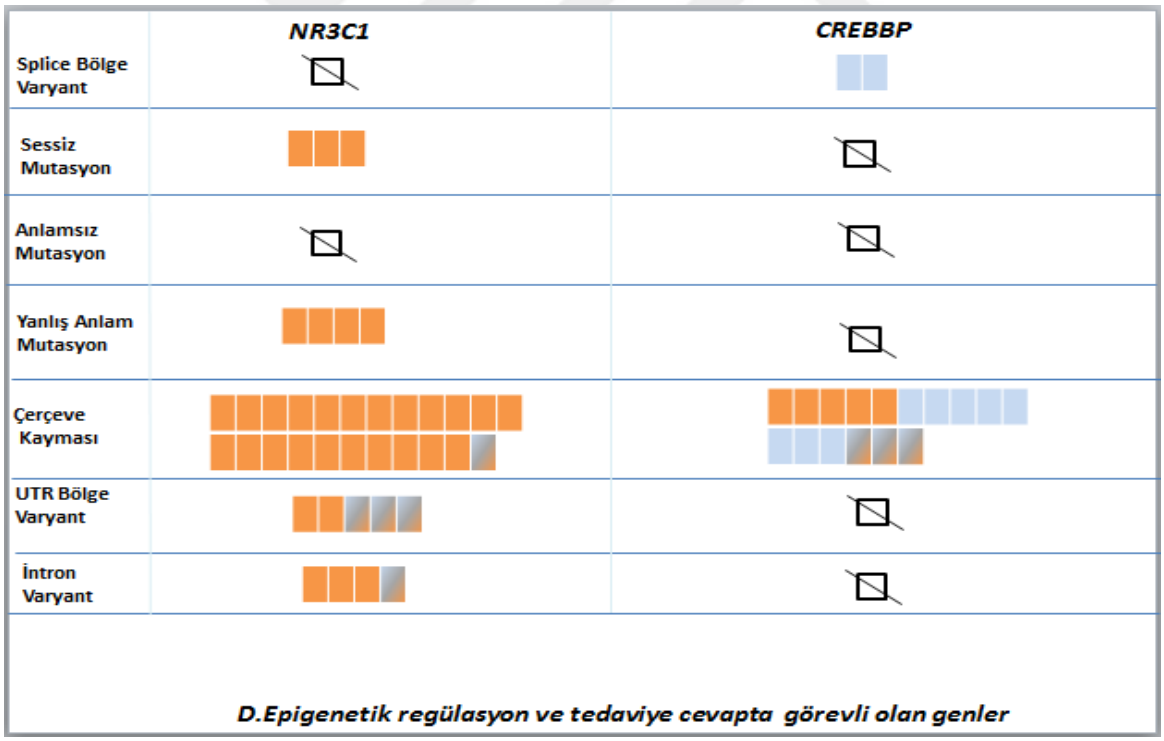



*A.Yaşamsal faaliyetlerden sorumlu genler*




*B.Sinyal iletim mekanizmasında görevli olan genler*




Şekil 5.24. Hasta ve kontrol örneklerinde saptanan değişimlerin fonksiyonel sonuçlarına göre şemasal gösterimi. A. RB1, FOXO3A, ZNRF1, NF1, ERG Genleri. B. ZAP70, JAK2, TSLP, CRFL2 Genleri C. EBF1, PAX5, IKZF1 Genleri. D. NR3C1 ve CREBBP Genleri

Şekil 5.24 A'da hücresel yolaklar şeklinde olan gruplandırma yapılan genlerden *yaşamsal faaliyetlerden sorumlu* olan genlere ait değişim sayılarını ifade eden kümeler verilmektedir. Bu grupta en çok değişim RB1 geninde tespit edilmiştir fakat değişim sonuçlarının çeşitliliği açısından ise FOXO3A'dır. Diğer gruplardan farklı olarak genlerin tamamında çerçeve kayması mutasyon ve yanlış anlam mutasyonu tespit edilmiştir. Bu grup içinde, hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de görülen değişim sonucu çerçeve kayması mutasyondur.

Şekil 5.24 B'de hücresel yolaklar şeklinde olan gruplandırma yapılan genlerden *sinyal iletim mekanizmasında* görevli olan genlere ait değişim sonuçlarını ifade eden kümeler verilmektedir. Bu grupta en çok değişim tespit edilen gen CRFL2'dir ve saptanan değişimlerin fonksiyonel sonuçlarının çeşitliliği açısından da en çok farklı değişim sonucu taşıyan gendir (çerçeve kayması mutasyon, yanlış anlamlı mutasyon, anlamsız mutasyon, sessiz mutasyon ayıklama bölgesi mutasyonları ve intron bölge değişimleri). Bu grup içersinde, hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de görülen değişim sonucu çerçeve kayması mutasyondur.

Şekil 5.24.C'de hücresel yolaklar şeklinde olan gruplandırma yapılan genlerden *gen ifadesinin kontrolünde* görevli olan genlere ait değişim sayılarını ifade eden kümeler verilmektedir. Bu grupta en çok değişim IKZF1 ve PAX5 genlerinde tespit edilmiştir. Diğer gruplardan farklı olarak genlerin tamamında çerçeve kayması mutasyon, sessiz mutasyon ve UTR bölge değişimleri tespit edilmiştir. Bu grup içinde, hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de görülen değişim sonucu çerçeve kayması mutasyondur.

Şekil 5.24.D'de hücresel yolaklar şeklinde olan gruplandırma yapılan genlerden *epigenetik regülasyon ve tedaviye cevapta* görevli olan genlere ait değişim sayılarını ifade eden kümeler verilmektedir. Bu grupta en çok değişim ve değişim sonuçlarının çeşitliliğinin en fazla görüldüğü gen NR3C1' dir. Çalışmaya dahil edilen tüm genler içerisinde en çok çerçeve kayması mutasyon tespit edilen gen NR3C1'dir. Bu grup içinde, hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de görülen değişim sonucu çerçeve kayması mutasyondur.

### 5.3.2.6. Mutasyon Analizinin İstatistiksel Değerlendirilmesi

#### 5.3.2.6.1. Saptanan Değişimlerinin Çalışma Gruplarında Dağılımının Değerlendirilmesi

Saptanan değişimlerin çalışma örneklerini oluşturan hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, ERG geni yanlış anlam mutasyonu taşıyor olmak, CRLF2 geni sessiz mutasyonu taşıyor olmak, CREBBP, FOXO3, TSLP ve JAK2 genlerinde indel değişim taşıyor olmak, ERG, CREBBP, CRFL2 genlerinde delesyon taşıyor olmak ve FOXO3A, NR3C1 genlerinde duplikasyon taşıyor olmak; istatistiksel olarak $p<0,005$ anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 5.25. Saptanan yanlış anlam mutasyonların çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması

| Gen | Hasta n (%) | Kontrol n (%) | p değerleri |
|---|---|---|---|
| *CRLF2* | 5 (11,1) | 0 | 1,000 |
| *ERG* | 12 (26,7) | 5 (100) | **0,003** |
| *ZNFR1* | 9 (20,0) | 0 | 0,570 |
| *FOXO3* | 3 (6,7) | 1 (20,0) | 0,303 |
| *IKZF1* | 20 (44,4) | 3 (60,0) | 0,651 |
| *NR3C1* | 18 (40,0) | 3 (60,0) | 0,145 |
| *NF1* | 3 (6,7) | 0 | 1,000 |
| *PAX5* | 5 (11,1) | 1 (20,0) | 0,487 |
| *RB1* | 4 (8,9) | 0 | 1,000 |

Çizelge 5.26. Saptanan anlamsız mutasyonların çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması

| Gen | Hasta n (%) | Kontrol n (%) | p değerleri |
|---|---|---|---|
| *FOXO3* | 1 (2,2) | 1 (20,0) | 0,192 |
| *IKZF1* | 3 (6,7) | 0 | 1,000 |

Çizelge 5.27.Saptanan sessiz mutasyonların çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması

| Gen | Hasta n (%) | Kontrol n (%) | p değerleri |
|---|---|---|---|
| *CRFL2* | 8 (17,8) | 4 (80,0) | 0,009 |
| *FOXO3* | 2 (4,4) | 1(20,0) | 0,276 |
| *NR3C1* | 6 (13,3) | 0 | 1,000 |
| *JAK2* | 15 (33,3) | 1(20,0) | 1,000 |
| *NF1* | 4 (8,9) | 0 | 1,000 |
| *PAX5* | 1(2,2) | 1(20,0) | 0,192 |
| *RB1* | 4(8,9) | 0 | 1,000 |
| *EBF1* | 12 (26,7) | 0 | 0,319 |

Çizelge 5.28.Saptanan indel değişimlerin çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması

| Gen | Hasta n (%) | Kontrol n (%) | p değerleri |
|---|---|---|---|
| *RB1* | 11 (24,4) | 2 (40,0) | 0,595 |
| *ERG* | 7 (15,6) | 2 (40,0) | 0,216 |
| *CREBBP* | 2 (4,4) | 3 (60,0) | 0,005 |
| *CRFL2* | 1 (2,2) | 0 | 1,000 |
| *ZNFR1* | 6 (13,3) | 1 (20,0) | 0,646 |
| *FOXO3* | 8 (17,8) | 4 (80,0) | 0,009 |
| *IKZF1* | 45 (100) | 5 (100) | - |
| *ZAP70* | 8 (17,8) | 0 | 0,577 |
| *TSLP* | 2 (4,4) | 2 (40,0) | 0,045 |
| *NR3C1* | 15 (33,3) | 1 (20,0) | 1,000 |
| *JAK2* | 1 (2,2) | 3 (60,0) | 0,002 |
| *NF1* | 12 (26,7) | 0 | 0,319 |
| *PAX5* | 10 (22,2) | 1 (20,0) | 1,000 |

Çizelge 5.29. Saptanan delesyon değişimlerin çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması

| Gen | Hasta n (%) | Kontrol n (%) | p değerleri |
|---|---|---|---|
| *ERG* | 13 (28,9) | 5 (100) | 0,004 |
| *CREBBP* | 4 (8,9) | 3 (60,0) | 0,016 |
| *CRFL2* | 7 (15,6) | 4 (80,0) | 0,006 |
| *FOXO3* | 22(48,9) | 2 (40,0) | 1,000 |
| *IKZF1* | 35 (77,8) | 4 (80) | 1,000 |
| *ZAP70* | 33 (60,0) | 5 (100) | 0,148 |
| *NR3C1* | 39 (86,7) | 5 (100) | 1,000 |
| *JAK2* | 21 (46,7) | 4 (80,0) | 0,349 |
| *NF1* | 20 (44,4) | 2 (40,0) | 0,650 |
| *PAX5* | 21 (46,7) | 3 (60,0) | 0,661 |
| *RB1* | 15(33,3) | 2 (40,0) | 1,000 |
| *EBF1* | 32(71,1) | 2 (40,0) | 0,318 |
| *ZNFR1* | 16 (35,6) | 1 (20,0) | 0,650 |
| *TSLP* | 21 (46,7) | 4 (80,0) | 0,349 |

Çizelge 5.30.Saptanan duplikasyon değişimlerin çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması

| Gen | Hasta n (%) | Kontrol n (%) | p değerleri |
|---|---|---|---|
| *ZNFR1* | 4 (8,9) | 0 | 1,000 |
| *FOXO3* | 5 (11,1) | 5 (100) | 0,000 |
| *ZAP70* | 15 (33,3) | 1 (20,0) | 1,000 |
| *TSLP* | 4 (8,9) | 0 | 1,000 |
| *NR3C1* | 25 (55,6) | 0 | 0,050 |
| *JAK2* | 9 (20,0) | 3 (60,0) | 0,082 |
| *RB1* | 20(44,4) | 2 (40,0) | 1,000 |
| *EBF1* | 7 (15,6) | 2 (40,0) | 0,216 |
| *ERG* | 5 (11,1) | 0 | 1,000 |
| *CREBBP* | 8 (17,8) | 3 (60,0) | 0,064 |
| *CRFL2* | 26 (57,8) | 5 (100) | 0,142 |
| *IKZF1* | 19 (42,2) | 3 (60,0) | 0,643 |
| *NF1* | 2 (4,4) | 0 | 1,000 |

Çizelge 5.31.Saptanan insersiyon değişimlerin çalışma örneklerinde dağılımının karşılaştırılması

| Gen | Hasta n (%) | Kontrol n (%) | p değerleri |
|---|---|---|---|
| *ZNFR1* | 2 (4,4) | 0 | 1,000 |
| *FOXO3* | 0 | 2 (40,0) | 0,008 |
| *IKZF1* | 24 (53,3) | 5 (100) | 0,066 |
| *ZAP70* | 4 (8,9) | 4 (80,0) | 0,001 |
| *NR3C1* | 6 (13,3) | 1 (20,0) | 0,546 |
| *JAK2* | 9 (20,0) | 4 (80,0) | 0,013 |
| *NF1* | 16 (35,6) | 1 (20,0) | 0,650 |
| *PAX5* | 0 | 5 (100) | 0,000 |
| *RB1* | 3 (6,7) | 0 | 1,000 |
| *EBF1* | 11 (24,4) | 2 (40,0) | 0,595 |

#### 5.3.2.6.2. Saptanan Değişimlerinin Tedavi ve İzlem Parametreleri ile Değerlendirilmesi

Genlerde tespit edilen değişimler, mevcut olan tedavi ve izlem verileri ışığında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Gen taramalarında ortaya konulan mutasyonların ve değişimlerinin ne kadar risk getirdiğinin saptanması amacıyla ‘’IBM SPSS Statistics 20 for Chi-Square” programı kullanılmıştır. Chi-Square tablolarında farklılık var mı sorusunu test ederken %5 yani 0,05 yanılma payı ile çalışılarak anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

***ZNRF1***

Verilen tedavi protokolü, tanı, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *ZNRF1* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda tanı parametresi için istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur (p:0.039). Ancak varsayımlar sağlanamadığından dolayı Odds değeri hesaplanamamıştır.

Çizelge 5.32.Tedavi son durumu ve *ZNRF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

| Grup | | | *ZNRF1 Değişim* | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | Tedavisi Biten | n | 22 | 11 | 33 |
| | | % | 66.7% | 33.3% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 6 | 6 | 12 |
| | | % | 50.0% | 50.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 28 | 17 | 45 |
| | | % | 62.2% | 37.8% | 100.0% |

**Chi-Square Tests**

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.040[a] | 1 | .308 | .488 | .249 | |
| Continuity Correction[b] | .452 | 1 | .502 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.021 | 1 | .312 | .488 | .249 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .325 | .249 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.017[c] | 1 | .313 | .488 | .249 | .162 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.33.Risk durumu ve *ZNRF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

**Crosstab**

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *ZNRF1* | Değişim Taşımayan | n | 8 | 9 | 11 | 28 |
| | | % | 28.6% | 32.1% | 39.3% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 1 | 11 | 5 | 17 |
| | | % | 5.9% | 64.7% | 29.4% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

**Chi-Square Tests**

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 5.536[a] | 2 | .063 | .061 | | |
| Likelihood Ratio | 5.988 | 2 | .050 | .056 | | |
| Fisher's Exact Test | 5.298 | | | .061 | | |
| Linear-by-Linear Association | .320[b] | 1 | .572 | .679 | .362 | .142 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.34.Tanı ve *ZNRF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *ZNFR1 Değişimi* Yok | *ZNFR1 Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | My+ öncü B-ALL | n | 2 | 6 | 8 |
| | | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| | Erken öncü B-ALL/önc B-ALL | n | 26 | 11 | 37 |
| | | % | 70.3% | 29.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 28 | 17 | 45 |
| | | % | 62.2% | 37.8% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 5.735[a] | 1 | .017 | .039 | .024 | |
| Continuity Correction[b] | 3.971 | 1 | .046 | | | |
| Likelihood Ratio | 5.636 | 1 | .018 | .039 | .024 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .039 | .024 | |
| Linear-by-Linear Association | 5.607[c] | 1 | .018 | .039 | .024 | .022 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.35.Tedavi protokolü ve *ZNRF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *ZNRF1 Değişimi* Yok | *ZNRF1 Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | ALL-BFM-95 | n | 25 | 14 | 39 |
| | | % | 64.1% | 35.9% | 100.0% |
| | ALL IC-BFM 2009 | n | 3 | 3 | 6 |
| | | % | 50.0% | 50.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 28 | 17 | 45 |
| | | % | 62.2% | 37.8% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .440[a] | 1 | .507 | .658 | .407 | |
| Continuity Correction[b] | .045 | 1 | .833 | | | |
| Likelihood Ratio | .429 | 1 | .513 | .658 | .407 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .658 | .407 | |
| Linear-by-Linear Association | .430[c] | 1 | .512 | .658 | .407 | .274 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

### *TSLP*

Verilen tedavi protokolü, tanı, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *TSLP* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda

TSLP geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.36.Tedavi son durumu ve *TSLP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *TSLP Değişimi* Yok | *TSLP Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | Tedavisi Biten | n | 18 | 15 | 33 |
| | | % | 54.5% | 45.5% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 6 | 6 | 12 |
| | | % | 50.0% | 50.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 24 | 21 | 45 |
| | | % | 53.3% | 46.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .073[a] | 1 | .787 | 1.000 | .525 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .073 | 1 | .787 | 1.000 | .525 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .525 | |
| Linear-by-Linear Association | .071[c] | 1 | .789 | 1.000 | .525 | .254 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.37.Risk durumu ve *TSLP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu Yüksek | Risk Durumu Orta | Risk Durumu Standart | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *TSLP* | Değişim Taşımayan | n | 4 | 12 | 8 | 24 |
| | | % | 16.7% | 50.0% | 33.3% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 5 | 8 | 8 | 21 |
| | | % | 23.8% | 38.1% | 38.1% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .714[a] | 2 | .700 | .793 | | |
| Likelihood Ratio | .717 | 2 | .699 | .793 | | |
| Fisher's Exact Test | .780 | | | .793 | | |
| Linear-by-Linear Association | .012[b] | 1 | .914 | 1.000 | .537 | .159 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.38.Tanı ve *TSLP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | *TSLP* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | My+ öncü B hücreli ALL | n% | 6<br>75.0% | 2<br>25.0% | 8<br>100.0% |
| | Erken öncü B-ALL/öncü B-ALL | n% | 18<br>48.6% | 19<br>51.4% | 37<br>100.0% |
| Toplam | | n% | 24<br>53.3% | 21<br>46.7% | 45<br>100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.835[a] | 1 | .176 | .252 | .168 | |
| Continuity Correction[b] | .929 | 1 | .335 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.920 | 1 | .166 | .252 | .168 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .252 | .168 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.794[c] | 1 | .180 | .252 | .168 | .131 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.39.Tedavi protokolü ve *TSLP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *TSLP* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | ALL-BFM | n | 22 | 17 | 39 |
| | | % | 56.4% | 43.6% | 100.0% |
| | ALL IC-BFM 2009 | n | 2 | 4 | 6 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 24 | 21 | 45 |
| | | % | 53.3% | 46.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.113[a] | 1 | .292 | .396 | .269 | |
| Continuity Correction[b] | .379 | 1 | .538 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.122 | 1 | .289 | .396 | .269 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .396 | .269 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.088[c] | 1 | .297 | .396 | .269 | .203 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

***ERG***

Verilen tedavi protokolü, tanı, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *ERG* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda tedavi son durumu, ERG geni için istatistiksel olarak anlamlı bulunur iken diğer iki parametre için anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). ERG geninde saptanan değişimler, tedavisi biten gruptaki hastalara göre tedavisi devam eden gruptaki hastalarda mutasyon görülme olasılığı 5.25 kat yüksektir.

Çizelge 5.40. Tedavi son durumu ve *ERG* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *ERG* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | Tedavisi Biten | n | 21 | 12 | 33 |
| | | % | 63.6% | 36.4% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 3 | 9 | 12 |
| | | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 24 | 21 | 45 |
| | | % | 53.3% | 46.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 5.278[a] | 1 | .022 | .041 | .024 | |
| Continuity Correction[b] | 3.840 | 1 | .050 | | | |
| Likelihood Ratio | 5.425 | 1 | .020 | .041 | .024 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .041 | .024 | |
| Linear-by-Linear Association | 5.161[c] | 1 | .023 | .041 | .024 | .021 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | 5.250 | 1.187 | 23.219 |
| For cohort *ERG* = .00 | 2.545 | .924 | 7.012 |
| For cohort *ERG* = 1.00 | .485 | .278 | .846 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.41. Risk durumu ve *ERG* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *ERG* | Değişim Taşımayan | n | 6 | 10 | 8 | 24 |
| | | % | 25.0% | 41.7% | 33.3% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 3 | 10 | 8 | 21 |
| | | % | 14.3% | 47.6% | 38.1% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .804[a] | 2 | .669 | .739 | | |
| Likelihood Ratio | .819 | 2 | .664 | .739 | | |
| Fisher's Exact Test | .824 | | | .739 | | |
| Linear-by-Linear Association | .494[b] | 1 | .482 | .547 | .309 | .126 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.42. Tanı ve *ERG* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | *ERG Değişimi* | | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| | | Yok | Var | |
| My+ öncü B-hücreli ALL | n% | 3 | 5 | 8 |
| | | 37.5% | 62.5% | 100.0% |
| Erken öncü B-ALL/öncü B- ALL | n% | 21 | 16 | 37 |
| | | 56.8% | 43.2% | 100.0% |
| Toplam | n % | 24 | 21 | 45 |
| | | 53.3% | 46.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .980[a] | 1 | .322 | .443 | .274 | |
| Continuity Correction[b] | .359 | 1 | .549 | | | |
| Likelihood Ratio | .983 | 1 | .321 | .443 | .274 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .443 | .274 | |
| Linear-by-Linear Association | .958[c] | 1 | .328 | .443 | .274 | .191 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.43. Tedavi protokolü ve *ERG* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *ERG* Yok | *ERG* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | ALL-BFM | n | 22 | 17 | 39 |
| | | % | 56.4% | 43.6% | 100.0% |
| | ALLIC-BFM 2009 | n | 2 | 4 | 6 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 24 | 21 | 45 |
| | | % | 53.3% | 46.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.113[a] | 1 | .292 | .396 | .269 | |
| Continuity Correction[b] | .379 | 1 | .538 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.122 | 1 | .289 | .396 | .269 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .396 | .269 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.088[c] | 1 | .297 | .396 | .269 | .203 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

## *CREBBP*

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *CREBBP* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda CREBBP geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.44. Tedavi son durumu ve *CREBBP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *CREBBP* Değişimi Yok | *CREBBP* Değişimi Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | Tedavisi Biten | n | 26 | 7 | 33 |
| | | % | 78.8% | 21.2% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 10 | 2 | 12 |
| | | % | 83.3% | 16.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 36 | 9 | 45 |
| | | % | 80.0% | 20.0% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .114[a] | 1 | .736 | 1.000 | .550 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .117 | 1 | .732 | 1.000 | .550 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .550 | |
| Linear-by-Linear Association | .111[c] | 1 | .739 | 1.000 | .550 | .318 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | .743 | .131 | 4.201 |
| For cohort *CREBBP* = .00 | .945 | .694 | 1.288 |
| For cohort *CREBBP* = 1.00 | 1.273 | .306 | 5.296 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.45. Risk durumu ve *CREBBP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *CREBBP* | Değişim Taşımayan | n | 8 | 15 | 13 | 36 |
| | | % | 22.2% | 41.7% | 36.1% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 1 | 5 | 3 | 9 |
| | | % | 11.1% | 55.6% | 33.3% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .773[a] | 2 | .680 | .716 | | |
| Likelihood Ratio | .821 | 2 | .663 | .716 | | |
| Fisher's Exact Test | .687 | | | .800 | | |
| Linear-by-Linear Association | .092[b] | 1 | .762 | .807 | .484 | .191 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.46.Tanı ve *CREBBP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *CREBBP Değişimi* Yok | *CREBBP Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | My+ öncü B hücreli ALL | n | 7 | 1 | 8 |
| | | % | 87.5% | 12.5% | 100.0% |
| | Erken öncü B-ALL/öncü B-ALL | n | 29 | 8 | 37 |
| | | % | 78.4% | 21.6% | 100.0% |
| Toplam | | n | 36 | 9 | 45 |
| | | % | 80.0% | 20.0% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .342[a] | 1 | .559 | .675 | .489 | |
| Continuity Correction[b] | .010 | 1 | .922 | | | |
| Likelihood Ratio | .374 | 1 | .541 | .675 | .489 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .489 | |
| Linear-by-Linear Association | .334[c] | 1 | .563 | .675 | .489 | .349 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.47. Tedavi protokolü ve *CREBBP* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *CREBBP Değişimi* Yok | *CREBBP Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | ALL-BFM 95 | n | 30 | 9 | 39 |
| | | % | 76.9% | 23.1% | 100.0% |
| | ALL IC-BFM 2009 | n | 6 | 0 | 6 |
| | | % | 100.0% | 0.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 36 | 9 | 45 |
| | | % | 80.0% | 20.0% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.731[a] | 1 | .188 | .323 | .239 | |
| Continuity Correction[b] | .589 | 1 | .443 | | | |
| Likelihood Ratio | 2.900 | 1 | .089 | .323 | .239 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .323 | .239 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.692[c] | 1 | .193 | .323 | .239 | .239 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval Lower | 95% Confidence Interval Upper |
|---|---|---|---|
| For cohort *CREBBP*= .00 | .769 | .648 | .914 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

***ZAP70***

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *ZAP70* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda ZAP70 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.48. Tedavi son durumu ve ZAP70 değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *ZAP70* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | Tedavisi Biten | n | 5 | 28 | 33 |
| | | % | 15.2% | 84.8% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 1 | 11 | 12 |
| | | % | 8.3% | 91.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 6 | 39 | 45 |
| | | % | 13.3% | 86.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .354[a] | 1 | .552 | .668 | .486 | |
| Continuity Correction[b] | .010 | 1 | .921 | | | |
| Likelihood Ratio | .385 | 1 | .535 | .668 | .486 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .486 | |
| Linear-by-Linear Association | .346[c] | 1 | .556 | .668 | .486 | .350 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | 1.964 | .205 | 18.776 |
| For cohort *ZAP70* = .00 | 1.818 | .236 | 14.023 |
| For cohort *ZAP70* = 1.00 | .926 | .740 | 1.157 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.49.Risk durumu ve *ZAP70* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *ZAP70* | Değişim Taşımayan | n | 1 | 3 | 2 | 6 |
| | | % | 16.7% | 50.0% | 33.3% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 8 | 17 | 14 | 39 |
| | | % | 20.5% | 43.6% | 35.9% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .096[a] | 2 | .953 | 1.000 | | |
| Likelihood Ratio | .097 | 2 | .953 | 1.000 | | |
| Fisher's Exact Test | .260 | | | 1.000 | | |
| Linear-by-Linear Association | .002[b] | 1 | .968 | 1.000 | .606 | .231 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.50.Tanı ve *ZAP70* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *ZAP70* | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| My+ öncü B hücreli ALL | | n | 2 | 6 | 8 |
| | | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| Erken öncü B- ALL/öncü B- ALL | | n | 4 | 33 | 37 |
| | | % | 10.8% | 89.2% | 100.0% |
| Toplam | | n | 6 | 39 | 45 |
| | | % | 13.3% | 86.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.146[a] | 1 | .284 | .572 | .286 | |
| Continuity Correction[b] | .247 | 1 | .619 | | | |
| Likelihood Ratio | .995 | 1 | .318 | .572 | .286 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .286 | .286 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.121[c] | 1 | .290 | .572 | .286 | .227 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.51. Tedavi protokolü ve *ZAP70* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *ZAP70* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | ALL-BFM 95 | n | 6 | 33 | 39 |
| | | % | 15.4% | 84.6% | 100.0% |
| | ALL IC-BFM 2009 | n | 0 | 6 | 6 |
| | | % | 0.0% | 100.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 6 | 39 | 45 |
| | | % | 13.3% | 86.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.065[a] | 1 | .302 | .576 | .401 | |
| Continuity Correction[b] | .150 | 1 | .699 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.854 | 1 | .173 | .576 | .401 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .576 | .401 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.041[c] | 1 | .307 | .576 | .401 | .401 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| For cohort *ZAP70* = 1.00 | .846 | .740 | .967 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

### *JAK2*

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *JAK2* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda JAK2 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.52. Tedavi son durumu ve *JAK2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *JAK2* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | Tedavisi Biten | n | 15 | 18 | 33 |
| | | % | 45.5% | 54.5% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 4 | 8 | 12 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 19 | 26 | 45 |
| | | % | 42.2% | 57.8% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .530[a] | 1 | .467 | .517 | .353 | |
| Continuity Correction[b] | .150 | 1 | .699 | | | |
| Likelihood Ratio | .539 | 1 | .463 | .517 | .353 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .517 | .353 | |
| Linear-by-Linear Association | .518[c] | 1 | .472 | .517 | .353 | .211 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | 1.667 | .418 | 6.638 |
| For cohort jak2 = .00 | 1.364 | .564 | 3.298 |
| For cohort jak2 = 1.00 | .818 | .493 | 1.358 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.53. Risk durumu ve *JAK2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | Risk | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *JAK2* | Değişim Taşımayan | n | 5 | 6 | 8 | 19 |
| | | % | 26.3% | 31.6% | 42.1% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 4 | 14 | 8 | 26 |
| | | % | 15.4% | 53.8% | 30.8% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 2.277[a] | 2 | .320 | .360 | | |
| Likelihood Ratio | 2.309 | 2 | .315 | .360 | | |
| Fisher's Exact Test | 2.303 | | | .360 | | |
| Linear-by-Linear Association | .000[b] | 1 | .985 | 1.000 | .574 | .162 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.54. Tanı ve *JAK2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *JAK2* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | My+ öncü B hücreli ALL | n | 3 | 5 | 8 |
| | | % | 37.5% | 62.5% | 100.0% |
| | Erken öncü B-ALL/öncü B-ALL | n | 16 | 21 | 37 |
| | | % | 43.2% | 56.8% | 100.0% |
| Toplam | | n | 19 | 26 | 45 |
| | | % | 42.2% | 57.8% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .089[a] | 1 | .766 | 1.000 | .544 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .090 | 1 | .764 | 1.000 | .544 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .544 | |
| Linear-by-Linear Association | .087[c] | 1 | .768 | 1.000 | .544 | .296 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.55.Tedavi protokolü ve *JAK2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | JAK2 Yok | JAK2 Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| ALL-BFM 95 | n | | 18 | 21 | 39 |
| | % | | 46.2% | 53.8% | 100.0% |
| ALL IC-BFM 2009 | n | | 1 | 5 | 6 |
| | % | | 16.7% | 83.3% | 100.0% |
| Toplam | n | | 19 | 26 | 45 |
| | % | | 42.2% | 57.8% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.853[a] | 1 | .173 | .222 | .182 | |
| Continuity Correction[b] | .842 | 1 | .359 | | | |
| Likelihood Ratio | 2.049 | 1 | .152 | .222 | .182 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .222 | .182 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.812[c] | 1 | .178 | .222 | .182 | .153 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval Lower | 95% Confidence Interval Upper |
|---|---|---|---|
| Odds Ratio for protokol (1.00 / 2.00) | 4.286 | .457 | 40.154 |
| For cohort *JAK2* = .00 | 2.769 | .448 | 17.109 |
| For cohort *JAK2* = 1.00 | .646 | .408 | 1.025 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

### *IKZF1*

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *IKZF1* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda IKZF1 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.56. Risk durumu ve *IKZF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *IKZF1* | Değişim Taşımayan | n | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | | % | 0.0% | 100.0% | 0.0% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 9 | 18 | 16 | 43 |
| | | % | 20.9% | 41.9% | 37.2% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 2.616[a] | 2 | .270 | .349 | | |
| Likelihood Ratio | 3.361 | 2 | .186 | .349 | | |
| Fisher's Exact Test | 1.785 | | | .677 | | |
| Linear-by-Linear Association | .093[b] | 1 | .760 | 1.000 | .556 | .337 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.57. Tanı ve *IKZF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | *IKZF1* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | My+ öncü B hücreli ALL | n | 1 | 7 | 8 |
| | | % | 12.5% | 87.5% | 100.0% |
| | Erken öncü B-ALL/öncü B- ALL | n | 1 | 36 | 37 |
| | | % | 2.7% | 97.3% | 100.0% |
| Toplam | | n | 2 | 43 | 45 |
| | | % | 4.4% | 95.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.487[a] | 1 | .223 | .327 | .327 | |
| Continuity Correction[b] | .075 | 1 | .785 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.141 | 1 | .285 | .327 | .327 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .327 | .327 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.454[c] | 1 | .228 | .327 | .327 | .299 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.58. Tedavi son durumu ve *IKZF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *IKZF1* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Var | Yok | |
| | Tedavisi Biten | n | 1 | 32 | 33 |
| | | % | 3.0% | 97.0% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 1 | 11 | 12 |
| | | % | 8.3% | 91.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 2 | 43 | 45 |
| | | % | 4.4% | 95.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .583[a] | 1 | .445 | 1.000 | .467 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .517 | 1 | .472 | 1.000 | .467 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .467 | .467 | |
| Linear-by-Linear Association | .570[c] | 1 | .450 | 1.000 | .467 | .400 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | .344 | .020 | 5.974 |
| For cohort ikzf1 = .00 | .364 | .025 | 5.367 |
| For cohort ikzf1 = 1.00 | 1.058 | .883 | 1.268 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.59. Tedavi protokolü ve *IKZF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *IKZF1* | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | ALL-BFM 95 | n | 2 | 37 | 39 |
| | | % | 5.1% | 94.9% | 100.0% |
| | ALL IC-BFM 2009 | n | 0 | 6 | 6 |
| | | % | 0.0% | 100.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 2 | 43 | 45 |
| | | % | 4.4% | 95.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .322[a] | 1 | .570 | 1.000 | .748 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .587 | 1 | .444 | 1.000 | .748 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .748 | |
| Linear-by-Linear Association | .315[c] | 1 | .575 | 1.000 | .748 | .748 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| For cohort ikzf1 = 1.00 | .949 | .882 | 1.021 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

### *NR3C1*

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *NR3C1* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda NR3C1 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.60.Tedavi protokolü ve *NR3C1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *NR3C1* Değişimi: Yok | *NR3C1* Değişimi: Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| ALL-BFM 95 | n | | 3 | 36 | 39 |
| | % | | 7.7% | 92.3% | 100.0% |
| ALL IC-BFM 2009 | n | | 0 | 6 | 6 |
| | % | | 0.0% | 100.0% | 100.0% |
| Toplam | n | | 3 | 42 | 45 |
| | % | | 6.7% | 93.3% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .495[a] | 1 | .482 | 1.000 | .644 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .891 | 1 | .345 | .687 | .644 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .644 | |
| Linear-by-Linear Association | .484[c] | 1 | .487 | 1.000 | .644 | .644 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| For cohort *NR3C1* = 1.00 | .923 | .843 | 1.011 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.61. Risk durumu ve *NR3C1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *NR3C1* | Değişim Taşımayan | Count | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | | % | 33.3% | 33.3% | 33.3% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | Count | 8 | 19 | 15 | 42 |
| | | % | 19.0% | 45.2% | 35.7% | 100.0% |
| Toplam | | Count | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .379[a] | 2 | .827 | 1.000 | | |
| Likelihood Ratio | .343 | 2 | .842 | 1.000 | | |
| Fisher's Exact Test | .909 | | | .786 | | |
| Linear-by-Linear Association | .143[b] | 1 | .705 | 1.000 | .501 | .283 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.62. Tanı ve *NR3C1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

| Grup | | *NR3C1* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| | | Yok | Var | |
| My+ öncü B hücreli ALL | n | 0 | 8 | 8 |
| | % | 0.0% | 100.0% | 100.0% |
| Erken öncü B-ALL/öncü B-ALL | n | 3 | 34 | 37 |
| | % | 8.1% | 91.9% | 100.0% |
| Toplam | n | 3 | 42 | 45 |
| | % | 6.7% | 93.3% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .695[a] | 1 | .404 | .625 | .548 | |
| Continuity Correction[b] | .003 | 1 | .958 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.220 | 1 | .269 | .625 | .548 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .548 | |
| Linear-by-Linear Association | .680[c] | 1 | .410 | .625 | .548 | .548 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

### *EBF1*

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *EBF1* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda EBF1 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.63.Tedavi protokolü ve *EBF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *EBF1* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | ALL-BFM 95 | n | 15 | 24 | 39 |
| | | % | 38.5% | 61.5% | 100.0% |
| | ALL IC-BFM 2009 | n | 2 | 4 | 6 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 17 | 28 | 45 |
| | | % | 37.8% | 62.2% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .058[a] | 1 | .809 | 1.000 | .593 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .059 | 1 | .808 | 1.000 | .593 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .593 | |
| Linear-by-Linear Association | .057[c] | 1 | .811 | 1.000 | .593 | .342 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for protokol (1.00 / 2.00) | 1.250 | .203 | 7.683 |
| For cohort *EBF1* = .00 | 1.154 | .348 | 3.828 |
| For cohort *EBF1* = 1.00 | .923 | .498 | 1.712 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.64. Risk durumu ve *EBF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *EBF1* | Değişim Taşımayan | n | 5 | 9 | 3 | 17 |
| | | % | 29.4% | 52.9% | 17.6% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 4 | 11 | 13 | 28 |
| | | % | 14.3% | 39.3% | 46.4% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 4.118[a] | 2 | .128 | .130 | | |
| Likelihood Ratio | 4.334 | 2 | .115 | .131 | | |
| Fisher's Exact Test | 4.128 | | | .130 | | |
| Linear-by-Linear Association | 3.753[b] | 1 | .053 | .061 | .041 | .026 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.65. Tanı ve *EBF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | *EBF1* Değişimi Yok | *EBF1* Değişimi Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| My+ öncü B hücreli ALL (a) | n | 3 | 5 | 8 |
| | % | 37.5% | 62.5% | 100.0% |
| Erken öncü B-ALL/öncü B- ALL (b) | n | 14 | 23 | 37 |
| | % | 37.8% | 62.2% | 100.0% |
| Toplam | n | 17 | 28 | 45 |
| | % | 37.8% | 62.2% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .000[a] | 1 | .986 | 1.000 | .656 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .000 | 1 | .986 | 1.000 | .656 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .656 | |
| Linear-by-Linear Association | .000[c] | 1 | .986 | 1.000 | .656 | .310 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.66. Tedavi son durumu ve *EBF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | *EBF1 Değişimi* Yok | *EBF1 Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| Tedavisi Biten | n | 15 | 18 | 33 |
| | % | 45.5% | 54.5% | 100.0% |
| Tedavisi Devam Eden | n | 2 | 10 | 12 |
| | % | 16.7% | 83.3% | 100.0% |
| Toplam | n | 17 | 28 | 45 |
| | % | 37.8% | 62.2% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 3.103[a] | 1 | .078 | .096 | .076 | |
| Continuity Correction[b] | 1.999 | 1 | .157 | | | |
| Likelihood Ratio | 3.379 | 1 | .066 | .096 | .076 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .096 | .076 | |
| Linear-by-Linear Association | 3.034[c] | 1 | .082 | .096 | .076 | .062 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | 4.167 | .788 | 22.038 |
| For cohort ebf1 = .00 | 2.727 | .729 | 10.201 |
| For cohort ebf1 = 1.00 | .655 | .438 | .978 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.67. Tedavi son durumu ve *NR3C1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *NR3C1* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| Tedavisi Biten | | n | 3 | 30 | 33 |
| | | % | 9.1% | 90.9% | 100.0% |
| Tedavisi Devam Eden | | n | 0 | 12 | 12 |
| | | % | 0.0% | 100.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 3 | 42 | 45 |
| | | % | 6.7% | 93.3% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.169[a] | 1 | .280 | .553 | .384 | |
| Continuity Correction[b] | .164 | 1 | .685 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.938 | 1 | .164 | .553 | .384 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .553 | .384 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.143[c] | 1 | .285 | .553 | .384 | .384 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| For cohort *NR3C1* = 1.00 | .909 | .816 | 1.013 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

***FOXO3A***

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *FOXO3A* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda FOXO3A geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.68. Tedavi son durumu ve *FOXO3A* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *FOXO3 Değişim* Yok | *FOXO3 Değişim* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | Tedavisi Biten | n | 15 | 18 | 33 |
| | | % | 45.5% | 54.5% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 3 | 9 | 12 |
| | | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 18 | 27 | 45 |
| | | % | 40.0% | 60.0% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.534[a] | 1 | .215 | .308 | .187 | |
| Continuity Correction[b] | .800 | 1 | .371 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.600 | 1 | .206 | .308 | .187 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .308 | .187 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.500[c] | 1 | .221 | .308 | .187 | .133 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval Lower | 95% Confidence Interval Upper |
|---|---|---|---|
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | 2.500 | .572 | 10.932 |
| For cohort *FOXO3* = .00 | 1.818 | .637 | 5.190 |
| For cohort *FOXO3* = 1.00 | .727 | .463 | 1.142 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.69. Tedavi protokolü ve *FOXO3A* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *FOXO3* Değişim | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | ALL-BFM 95 | n | 17 | 22 | 39 |
| | | % | 43.6% | 56.4% | 100.0% |
| | ALL IC-BFM 2009 | n | 1 | 5 | 6 |
| | | % | 16.7% | 83.3% | 100.0% |
| Toplam | | n | 18 | 27 | 45 |
| | | % | 40.0% | 60.0% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.571[a] | 1 | .210 | .377 | .215 | |
| Continuity Correction[b] | .649 | 1 | .420 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.742 | 1 | .187 | .377 | .215 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .377 | .215 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.536[c] | 1 | .215 | .377 | .215 | .178 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for protokol (1.00 / 2.00) | 3.864 | .412 | 36.234 |
| For cohort *FOXO3* = .00 | 2.615 | .422 | 16.214 |
| For cohort *FOXO3* = 1.00 | .677 | .431 | 1.064 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.70. Risk durumu ve *FOXO3A* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *FOXO3* | Değişim Taşımayan | n | 5 | 7 | 6 | 18 |
| | | % | 27.8% | 38.9% | 33.3% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 4 | 13 | 10 | 27 |
| | | % | 14.8% | 48.1% | 37.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.157[a] | 2 | .561 | .622 | | |
| Likelihood Ratio | 1.138 | 2 | .566 | .622 | | |
| Fisher's Exact Test | 1.196 | | | .622 | | |
| Linear-by-Linear Association | .552[b] | 1 | .457 | .538 | .296 | .124 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.71. Tanı ve *FOXO3A* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *FOXO3* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | My+ öncü B hücreli ALL | n | 1 | 7 | 8 |
| | | % | 12.5% | 87.5% | 100.0% |
| | Erken öncü B-ALL/öncü B- ALL | n | 17 | 20 | 37 |
| | | % | 45.9% | 54.1% | 100.0% |
| Toplam | | n | 18 | 27 | 45 |
| | | % | 40.0% | 60.0% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 3.066[a] | 1 | .080 | .119 | .084 | |
| Continuity Correction[b] | 1.831 | 1 | .176 | | | |
| Likelihood Ratio | 3.493 | 1 | .062 | .119 | .084 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .119 | .084 | |
| Linear-by-Linear Association | 2.998[c] | 1 | .083 | .119 | .084 | .074 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

### *PAX5*

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *PAX5* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda PAX5 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.72. Risk durumu ve *PAX5* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *PAX5* | Değişim Taşımayan | n | 1 | 2 | 3 | 6 |
| | | % | 16.7% | 33.3% | 50.0% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 8 | 18 | 13 | 39 |
| | | % | 20.5% | 46.2% | 33.3% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .637[a] | 2 | .727 | .849 | | |
| Likelihood Ratio | .616 | 2 | .735 | .849 | | |
| Fisher's Exact Test | .763 | | | .849 | | |
| Linear-by-Linear Association | .403[b] | 1 | .526 | .572 | .375 | .197 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.73. Tanı ve *PAX5* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | *PAX5* Değişimi Yok | *PAX5* Değişimi Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| My+ öncü B hücreli ALL | n | 1 | 7 | 8 |
| | % | 12.5% | 87.5% | 100.0% |
| Erken öncü B-ALL/öncü B-ALL | n | 5 | 32 | 37 |
| | % | 13.5% | 86.5% | 100.0% |
| Toplam | n | 6 | 39 | 45 |
| | % | 13.3% | 86.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .006[a] | 1 | .939 | 1.000 | .714 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .006 | 1 | .939 | 1.000 | .714 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .714 | |
| Linear-by-Linear Association | .006[c] | 1 | .940 | 1.000 | .714 | .428 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.74.Tedavi son durumu ve *PAX5* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | *PAX5* Değişimi Yok | *PAX5* Değişimi Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| Tedavisi Biten | n | 5 | 28 | 33 |
| | % | 15.2% | 84.8% | 100.0% |
| Tedavisi Devam Eden | n | 1 | 11 | 12 |
| | % | 8.3% | 91.7% | 100.0% |
| Toplam | n | 6 | 39 | 45 |
| | % | 13.3% | 86.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .354[a] | 1 | .552 | .668 | .486 | |
| Continuity Correction[b] | .010 | 1 | .921 | | | |
| Likelihood Ratio | .385 | 1 | .535 | .668 | .486 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .486 | |
| Linear-by-Linear Association | .346[c] | 1 | .556 | .668 | .486 | .350 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | 1.964 | .205 | 18.776 |
| For cohort *PAX5* = .00 | 1.818 | .236 | 14.023 |
| For cohort *PAX5* = 1.00 | .926 | .740 | 1.157 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.75. Tedavi protokolü ve *PAX5* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *PAX5 Değişimi* Yok | *PAX5 Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| ALL-BFM 95 | n | | 6 | 33 | 39 |
| | % | | 15.4% | 84.6% | 100.0% |
| ALL IC-BFM 2009 | n | | 0 | 6 | 6 |
| | % | | 0.0% | 100.0% | 100.0% |
| Toplam | n | | 6 | 39 | 45 |
| | % | | 13.3% | 86.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.065[a] | 1 | .302 | .576 | .401 | |
| Continuity Correction[b] | .150 | 1 | .699 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.854 | 1 | .173 | .576 | .401 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .576 | .401 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.041[c] | 1 | .307 | .576 | .401 | .401 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| For cohort pax5 = 1.00 | .846 | .740 | .967 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

***RB1***

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *RB1* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda RB1 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.76. Risk durumu ve *RB1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *RB1* | Değişim Taşımayan | n | 4 | 8 | 3 | 15 |
| | | % | 26.7% | 53.3% | 20.0% | 100.0% |
| | Değişim Taşıyan | n | 5 | 12 | 13 | 30 |
| | | % | 16.7% | 40.0% | 43.3% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 2.431[a] | 2 | .297 | .384 | | |
| Likelihood Ratio | 2.558 | 2 | .278 | .333 | | |
| Fisher's Exact Test | 2.490 | | | .357 | | |
| Linear-by-Linear Association | 2.045[b] | 1 | .153 | .198 | .112 | .062 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.77. Tanı ve *RB1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *RB1* Değişimi | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | My+ öncü B hücreli ALL | n % | 4 | 4 | 8 |
| | | | 50.0% | 50.0% | 100.0% |
| | Erken öncü B-ALL/öncü B- ALL | n% | 11 | 26 | 37 |
| | | | 29.7% | 70.3% | 100.0% |
| Toplam | | n | 15 | 30 | 45 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.216[a] | 1 | .270 | .410 | .241 | |
| Continuity Correction[b] | .475 | 1 | .491 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.163 | 1 | .281 | .410 | .241 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .410 | .241 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.189[c] | 1 | .275 | .410 | .241 | .174 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.78. Tedavi son durumu ve *RB1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *RB1* Değişimi Yok | *RB1* Değişimi Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| Tedavisi Biten | | n | 12 | 21 | 33 |
| | | % | 36.4% | 63.6% | 100.0% |
| Tedavisi Devam Eden | | n | 3 | 9 | 12 |
| | | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 15 | 30 | 45 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .511[a] | 1 | .475 | .722 | .368 | |
| Continuity Correction[b] | .128 | 1 | .721 | | | |
| Likelihood Ratio | .528 | 1 | .467 | .510 | .368 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .722 | .368 | |
| Linear-by-Linear Association | .500[c] | 1 | .480 | .722 | .368 | .226 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval Lower | 95% Confidence Interval Upper |
|---|---|---|---|
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | 1.714 | .388 | 7.582 |
| For cohort *RB1* = .00 | 1.455 | .494 | 4.279 |
| For cohort *RB1* = 1.00 | .848 | .560 | 1.286 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.79. Tedavi protokolü ve *RB1*değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *RB1 Değişimi* Yok | *RB1 Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| ALL-BFM | | n | 13 | 26 | 39 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |
| ALLIC BFM 2009 | | n | 2 | 4 | 6 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 15 | 30 | 45 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .000[a] | 1 | 1.000 | 1.000 | .665 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .000 | 1 | 1.000 | 1.000 | .665 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .665 | |
| Linear-by-Linear Association | .000[c] | 1 | 1.000 | 1.000 | .665 | .353 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for protokol (1.00 / 2.00) | 1.000 | .161 | 6.192 |
| For cohort *RB1* = .00 | 1.000 | .297 | 3.372 |
| For cohort *RB1* = 1.00 | 1.000 | .545 | 1.836 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

### *CRFL2*

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *CRFL2* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda CRLF2 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.80. Tanı ve *CRFL2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | *CRFL2* Yok | *CRFL2* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| My+ öncü B hücreli ALL | n | 2 | 6 | 8 |
| | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| Erken öncü B-ALL/öncü B-ALL | n | 15 | 22 | 37 |
| | % | 40.5% | 59.5% | 100.0% |
| Toplam | n | 17 | 28 | 45 |
| | % | 37.8% | 62.2% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .676[a] | 1 | .411 | .464 | .345 | |
| Continuity Correction[b] | .176 | 1 | .675 | | | |
| Likelihood Ratio | .709 | 1 | .400 | .464 | .345 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .690 | .345 | |
| Linear-by-Linear Association | .661[c] | 1 | .416 | .464 | .345 | .238 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.81.Tedavi son durumu ve *CRFL2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *CRLF2* Değişimi Yok | *CRLF2* Değişimi Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| Tedavisi Biten | | n | 14 | 19 | 33 |
| | | % | 42.4% | 57.6% | 100.0% |
| Tedavisi Devam Eden | | n | 3 | 9 | 12 |
| | | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 17 | 28 | 45 |
| | | % | 37.8% | 62.2% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | 1.137[a] | 1 | .286 | .326 | .239 | |
| Continuity Correction[b] | .516 | 1 | .472 | | | |
| Likelihood Ratio | 1.184 | 1 | .277 | .326 | .239 | |
| Fisher's Exact Test | | | | .488 | .239 | |
| Linear-by-Linear Association | 1.111[c] | 1 | .292 | .326 | .239 | .163 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval Lower | 95% Confidence Interval Upper |
|---|---|---|---|
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | 2.211 | .504 | 9.689 |
| For cohort *CRLF2* = .00 | 1.697 | .589 | 4.886 |
| For cohort *CRLF2* = 1.00 | .768 | .495 | 1.190 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.82. Tedavi protokolü ve *CRFL2* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *CRLF2* Değişimi Yok | *CRLF2* Değişimi Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| ALL-BFM 95 | | n | 15 | 24 | 39 |
| | | % | 38.5% | 61.5% | 100.0% |
| ALL IC-BFM 2009 | | n | 2 | 4 | 6 |
| | | % | 33.3% | 66.7% | 100.0% |
| Toplam | | n | 17 | 28 | 45 |
| | | % | 37.8% | 62.2% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .058[a] | 1 | .809 | 1.000 | .593 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .059 | 1 | .808 | 1.000 | .593 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .593 | |
| Linear-by-Linear Association | .057[c] | 1 | .811 | 1.000 | .593 | .342 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for protokol (1.00 / 2.00) | 1.250 | .203 | 7.683 |
| For cohort *CRLF2* = .00 | 1.154 | .348 | 3.828 |
| For cohort *CRLF2* = 1.00 | .923 | .498 | 1.712 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

### *NF1*

Tanı, verilen tedavi protokolü, tedavi son durumu ve risk değerlendirilmesi parametreleri için *NF1* değişimlerinin varlığı değerlendirilmiş, uygulanan Chi-Square analizi sonucunda NF1 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

Çizelge 5.83. Tanı ve *NF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | *NF1 Değişimi* Yok | *NF1 Değişimi* Var | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| My+ öncü B hücreli ALL | n | 2 | 6 | 8 |
| | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| Erken öncü B-ALL/öncü B- ALL | n | 8 | 29 | 37 |
| | % | 21.6% | 78.4% | 100.0% |
| Toplam | n | 10 | 35 | 45 |
| | % | 22.2% | 77.8% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .043[a] | 1 | .835 | 1.000 | .579 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .042 | 1 | .837 | 1.000 | .579 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .579 | |
| Linear-by-Linear Association | .042[c] | 1 | .837 | 1.000 | .579 | .339 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Çizelge 5.84. Tedavi son durumu ve *NF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *NF1 Değişimi* | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | Tedavisi Biten | n | 7 | 26 | 33 |
| | | % | 21.2% | 78.8% | 100.0% |
| | Tedavisi Devam Eden | n | 3 | 9 | 12 |
| | | % | 25.0% | 75.0% | 100.0% |
| Toplam | | n | 10 | 35 | 45 |
| | | % | 22.2% | 77.8% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .073[a] | 1 | .787 | 1.000 | .539 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .072 | 1 | .789 | 1.000 | .539 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .539 | |
| Linear-by-Linear Association | .071[c] | 1 | .789 | 1.000 | .539 | .295 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for tedavi (1.00 / 2.00) | .808 | .171 | 3.807 |
| For cohort *NF1* = .00 | .848 | .261 | 2.762 |
| For cohort *NF1* = 1.00 | 1.051 | .724 | 1.523 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.85. Tedavi protokolü ve *NF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

Crosstab

| Grup | | | *NF1 Değişimi* | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yok | Var | |
| | ALL-BFM 95 | n | 9 | 30 | 39 |
| | | % | 23.1% | 76.9% | 100.0% |
| | ALL IC-BFM 2009 | n | 1 | 5 | 6 |
| | | % | 16.7% | 83.3% | 100.0% |
| Toplam | | n | 10 | 35 | 45 |
| | | % | 22.2% | 77.8% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .124[a] | 1 | .725 | 1.000 | .598 | |
| Continuity Correction[b] | .000 | 1 | 1.000 | | | |
| Likelihood Ratio | .131 | 1 | .718 | 1.000 | .598 | |
| Fisher's Exact Test | | | | 1.000 | .598 | |
| Linear-by-Linear Association | .121[c] | 1 | .728 | 1.000 | .598 | .399 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for protokol (1.00 / 2.00) | 1.500 | .155 | 14.557 |
| For cohort *NF1* = .00 | 1.385 | .212 | 9.062 |
| For cohort *NF1* = 1.00 | .923 | .621 | 1.373 |
| N of Valid Cases | 45 | | |

Çizelge 5.86. Risk durumu ve *NF1* değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi

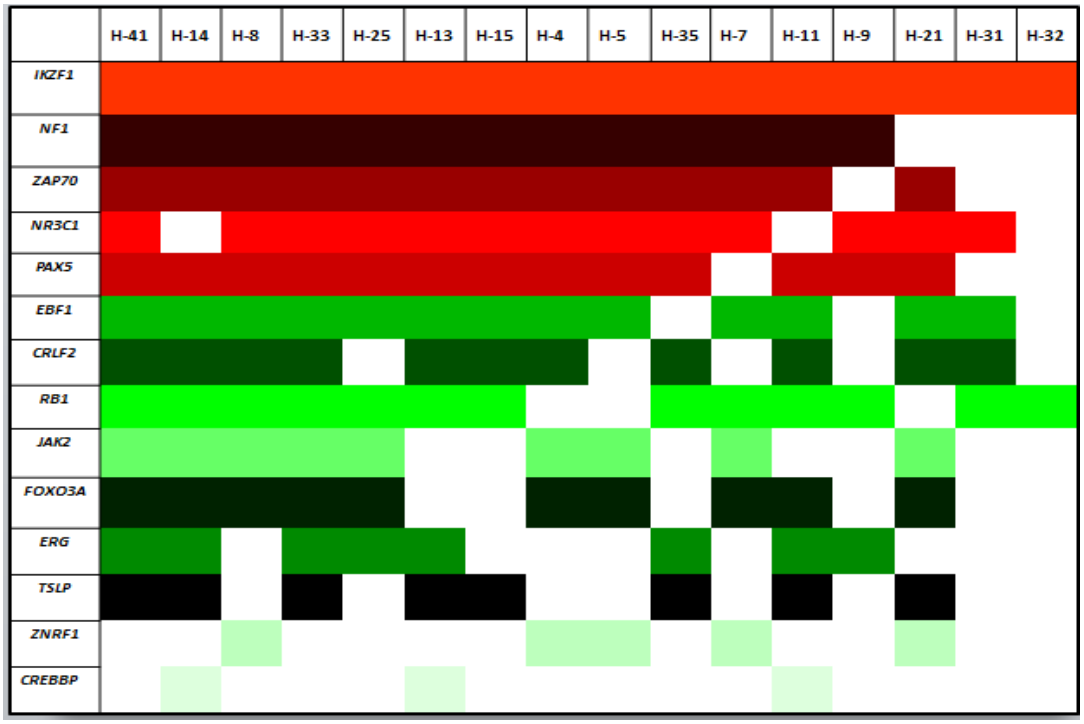
| | | | Risk Durumu | | | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Yüksek | Orta | Standart | |
| *NF1* | Değişim | n | 2 | 5 | 3 | 10 |
| | Taşımayan | % | 20.0% | 50.0% | 30.0% | 100.0% |
| | Değişim | n | 7 | 15 | 13 | 35 |
| | Taşıyan | % | 20.0% | 42.9% | 37.1% | 100.0% |
| Toplam | | n | 9 | 20 | 16 | 45 |
| | | % | 20.0% | 44.4% | 35.6% | 100.0% |

Chi-Square Tests

| | Value | df | Asymptotic Significance (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) | Point Probability |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pearson Chi-Square | .201[a] | 2 | .904 | .900 | | |
| Likelihood Ratio | .203 | 2 | .903 | .900 | | |
| Fisher's Exact Test | .322 | | | .900 | | |
| Linear-by-Linear Association | .073[b] | 1 | .787 | .812 | .486 | .183 |
| N of Valid Cases | 45 | | | | | |

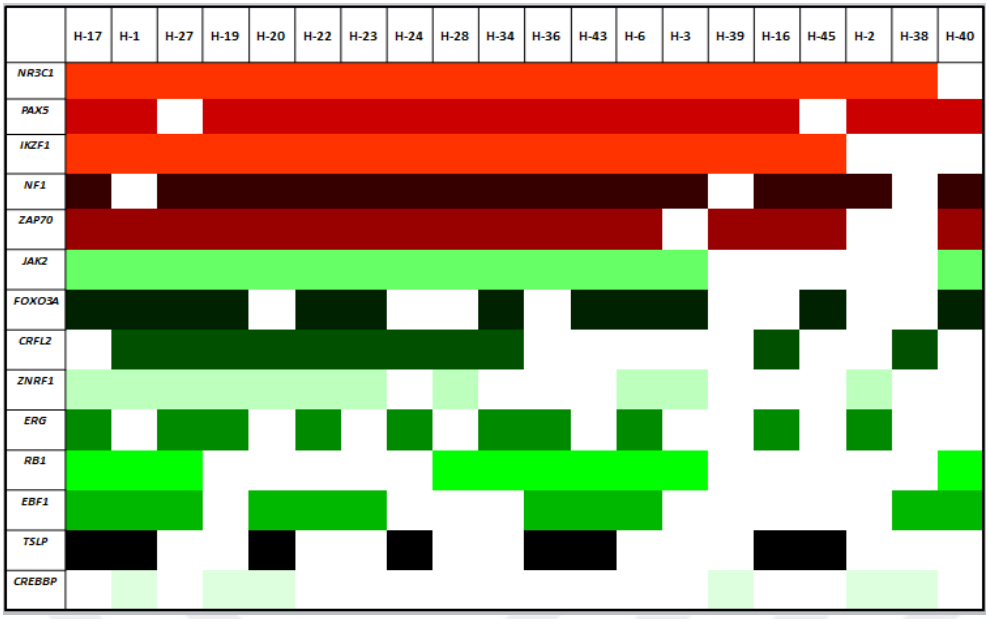
### 5.3.2.6.3. Risk Sınıflandırılmasına Göre Saptanan Değişimlerin Dağılımı

Tedavi ve izlem özellikleri arasında bulunmakta olan ve hastalığın klinik seyrini belirleyen risk sınıflandırılmasına göre (standart-orta-yüksek) hasta örneklerinde değişim saptanan genler değerlendirilmiştir. Söz konusu değerlendirmeye göre *IKZF1* risk gruplarına dâhil olan hasta örneklerinin en sık değişim saptandığı gendir. Tüm risk grupları için *CREBBP,* en az sıklıkta değişim görülen ortak gen olarak belirlenmiştir.



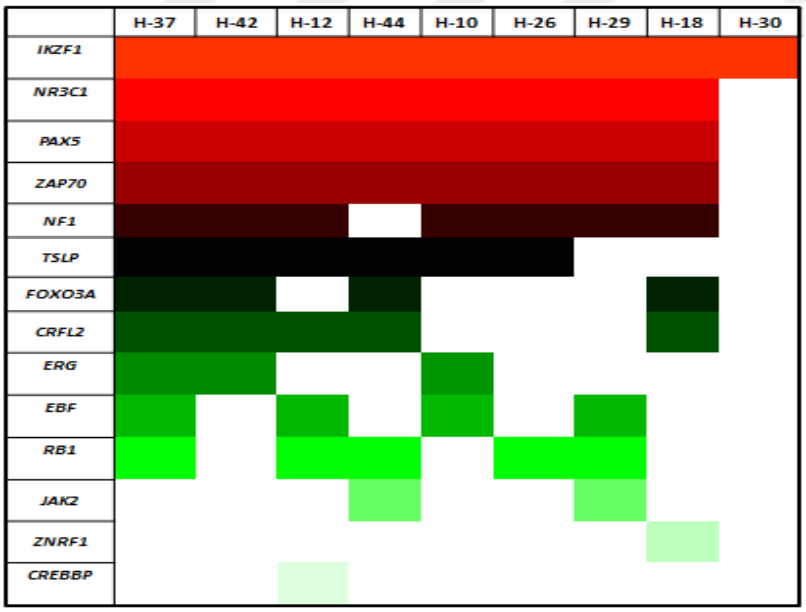

Şekil 5.25.Risk sınıflandırılmasına göre standart risk grubuna dâhil hastalarda değişim görülmekte olan genler

Standart risk sınıflandırılmasına dâhil edilmiş olan hasta örneklerinde IKZF1 geninde saptanan değişim miktarından sonra *NF1, ZAP70, NR3C1, PAX5* gelmektedir. En az değişim ise *CREBBP'*de saptanmıştır.




Şekil 5.26. Risk sınıflandırılmasına göre orta risk grubuna dâhil hastalarda değişim görülmekte olan genler

Orta risk sınıflandırılmasına dâhil edilmiş olan hasta örneklerinde NR3C1 en çok değişim saptanan gendir ve bu grubu diğer gruplardan farklılaştırmıştır. Bu genin ardından *IKZF1, PAX5, NF1* ve *ZAP70,* de tespit edilen değişim miktarları gelmektedir.




Şekil 5.27. Risk sınıflandırılmasına göre yüksek risk grubuna dâhil hastalarda değişim görülmekte olan genler

Yüksek risk sınıflandırılmasına dâhil edilmiş olan hasta örneklerinde *IKZF1* en çok değişim saptanan gendir. Bu genin ardından *NR3C1, PAX5, ZAP70, NF1* 'de tespit edilen

değişim miktarları gelmektedir. Yüksek risk gruplarında en az değişim ise *CREBBP* 'nin yanı sıra *ZNRF1*'de de saptanmıştır. Bu grubu diğer gruplardan JAK2 geninde mevcut değişimlerin daha az hastada, TSLP geninde mevcut değişimlerin ise daha çok hastada görülmesi ile farklı konuma getirmiştir.

### 5.3.3. GEN İFADE ANALİZİ SONUÇLARI

#### 5.3.3.1. Amplifikasyon Eğrileri ve Ortalama Cp Değerleri

Gerçekleştirilmiş olan her kantitatif eş zamanlı PCR deneyinin sonunda, hedef gene özgü primerlerin örnek cDNA'sı üzerinde uygun bölgelere bağlanması ve bu transkriptin logaritmik olarak artışını gösteren amplifikasyon eğrisi grafikleri oluşmaktadır. Oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green I daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışıma artmaktadır. Genlere ait amplifikasyon eğrilerini gösteren grafikler ek 21'de verilmiştir. Çalışma genlerine ait Cp değerlerini içeren çizelge ise ek-22'de verilmiştir.

#### 5.3.3.2. Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi ve Sonuçları

Kantitatif eş zamanlı PCR reaksiyonlarında kullanılan SYBR Green I, DNA çift sarmalına bağlanmaktadır bu nedenle yapılan erime eğrisi analizi PCR'ın özgünlüğü için büyük önem taşımaktadır. Tipik bir erime eğrisi grafiğinde, her örnek için sadece bir tane peak görülmesi beklenmektedir. Ekstra peakler özgün olmayan PCR ürünlerin varlığını veya primer dimerinin habercisi durumundadır. Her kantitatif eş zamanlı PCR reaksiyonunun ardından, reaksiyonun özgünlüğünü değerlendirebilmek açısından erime eğrisi analizi yapılmış ve primerlerin güvenirliliği kontrol edilmiştir. Genlere ait erime analizlerinin sonuçlarını gösteren şekiller ek-23 'te verilmiştir.

#### 5.3.3.3. Gen İfade Değişikliği Oranlarınn Hesaplanması ve Sonuçları

Elde edilen Ct değerleri cihazdan alınarak gen ifade değişikliği oranlarının hesaplanmasında şekil 4.11'de verilen formülü kullanılmıştır (185). Bu formül doğrultusunda hesaplanan gen ifadesi değişim oranları, daha sonra log2 tabanına çevrilmiştir. Bunun yapılmasının sebebi, bu değişimlerinin ifade ediliş biçimlerini kolaylaştırmaktır. Hasta ve kontrol örneklerinin ifade oranları myeloma hücre hattına göre

bu hücre hattı referans kabul edilerek hesaplanmış, böylece aynı örnekle kıyaslanan hasta ve kontrol örnek gruplarının birbirleri ile kıyası mümkün olmuştur.

Gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanına göre karşılığı olan değerlerin negatif olması, ilgili örnekte hedef gen ifadesinin azaldığını; değerin pozitif olması ise, hedef gen ifadesinin artmış olduğunu göstermektedir. Oranların log2 tabanında olan karşılıklarını içeren çizelge ek-24'de verilmiştir.

Yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen verilen üzerinde istatistiksel analizler uygulanmıştır. Veri seti non parametrik Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir. Yapılan bu analizler sonucunda elde edilen p değerleri üzerinden hangi genlerin anlamlı olduğu değerlendirilmiştir. Analizlerde $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

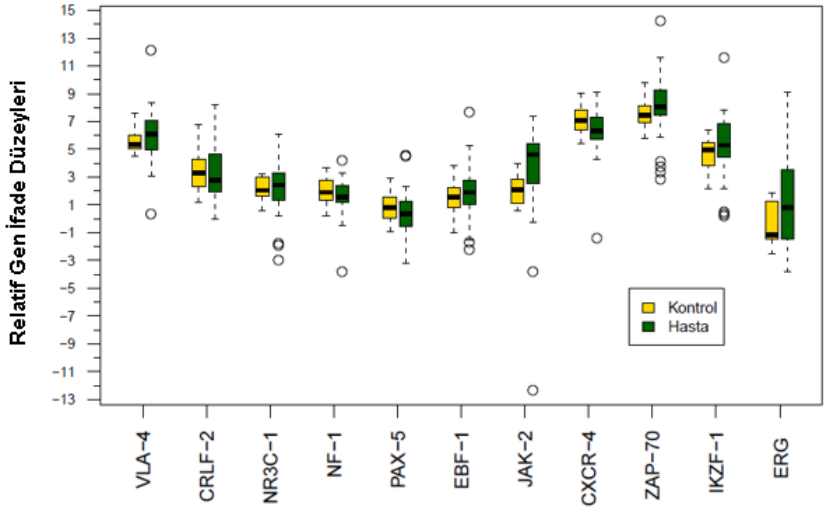
### 5.3.3.4. Hasta ve Kontrol Grubunda Hedeflenen Genlerin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

Sağlıklı çocuklardan oluşan kontrol grubu ve pediatrik öncü B-ALL hastalarından oluşan hasta grubunda, hedef genlerin normalize relatif gen ifade düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, *JAK2* ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu (Mann-Whitney U test) çizelge 5.88' te belirlenmiştir. Hasta ve kontrol hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasının grafikleştirilmiş hali şekil 5.28 'de verilmiştir.

Çizelge 5.88.Hasta ve Kontrol grubunda hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

| Grup | | *VLA4* | *CRLF2* | *NR3C1* | *NF1* | *PAX5* | *EBF1* | *JAK2* | *CXCR4* | *ZAP70* | *IKZF1* | *ERG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol** | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | Mean | 5,654 | 3,534 | 2,134 | 2,022 | 0,805 | 1,576 | 2,070 | 7,090 | 7,627 | 4,721 | -0,467 |
| | Std. Deviation | 0,925 | 1,679 | 0,910 | 1,106 | 1,210 | 1,379 | 1,129 | 1,083 | 1,302 | 1,244 | 1,515 |
| | Median | 5,353 | 3,291 | 2,050 | 1,911 | 0,784 | 1,562 | 2,101 | 7,077 | 7,468 | 4,949 | -1,130 |
| | Minimum | 4,509 | 1,216 | 0,587 | 0,237 | -0,920 | -0,990 | 0,553 | 5,398 | 5,787 | 2,195 | -2,533 |
| | Maximum | 7,613 | 6,776 | 3,229 | 3,678 | 2,926 | 3,850 | 3,990 | 9,052 | 9,771 | 6,378 | 1,831 |
| **Hasta** | N | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 |
| | Mean | 6,022 | 3,276 | 2,262 | 1,620 | 0,375 | 1,868 | 3,650 | 6,401 | 8,192 | 5,329 | 1,226 |
| | Std. Deviation | 1,852 | 2,074 | 1,794 | 1,267 | 1,504 | 1,887 | 3,267 | 1,624 | 2,198 | 2,092 | 3,462 |
| | Median | 6,098 | 2,752 | 2,429 | 1,552 | 0,375 | 1,908 | 4,627 | 6,335 | 8,075 | 5,311 | 0,783 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Minimum | 0,327 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 2,833 | 0,213 | -3,823 |
| | Maximum | 12,119 | 8,178 | 6,115 | 4,184 | 4,545 | 7,701 | 7,393 | 9,090 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **Toplam** | N | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 |
| | Mean | 5,955 | 3,323 | 2,239 | 1,693 | 0,453 | 1,815 | 3,363 | 6,526 | 8,089 | 5,219 | 0,918 |
| | Std. Deviation | 1,720 | 1,996 | 1,662 | 1,239 | 1,455 | 1,798 | 3,048 | 1,555 | 2,065 | 1,970 | 3,253 |
| | Median | 5,919 | 2,925 | 2,384 | 1,662 | 0,407 | 1,854 | 3,801 | 6,482 | 8,010 | 5,179 | 0,388 |
| | Minimum | 0,327 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 2,833 | 0,213 | -3,823 |
| | Maximum | 12,119 | 8,178 | 6,115 | 4,184 | 4,545 | 7,701 | 7,393 | 9,090 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **p Değeri** | | 0,348 | 0,499 | 0,556 | 0,371 | 0,326 | 0,647 | **0,004** | 0,198 | 0,214 | 0,247 | 0,156 |




Şekil 5.28. Hasta ve Kontrol grubunda hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

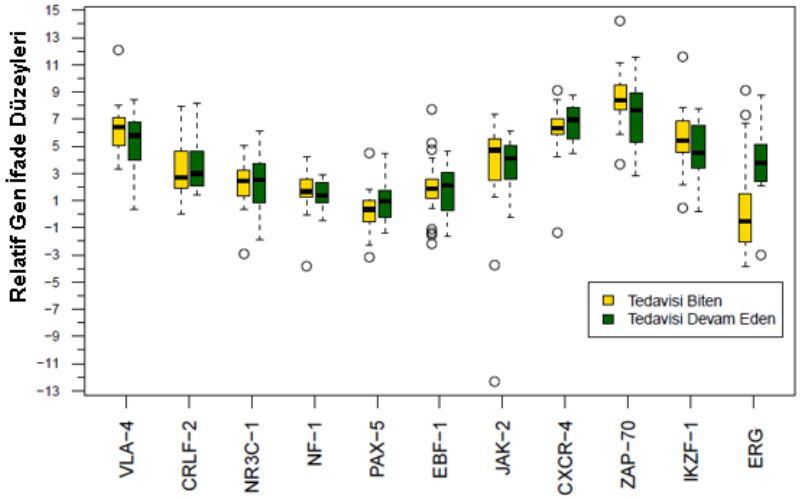
### 5.3.3.5. Klinik Bulgular ile Hedeflenen Genlerin İfade Düzeyleri Arasındaki İlişki

Hedef genlerin gen ifade anlatımlarının pediatrik öncü B-ALL üzerindeki etkisinin daha iyi inceleyebilmek için hasta örnekleri çeşitli gruplara ayrılarak değerlendirilmişlerdir.

Tedavisi biten ve devam eden hasta gruplarında hedef genlerin normalize gen ifade düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında tedavisi biten grupta ERG ifadesinin düştüğü (Mann-Whitney U test) çizelge 5.89'da belirlenmiştir. Hasta örneklerinde tedavi son durumlarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasının grafikleştirilmiş hali şekil 5.29'da verilmiştir.

Çizelge 5.89. Hasta örneklerinde tedavi son durumlarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

| Grup | | *VLA 4* | *CRLF2* | *NR3C1* | *NF1* | *PAX5* | *EBF1* | *JAK2* | *CXCR4* | *ZAP70* | *IKZF1* | *ERG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tedavi Biten** | N | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 |
| | Mean | 6,270 | 3,111 | 2,316 | 1,684 | 0,194 | 1,869 | 3,688 | 6,316 | 8,506 | 5,617 | 0,331 |
| | Std. Deviation | 1,630 | 1,999 | 1,585 | 1,342 | 1,429 | 1,927 | 3,631 | 1,702 | 1,885 | 1,891 | 3,262 |
| | Median | 6,411 | 2,713 | 2,429 | 1,665 | 0,335 | 1,880 | 4,700 | 6,325 | 8,385 | 5,429 | -0,522 |
| | Min | 3,340 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 3,722 | 0,503 | -3,823 |
| | Max | 12,119 | 7,912 | 5,040 | 4,184 | 4,545 | 7,701 | 7,393 | 9,090 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **Tedavi Devam** | N | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| | Mean | 5,340 | 3,731 | 2,115 | 1,443 | 0,874 | 1,866 | 3,546 | 6,636 | 7,329 | 4,537 | 3,687 |
| | Std. Deviation | 2,303 | 2,295 | 2,352 | 1,066 | 1,655 | 1,855 | 2,080 | 1,429 | 2,806 | 2,484 | 2,821 |
| | Median | 5,775 | 2,972 | 2,545 | 1,386 | 0,945 | 2,097 | 4,094 | 6,941 | 7,659 | 4,521 | 3,769 |
| | Min | 0,327 | 1,440 | -1,889 | -0,478 | -1,368 | -1,662 | -0,265 | 4,493 | 2,833 | 0,213 | -2,995 |
| | Max | 8,386 | 8,178 | 6,115 | 2,896 | 4,459 | 4,598 | 6,131 | 8,724 | 11,586 | 7,769 | 8,754 |
| **Toplam** | N | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 |
| | Mean | 6,022 | 3,276 | 2,262 | 1,620 | 0,375 | 1,868 | 3,650 | 6,401 | 8,192 | 5,329 | 1,226 |
| | Std. Deviation | 1,852 | 2,074 | 1,794 | 1,267 | 1,504 | 1,887 | 3,267 | 1,624 | 2,198 | 2,092 | 3,462 |
| | Median | 6,098 | 2,752 | 2,429 | 1,552 | 0,375 | 1,908 | 4,627 | 6,335 | 8,075 | 5,311 | 0,783 |
| | Min | 0,327 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 2,833 | 0,213 | -3,823 |
| | Max | 12,119 | 8,178 | 6,115 | 4,184 | 4,545 | 7,701 | 7,393 | 9,090 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **p Değeri** | | 0,317 | 0,437 | 0,939 | 0,397 | 0,248 | 0,739 | 0,426 | 0,681 | 0,209 | 0,209 | **0,003** |



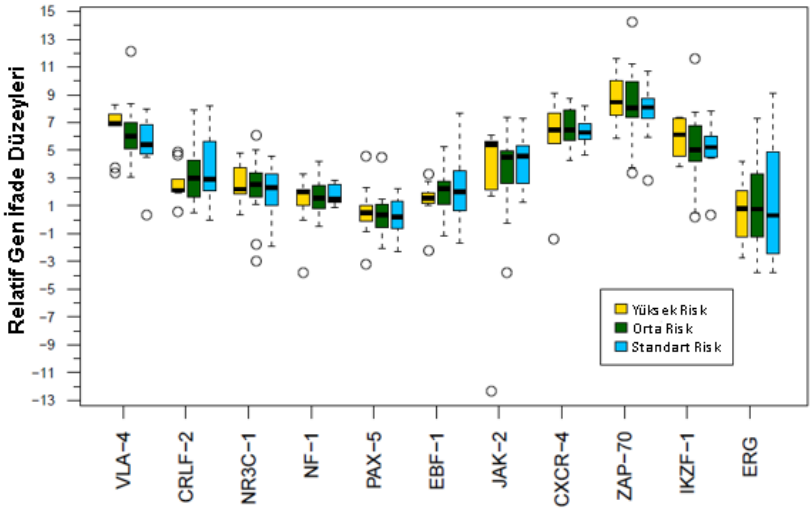

Şekil 5.29.Hasta örneklerinde tedavi son durumlarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Risk durumlarına göre hastalar yüksek, orta ve standart risk şeklinde gruplandırılmıştır. Bu oluşturulan gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında risk durumunun relatif gen ifade düzeyi

üzerine olan etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (Kruskal Wallis testi) çizelge 5.90'da belirlenmiştir. Hasta örneklerinde risk durumlarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasının grafikleştirilmiş hali şekil 5.30'da verilmiştir.

Çizelge 5.90.Hasta örneklerinde risk durumlarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

| Grup | | *VLA4* | *CRLF2* | *NR3C1* | *NF1* | *PAX5* | *EBF1* | *JAK2* | *CXCR4* | *ZAP70* | *IKZF1* | *ERG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **YR** | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| | Mean | 6,502 | 2,605 | 2,521 | 1,200 | 0,571 | 1,419 | 2,822 | 5,934 | 8,573 | 5,975 | 0,550 |
| | Std. Deviation | 1,761 | 1,373 | 1,477 | 2,115 | 2,112 | 1,551 | 5,902 | 2,980 | 1,926 | 1,427 | 2,316 |
| | Median | 6,907 | 2,127 | 2,200 | 1,991 | 0,515 | 1,566 | 5,391 | 6,452 | 8,471 | 6,126 | 0,783 |
| | Min. | 3,340 | 0,579 | 0,362 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 5,840 | 3,806 | -2,722 |
| | Max. | 8,267 | 4,902 | 4,805 | 3,323 | 4,545 | 3,263 | 6,079 | 9,090 | 11,586 | 7,406 | 4,231 |
| | N | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| | Mean | 6,175 | 3,167 | 2,338 | 1,664 | 0,387 | 1,957 | 3,633 | 6,636 | 8,283 | 5,127 | 1,332 |
| | Std. Deviation | 1,916 | 1,847 | 2,071 | 1,157 | 1,387 | 1,470 | 2,656 | 1,279 | 2,658 | 2,620 | 3,301 |
| | Median | 6,008 | 2,972 | 2,533 | 1,582 | 0,386 | 2,244 | 4,492 | 6,477 | 8,030 | 5,055 | 0,772 |
| | Min. | 3,087 | 0,498 | -2,955 | -0,478 | -2,075 | -1,126 | -3,776 | 4,255 | 3,371 | 0,213 | -3,823 |
| | Max. | 12,119 | 7,912 | 6,115 | 4,184 | 4,459 | 5,280 | 7,393 | 8,724 | 14,236 | 11,571 | 7,303 |
| **SR** | N | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| | Mean | 5,561 | 3,790 | 2,023 | 1,801 | 0,250 | 2,009 | 4,137 | 6,370 | 7,865 | 5,219 | 1,473 |
| | Std. Deviation | 1,834 | 2,593 | 0,655 | 0,696 | 1,335 | 2,504 | 1,770 | 0,853 | 1,740 | 1,655 | 4,258 |
| | Median | 5,416 | 2,943 | 2,348 | 1,495 | 0,203 | 1,998 | 4,613 | 6,288 | 8,091 | 5,235 | 0,321 |
| | Min. | 0,327 | 0,004 | -1,889 | 0,902 | -2,254 | -1,662 | 1,233 | 4,683 | 2,833 | 0,350 | -3,780 |
| | Max. | 8,013 | 8,178 | 4,614 | 2,847 | 2,216 | 7,701 | 7,327 | 8,180 | 10,707 | 7,812 | 9,110 |
| **Toplam** | N | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 |
| | Mean | 6,022 | 3,276 | 2,262 | 1,620 | 0,375 | 1,868 | 3,650 | 6,401 | 8,192 | 5,329 | 1,226 |
| | Std. Deviation | 1,852 | 2,074 | 1,794 | 1,267 | 1,504 | 1,887 | 3,267 | 1,624 | 2,198 | 2,092 | 3,462 |
| | Median | 6,098 | 2,752 | 2,429 | 1,552 | 0,375 | 1,908 | 4,627 | 6,335 | 8,075 | 5,311 | 0,783 |
| | Min. | 0,327 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 2,833 | 0,213 | -3,823 |
| | Max. | 12,119 | 8,178 | 6,115 | 4,184 | 4,545 | 7,701 | 7,393 | 9,090 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **p Değeri** | | **0,324** | **0,542** | **0,776** | **0,912** | **0,975** | **0,774** | **0,753** | **0,868** | **0,790** | **0,552** | **0,849** |



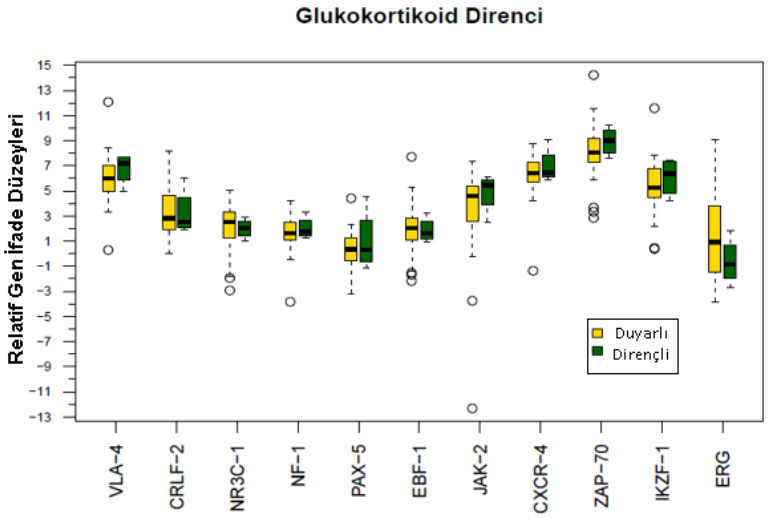

Şekil 5.30.Hasta örneklerinde risk durumlarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Hasta grubu tedaviye verilen cevaba göre glukokortikoid duyarlı/dirençli şeklinde 2 ye ayrılmıştır. Bu oluşturulan gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında tedaviye verilen cevabın relatif gen ifade düzeyi üzerine olan etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (Mann-Whitney U test) çizelge 5.91'de belirlenmiştir. Hasta örneklerinde glukokortikoid direnci göstermesine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasının grafikleştirilmiş hali ise şekil 5.31'de verilmiştir.

Çizelge 5.91.Hasta örneklerinde glukokortikoid direnci göstermesine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

| Grup | | *VLA4* | *CRLF2* | *NR3C1* | *NF1* | *PAX5* | *EBF1* | *JAK2* | *CXCR4* | *ZAP70* | *IKZF1* | *ERG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Duyarlı** | N | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| | Mean | 6,021 | 3,317 | 2,194 | 1,622 | 0,301 | 1,907 | 3,623 | 6,365 | 8,218 | 5,381 | 1,320 |
| | Std. Deviation | 1,863 | 2,125 | 1,786 | 1,288 | 1,423 | 1,968 | 3,363 | 1,662 | 2,205 | 2,006 | 3,536 |
| | Median | 6,008 | 2,804 | 2,533 | 1,608 | 0,355 | 2,024 | 4,574 | 6,393 | 8,062 | 5,245 | 0,918 |
| | Min. | 0,327 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 2,833 | 0,350 | -3,823 |
| | Max. | 12,119 | 8,178 | 5,040 | 4,184 | 4,459 | 7,701 | 7,393 | 8,724 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **Dirençli** | N | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | Mean | 6,767 | 3,256 | 1,989 | 2,017 | 0,993 | 1,868 | 4,880 | 6,980 | 8,958 | 6,093 | -0,654 |
| | Std. Deviation | 1,260 | 1,882 | 0,784 | 0,921 | 2,490 | 1,013 | 1,605 | 1,436 | 1,134 | 1,529 | 1,907 |
| | Median | 7,197 | 2,538 | 2,037 | 1,738 | 0,300 | 1,630 | 5,460 | 6,460 | 8,988 | 6,364 | -0,874 |
| | Min. | 4,982 | 1,940 | 0,997 | 1,271 | -1,171 | 0,951 | 2,520 | 5,909 | 7,641 | 4,240 | -2,722 |
| | Max. | 7,693 | 6,006 | 2,885 | 3,323 | 4,545 | 3,263 | 6,079 | 9,090 | 10,217 | 7,406 | 1,855 |
| **Toplam** | N | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 |
| | Mean | 6,089 | 3,312 | 2,175 | 1,658 | 0,364 | 1,904 | 3,738 | 6,421 | 8,285 | 5,445 | 1,140 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Std. Deviation | 1,818 | 2,084 | 1,715 | 1,256 | 1,520 | 1,893 | 3,252 | 1,638 | 2,132 | 1,964 | 3,453 |
| Median | 6,104 | 2,804 | 2,314 | 1,608 | 0,355 | 1,919 | 4,664 | 6,393 | 8,091 | 5,370 | 0,637 |
| Min. | 0,327 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 2,833 | 0,350 | -3,823 |
| Max. | 12,119 | 8,178 | 5,040 | 4,184 | 4,545 | 7,701 | 7,393 | 9,090 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **p Değeri** | 0,331 | 0,553 | 0,568 | 0,595 | 0,922 | 0,890 | 0,311 | 0,622 | 0,441 | 0,465 | 0,292 |



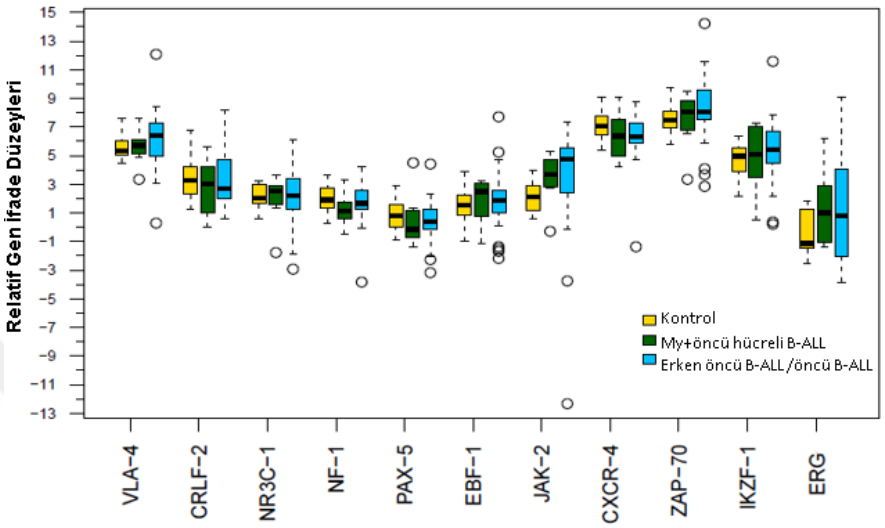

Şekil 5.31.Hasta örneklerinde glukokortikoid direnci göstermesine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Relatif gen ifade düzeylerinin hastaların aldıkları tanılar üzerindeki etkilerinin daha iyi incelenebilmesi için hasta grubu tanısal özelliklerine göre Myeloid antijen (+) öncü B-ALL ve erken öncü ve öncü B-ALL tanısı almış olan şeklinde 2 gruba ayrılmıştır. İncelenen alt gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadığı (Mann-Whitney U test) çizelge 5.92' de belirlenmiştir. Hasta örneklerinde tanılarına göre göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasının grafikleştirilmiş hali şekil 5.32'de verilmiştir.

Çizelge 5.92.Hasta örneklerinde tanılarına göre göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

| Grup | *VLA4* | *CRLF2* | *NR3C1* | *NF1* | *PAX5* | *EBF1* | *JAK2* | *CXCR4* | *ZAP70* | *IKZF1* | *ERG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **My+ öncü B hücreli ALL** | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| | 5,59 | 2,76 | 1,98 | 1,22 | 0,48 | 1,84 | 3,45 | 6,38 | 7,52 | 4,86 | 1,30 |
| | 1,23 | 1,98 | 1,68 | 1,15 | 1,89 | 1,59 | 1,75 | 1,68 | 1,96 | 2,38 | 2,63 |
| | 5,70 | 3,01 | 2,53 | 1,13 | -0,15 | 2,50 | 3,68 | 6,35 | 8,05 | 5,10 | 1,00 |
| | 3,32 | 0,00 | -1,78 | -0,48 | -1,37 | -1,13 | -0,26 | 4,25 | 3,37 | 0,50 | -1,43 |
| | 7,62 | 5,64 | 3,66 | 3,32 | 4,54 | 3,26 | 5,31 | 9,09 | 9,50 | 7,29 | 6,16 |
| **Erken** | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **öncü B-ALL/öncü B-ALL** | 6,12 | 3,39 | 2,32 | 1,71 | 0,35 | 1,87 | 3,69 | 6,41 | 8,34 | 5,43 | 1,21 |
| | 1,96 | 2,10 | 1,83 | 1,29 | 1,44 | 1,96 | 3,53 | 1,64 | 2,24 | 2,05 | 3,65 |
| | 6,41 | 2,71 | 2,20 | 1,67 | 0,40 | 1,88 | 4,76 | 6,33 | 8,08 | 5,43 | 0,78 |
| | 0,33 | 0,58 | -2,96 | -3,82 | -3,18 | -2,21 | -12,31 | -1,38 | 2,83 | 0,21 | -3,82 |
| | 12,12 | 8,18 | 6,12 | 4,18 | 4,46 | 7,70 | 7,39 | 8,72 | 14,24 | 11,57 | 9,11 |
| **p Değeri** | 0,388 | 0,631 | 0,694 | 0,113 | 0,673 | 0,651 | 0,341 | 0,716 | 0,422 | 0,673 | 0,782 |



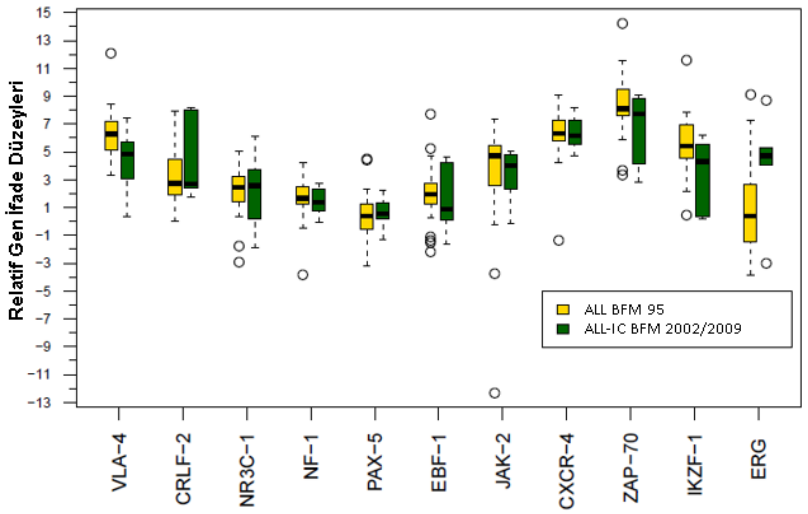

Şekil 5.32.Hasta örneklerinde tanılarına göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Hasta grubu verilen tedavi protokolüne göre ALL BFM 95 ve ALL IC-BFM 2009 olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında verilen tedavi protokolünün, IKZF1 ve ERG relatif gen ifade düzeyleri üzerinde olan etkisi istatistiksel olarak anlamlı (Mann-Whitney U test) bulunmuştur. IKZF1 ifadesi ALL BFM 95 tedavisi alan bireylerde ALL IC-BFM 2009 alan bireylere göre yüksek bulunmuştur. ERG ifadesi ise ALL IC-BFM 2009 95 tedavisi alan bireylerde ALL BFM 95 alan bireylere göre yüksek bulunmuştur.

Hasta örneklerinde verilen tedavi protokollerine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması çizelge 5.93'te verilmiştir. Hasta örneklerinde verilen tedavi protokollerine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasının grafikleştirilmiş hali ise şekil 5.33'te verilmiştir.

Çizelge 5.93. Hasta örneklerinde verilen tedavi protokollerine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.

| Grup | | *VLA* | *CRLF2* | *NR3C1* | *NF1* | *PAX5* | *EBF1* | *JAK2* | *CXCR4* | *ZAP70* | *IKZF1* | *ERG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **ALL BFM-95** | N | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 |
| | Mean | 6,276 | 3,123 | 2,268 | 1,652 | 0,342 | 1,923 | 3,700 | 6,412 | 8,419 | 5,612 | 0,786 |
| | Std. Deviation | 1,642 | 1,906 | 1,624 | 1,309 | 1,557 | 1,816 | 3,437 | 1,684 | 2,073 | 1,888 | 3,230 |
| | Median | 6,268 | 2,752 | 2,429 | 1,665 | 0,375 | 1,930 | 4,700 | 6,335 | 8,106 | 5,429 | 0,388 |
| | Min. | 3,318 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 3,371 | 0,503 | -3,823 |
| | Max. | 12,119 | 7,912 | 5,040 | 4,184 | 4,545 | 7,701 | 7,393 | 9,090 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **ALL IC-BFM 2009** | N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Mean | 4,371 | 4,271 | 2,224 | 1,410 | 0,589 | 1,510 | 3,326 | 6,335 | 6,716 | 3,488 | 4,084 |
| | Std. Deviation | 2,432 | 2,977 | 2,879 | 1,017 | 1,195 | 2,470 | 2,010 | 1,287 | 2,610 | 2,592 | 3,854 |
| | Median | 4,858 | 2,673 | 2,579 | 1,356 | 0,557 | 0,892 | 4,003 | 6,158 | 7,739 | 4,305 | 4,725 |
| | Min. | 0,327 | 1,714 | -1,889 | -0,045 | -1,298 | -1,662 | -0,191 | 4,683 | 2,833 | 0,213 | -2,995 |
| | Max. | 7,403 | 8,178 | 6,115 | 2,739 | 2,216 | 4,598 | 5,074 | 8,180 | 9,057 | 6,207 | 8,754 |
| **Toplam** | N | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 |
| | Mean | 6,022 | 3,276 | 2,262 | 1,620 | 0,375 | 1,868 | 3,650 | 6,401 | 8,192 | 5,329 | 1,226 |
| | Std. Deviation | 1,852 | 2,074 | 1,794 | 1,267 | 1,504 | 1,887 | 3,267 | 1,624 | 2,198 | 2,092 | 3,462 |
| | Median | 6,098 | 2,752 | 2,429 | 1,552 | 0,375 | 1,908 | 4,627 | 6,335 | 8,075 | 5,311 | 0,783 |
| | Min. | 0,327 | 0,004 | -2,955 | -3,820 | -3,185 | -2,212 | -12,310 | -1,382 | 2,833 | 0,213 | -3,823 |
| | Max. | 12,119 | 8,178 | 6,115 | 4,184 | 4,545 | 7,701 | 7,393 | 9,090 | 14,236 | 11,571 | 9,110 |
| **p Değeri** | | 0,053 | 0,442 | 0,961 | 0,503 | 0,613 | 0,525 | 0,333 | 0,732 | 0,243 | **0,049** | **0,049** |




Şekil 5.33.Hasta örneklerinde verilen tedavi protokollerine göre hedeflenen genlerin normalize relatif gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

# 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

## 6.1. TARTIŞMA

Pediatrik dönemin en sık görülen malign hastalığı olan lösemi, etiyolojisi kesin olarak bilinmeyen geniş bir hastalık grubudur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çoğalma, farklılaşma ve apoptozisde görev alan genlerde oluşan anomalilerin etiyolojide rol aldığı öne sürülmektedir. Lösemilerde saptanan bu genetik anomaliler, hücrenin biyolojisini, dolayısıyla da hastalığın klinik seyir ve prognozunu etkilemektedir. Bu anomalilerin bilinmesi bu basamaklara etki eden tedavi seçeneklerinin bulunması ve bu sayede kemoterapiye dirençli ve nüks gösteren lösemilerin tedavi edilmesine, kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Çalışma grubumuzu, ALL'nin büyük bir alt grubunu oluşturan, herhangi sitogenetik anomalisi olmayan, pediatrik öncü B-hücreli ALL hastalar oluşturmaktadır. Pediatrik öncü B-ALL çok heterojen bir lösemi alt grubudur, hematopoetik kök hücreden, B-hücre serisinin gelişimi, birden çok transkripsiyon faktör, gen ve genlerin ilişkili olduğu yolaklar ile düzenlenmektedir. Bu nedenle öncü B-ALL multigenetik, heterojen ve birden çok tanımlanmış alt grubunun olmasının yanı sıra henüz sınıflandırılması mümkün olmayan, prognostik faktörler ışığında ayrımı yapılması muhtemel olan birden çok öncü B-ALL alt tipi mevcut olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada "Pubmed" ve "Scopus" veri tabanları kullanılarak literatür taramaları gerçekleştirilmiştir. 1977–2016 yılları arasında "lösemi" anahtar kelimesi kullanılarak literatür taraması yaptığımızda **363.305** yayın olduğunu görmekteyiz, ülkemizi sınırlandırdığımızda bu sayı **2978**'tir. "Akut lenfoblastik lösemi" anahtar kelimesini kullandığımızda aynı yıllar içerisinde yayın sayısı **43.390**, ülkemizi sınırlandırdığımızda ise **874**'e düşmektedir. "Öncü B-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi" anahtar kelimesi ile arama yaptığımızda **2714** yayın olduğunu görmekteyiz ve bu yayınlardan geçen 40 yıla rağmen sadece **29** tanesi ülkemizde yapılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmaları çalışma türü açısından özelleştirmek adına, "Öncü B-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi, gen" anahtar kelimelerini kullanarak arama yaptığımızda **1484** yayın, ülkemizi sınırlandırdığımızda ise sadece **9** yayın olduğunu görmekteyiz. Mevcut çalışmalara katkı sağlamak amacıyla yapılan bu tez çalışması ile literatürde son 5 yıldır özellikle konu alınan gen ve yolakların

yüksek hacimde ve çözünürlükte veri sunma potansiyeline sahip teknolojiler ile çalışılması sağlanmıştır.

1993-2013 yılları arasında yapılmış olan DNA ve RNA boyutundaki çalışmalarda verilen genlerden B-ALL ile ilişkilendirilmiş olan çalışmalarda birbirinden bağımsız prognostik biyobelirteçler olarak belirlenmişlerdir. Fakat yapılan bu birbirinden bağımsız çalışmalardaki prognostik biyobelirteç olarak bildirilen gen ve gen ürünleri tek başına ya da birlikte öncü B-ALL lösemili hastalarda ekspresyon ve mutasyon değerlendirilmesi açısından ne göstermektedir, hastalar farklı prognoz göstermelerine rağmen aynı prognostik biyobelirteçlerde anomalilere sahipler mi, tedaviye verilen yanıt nasıl değişmektedir, bu prognostik biyobelirteçlerin nüks üzerindeki etkisi nasıldır, gibi soruların yanıtları aynı çalışma içerisinde değerlendirilmemiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında, sitogenetik anomalisi olmayan yani klinisyen doğru ve hedefe yönelik tedavi için **"araçsız"** bırakan 45 pediatrik öncü B-ALL ve çalışma verilerinin doğrulanabilmesi açısından 10 çocuktan oluşan kontrol grubu da gerekli izinler alınarak çalışmaya dâhil edilmiştir. Yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak çalışılmış olan genlerin DNA boyutunda mutasyon analizi ve kantitatif eş zamanlı real time-PCR yöntemi kullanılarak RNA boyutunda genlerin ifade değişimleri moleküler düzeyde incelenmiş, farklılıklar deneysel ve istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Böylece pediatrik öncü B-ALL hastalarında prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilecek genlerin olup olmadığı sorgulanmıştır.

Bu çalışma seçilen genlerin tek çalışma çatısı altında DNA ve RNA boyutunda analiz edilebilmesine imkan vermesi, çalışma grubunun pediatrik grup olması, metodolojinin son teknoloji deneysel analizler ile gerçekleştirilmesi açısından ilk olması bakımından önemlidir.

### 6.1.1. MUTASYON ANALİZİ

Mutasyon analizi kısmında 45 hasta ve 5 sağlıklı kontrolün *ZAP70, TSLP, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5, EBF1, CREBBP, FOXO3A, RB1, ZNRF1, NR3C1, NF1* ve *ERG* bulunan olası mutasyonlarının saptamak için yeni nesil dizileme tekniği kullanılmıştır.

Tezin başlangıcında çalışma genleri bulundukları hücresel yolaklara göre 4 farklı gruba ayırılarak incelenmiştir. Bu gruplamaya dâhil olan ve mutasyon analizi yapılan genler Çizelge 6.1.'de verilen gibidir.

Çizelge 6.1.Mutasyon analizi yapılmış olan genlerin dâhil edildiği hücresel yolaklar

| **Hücresel Yolaklar** | **Mutasyon analizi yapılan genler** | **Saptanan Değişim Sayısı** |
|---|---|---|
| Yaşamsal faaliyetler | *FOXO3A, RB1, ZNRF1, NF1, ERG* | *96* |
| Sinyal İletim Mekanizması | *ZAP70, TSLP, JAK2, CRLF2* | *87* |
| Gen ifadesi kontrolü | *IKZF1, PAX5, EBF1* | *85* |
| Epigenetik regülasyon/ Tedaviye Cevap | *CREEBP, NR3C1* | *60* |

Çalışma örneklerinin tamamında yapılan analizler sonucunda 328 değişim tespit edilmiştir (28 adet insersiyon, 47 adet indel, 74 adet nükleotid değişimi, 75 adet duplikasyon ve 104 adet delesyon). Tespit edilen değişimlerin genlere göre dağılımında *CRFL2* (47) en çok değişim görülmekte olan gen iken *TSLP* (6) en az değişim görülen gen olarak belirlenmiştir.

Hasta ve kontrol gruplarında baktığımızda ise *IKZF1*, 42 hasta (%93) tespit edilerek sıklığı en fazla olan gen, *CREEBP* ise 10 (%22) hastada tespit edilerek sıklığı en az olan gen olarak belirlenmiştir.

Bu hücresel yolak gruplandırmaları arasında en fazla değişim yaşamsal faaliyetlerin yerine getirilmesinden sorumlu olan genler de (96 değişim), en az değişim ise epigenetik regülasyon/ tedaviye cevapta görev alan genler de (60 değişim) tespit edilmiştir. Fakat gruplardaki gen sayılarına göre baktığımızda ise en çok değişim kaba bir hesaplama ile *epigenetik regülasyon/tedaviye cevapta görevli* hücresel yolakta olduğunu görüyoruz, gen başına 30 adet gibi bir değişim sayısı hesaplanabilmektedir.

ALL tedavisinde önemli olan olası değişimlerinin glukokortikoid tedavisini etkileyebileceğini düşündüğümüz glukokortikoid reseptör geni olan NR3C1, hücresel yolak gruplandırmasında *epigenetik regülasyon/tedaviye cevapta görevli* olan genler içinde bulunmaktadır. Bu grupta en çok ve tüm yolak grupları içerisinde en fazla ikinci yapısal değişim tipi tespit edilmiştir. *NRC31,* steroidlerin hücre içi konsantrasyonunu ve hedef dokudaki biyolojik aktivitesini düzenlemektedir. Pediatrik ALL hastalarının tedavi sırasında %10'ununda glukokortikoid direnci geliştirmekte olduğu bilinmektedir. NR3C1

geninde olan değişimler hastada glukokortikoid uygulanmasında direnç ya da duyarlılık getirebilecek özellikte olabilmektedirler (173).

Çalışmamızda saptanan değişimler NR3C1 geninin TAD ve DBD bölgelerini kodlayan nükleotid dizilerindedir ve bu bölgeler üzerinde 23 adet çerçeve kayması mutasyon tespit edilmiştir. Translasyonun erken sonlanmasına neden olan ve TAD Domaini üzerinde olan bu değişimler, NR3C1 geninin 777 amino asit olan ürünün 24 amino asit gibi oldukça erken bir evrede sonlanmasına neden olarak işlevsiz reseptör oluşmasına neden olacağını söylemek kaçınılmazdır. TAD bölgesi hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonundan sorumlu AF1 bölgesini içermektedir ve genin TAD bölgesini kodlayan nükleotid dizilerinde olan değişimler sonucu bu aktivasyon bölgesinin kaybı söz konusu olabileceği de literatürde rapor edilmiştir (166, 169, 170, 178). Çalışmamızda glukokortikoid direnci görülen 4 hastada, NR3C1 geni değişimleri saptanmıştır.

En az değişim tespit edilen gen *TSLP* ise *JAK1-JAK2* bağımlı STAT transkripsiyon faktörlerinin çoğalmasını ve fosforalisyonunu uyarmaktadır, CRLF2 proteini bağlanma ligandıdır.

*Yaşamsal faaliyetlerden sorumlu* genlerde saptanan değişimlerin fonksiyonel sonuçlarına baktığımızda, bu gruba dâhil olan 5 genin tamamında okuma çerçevesinin değişmesine neden olan çerçeve kayması mutasyon ve genin ürünü olan son molekülün yapı ve fonksiyonunu etkileyen yanlış anlam mutasyonları birlikte görülmektedir.

*Sinyal iletim mekanizmasında* görevli olan 4 genin tamamında çerçeve kayması mutasyon tespit edilmiştir.

Hücresel yolak gruplandırmasında *gen ifadesi ve kontrolünde görevli* olan genlerde, değişimlerin fonksiyonel sonuçlarına göre değerlendirme yapıldığında çerçeve kayması, sessiz mutasyon ve UTR bölge değişimleri bu gruba dâhil olan 3 genin tamamında saptanmıştır.

Genel bir tablo olarak baktığımızda, saptanan değişimlerin genlerin ürünleri olan moleküllerinin translasyonun erken bir evrede sonlanması neden olması açısından oldukça

önemlidir ve bu sonlanmaların işlevsiz gen ürünleri oluşumuna yol açacağı şüphesizdir. Bu durum mutasyon analizi yapılan 14 genin tamamında gözlenmiştir.

Saptanan **328** değişimden 15 tanesinin, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren HGMD e-veri tabanında değerlendirilmesi sonucu literatür de daha önce bildirilmiş olduğu belirlenmiştir. **313** değişim ilk kez bu çalışmada bildirilmiştir.

Değişimlerin dağılımına çalışma grupları içinde hasta ve/veya kontrol şeklinde baktığımızda, TSLP, ERG ve NF1 genlerinde tespit edilen değişimlerden sadece kontrol grubuna özel değişim tipine rastlanmamıştır. Sadece hastada, hasta ve kontrolde şeklinde değişimlerin dağıldığı gözlenmiştir. Sadece kontrolde ve sadece hasta grubunda en çok değişim rastlanan gen ise *IKZF1'* dir. Sadece kontrol grubunda en çok değişim saptanan gen ise CRFL2'dir.

Tespit edilen değişimlerin evrimsel süreçte korunmuş olan amino asitlerin değişmesine yol açması, gen ürünlerinin fonksiyonları üzerinde etkileri olduğu sonucunu ortaya çıkartmaktadır. Ayrıca 4 gende (*ZAP70, RB1, IKZF1* ve *CREBBP*) splice bölgesinde meydana gelen değişimlerin olası transkriptin farklı kesime neden olmasını sağlayacak ve proteinin yapı-fonksiyonunu etkileyeceği düşünülmektedir.

Minimal toksisite ile yüksek kür oranlarının sağlanabilmesi için hasta gruplarına uygun tedavinin belirlenmesinde prognostik faktörlerin tanımlanması oldukça önemlidir. Klinik parametreler, immünofenotip, sitogenetik, moleküler genetik, tedavi yanıt ve minimal rezidüel hastalık günümüzde ALL de risk sınıflandırılmasında kullanılmakta olan faktörlerdir. Prognostik faktörlere göre hastalar standart risk orta risk ve yüksek risk olarak sınıflandırılmakta ve bu bilgiler ışığında tedavi yoğunluğu, remisyon, nüks durumları puanlanarak tedaviye devam edilmektedir.

Risk sınıflandırılmasına göre standart, orta ve yüksek risk gruplarına dâhil olan hasta örneklerinde değişim saptanan genler değerlendirilmiştir. Bu analizin yapılmasındaki amaç farklı risk grupları arasında belirli bir farklılık olup olmadığının belirlenmesidir. Mutasyon analizine dâhil edilen 14 genden *IKZF1 NR3C1, ZAP70, PAX5* ve *NF1* tüm gruplarda ortak en çok değişim saptanan genlerdir. *CREBBP* en az sıklıkta değişim görülen gen olarak belirlenmiştir.

Yüksek risk grubunu diğer gruplardan farklı olarak JAK2 geninde mevcut değişimlerin daha az hastada, TSLP geninde mevcut değişimlerin ise daha çok hastada görülmesi ile farklı konuma getirmiştir.

Risk sınıflandırılmasına göre gruplandırılmış hasta örneklerinde en çok değişim saptanan IKZF1 geninin DBD ve DD domainlerini kodlayan nükleotid dizilerinde olan saptadığımız değişimler, IKZF1 gen ürünü olan IKAROS transkripsiyon faktörünün fonksiyonunu bozucu özellikte olabileceğini söylemek mümkündür, bu domainler transkripsiyon faktörünün diğer genleri aktive edebilme özelliğini kontrol edici durumdadırlar. Aynı zamanda genin ayıklama bölgelerinde saptanan değişimler farklı transkriptlerinde oluşmasına neden olarak hücre içinde işlevsiz IKAROS transkripsiyon faktörü olmasına neden olabilecek niteliktedirler.

Bizim çalışmamızı doğrular nitelikte olan son 5 yılda yapılan çalışmalarda, IKZF1 geninde mevcut olan değişimlerin özellikle delesyonların, pediatrik öncü B-ALL risk sınıflandırılması amacı ile kullanılması düşünülen prognostik biyobelirteçlerden olduğu bilinmektedir. Gende olan değişimlerin BCR-ABL negatif, pediatrik öncü B-ALL hasta grubunda kötü prognoz ve artmış nüks riski ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (131, 132)

Risk sınıflandırılmasına göre gruplandırılmış hasta örneklerinde en az değişim saptanan CREBBP geninde saptadığımız değişimlerin tamamı genin HAT Domainini kodlayan nükleotid dizilerindedir ve literatürde de HAT domaini üzerinde bulunan mutasyonların genin fonksiyonunu bozduğu, glukokortikoid direncini etkilediği ve nüks ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (162). Fakat HAT domaininde değişim tespit edilen bireylerde glukokortikoid direnci ve nüks gözlemlenmemiştir.

Saptanan değişimlerin çalışma örneklerini oluşturan hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, ERG geni yanlış anlam mutasyonu taşıyor olmak, CRLF2 geni sessiz mutasyonu taşıyor olmak, CREBBP, FOXO3, TSLP ve JAK2 genlerinde indel değişim taşıyor olmak, ERG, CREBBP, CRFL2 genlerinde delesyon taşıyor olmak ve FOXO3A, NR3C1 genlerinde duplikasyon taşıyor olmak; istatistiksel olarak $p<0,005$ anlamlı bulunmuştur.

Ayrıca hasta örneklerine ait tanı ve tedavi parametreleri ile saptanan değişimlerin birlikteliğini değerlendirmek için uygulanan chi-square analizleri sonucunda 14 gen içinde istatistiksel olarak anlamlı olarak *ZNRF1* değişimleri taşımak tanı parametresi için, *ERG* değişimleri taşımak ise tedavi durumu için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer genler ve tanı tedavi izlem parametreleri arasında ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Transaktivasyon ailesi üyesi olan *ERG* erken hematopoetik hücrelerin farklılaşmasında düzenleyici rolü olduğu literatürde bildirilmiştir ve gende olabilecek olası değişimler genin hematopoezde görev alan genlerin aktivasyonunu değiştirebileceği düşünülmektedir (64-67). Çalışmamızda ERG geninde saptanan değişimler, tedavisi biten gruptaki hastalara göre tedavisi devam eden gruptaki hastalarda mutasyon görülme olasılığı 5.25 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Tedavisi devam edenlerde görülmekte olan *ERG* değişimleri, hematopoezden sorumlu genlerin işlevlerini etkileyebilmekte, lösemi oluşum ve gelişiminde literatürü destekleyici yönde olduğu görülmektedir. Değişimler geninin fosforilasyon bölgesi olarak işlev gören PNT domainini kodlayan bölgesinde saptanmıştır. PNT Domaini, ETS ailesinin diğer üyesi olan proteinler ile heterodimerizasyon özelliğini gerçekleştiren önemli bir domaindir (65). Bu domainin fonksiyon kaybına neden olabilecek değişimler genin fosforilasyon bölgesinin kaybına ve heterodimerizasyon özelliğinin etkilenmesine neden olabilir.

*ZNRF1* değişimlerinin lösemi gelişimi ile direkt ilişkili olduğunu göstermekte olan literatürde bilgi mevcut değildir, *PAX5* delesyonları ile birlikteliğinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu belirten tek çalışma mevcuttur. Çalışmamızda *PAX5* delesyonu taşıyan 27 hasta mevcuttur bunlardan 9 tanesi hem *PAX5* delesyonlarını hem de *ZNRF1* değişimlerini birlikte taşımaktadırlar. 9 hastanın 3'ü standart, 5'i orta ve 1'i yüksek risk sınıflandırma gruplarındadırlar.

Lösemi patogenezinde etkili olan genlerin taranması, mutasyon tiplerinin saptanması, fenotip/ genotip ilişkisinin ortaya konması tedavi yaklaşımlarında yol gösterici olmaktadır. Bu çalışma ile pediatrik öncü B-ALL de mutasyon analizleri yapılarak daha önce tanımlanmayan mutasyonlar ortaya konulmuştur. Daha sonra yapılması mümkün olan

büyük örneklem grubun sahip ve yüksek işlem hacimli mutasyon analizlerinin tüm genom boyunca yürütülmesini sağlayan çalışmalar için yol gösterici olmuştur.

### 6.1.2. GEN İFADE ANALİZİ

Gen ifade analizi kısmında 45 hasta ve 10 sağlıklı kontrolün ZAP70, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5, EBF1, NR3C1, CXCR4, VLA4, NF1, ERG hedef genleri ile RPLP0 referans geninin ifadelenme oranları kantitatif eş zamanlı PCR tekniği kullanılarak belirlendi ve değerlendirildi.

Tezin başlangıcında mutasyon analizi değerlendirmelerinde olduğu gibi çalışma genleri bulundukları hücresel yolaklara göre 4 farklı gruba ayırılarak incelenmiştir. Bu gruplamaya dâhil olan ve gen ifade analizi yapılan genler Çizelge 6.2 'de verilen gibidir.

Çizelge 6.2.Gen ifade analizi yapılmış olan genlerin dâhil edildiği hücresel yolaklar

| **Hücresel Yolaklar** | **Gen ifade analizi yapılan genler** |
|---|---|
| Yaşamsal faaliyetler | *NF1, ERG, VLA4, CXCR4* |
| Sinyal İletim Mekanizması | *ZAP70, JAK2, CRLF2* |
| Gen ifadesi kontrolü | *IKZF1,PAX5, EBF1* |
| Epigenetik regülasyon/ Tedaviye Cevap | *NR3C1* |

Pediatrik öncü B-ALL hasta örneklerinde yapılan gen ifade analizleri sonucunda her bir hasta için hedef genlerin ifade değişiklikleri Bulgular bölümünde grafikleştirilerek ve istatistiksel analiz şeklinde verilmiştir.

Hasta ve kontrol grubu arasında hedef olarak seçilen ZAP70, JAK2, CRFL2, IKZF1, PAX5, EBF1, NR3C1, CXCR4, VLA4, NF1 ve ERG hedef genlerinin ifade değişiklikleri incelendiğinde 11 genden sadece JAK2 geni için istatistiksel olarak *(*$p<0,05$) anlamlı bulunmuştur. Hasta grubunda kontrol grubuna göre daha artmış ifadelenme seviyesi olduğu görülmektedir.

Hasta örnekleri tedavi son durumlarına göre tedavisi devam eden ve tedavisi biten şeklinde gruplara ayrılmış, ERG geni için istatistiksel olarak ($p<0,05$) için anlamlı bulunmuştur. Tedavisi devam eden grupta tedavisi biten gruptaki bireylere göre ifadelenme seviyesinde artış olduğu görülmektedir. İfade seviyesinde artışını, *ERG* mutasyon analizleri sonuçları

da doğrulamaktadır. Saptanan değişimlerin sonucu olarak ifadelenme seviyesinin değiştiğini gözlemlemekteyiz.

Bu nedenle, *ERG* transkripsiyon faktörünün, hematopoezde erken lösemik hücrelerin gelişim sürecinde görev alması ve bu yolakta bulunan genleri kontrol etmesi nedeni ile ifade seviyesinin değişmesinin, lösemi patogenezinde önemli olabileceğini ve prognoz ile muhtemel bir ilişkisi olduğunu göstermektedir, sonuçlarımız literatürü doğrulayıcı niteliktedir.

Verilen tedavi protokollerine göre hastalar 2 farklı gruba ayrılmıştır. ALL BFM-95 tedavisi alan hastalar grubunda, ALL-IC BFM 95 tedavisi alan hasta grubuna göre IKZF1 geni ifadelenme seviyesinde artış gözlemlenmiş, ERG geni ifadelenme seviyesi ise ALL-IC BFM 95 tedavisi alan hasta grubunda yüksek bulunmuştur ve her iki gen içinde istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı bulunmuştur.

Lökosit sayısı risk sınıflandırılmasından önemli parametrelerden biri olarak kabul edilmekte ve >50.000 olduğunda yüksek riskli grup içerisine dahil edilmektedir (29). Bizim çalışmamızda da hastalar risk sınıflandırılmasına göre gruplara ayrılmıştır, lökosit sayısı risk sınıflandırılmasında ayırt edici bir faktör olduğu gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.015$).

## 6.2. SONUÇ

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile literatür de ilk defa rapor edilebilecek önemli bulgular ortaya çıkartılmıştır. DNA düzeyinde mutasyon analizi ile genlerde daha önce tespit edilmiş olan TNP/ mutasyonlar değil bunun yanı sıra, kullanılan yeni nesil dizileme teknolojisinin avantajı ile ilgili ekzonların tamamı çalışılmış ve yeni değişimler tanımlanmıştır. Mutasyon analizleri tespit edilen değişimlerin, gen ifade analizleri ile fonksiyonel genomu nasıl etkilediği belirlenmiştir.

Çalışmaya dâhil edilen hasta ve kontrol sayılarının yetersiz olması sebebi ile genlerin DNA ve RNA boyutunda incelenmesi sonucunda lösemi patogenezi ve prognozu üzerine katkısı olup olmadığı ve biyobelirteç olma nitelikleri hakkında kesin bir sonuca varılabilmesi için tam olarak yeterli değildir.

Bu çalışmanın sonuçlarını sınırlandırıcı en büyük etken mevcut hasta örneklerinden alınan kan/kemik iliği örneklerinin teşhis ve tedavinin farklı dönemlerinde alınmasıdır. Aynı hastada, tanıda tespit edilen anomalilerin tedavinin son aşamasına kadar izlenimi bu çalışma içerisinde mümkün olabilseydi aynı anomalilerin prognostik değerini ortaya konulabilecekti.

Çalışmanın  çok merkezli bir çalışma şeklinde daha büyük bir hasta grubunda, tedavinin farklı dönemlerinde aynı hastaya ait (tanı,8. gün, 33 gün, transplantasyon sonrası, nüks, remisyon gibi) kan/kemik iliği örnekleri ile çalışma gerçekleştirildiğinde mutasyon ve ifade profilleri değerlendirilerek var olan malign hücrelerin miktarının belirlenmesi ve izlemi yeni nesil dizileme teknoloji kullanılarak ile sağlanabilmesi mümkün olacaktır. Bu şekilde literatürde özellikle MRD takibinde hasta grubuna ait tedavi aşamalarının farklı zaman aralıklarını temel alarak malign hücre tespiti, izlemi ve klonaliteyi konu alan makaleler bulunmaktadır. Bu şekilde tasarlanan çalışmalar sayesinde tedavinin malign hücreler üzerine olan etkisinin izlenebilmesi mümkün hale gelmiş ve kanser ve lösemi tedavisinde önemli olan kişiselleştirilmiş tedavi gerçekleştirilebilmesine ilk adım atılması sağlanmıştır(191-195).

Bu çalışmada kullanılan metodoloji ile mutasyon ve gen ifade analizlerinin pediatrik öncü B-ALL gibi löseminin sık görülen bir grubunda gerçekleştirmesi sonucunda elde edilen verilerin daha kapsamlı çalışma grubu ile planlanabilecek çalışmalar için yol gösterici olabilecek nitelikte olduğu görülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR


1 Golub E, Arceci RJ. Acute myelogenous leukemia. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Company; 2002.

2 Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Pizzo PA, editor. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

3 Williams WJ, Beutler E, Litchman MA, Coler BS, Kipps TJ, Mauner AM. William's Hematology. New York: McGraw Hill Company; 1991.

4 Franks LM, Teich NM. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. New York: Oxford University Pres; 2001.

5 Altınok B. Akut Miyeloid Lösemide Wnt sinyal yolağındaki genlerin DNA Mikroarray Analiziile tanımlanmasıAnkara: Ankara Universitesi; 2011.

6 Barnard DR, Kalousek DK, Wiersma SR, et al. Morphologic, immunologic, and cytogenetic classification of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in childhood: a report from the Childrens Cancer Group. Leukemia. 1996 Jan;**10**(1):5-12.

7 Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. The New England journal of medicine. 1998 Aug 27;**339**(9):605-15.

8 Apak H. Çocukluk çağı lösemileri. Türk Pediatri Arşivi. 2006;**41**:189-96.

9 Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. Journal of immunological methods. 2000 Sep 21;**243**(1-2):59-75.

10 Mullighan CG, Downing JR. Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: recent insights and future directions. Leukemia. 2009 Jul;**23**(7):1209-18.

11 Uzunhan T, Karakaş Z. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. Çocuk Dergisi. 2012;**12**(1):6-15.

12 www.kanser.org.tr. [cited; Available from:

13 Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. Leukemia. 2007 Jun;**21**(6):1258-66.

14 Olney HJ, Gozzetti A. Chromosomal abnormalities in childhood hematologic malignant disease. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, editors. Hematology of Infancy and childhood. Philadelphia: WB Saunders Company; 2003. p. 1101-34.

15 Foon KA, Gale RP. Immunologic classification of lymphoma and lymphoid leukemia. Blood reviews. 1987 Jun;**1**(2):77-88.

16 Miller DR, Krailo M, Bleyer WA, et al. Prognostic implications of blast cell morphology in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group. Cancer treatment reports. 1985 Oct;**69**(10):1211-21.

17 Silverman LB, Sallan SE. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Nathan DG OS, Ginsburg D, Look TA, , editor. Hematology of infancy and childhood. 6 ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2003. p. 1135-66.

18 Kinney MC, Lukens JN. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Lee GR, Foerster J, Lukens JN, editors. Wintrobe's Clinical Hematology: Wiiliams and Wilkins Company; 1999. p. 2209-24.

19 Onciu M, Pui CH. Diagnosis and classification. In: Pui CH, editor. Childhood Leukemias. Cambridege University Pres; 2006. p. 21-47.

20 Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia. 1995 Oct;**9**(10):1783-6.

21 Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. Critical reviews in oncology/hematology. 2005 Nov;**56**(2):223-34.

22 Orkin SH, Fisher DE, Look AT, Lux SE, Ginsburg D, Nathan DG. Acute Lymphoblastic and Myeloblastic Leukemia. In: Nathan DG, editor. Hematology of İnfancy and Childhood. 7 ed. Philedelphia: Saunders; 2009. p. 298-374.

23 Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. The New England journal of medicine. 2006 Jan 12;**354**(2):166-78.

24 Sullivan MP, Pullen DJ, Crist WM, et al. Clinical and biological heterogeneity of childhood B cell acute lymphocytic leukemia: implications for clinical trials. Leukemia. 1990 Jan;**4**(1):6-11.

25 Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science. 1997 Nov 7;**278**(5340):1059-64.

26 Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. European journal of cancer. 1999 Dec;**35**(14):1941-53.

27 Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. Experimental hematology & oncology. 2014;**3**:16.

28 Berg SL, Steuber P, Poplack DG. Clinical manifestations of acute lymphoblastic leukemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al., editors. Hematology Basic principles and practice. Philadelphia; 2005. p. 1155-62.

29 Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1996 Jan;**14**(1):18-24.

30 Gokbuget N, Hoelzer D. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. Reviews in clinical and experimental hematology. 2002 Jun;**6**(2):114-41; discussion 200-2.

31 Rubnitz JE, Razzouk BI, Ribeiro RC. Acute myleoid leukemia. In: Pui CH, editor. Childhood Leukemias,. England: Cambridege University Pres; 2006. p. 499-539.

32 Golub TR. The molecular basis of hematologic malignancy in children. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, editors. Hematology of infancy and childhood. Philadelphia: WB Saunders Company; 2003. p. 1219-58.

33 Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. Haematologica. 2013 Jul;**98**(7):1081-8.

34 Tecimer T. Prekursor B ve T Lenfoblastik Losemi/Lenfoblastik Lenfoma Patolojisi. Klinisyen-Patolog Ortak Lenfoma Kursu; 2004.

35 Lowell C. Fundamentals of blood cell biology. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editors. Medical Immunology. 9 ed; 1997. p. 9-25.

36 Oláh E. Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination. The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2005;**16**(2).

37 Martinez JD, Parker MD, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW. Molecular Biology of Cancer. Arizona: John Wiley&Sons; 2003.

38 Kleinsmith LJ. Principles of Cancer Biology. Michigan: Benjamin Cummings; 2006.

39 Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. Nature reviews Clinical oncology. 2015 Jun;**12**(6):344-57.

40 Durmaz ÖE. B hücre aktivasyonu ve antikor üretimi B cell activation and antibody. Türkderm. 2013;**47**(1):24-7.

41 Harrison CJ. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2013;**2013**:118-25.

42 Parikh NI, Vasan RS. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. Biomarkers in medicine. 2007 Oct;**1**(3):419-36.

43 Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS. 2010 Nov;**5**(6):463-6.

44 http://www.genome.jp/kegg/. [cited; Available from:

45 Shalapour S, Hof J, Kirschner-Schwabe R, et al. High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse. Haematologica. 2011 Nov;**96**(11):1627-35.

46 Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. Nature medicine. 2003 Sep;**9**(9):1158-65.

47 Blenc AM, Chigaev A, Sklar L, Larson RS. VLA-4 affinity correlates with peripheral blood white cell count and DNA content in patients with precursor B-ALL. Leukemia. 2003 Mar;**17**(3):641-3.

48 http://www.ensembl.org/index.html. [cited; Available from:

49 Walter RB, Alonzo TA, Gerbing RB, et al. High expression of the very late antigen-4 integrin independently predicts reduced risk of relapse and improved outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010 Jun 10;**28**(17):2831-8.

50 Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. Advances in immunology. 2003;**81**:1-44.

51 Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. Cancer letters. 2008 Aug 28;**267**(2):226-44.

52 Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity. 2000 Feb;**12**(2):121-7.

53 Herbein G, Mahlknecht U, Batliwalla F, et al. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. Nature. 1998 Sep 10;**395**(6698):189-94.

54 Gassmann P, Haier J, Schluter K, et al. CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. Neoplasia. 2009 Jul;**11**(7):651-61.

55 Sharma M, Afrin F, Tripathi RP, Gangenahalli G. Transgene expression study of CXCR4 active mutants. Potential prospects in up-modulation of homing and engraftment efficiency of hematopoietic stem/progenitor cells. Cell adhesion & migration. 2014;**8**(4):384-8.

56 van den Berk LC, van der Veer A, Willemse ME, et al. Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. British journal of haematology. 2014 Jul;**166**(2):240-9.

57 Crazzolara R, Kreczy A, Mann G, et al. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. British journal of haematology. 2001 Dec;**115**(3):545-53.

58 Schneider P, Vasse M, Al Bayati A, Lenormand B, Vannier JP. Is high expression of the chemokine receptor CXCR-4 of predictive value for early relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia? British journal of haematology. 2002 Nov;**119**(2):579-80.

59 Konoplev S, Jorgensen JL, Thomas DA, et al. Phosphorylated CXCR4 is associated with poor survival in adults with B-acute lymphoblastic leukemia. Cancer. 2011 Oct 15;**117**(20):4689-95.

60 Sison EA, Magoon D, Li L, et al. POL5551, a novel and potent CXCR4 antagonist, enhances sensitivity to chemotherapy in pediatric ALL. Oncotarget. 2015 Oct 13;**6**(31):30902-18.

61 Oikawa T. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. Cancer science. 2004 Aug;**95**(8):626-33.

62 Rashed RA, Kadry DY, El Taweel M, Abd El Wahab N, Abd El Hameed T. Relation of BAALC and ERG Gene Expression with Overall Survival in Acute Myeloid Leukemia Cases. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2015;**16**(17):7875-82.

63 Siddique HR, Rao VN, Lee L, Reddy ES. Characterization of the DNA binding and transcriptional activation domains of the erg protein. Oncogene. 1993 Jul;**8**(7):1751-5.

64 Bock J, Mochmann LH, Schlee C, et al. ERG transcriptional networks in primary acute leukemia cells implicate a role for ERG in deregulated kinase signaling. PloS one. 2013;**8**(1):e52872.

65 Eid MA, Attia M, Abdou S, et al. BAALC and ERG expression in acute myeloid leukemia with normal karyotype: impact on prognosis. International journal of laboratory hematology. 2010 Apr;**32**(2):197-205.

66 Pigazzi M, Masetti R, Martinolli F, et al. Presence of high-ERG expression is an independent unfavorable prognostic marker in MLL-rearranged childhood myeloid leukemia. Blood. 2012 Jan 26;**119**(4):1086-7; author reply 7-8.

67 Salek-Ardakani S, Smooha G, de Boer J, et al. ERG is a megakaryocytic oncogene. Cancer research. 2009 Jun 1;**69**(11):4665-73.

68 Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, et al. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005 Dec 20;**23**(36):9234-42.

69 Arden KC, Biggs WH, 3rd. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. Archives of biochemistry and biophysics. 2002 Jul 15;**403**(2):292-8.

70 Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. The Journal of biological chemistry. 2003 Sep 19;**278**(38):35959-67.

71 Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). International journal of oncology. 2004 Nov;**25**(5):1495-500.

72 Ruvolo PP. The Herculean task of killing cancer cells: suppression of FOXO3A in acute leukemia involves a hydra of multiple survival kinases. Cell cycle. 2012 Jul 15;**11**(14):2589.

73 Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature. 2002 Sep 19;**419**(6904):316-21.

74 Tran H, Brunet A, Grenier JM, et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. Science. 2002 Apr 19;**296**(5567):530-4.

75 Santamaria CM, Chillon MC, Garcia-Sanz R, et al. High FOXO3a expression is associated with a poorer prognosis in AML with normal cytogenetics. Leukemia research. 2009 Dec;**33**(12):1706-9.

76 Wang Y, Zhou L, Chen J, et al. Association of the 3'UTR FOXO3a polymorphism rs4946936 with an increased risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2014;**34**(2):325-32.

77 Zhao JN, Lu QY, Niu XQ, et al. [Expression of FoxO3a in patients with acute myeloid leukemia and its clinical significance]. Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology. 2013 Aug;**21**(4):847-50.

78 Akdeniz D, Tuncer ŞB, Yazıcı H. Retinoblastoma (RB) gen yolağı ve kanser. Türk Onkoloji Dergisi. 2014;**29**(4):173-80.

79 Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, et al. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990 Apr;**87**(7):2775-9.

80 Zeng X, Lee H, Zhang Q, Lu H. p300 does not require its acetylase activity to stimulate p73 function. The Journal of biological chemistry. 2001 Jan 5;**276**(1):48-52.

81 Kelly BL, Wolfe KG, Roberts JM. Identification of a substrate-targeting domain in cyclin E necessary for phosphorylation of the retinoblastoma protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 Mar 3;**95**(5):2535-40.

82 Valverde JR, Alonso J, Palacios I, Pestana A. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. BMC genetics. 2005;**6**:53.

83 Melo MB, Costa FF, Saad ST, Lorand-Metze I, Bordin S, Ahmad NN. Molecular analysis of the retinoblastoma (RB1) gene in acute myeloid leukemia patients. Leukemia research. 1998 Sep;**22**(9):787-92.

84 Yerlikaya A. Proteinin Yıkımının Önemi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2009;**35**(2):93-9.

85 Yoshida K, Watanabe M, Hatakeyama S. ZNRF1 interacts with tubulin and regulates cell morphogenesis. Biochemical and biophysical research communications. 2009 Nov 20;**389**(3):506-11.

86 Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. Cancer letters. 2005 Dec 8;**230**(1):6-19.

87 Shang Z, Zhao Y, Zhou K, Xu Y, Huang W. PAX5 alteration-associated gene-expression signatures in B-cell acute lymphoblastic leukemia. International journal of hematology. 2013 May;**97**(5):599-603.

88 Trovo-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. Clinical genetics. 2006 Jul;**70**(1):1-13.

89 Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. Cell. 2001 Feb 23;**104**(4):593-604.

90 Yu X, Chen S, Potter OL, et al. Neurofibromin and its inactivation of Ras are prerequisites for osteoblast functioning. Bone. 2005 May;**36**(5):793-802.

91 Jenne DE, Tinschert S, Reimann H, et al. Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2 microdeletions. American journal of human genetics. 2001 Sep;**69**(3):516-27.

92 Jenne DE, Tinschert S, Stegmann E, et al. A common set of at least 11 functional genes is lost in the majority of NF1 patients with gross deletions. Genomics. 2000 May 15;**66**(1):93-7.

93 Side LE, Emanuel PD, Taylor B, et al. Mutations of the NF1 gene in children with juvenile myelomonocytic leukemia without clinical evidence of neurofibromatosis, type 1. Blood. 1998 Jul 1;**92**(1):267-72.

94 Le DT, Kong N, Zhu Y, et al. Somatic inactivation of Nf1 in hematopoietic cells results in a progressive myeloproliferative disorder. Blood. 2004 Jun 1;**103**(11):4243-50.

95 Balgobind BV, Van Vlierberghe P, van den Ouweland AM, et al. Leukemia-associated NF1 inactivation in patients with pediatric T-ALL and AML lacking evidence for neurofibromatosis. Blood. 2008 Apr 15;**111**(8):4322-8.

96 Kronke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. Blood. 2013 Jul 4;**122**(1):100-8.

97 Huber RG, Fan H, Bond PJ. The Structural Basis for Activation and Inhibition of ZAP-70 Kinase Domain. PLoS computational biology. 2015 Oct;**11**(10):e1004560.

98 Abbas AK, Lichtman MA. Cellular and moleculer immunology. Lymphocyte Maturation and Expression of Antigen Receptor Genes. 2000:175-81.

99 D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. American journal of hematology. 2007 Sep;**82**(9):787-91.

100 Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2006 Aug 1;**108**(3):853-61.

101 Saito T, Matsuda Y, Ito H, Fusaki N, Hori T, Yamamoto T. Localization of Zap70, the gene for a T cell-specific protein tyrosine kinase, to mouse and rat chromosomes by fluorescence in situ hybridization and molecular genetic linkage analyses. Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society. 1997 Jan;**8**(1):45-6.

102 Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002 Dec 15;**100**(13):4609-14.

103 Chakupurakal G, Bell A, Griffiths M, Wandroo F, Moss P. Analysis of ZAP70 expression in adult acute lymphoblastic leukaemia by real time quantitative PCR. Molecular cytogenetics. 2012;**5**(1):22.

104 Kong GH, Bu JY, Kurosaki T, Shaw AS, Chan AC. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. Immunity. 1995 May;**2**(5):485-92.

105 Ebeid E, Kamel M, Moussa H, Galal U. ZAP-70 as a possible prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. Journal of the Egyptian National Cancer Institute. 2008 Jun;**20**(2):121-6.

106 Wandroo F, Bell A, Darbyshire P, et al. ZAP-70 is highly expressed in most cases of childhood pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. International journal of laboratory hematology. 2008 Apr;**30**(2):149-57.

107 Crespo M, Villamor N, Gine E, et al. ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2006 Feb 1;**12**(3 Pt 1):726-34.

108 Tasian SK, Loh ML. Understanding the biology of CRLF2-overexpressing acute lymphoblastic leukemia. Critical reviews in oncogenesis. 2011;**16**(1-2):13-24.

109 Quentmeier H, Drexler HG, Fleckenstein D, et al. Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. Leukemia. 2001 Aug;**15**(8):1286-92.

110 Ziegler SF. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. Current opinion in immunology. 2010 Dec;**22**(6):795-9.

111 Zhong J, Sharma J, Raju R, et al. TSLP signaling pathway map: a platform for analysis of TSLP-mediated signaling. Database : the journal of biological databases and curation. 2014;**2014**:bau007.

112 Rochman Y, Leonard WJ. The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis. Journal of immunology. 2008 Dec 1;**181**(11):7699-705.

113 Scheeren FA, van Lent AU, Nagasawa M, et al. Thymic stromal lymphopoietin induces early human B-cell proliferation and differentiation. European journal of immunology. 2010 Apr;**40**(4):955-65.

114 Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S, et al. Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010 Jan 5;**107**(1):252-7.

115 Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2010 Jul 1;**115**(26):5312-21.

116 Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. Nature genetics. 2009 Nov;**41**(11):1243-6.

117 Roll JD, Reuther GW. CRLF2 and JAK2 in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia: a novel association in oncogenesis. Cancer research. 2010 Oct 1;**70**(19):7347-52.

118 Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, et al. Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. Blood. 2011 Feb 17;**117**(7):2129-36.

119 Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. The Journal of clinical investigation. 2002 May;**109**(9):1133-7.

120 Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. Leukemia. 2010 Jun;**24**(6):1128-38.

121 Er TK, Lin SF, Chang JG, et al. Detection of the JAK2 V617F missense mutation by high resolution melting analysis and its validation. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2009 Oct;**408**(1-2):39-44.

122 Veneri D, Capuzzo E, de Matteis G, et al. Comparison of JAK2V617F mutation assessment employing different molecular diagnostic techniques. Blood transfusion = Trasfusione del sangue. 2009 Jul;**7**(3):204-9.

123 McLornan D, Percy M, McMullin MF. JAK2 V617F: a single mutation in the myeloproliferative group of disorders. The Ulster medical journal. 2006 May;**75**(2):112-9.

124 Vladareanu AM, Muller-Tidow C, Bumbea H, Radesi S. Molecular markers guide diagnosis and treatment in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders (Review). Oncology reports. 2010 Mar;**23**(3):595-604.

125 Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009 Jun 9;**106**(23):9414-8.

126 Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. Science. 1992 Oct 30;**258**(5083):808-12.

127 Joshi I, Yoshida T, Jena N, et al. Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. Nature immunology. 2014 Mar;**15**(3):294-304.

128 Yoshida T, Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. International journal of hematology. 2014 Sep;**100**(3):220-9.

129 van der Sligte NE, Scherpen FJ, Ter Elst A, Guryev V, van Leeuwen FN, de Bont ES. Effect of IKZF1 deletions on signal transduction pathways in Philadelphia chromosome negative pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Experimental hematology & oncology. 2015;**4**:23.

130 Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. Cell. 1995 Oct 20;**83**(2):289-99.

131 Waanders E, van der Velden VH, van der Schoot CE, et al. Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79% of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2011 Feb;**25**(2):254-8.

132 Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. The New England journal of medicine. 2009 Jan 29;**360**(5):470-80.

133 Dai YE, Tang L, Healy J, Sinnett D. Contribution of polymorphisms in IKZF1 gene to childhood acute leukemia: a meta-analysis of 33 case-control studies. PloS one. 2014;**9**(11):e113748.

134 de Rooij JD, Beuling E, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Recurrent deletions of IKZF1 in pediatric acute myeloid leukemia. Haematologica. 2015 Sep;**100**(9):1151-9.

135 Holmes ML, Pridans C, Nutt SL. The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. Immunology and cell biology. 2008 Jan;**86**(1):47-53.

136 Nutt SL, Busslinger M. Monoallelic expression of Pax5: a paradigm for the haploinsufficiency of mammalian Pax genes? Biological chemistry. 1999 Jun;**380**(6):601-11.

137 Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. Nature immunology. 2007 May;**8**(5):463-70.

138 Iacobucci I, Lonetti A, Paoloni F, et al. The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Haematologica. 2010 Oct;**95**(10):1683-90.

139 Heltemes-Harris LM, Willette MJ, Ramsey LB, et al. Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. The Journal of experimental medicine. 2011 Jun 6;**208**(6):1135-49.

140 Miller CB, Mullighan CG, Su X, et al. Pax5 Haploinsufficiency cooperates with BCR-ABL1 to induce acute lymphoblastic leukemia. ASH Annu Meeting; 2008. p. 112-293.

141 Familiades J, Bousquet M, Lafage-Pochitaloff M, et al. PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. Leukemia. 2009 Nov;**23**(11):1989-98.

142 Shah S, Schrader KA, Waanders E, et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. Nature genetics. 2013 Oct;**45**(10):1226-31.

143 Fazio G, Daniele G, Cazzaniga V, et al. Three novel fusion transcripts of the paired box 5 gene in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2015 Jan;**100**(1):e14-7.

144 Denk D, Nebral K, Bradtke J, et al. PAX5-AUTS2: a recurrent fusion gene in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia research. 2012 Aug;**36**(8):e178-81.

145 Boller S, Grosschedl R. The regulatory network of B-cell differentiation: a focused view of early B-cell factor 1 function. Immunological reviews. 2014 Sep;**261**(1):102-15.

146 Liao D. Emerging roles of the EBF family of transcription factors in tumor suppression. Molecular cancer research : MCR. 2009 Dec;**7**(12):1893-901.

147 Hagman J, Gutch MJ, Lin H, Grosschedl R. EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. The EMBO journal. 1995 Jun 15;**14**(12):2907-16.

148 Hagman J, Ramirez J, Lukin K. B lymphocyte lineage specification, commitment and epigenetic control of transcription by early B cell factor 1. Current topics in microbiology and immunology. 2012;**356**:17-38.

149 Prasad MA, Ungerback J, Ahsberg J, et al. Ebf1 heterozygosity results in increased DNA damage in pro-B cells and their synergistic transformation by Pax5 haploinsufficiency. Blood. 2015 Jun 25;**125**(26):4052-9.

150 Gyory I, Boller S, Nechanitzky R, et al. Transcription factor Ebf1 regulates differentiation stage-specific signaling, proliferation, and survival of B cells. Genes & development. 2012 Apr 1;**26**(7):668-82.

151 Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. p300/CBP and cancer. Oncogene. 2004 May 24;**23**(24):4225-31.

152 Blobel GA. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. Blood. 2000 Feb 1;**95**(3):745-55.

153 Cho EC, Mitton B, Sakamoto KM. CREB and leukemogenesis. Critical reviews in oncogenesis. 2011;**16**(1-2):37-46.

154 Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. Nature. 2011 Mar 10;**471**(7337):235-9.

155 Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schonegger A, et al. KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2015 Aug;**29**(8):1656-67.

156 Inthal A, Zeitlhofer P, Zeginigg M, et al. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2012 Aug;**26**(8):1797-803.

157 Ma X, Edmonson M, Yergeau D, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. Nature communications. 2015;**6**:6604.

158 Huether R, Dong L, Chen X, et al. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. Nature communications. 2014;**5**:3630.

159 Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, et al. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. Genome research. 2004 Apr;**14**(4):580-90.

160 Tao Y, Williams-Skipp C, Scheinman RI. Mapping of glucocorticoid receptor DNA binding domain surfaces contributing to transrepression of NF-kappa B and induction of apoptosis. The Journal of biological chemistry. 2001 Jan 26;**276**(4):2329-32.

161 Hecht K, Carlstedt-Duke J, Stierna P, Gustafsson J, Bronnegard M, Wikstrom AC. Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor. The Journal of biological chemistry. 1997 Oct 17;**272**(42):26659-64.

162 Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM. Effects of glucocorticoids on gene transcription. European journal of pharmacology. 2004 Oct 1;**500**(1-3):51-62.

163 Prima V, Depoix C, Masselot B, Formstecher P, Lefebvre P. Alteration of the glucocorticoid receptor subcellular localization by non steroidal compounds. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2000 Jan-Feb;**72**(1-2):1-12.

164 Longui CA, Vottero A, Adamson PC, et al. Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme. 2000 Oct;**32**(10):401-6.

165 Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994 Jan 18;**91**(2):752-6.

166 Haarman EG, Kaspers GJ, Pieters R, Rottier MM, Veerman AJ. Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticod resistance in childhood leukemia. Leukemia. 2004 Mar;**18**(3):530-7.

167 Bhadri VA, Trahair TN, Lock RB. Glucocorticoid resistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. Journal of paediatrics and child health. 2012 Aug;**48**(8):634-40.

168 Ho GA, Odenwald E, Reiter A, Sauter S, Riehm H. Lack of correlation between glucocorticoid receptor levels, response to prednisone monotherapy and relapse-free survival in childhood leukemia. Proc Am Soc Clin Oncol. 1991;**18**(3):530-7.

169 Haarman EG, Kaspers GJ, Pieters R, et al. In vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia correlates with receptor affinity determined at 37 degrees C, but not with affinity determined at room temperature. Leukemia. 2002 Sep;**16**(9):1882-4.

170 Labuda M, Gahier A, Gagne V, Moghrabi A, Sinnett D, Krajinovic M. Polymorphisms in glucocorticoid receptor gene and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). Leukemia research. 2010 Apr;**34**(4):492-7.

171 Tissing WJ, Meijerink JP, Brinkhof B, et al. Glucocorticoid-induced glucocorticoid-receptor expression and promoter usage is not linked to glucocorticoid resistance in childhood ALL. Blood. 2006 Aug 1;**108**(3):1045-9.

172 Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. Genome research. 2001 Jan;**11**(1):3-11.

173 Dönmez D, Simsek Ö, Akakaçar Y. Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2008;**8**(1):30-7.

174 Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. Journal of biomedicine & biotechnology. 2012;**2012**:251364.

175 Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nature reviews Genetics. 2010 Jan;**11**(1):31-46.

176 Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". Turkiye Klinikleri J Med Sci. 2007;**27**.

177 Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of molecular endocrinology. 2000 Oct;**25**(2):169-93.

178 Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature protocols. 2006;**1**(3):1559-82.

179 http://454.com/products/gs-junior-system/. [cited; Available from:

180 www.idtdna.com. [cited; Available from:

181 www.idtdna.com/oligoanalyzer. [cited; Available from:

182 http://www.ncbı.nlm.nih.gov/BLAST/. [cited; Available from:

183 genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.

184 Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. BioTechniques. 2004 Jul;**37**(1):112-4, 6, 8-9.

185 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research. 2001 May 1;**29**(9):e45.

186 www.lifetechnologies.com. [cited; Available from:

187 Team RDC. A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing,. Vienna, Austria; 2008.

188 http://www.jsi-medisys.de/.

189 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/. [cited; Available from:

190 http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch5A4.htm. [cited; Available from:

191 Bruggemann M, Raff T, Flohr T, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2006 Feb 1;**107**(3):1116-23.

192 Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, et al. IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. Blood. 2015 May 28;**125**(22):3501-8.

193 Bibault JE, Figeac M, Helevaut N, et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. Oncotarget. 2015 Sep 8;**6**(26):22812-21.

194 Li A, Zhou J, Zuckerman D, et al. Sequence analysis of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at relapse: implications for pathogenesis and for the clinical utility of PCR-based methods of minimal residual disease detection. Blood. 2003 Dec 15;**102**(13):4520-6.

195 Hourigan CS. Next generation MRD. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2014 Sep;**20**(9):1259-60.

196 Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. The Journal of clinical investigation. 2012 Oct;**122**(10):3407-15.

197 Dunwell TL, Hesson LB, Pavlova T, et al. Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. Epigenetics. 2009 Apr 1;**4**(3):185-93.

198 De Braekeleer E, Basinko A, Douet-Guilbert N, et al. Cytogenetics in pre-B and B-cell acute lymphoblastic leukemia: a study of 208 patients diagnosed between 1981 and 2008. Cancer genetics and cytogenetics. 2010 Jul 1;**200**(1):8-15.

199 Gandemer V, Rio AG, de Tayrac M, et al. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia. BMC genomics. 2007;**8**:385.

200 Simons A, Stevens-Kroef M, El Idrissi-Zaynoun N, et al. Microarray-based genomic profiling as a diagnostic tool in acute lymphoblastic leukemia. Genes, chromosomes & cancer. 2011 Dec;**50**(12):969-81.

201 De Pitta C, Tombolan L, Campo Dell'Orto M, et al. A leukemia-enriched cDNA microarray platform identifies new transcripts with relevance to the biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2005 Jul;**90**(7):890-8.

202 Hoffmann K, Firth MJ, Beesley AH, de Klerk NH, Kees UR. Translating microarray data for diagnostic testing in childhood leukaemia. BMC cancer. 2006;**6**:229.

203 Haferlach T, Kohlmann A, Wieczorek L, et al. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010 May 20;**28**(15):2529-37.

204 Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, et al. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2010 Sep;**95**(9):1481-8.

205 Yu L, Slovak ML, Mannoor K, et al. Microarray detection of multiple recurring submicroscopic chromosomal aberrations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2011 Jun;**25**(6):1042-6.

206 Torelli GF, Guarini A, Porzia A, et al. FLT3 inhibition in t(4;11)+ adult acute lymphoid leukaemia. British journal of haematology. 2005 Jul;**130**(1):43-50.

207 Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. Blood. 2008 Jan 15;**111**(2):776-84.

208 Usvasalo A, Raty R, Harila-Saari A, et al. Acute lymphoblastic leukemias with normal karyotypes are not without genomic aberrations. Cancer genetics and cytogenetics. 2009 Jul;**192**(1):10-7.

209 Usvasalo A, Elonen E, Saarinen-Pihkala UM, et al. Prognostic classification of patients with acute lymphoblastic leukemia by using gene copy number profiles identified from array-based comparative genomic hybridization data. Leukemia research. 2010 Nov;**34**(11):1476-82.

210 Akiyama M, Yamada O, Agawa M, et al. Effects of prednisolone on specifically expressed genes in pediatric acute B-lymphoblastic leukemia. Journal of pediatric hematology/oncology. 2008 Apr;**30**(4):313-6.

211 Alvarez Y, Coll MD, Ortega JJ, et al. Genetic abnormalities associated with the t(12;21) and their impact in the outcome of 56 patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Cancer genetics and cytogenetics. 2005 Oct 1;**162**(1):21-9.

212 Amare P, Gladstone B, Varghese C, Pai S, Advani S. Clinical significance of cytogenetic findings at diagnosis and in remission in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia: experience from India. Cancer genetics and cytogenetics. 1999 Apr;**110**(1):44-53.

213 Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. Leukemia. 2010 Jul;**24**(7):1258-64.

214 Tang G, Zuo Z, Thomas DA, et al. Precursor B-acute lymphoblastic leukemia occurring in patients with a history of prior malignancies: is it therapy-related? Haematologica. 2012 Jun;**97**(6):919-25.

215 Kang H, Chen IM, Wilson CS, et al. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2010 Feb 18;**115**(7):1394-405.

216 van Bodegom D, Zhong J, Kopp N, et al. Differences in signaling through the B-cell leukemia oncoprotein CRLF2 in response to TSLP and through mutant JAK2. Blood. 2012 Oct 4;**120**(14):2853-63.

217 Morishita N, Tsukahara H, Chayama K, et al. Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Pediatric blood & cancer. 2012 Jul 15;**59**(1):83-9.

218 Primo D, Tabernero MD, Perez JJ, et al. Genetic heterogeneity of BCR/ABL+ adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: impact on the clinical, biological and immunophenotypical disease characteristics. Leukemia. 2005 May;**19**(5):713-20.

219 Berger R, Busson M, Daniel MT. B-cell acute lymphoblastic leukemia with tandem t(14;14)(q11;q32). Cancer genetics and cytogenetics. 2001 Oct 1;**130**(1):84-6.

220 Kuhnl A, Gokbuget N, Kaiser M, et al. Overexpression of LEF1 predicts unfavorable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2011 Dec 8;**118**(24):6362-7.

221 Fais F, Tenca C, Cimino G, et al. CD1d expression on B-precursor acute lymphoblastic leukemia subsets with poor prognosis. Leukemia. 2005 Apr;**19**(4):551-6.

222 Krentz S, Hof J, Mendioroz A, et al. Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2013 Feb;**27**(2):295-304.

223 Moorman AV, Schwab C, Ensor HM, et al. IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2012 Sep 1;**30**(25):3100-8.

224 Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. Blood. 1994 Nov 1;**84**(9):3148-57.

225 Lens D, De Schouwer PJ, Hamoudi RA, et al. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. Blood. 1997 Mar 15;**89**(6):2015-23.

226 Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2009 Sep 24;**114**(13):2688-98.

227 Chen IM, Harvey RC, Mullighan CG, et al. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. Blood. 2012 Apr 12;**119**(15):3512-22.

228 Yang YL, Hung CC, Chen JS, et al. IKZF1 deletions predict a poor prognosis in children with B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia: a multicenter analysis in Taiwan. Cancer science. 2011 Oct;**102**(10):1874-81.

229 Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009 Nov 1;**27**(31):5202-7.

230 Iacobucci I, Iraci N, Messina M, et al. IKAROS deletions dictate a unique gene expression signature in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. PloS one. 2012;**7**(7):e40934.

231 Chen B, Wang YY, Shen Y, et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (I): abnormal genetic patterns in 1346 childhood and adult cases and their comparison with the reports from Western countries. Leukemia. 2012 Jul;**26**(7):1608-16.

232 Chapiro E, Russell L, Lainey E, et al. Activating mutation in the TSLPR gene in B-cell precursor lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2010 Mar;**24**(3):642-5.

233 Bhatla T, Wang J, Morrison DJ, et al. Epigenetic reprogramming reverses the relapse-specific gene expression signature and restores chemosensitivity in childhood B-lymphoblastic leukemia. Blood. 2012 May 31;**119**(22):5201-10.

234 Tesfai Y, Ford J, Carter KW, et al. Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy. Leukemia research. 2012 Mar;**36**(3):299-306.

235 Fuka G, Kantner HP, Grausenburger R, et al. Silencing of ETV6/RUNX1 abrogates PI3K/AKT/mTOR signaling and impairs reconstitution of leukemia in xenografts. Leukemia. 2012 May;**26**(5):927-33.

236 el Rouby S, Bayona W, Pisharody SM, Newcomb EW. p53 mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Current topics in microbiology and immunology. 1992;**182**:313-7.

237 Cario G, Zimmermann M, Romey R, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. Blood. 2010 Jul 1;**115**(26):5393-7.

238 Li Z, Zhang W, Wu M, et al. Gene expression-based classification and regulatory networks of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2009 Nov 12;**114**(20):4486-93.

239 Trentin L, Giordan M, Dingermann T, Basso G, Te Kronnie G, Marschalek R. Two independent gene signatures in pediatric t(4;11) acute lymphoblastic leukemia patients. European journal of haematology. 2009 Nov;**83**(5):406-19.

240 Breslin T, Krogh M, Peterson C, Troein C. Signal transduction pathway profiling of individual tumor samples. BMC bioinformatics. 2005;**6**:163.

# 8. EKLER

## EK- 1

## Etik Kurul Kararı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

| | | |
|---|---|---|
| ETİK KURUL BİLGİLERİ | ETİK KURULUN ADI | Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu |
| | AÇIK ADRESİ: | Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA |
| | TELEFON | 0312 595 82 27 |
| | FAKS | 0312 310 63 70 |
| | E-POSTA | etik@medicine.ankara.edu.tr |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Pediatrik önrü B-ALL'de aday prognostik biyobelirteç genlerinin araştırılması | | | |
| | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU | | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI | Prof.Dr. Hilal Özdağ | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI | Moleküler Biyoloji ve Genetik | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü | | | |
| | DESTEKLEYİCİ | | | | |
| | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ | | | | |
| | ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ | FAZ 1 | ☐ | | |
| | | FAZ 2 | ☐ | | |
| | | FAZ 3 | ☐ | | |
| | | FAZ 4 | ☐ | | |
| | | Gözlemsel ilaç çalışması | ☐ | | |
| | | İlaç dışı klinik araştırma | ☐ | | |
| | | Diğer ise belirtiniz: Laboratuar Çalışması | | | |
| | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEK MERKEZ ☐ | ÇOK MERKEZLİ ☒ | ULUSAL ☒ | ULUSLARARASI ☐ |

Şekil 8.1.Etik Kurul Kararı-ilk sayfa

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

| | Belge Adı | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili |
|---|---|---|---|---|
| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ | | | Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐ |
| | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | | | Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐ |
| | OLGU RAPOR FORMU | | | Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐ |
| | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ | | | Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐ |

| | Belge Adı | | Açıklama |
|---|---|---|---|
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER | SİGORTA | ☐ | |
| | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ | ☐ | |
| | BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU | ☐ | |
| | İLAN | ☐ | |
| | YILLIK BİLDİRİM | ☐ | |
| | SONUÇ RAPORU | ☐ | |
| | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ | ☐ | |
| | DİĞER: | ☐ | |
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No:14-543-13 | Tarih: 23 Eylül 2013 | |
| | Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. | | |

| KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU | |
|---|---|
| ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI | Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: | Prof.Dr.Mehmet MELİ |

| Unvanı/Adı/Soyadı | Uzmanlık Alanı | Kurumu | Cinsiyet | | Araştırma ile ilişki | | Katılım * | | İmza |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Prof.Dr.Mehmet MELİ | Farmakoloji | A.Ü.Tıp Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN | Gastroenteroloji | A.Ü. Tıp Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☐ | H☒ | Yardımcı |
| Prof.Dr.Mehmet GÜREL | Genel Cerrahi | A.Ü. Tıp Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY | Farmakoloji | A.Ü.Eczacılık Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Prof.Dr.Nilüfer PULAL | Biyofizik | H.Ü. Tıp Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Prof.Dr.Esra ATBAŞOĞLU | Ruh Sağlığı ve Hastalıkları | A.Ü. Tıp Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK | Biyokimya | A.Ü. Tıp Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Prof.Dr.Saruş SİVRİ | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları | H.Ü. Tıp Fakültesi | E☐ | K☒ | E☐ | H☒ | E☐ | H☒ | |
| Prof.Dr.Zerife ŞENOCAK | Hukuk | A.Ü.Hukuk Fakültesi | E☐ | K☒ | E☐ | H☒ | E☐ | H☒ | |
| Prof.Dr.Banu ÇAKIR | Halk Sağlığı | H.Ü. Tıp Fakültesi | E☐ | K☒ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Prof.Dr.Gönül UTKAN | Tıbbi Onkoloji | A.Ü. Tıp Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Doç.Dr.Derya ÖZTUNA | Biyoistatistik | A.Ü. Tıp Fakültesi | E☐ | K☒ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY | Tıbbi Genetik | A.Ü. Tıp Fakültesi | E☐ | K☒ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS | Tıp Tarihi ve Etik | A.Ü. Tıp Fakültesi | E☒ | K☐ | E☐ | H☒ | E☒ | H☐ | |
| Gülsüre ASLAN | Arkeoloji | - | E☐ | K☒ | E☐ | H☒ | E☐ | H☒ | |

*:Toplantıda Bulunma

Şekil 8.2.Etik Kurul Kararı-ikinci sayfa

## EK-2:1993-2013 yılları arasında yapılmış olan DNA veya RNA boyutundaki çalışmalar

Çizelge 8.1. 1993-2013 yılları arasında yapılmış olan DNA veya RNA boyutundaki çalışmalar

| No | Otör, Merkez, Ülke | Çalışılan hasta sayısı (n) | Çalışılan Lösem□ Türü | Çalışma Platformu | Amaç | Gen | Sonuç | Referans |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Schawb (2013), İngiltere | n:1427 | 1-18 yaş arası pediatrik öncü B ALL | ■MLPA | ■Çalışmanın amacı; Öncü B-hücreli lösemili bireylerde çeşitli gen delesyonlarının sitogenetik analomliler ile olan ilişkilerinin belirlenmİdir. | IKZF1, CDKN2A/B, PAX5, EBF1, ETV6, BTG1, RB1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; belirlenen genlerde olan değişimlerin prognostik marker olarak kullanılabileceği öngörülmüştür. | (33) |
| 2 | Shalapour ( 2011), Berlin. | n:56 | Nüks Pediatrik öncü B-ALL | ■n: 56 relaps geçirmiş pediatrik Akut lenfoblastik lösemili bireylerin kanlardan elde edilmiş hücre hattı. | ■Bu çalışmada, B-ALL li bireylerde VLA-4 ekspresyonun lösemi gelişiminde etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. VLA-4 ekspresyonun, hücre çoğa□masında ve ilaç direnci üzerine etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. | VLA-4 | ■Çalışma sonuçlarına göre, VLA-4 artış ekspresyon düzeyi kötü prognoz markeri olarak belirlenmiş ve potansiyel terapatik bir marker olarak belirlenmiştir□□ □□ □ | (45) |
| 3 | Konoplev (2011), USA | n :54 | B-ALL yetişkin | ■Flow | ■Çalışmanın amacı; CXC kemokin reseptör olarak bilinen CXCR4, kemik iliğinden hematopoietik öncü hücrelerin göçü için önemli bir faktördür. Hematopoietik neoplazmalar arasında CXCR4 akut miyeloid lösemi hastalarında en iyi çalışılmıolndır ve kötü prognoz le ilişkili olup olmadğını belirlemektedir. | CXCR4 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; CXCR4 ün aktif formu olan fosforlanmış pCXCR4 ün erişkin B-ALL hastalarda prognoz açısından bağımsız bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. | (59) |
| 4 | Wandroo ( 2007), İngiltere | – | öncü B-ALL | ■ Q-PCR | ■Çalışmanın amacı; B-hücre hatlarında ZAP-70 ekspresyonun malinite durumunda nasıl değiştiğini gözlemlemek istemişlerdir. | ZAP70 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; ZAP-70 ekspresyonun farklı olduğunu bildirmişlerdir. ZAP-70 ekspresyonun, öncü B-hücreli lösemi için prognostik marker olabileceği bildirilmişlerdir. | (106) |
| 5 | Yoda ( 2009), İtalya | n:100 | öncü B-ALL Yetişkin | ■Sekanslama,Q-PCR | ■Çalışmanın amacı; Daha önce yaptıkları ifadelenme analizlerinde CRLF2 nin öncü B-hücreli ALL de diğer genlere daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada CRLF2 nin B-ALL için anahtat gen olduğunu belirtmeyi amaçlamışlardır. | CRLF2 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; CRLF2 nin çalışmanın başlangıcında kurdukları gibi prognostik bir beirteç, teröpatik ajan olma özelliğinin mevcut olduğunu öngörmüşlerdir. | (114) |
| 6 | Mullighan (2009), Amerika | n:221 | öncü B-ALL Yetişkin | ■Sekanslama,Q-PCR | ■Çalışmanın amacı; JAK/STAT yolağı BCR-ABL tirozin kinaz yolağını kontrol etmektedir.BCR-ABL negatif hastalarda görülen kötü prognozun JAK/STAT yolağı nedeni ile olup olmadığı araştırılmak istenmiştir. | JAK2 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; JAK-2 mutasyonları, BCR-ABL pozitif ALL benzeri bir tablo ile negatif bireylerde gözlemlenmektedir. JAK2 nin prognostik marker olabileceği BCR-ABL negatif bireylerde öngörülmüştür. | (125) |
| 7 | Mullighan (2009,), Amerika | n: 192 | Pediatrik öncü B-ALL | ■Affimetrix SNP array ( 50k Hind, Xba,250 ) | ■ Kanser araştırmalarında asıl amaç, tümor oluşumuna kaynaklık eden nedeni bulabilmektir. DNA kopya sayısı değişimi, gen ekspresyon değişim çalışmaları bu konuda son derece önemli olmaktadırlar Birden çok mikroarray platformu ile bu değişimler taranabilmektedir ( CNH array, SNP array, BAC array, oligonükleotid array gibi) | PAX5 | ■Çalışma sonucunda, ALL li hastalarda 50 adet farklı kopya sayısı değişimi tespit edilmiştir. Sıklıkla B- öncü hücre ALL li gruplarda (40%) civarında yeni mutasyonlar tanımlanmıştır. En sıklıkla mutasyon geçiren transkripsyon faktörü ise PAX5 geni dir, delesyonlar ve kopya sayısı değişimleri söz konusudur. | (10) |
| 8 | Mullighan (2011), Amerika . | n:221 | pediatrik yüksek risk öncü B-ALL | ■DNA kopya sayısı değişimi | ■Çalışmanın amacı: IKZF1 değişimlerinin lösemi de prognostik öneminin belirlenmesi | IKZF1, PAX5,EBF1 | ■IKZF1 delesyonları (ekzon 4-7) öncü B-hücreli lenfoblastik lösemi için potansiyel bir prognostik markerdır. BCR-ABL1 pozitifliğinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir, I□ZF1 mutasyonları BCR-ABL1 negatif bireylerin, pozitif bireylere benzer bir prognoz göstermesine neden olması nedeniyle (BCR-ABL1 like) olarak bilinen bir □lt tipleme yapılmaktadır. | (132) |
| 9 | Mullighan (2009), Amerika | – | – | ■Yapılmış genom profillenme çalışmalarından bahsedilmiştir. | ■Kanser araştırmalarının önemli hedefi tümorgenesiz üzerine etki eden genetik ve epigenetik faktörlerinin belirlenebilmesidir. ALL birden çok genetik genetik değişimi içeren bir hastalıktır ( Hiperdiplidihiopdiploidi, traslokasyonlar) içermektedi.( t(12;21)[ETV6-RUNX1], t(1;19)[TCF3-PBX1], t(9;22)[BCR-ABL1) | PAX5-IKZF1-CDKN2A-NF1-PTEN,NF1, FHIT, BTG1, NR3C1 ve NRC2, ATM, | ■Daha önce yapılan çalışmalarında 242 pediatrik ALL vakasının (192 B-progenitor, 50 T-lineage)Affymetrix SNP arrayleri kullanılarak taranması sonucunda (50k Hind and Xba, and 250 Sty) 350,000 markers belirlenebilmiştir. BCR-ABL1 taşıyan pediatrik ALL lilerde bireylerde n:304, PAX5, IKZF1, and CDKN2A/B genlerinde sıklıkla değişim olduğu belirlenmiştir. B-hücre Lösemi grubunda yapılan çalışmada ise (RB1, PTEN,NF1, FHIT, BTG1, NR3C1 ve NR3C2 , ATM, the IL3RA and CSF2RA mir-15/-16 microRNA gene sıklıkla ilişki olduğu belirlenmiştir. | (10) |
| 10 | Shang (2013), Çin | n:81 | Yüksek risk öncü B hücreli-ALL pediatrik | ■Q-PCR | ■Çalışmanın amacı:ETV-RUNX1 pozitif olan hastalarda ikincil genetik değişimlerin saptanabilmesi amaçlanmıştır. | PAX5 | ■Çalışamaın sonuçlarına göre; öncü B-ALL hastalarında, PAX-5 geninde olan anomalilerin ifadelenme düzeyini etkilediğini rapor etmişlerdir. | (87) |
| 11 | Denk (2012), Avusturya | n:3 | pediatrik öncü B ALL | ■ FISH, Q-PCR | ■Çalışmanın amacı;PAX-5 transkripsiyon faktörü ile ilgili kromozomal değişimleri tanımlamak. | PAX5-AUTS2 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; 3 vaka da PAX5-AUTS2 füzyon geni ile ilişkili kromozomal değişimler gözlemlemişlerdir (t(7;9)(q11.2;p13.2). | (144) |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **12** | Mullighan (2011), Amerika | n:23 | | ■Sekanslama,Q-PCR | ■Çalışmanın amacı;. CREBBP, ALL tedavisinde yaygın olarak kullanılan glukokortikoid yanıtı için önemli bir transkripsiyonel aracıdır, Yüksek risk grubunda ve tekrarlayan vakalarda, CREBBP geninde olan değişimler, direkt olarak lösemik hücrelerin kemoterapiye olan cevabının etkilemekte bu yüzden tedavi açısından çok önemli olduğu bilinmektedir. Bu hipotez doğrulanmaya çalışılmaktadır. | CREEBP | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; ALL de, CREBBP geni fonksiyonel bölgelerinde olan mutasyonlarının olması tedaviye yanıtın alınamamasına ve nükse sebep olmakta olduğu bildirilmiştir. | (154) |
| **13** | Mullighan (2011), Amerika | | pediatrik öncü B ALL | ■ Çocukluk çağı ALL si birden çok altgrubu içine alan bir hastalıktır. Hastalığın pathogenezinde kromozomal değişimler çok önemlidir ve bu değişimler hastalığın teşhisinde risk sınıflandırılmasının yapılmasını sağlamaktadır. Bu derlemede, son 5 yılda yapılan genom profillme çalışmalarının değerlendirilmesi yapılmıştır. | Genom profillme çalışmalarının değrlenirilmesi | IKZF1<br>BCR-ABL1-like<br>PAX5<br>JAK1/2<br>CRFl2<br>CREBBP | ■Sonuç olarak, ALL genomik analizi tedavi için önemli rol oynamaktadır ve gelecek birkaç yıl içersinde klinik teşhiste bu profillnme sonuçları önemli olucaktır. | (196) |
| **14** | Dunwell (20099, İngiltere | n:□94 (ALL (58, □ALL/ 36,T-ALL) | ALL (B-ALL/ T-ALL) | ■ Kromozom 3 Not1 arrayi | Metilasyon analizi | PPP2R3A, FBLN2, THRB,□BNC1, MSX1 | ■ PPP2R3A geninin metilasyon oranları: T hücreli lösemide %69 ve B hücreli lösemide %82<br>■ FBLN2 geninin metilasyon oranları: T hücreli lösemide %17 ve B hücreli lösemide %58<br>■ THRBT geninin metilasyon oranları: hücreli lösemide %17 ve B hücreli lösemide %56 ■ PPP2R3A, FBLN2 ve THRB genlerinin çocukluk çağı ALL'lerinde metile olma sıklığı ilk kez gösterilmiştir. ■ Lösemide bu genlerin (PPP2R3A, FBLN2, THRB, BNC1, MSX1) epigenetik inaktivasyonu ilk kez rapor edilmiş□ir. | (197) |
| **15** | Braekelee (2010), Fransa. | n:208 < 1yaş/ 1-15 yaş/ 15-25 yaş/ 25> yaş | B-ALL (Pre B-ALL, B-ALL) | ■ FISH | ALL li hastalarda yapılan FİSH çalışmaları ile risk sınıflandır□lması, relaps tahmi□i, MRD ta□ini belirlenmektedir. | ■ ALL li hastalarda yapılan FİSH çalışmaları ile risk sınıflandırılması, relaps tahmini, MRD tayini belirlenmektedir. | ■t( 9;22), (12;21), (13;21) kromozomal translokasyonlarının ye□işkinlerde ve çocuklarda sırasıyla (26,9%) ve (19,7%) olarak belirlenmiştir. | (198) |
| **16** | Gandemer (2007),□Fransa□. | n:60 | Pediatrik öncü B-ALL | ■Agilent tüm genom oligo chips 44k-G4112A | ■16 TEL/AML1 pozitif ALL ve 44 TEL/AML1 negatif hastanın gen ekspresyon ta□amaları karşılaştırılması amaçlanmıştır. | F14 TCFL5, TNFRSF7, CBFA2T3, CD9, SCARB1, TP53INP1, ACVR1C, PIK3□3, EG□L7, □EMA6A, CTGF, LSP1, TFPI | ■TEL/AML1 pozitif ve negatif toplam 26 örnekte birbirinden oldukça farklı bir ekspresyon profili izlenmiştir. Hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre hareketi ve yaralama yanıt gibi 5 farklı yolak ile 14 genin ekspresyonunda fark olduğu belirlenmiştir. | (199) |
| **17** | Simons (2011), Hollanda. | n:60 | B-ALL/ T-ALL ( pediatrik/ erişkin) | ■Affymetrix GeneChip 250k (□spI) SNP array platform çalışma sırasında kullanılmıştır. | ■SNP array ile DNA bazındaki değişimle□in incelenmesi | CDKN2A/B, ETV6, PAX5, ve IKZF | ■CDKN2A/B, ETV6, PAX5, ve IKZF1 genlerinde birden çok genetik lezyon nedeniyle ekspresyon değişimi bulmuşladır. 28 tane örnekte kopya sayısı değişimi tespit edilmiştir. | (200) |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **18** | Pitta (2005), İtalya | n:18 | (pediatrik B-ALL/T-ALL) | ■c-DNA mikroarray (Human Mikroaaray 2.0) yönte□ini kullanmışlardır. | ■ Çalışmanın amacı, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisinin n pathogenezini ve biyolojini aydınlatabilmek için bu yolaklar ile ilgili yeni aday genler belirleyebilmektir. | 4670 gen ifadelenmesi | ■ Ekspresyon çalışması sonucunda, lösemi hastaları ifade edilen genlere göre 3 ayrı sınıflandırma içine girmişlerdir: T-ALL, B-ALL ve MLL/ AF4 taşıyan B-ALL. ■ Bu 3 sınıfın ayrılmasında 30 gen görev almıştır. Bu 30 gen daha sonra 17 hastadan olan başka bir kohort üzerinde mini-array platformunda taranmıştır ve T-ALL li hastalara göre B-ALL lilerde over ekspresyon gösteren 2 yeni gen belirlenmiştir (EMCN, USP33) | (201) |
| **19** | Hoffmann( 2006), Avusturalya | n:126 | (ALL' nin 6 alt grubu sınıflandırılmıştır (BCR-ABL/ E2A-PBXI/HIPERDIP/T-ALL/TEL-AML1)) | ■ HG-U133 oligonükleotid array ( Affimetrix) kullanılarak, Random Forest (RF) ve Robust Multi Array (RMA) algoritmalarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. | ■Çalışmanın amacı, 2 farklı array datasını karşılaştırabilmektir. | 26 gen | ■ Pediatrik ALL de risk sınıflandırması ve tanısal teşhisin doğru olarak gerçekleştirilmesi için gen ekspresyon platformunun standardizasyonun artırılabilmesi için yayınlanan diğer mikroarray çalışmalarının sonuçları ile karşılaştırılmıştır. ■ 26 adet gen ürünü sınıflandırma tahmini için önemli olarak gösterilmiştir ve 6 ALL alt grubunu sınıflandırabilmek için gerekli olan genlerin % 70 daha önce tanımlanmamıştı | (202) |
| **20** | Haferlac (2010) Amerika | n: 3334 | ( ALL, AML, c-ALL, B-ALL, T-ALL, AML□CLL ,MDS ) | ■ HG-U133 Plus 2.0 array ( Affimetrix) | ■ 11 farklı laboratuvardan gelen hasta profilleri ile biyo-marker bulunabilmesi Mikroarray yöntemi kullanılarak Lösemi gruplarında lenfoid maligniteleri sınıflandırabilmek amaçlanmıştır. HG-U133 Plus 2.0 ar□ay ( Affimetrix) çalışma sırasında kullanılmıştır. | 18 farklı alt tiplendirme/ gen ekspresyon ilişkisi | ■Gen ekspresyon profillenmesi hematolojik kanserlerin tanı ve tedavisinin doğru yapılabilirliği için önemli bir araçtır ve □öseminin moleküler gelişimin□ anlamaya yardımcı olmaktadır. 2096 hastayı bu çalışma sonucunda belirlenen 18 altgrubtan herhangi birine yerleştirebilmişlerdir. | (203) |
| **21** | Lİ (2009), Çin | n:100 ( Çocukluk çağı ALL) | Çocukluk çağı ALL | ■ HG-U133 Plu□ 2.□□array (Affimetri) | ■ ALL kemoterapatik tedaviye göre farklı cevap verebilen en az 12 alt türü olan heterojen bir hastalıktır ve eğer doğru teşhis ve doğru tedavi uygulanabilirse 80% lere varan sağ kalım söz konusudur.■ Bu çalışmada, ALL sub grup sınıflandırabilinebilmesi için minimal s□yıda geni marker olarak seçebilmeyi amaçlamışlardır | 62 adet sınıflandırma marker gen | ■3 ALL mikroarray datalarını birleştirmişlerdir. İlk array seti HG-U95Av2 / n :535, ikinci set HG-U133A n:132, n:68 örnek içermektedir. Bu çalışmayı yaparken ALL alt gruplarını minimal sayıda gen ile belirleyebilmek amaçlanmıştır. 62 adet genni sub tiplemede marker olarak kullanabileceğini bildirmişlerdir. | (174) |
| **22** | Okamoto ( 2010), Singapur. | n: 75 yetişkin n: 399 pediatrik | yeni tanı yetişkin ve pediatrik ALL | ■Affimetrix□50 K ve 250 K SNP array in her ikisi de bu çalışmada kullanılmıştır. | ■ Çalışmanın amacı, akut lenfoblastik lösemisinin pathogenezini ve biyolojini aydınlatabilmek için bu yolaklar ile ilgili yeni aday g□nle□ belileyebilmektir. | | ■Yüksek duyarlıklı arrayler sonucunda 75 hastanının her biri için ortalama 7.6 genomik değişim tanımlanmıştır. Sıklıkla rastlanılan delesyonlar: 3p14.2 (FHIT), 5q33.3 (EBF), 6q, 9p21.3(CDKN2A/B), 9p13.2 (PAX5), 13q14.2 (RB1) ve17q11.2 (NF1) dir. Bu analizde bunların dışında yetişkin bireylerin TP53 kromozomal delesyonunun pediatrik gruba göre daha sıklıkla taşıdığı belirlenmiştir. | (204) |
| **23** | Yu (2011), Amerika | n:22 | Lösemik kemik iliği | Oligonükleotid tabanlı 133-k Whole genom mikrorray ile çalışma yapılmıştı□ (Signature OncoChip, manufactured by Roche Nimblegene) Dizayn edilen array de >1800 genden fazlası hedeflendirmiştir. | ■Fish ve karyotip analizi yapılan 22 lösemik kemik iliği örneği ilk olarak submikroskobik çalışmalara göre sınıflandırılmış ardından mikroarray çalışmasu y□pılması amaçlanmıştır.miRNA (17,19b,20a ) nında RT-PCR yöntemi ile ekspresyon seviyelerine bakılması amaçlanmıştır. | CDKN2A/CDKN2B | ■Mikroarray çalışması ve karyotip analizleri sonucunda CDKN2A/CDKN2B genlerinde sıklıkla mutasyonlar olduğu belirlenmiştir. | (205) |
| **24** | Torelli (2004) Amerika. | n: 16 | Yetişkin ALL | ■FLT3 geni U95Av2 Affimetrix Gene Chip array ile çalışma planlanmıştır | ■Bu çalışmada, (4;11) pozitif yetişkin ALL bireylerde FLT3 geninin patogenejik rolü,ekpresyon seviyesi, fosforilasyon seviyesinin tespiti ve olması muhtemel mutasyonların taranabilmesi amaçlanmıştır. Bu mutasyonu taşıyan 9 birey ve taşımayan 6 birey arasındaki genomik farkların ortaya konulması tasarlanmıştır. | FLT-3 | ■çalışma grubunda t (4;11) translokasyonunu taşıyan bireylerde FLT3 m-RNA seviyesinin artmış olduğu tespit edilmiştir ve bu western blot yöntemi ile doğrulanmıştır. FLT3 yüksek ekspresyon değerleri AML Bireylerde oldukça sık görülmektedir. Transmembran bölgesindeki ITD tandem duplikasyonları 30 %□oranında rastlanmaktadır. | (206) |
| **25** | Kawamata (2008), Amerika | n: 399 | 1-18 yaş arası 399 pediatric ALL | ■Remisyon kemik iliği örneklerinden çalışılmıştır. 50 000/250 000 SNP bölgesi DNA mikroarray ile taranmıştır. | ■Çalışmada; yüksek çözünürlükle ve verimle, 399 pediatrik ALL vakasının oluşturduğu kohorta moleküler karyotip değişiklerinin bulunması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar klinik veriler ile karşılaştırarak prognoz sınıflandırılması yapılabilecektir. | ETV6- P16ınk4 | ■Çalışma sonucunda, 3 genel genetik değişim belirlenmiştir. ETV6 ve P16ınk4 delesyonu ve birden çok hiperdiploidi keşfedilmiştir. 17. ve 18. kromozomlarında oluşan hiperdiploidi sonucunda kötü prognoz ile ilişkilidir. | (207) |
| **26** | Usvasova (2010), Finlandiya | n.50□ □□ □ | | ■□NA kopya sayısı değişimi | ■ Bu yaş grubundaki hastaların relaps riskinde önemli olduğu için makalede bakılan genlerin DNA kopya sayısı değişimi temel alınarak çalışma karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon yöntemiyle yapılmıştır. ■ Çalışmada bakılan genle□in prognostik sınıflandırılmasının yapılması | BAK1, CDKN2B GSTM1, MT1F | ■ Tanımlanan gen profili ile artan relaps riski birbiriyle ilişkilidir. Sonuçlara göre yeni bir risk sınıflandırması tasarlanmıştır. ■ Ölçülen kopya sayısı miktarı relaps riski miktarıyl□ profillendirilerek iki prognostik model sunulmuştur. | (208) |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **27** | Usvasova (2010), Finlandiya | n:□0 | yaş:10-25 ALL | ■CGH array | ■ Karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon (CGH) yöntemi kullanılarak v□rilen yaş aralığındaki hastalarda, DNA kopya sayısı değişimi belirlenmesi amaçlanmıştır. | | ■Hastaların 85% inde anormallik tespit edilmiştir 9p 21.3 delesyonu en çok belirlenen anomali olmuştur. | (209) |
| **28** | Akiyama (2008), Tokyo. | n:20 | öncü B□ hücreli - ALL pediatrik | ■TRANSPAC ve TRANSPATH sinyal yolakları üzerinde proglamlama çalışaması | ■Sinyal çevirici yolaklar, transkripsiyon faktörlerine bilgilerin aktarılmasında görev yapmaktadırlar, bu faktörlerin uyardığı genlerin ekspresyonu için mikroarray kullanılmaktadır.Bu yolaklar ile yapılan mikroarray çalışmaları skorlanarak sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. | ER,IL-1,fMLP,TLR,EDAR, ınsulin, TPO6, PRLN6, EGF, VEGF,PDGF VS. | ■Çalışmanın sonuçlarında transkripsyon faktörlerinin down regüle etmiş olduğu sinyal yolaklarından bazıları belirlenmiştir. Bu sinyal yollaklar bilgileri TRANSPATH ve TRANPAC veritabanından alınmıştır. | (210) |
| **29** | Alveraz (2005), İspanya | n:56 | öncü B□ hücreli - ALL pediatrik | ■Konvensiyonel sitogenetik/ FISH | ■Çalışmanın amacı, ETV-RUNX1 pozitif olan hastalarda ikincil genetik değişimlerin saptanabilmesi amaçlanmıştır. | ETV6/RUNX1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre, hastaların %71,4 ETV6 allelini taşımaktadır ve ETVRUNX1 rearanjmanı iyi prognostik belirteçtir. | (211) |
| **30** | Kadam ( 2008), Hindistan | n:76 | öncü B hücreli - ALL pediatrik | ■Konvensiyonel sitogenetik/ FISH | ■Çalışmanın amacı, ETV6-RUNX1 pozitif olan hastalarda ikincil genetik değişimlerin saptanabilmesi amaçlanarak yeni önc□ B- Hücreli ALL alt tipleri oluşturmaktır. | ETV6/RUNX1,MLL | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; ETV6-RUNX1 ve MLL poz□tif vakalar yeni bir□alt tip oluştura□ilir. | (212) |
| **31** | Kuiper (2010), Hollanda | n:30 | 1-18 yaş arası öncü B hücreli -ALL pediatrik | ■Affymetrix Human GeneChip Mapping 250K NSP arrays | ■□Çalışmanın amacı; Nüksü öngörebilecek prognostik markeleri belirleyebilmektir. | IKZF1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; IKZF1 değişimleri nüks vakalarında 12 kat diğer genlere göre etkil□ olduğu sonucuna varılmıştır. | (213) |
| **32** | Tang (2011), Amerika | n:457 | öncü B-ALL yetişkin | ■Konvensiyonel sitogenetik/□FISH | ■Çalışmanın amacı; Hastalarda lösemi öncesi olan hematolojik malignitelerin beli□lenmesi ve bunların prognostik önemi belirlenmesi amaçlanmıştı□. | – | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; t( 4,11), hipodiploid 5,7,17ile birlikte görülmesi kötü prognoz ile ilişkilidir. | (214) |
| **33** | Kang (2011), □Amerika | n:207 | 1-18 yaş arası öncü B hücreli -ALL pediatrik | ■HG_U133A_Plus2.0 oligonucleotide microarrays (Affymetrix) | ■çalışmanın amacı; Yüksek risk öncü B-ALL bireylerde, çeşitli sitogenetik anomaliler olan bireylerde risk sınıflandırılması ve prognoz için biyobelirteçl□rin bulunabilmesidir. | JAK2,IKZF1 | ■Çalışamanın sonuçlarına göre; JAK2-IKZF1 delesyonları taşımak yüksek risk öncü B-hücreli lösemi için kötü prognostik f□ktördür. | (215) |
| **34** | Van Bodegom (2012), Amerika | | Ba/F3 (ATCC) Hücre hattı | | ■ amacı; Yetişkin ve çocukluk çağı B-hücreli lenfoblastik lösemilerinin yaklaşık olarak %10 unda aşırı ekspresyon gösterdiği bildirilen CRFL2 kötü prognoz ile ilişkilidir. CRFL2 geninde olan rearanjmanlar nedeniyle transkripsiyonel kontrolü değişmektedir. TSLP sinyal bileşeni ile CRFL2 nin aşırı ekspresyonuna neden olan fonksiyon kazanım mutasyonları (JAK1-JAK2 gen mutasyonları, korunmuş bölgedeki ILR7 sistein homodimerizasyonları, CRFL2 heterodimerizasyonu ve CRFL2 jukstamembran domaininde F232C değişimi) daha önce yapılan çalışmalarında bildirilmişlerd□□. Bu çalışmalarında CRLF2/JAK2 mutant hücre□erde TSLP çalışmasını belirlemeyi amaçlamışlardır. | CRLF2, JAK2, TSLP | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; CRLF2 ve JAK2 yanısıra TSLP ninde önemli görevi olduğunu bildirmişlerdir. | (216) |
| **35** | Morishita (2012), Japan | n:21 | öncü B hücreli - ALL pediatrik | ■ Q-PCR | ■Çalışmanın amacı; Akt gen yolağı mekanizması ve lösemi arasındaki ilişkinin belirlenebi□mesi amaçlan□ıştır. | Akt | ■ Çalışmanın sonuçlarına göre; Akt yolağI öncü B-hücreli lösemide kemoterapi direnç mekanizmasında□rol oynar, relaps olan bireylerde teröpatik amaçlı olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. | (217) |
| **36** | Primo ( 2010), İspanya | n:46 | öncü B-ALL yetişkin | ■FISH, Flow | ■Çalışmanın amacı; Ph pozitifliği lösemi patogenezinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir, Ph Kromozom (-), trizomi 8, trizomi 7 kromozomal değişimlerinin sıklığı belirlenmesi amaçlanmıştı | – | ■Çalışamanın sonuçlarına göre; Sağkalım durumlarına göre bu kromozomal değişimlerin prognostik belirteç olduğu sonucuna varmışlardır. | (218) |
| **37** | Berger (2001), Fransa | n:1 | Pediatrik öncü B ALL | ■Konvensiyonel sitogeneti□/ FISH | ■Çalışmanın amacı; t(14;14) translokasyonun sonucunda 14. kromozom üzerinde bulunan genlerin( TCL1a, TCL1b) de bulunan değişimlerin lösemi patogenezi üzerinde etkisi olup olmadığını □elirlemeye çalışmışlardır. | TCL1a, TCL1b | ■Çalışmanın sonuçlarına□göre; Değişimlerin lösemi□patogenezi üzerinde etkisi olmadığı bildirilmişlerdir. | (219) |
| **38** | Kühnl( 2011), Almanya | n:282 | öncü B-ALL yetişkin | ■ Q-PCR | ■Çalışmanın amacı; LEF-1 proteini Wnt Yolağında anahtar olarak görev yapmaktadır. T-hücreli lösemi de önemi belirtilen bu genin B-hücreli lösemi üzerinde etkisine bakılma□ı amaçlanmış ve prognostik bir değeri olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. | LEF1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; LEF-1 ifadelenme düzeyi yüksek bulunmuştur. .Wnt sinyal yolağına etki edebilecek terapötik ajanla□ kullanılabilir. | (220) |
| **39** | Fais (2006), İtalya | n:80 | Pediatrik öncü B ALL | ■Flow | ■Çalışmanın amacı; B-hücre serisi gelişimi sırasında b-hücre yüzeyinde bulunan Cd1d ekspresyonun öncü -b-ALL ile ilişkisinin belirlenmesidir. | Cd1D | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; CD1d ifade düzeyi kötü prognoz ile karakterizedir. | (221) |
| **40** | Krentz□(2013) | n:204 | Pediatrik öncü B ALL | ■ Q-PCR | ■ Çalışmanın amacı,ı akut lenfoblastik lösemisinin pathogenezini ve biyolojini aydınlatabilmek için bu yolaklar ile ilgili□yeni aday genler belirleyebilmektir. | CDKN2A/2B, IKZF1, PAX5, ETV6 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; En çok gen değişimi görülen genler (CDKN2A/2B, IKZF1, PAX5, ETV6, TP53) olarak belirlenmiştir. Risk sınıflandırılmasına göre genleri karakterize etmeleri sonucunda, orta risk grubunda bulunan hastalar IKZF1 ve TP53 gen değişimlerini | (222) |

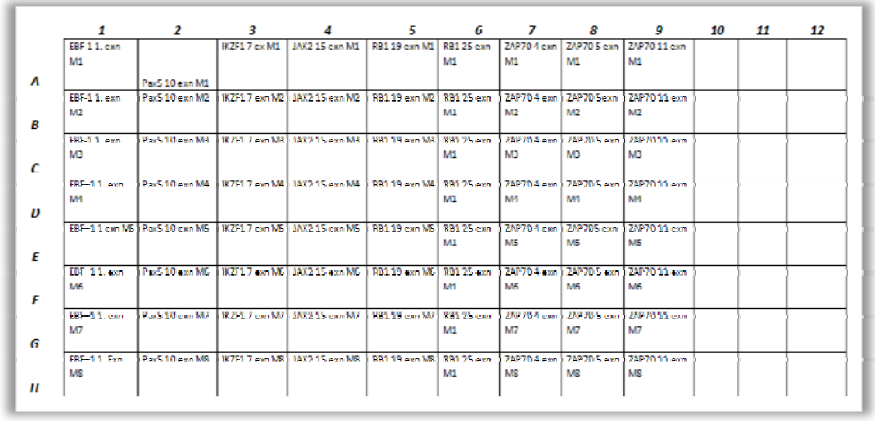
| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | sıklıkla taşımakta oldu□unu ve bu genlerin nüks için önemli bir prognostik marker olabileceği sonucuna varmışlardır. | |
| **41** | Moorman (2011), İngiltere | Derleme | | | Çalışmanın amacı; B-ALL de prognostik biyobelirteçlerinin öneminin belirlenemesidir. | | | (223) |
| **42** | Iacobucci (2010), İtalya | n:89 | B-ALL yetişkin | ■Human Mapping 250 K Nsp1, kopya sayısı değişimi | ■Çalışmanın amacı; Genellikle hedef olarak seçilen değişimler arasında ise; en sık görülen değişimi olan delesyonlar PAX–5 (paired box–5), B- ALL alt tipinde %30 sıklıkla görülmektedir. PAX–5 gen ürünü yetersizliği STAT–5 aktivasyonu ile birlikte görüldüğünde akut lenfoblastik lösemi başlamasına neden olabildiği rapor edilmiştir. PAX–5 geni, B hücre serisinin farklılaşması için önemli olan nükleusta lokalize olan paired box domain (PBD) transkripsyon faktörünü kodlamaktadır, tümör baskılayıcı özelliği nedeni ile epigenetik in aktivasyonunun tümör oluşumu ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın amacı PH pozitif bireylerde PAX-5 gen anomalilerin belirlenmesidir. | PAX-5 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; PAX-5 gen anomalileri bireylerin %33 ünde gözlenmiştir. Bu genin prognostik biyobelirteç olduğu ve B-ALL oluşum patogenezinde önemli olduğunu birkez daha ortaya koymuşlardır. | (138) |
| **43** | Wattel (1994), Fransa | n:503 | ALL, AML | ■PCR, RFLP | ■Çalışmanın amacı; P53 proteini, genomun bütünlüğünü korumada önemli rol oynamaktadır. p53'ün kanser tiplerinin %50'sinde inaktive edici mutasyon etkisi ile gende allel kaybı ve nokta mutasyonları gösterilmiştir. Farklı lösemi gruplarında P 53 gen anomalilerin değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır. | P53 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; P53 gen anomalilerin prognostik belirteç ve ilaç direnci ile ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır | (224) |
| **44** | Lens (1996), İngiltere | n:19 | B-PLL | ■PCR, RFLP | ■Çalışmanın amacı; B-PLL olgun B hücrelerde görülmekte olan agresif bir lösemi türüdür. Bu lösemi türünde, P 53 gen anomalilerin değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır. | P53 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; B-PLL ile P53 mutasyonları arasında bir ilişki kurulamamıştır. | (225) |
| **45** | Russell (2009), İngiltere | n:33 | Pediattrik öncü B - ALL | ■Konvensiyonel sitogenetik/ FISH/ Q-PCR | Çalışmanın amacı; sitokinler ve reseptörlerinin hematopoez de rol oynadığı bilinmektedir. Sitokinler ve reseptörleri doğrudan tirozin kinazlar ile de ilişkilidir. CRLF2 geninde olan kromozomal anamoliler ve gen ifadesinde olan değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. | CRLF2 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; 2 daha önce tanımlanmamış kromozomal anomali tespit edilmiştir. | (226) |
| **46** | Chen (2012), Amerika | n:1061 | Pediattrik öncü B - ALL | ■Sekanslama, DNA mikroarray | ■Çalışmanın amacı; CRLF2, IKZF1, JAK2 genlerinde olabilecek anomalilerin MRD izlenmesi için biyobelirteç olup olmadığı araştırılmıştırılması amaçlanmıştır. | CRLF2, JAK2, IKZF1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; CRLF2 ekspresyonun yüksek olmasının kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. | (227) |
| **47** | Yang (2011), Tayvan | n:242 | Pediattrik öncü B - ALL | ■MultİplexPCR | ■Çalışmanın amacı; Tasarlamış oldukları multiplex PCR metodları ile IKZF1 genleri mutasyonları belirlemeyi amaçlamışlardır. | IKZF1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; IKZF1 delesyonlarının prognostik belirteç olarak öncü b-hücreli ALL de kullanılabileceği öngörülmüştür. | (228) |
| **48** | Martinelli (2009), İtalya | n:83 | ALL yetişkin | ■SNP Mikroarray analiz,Affymetrix NspI 250□ and SNP6.0 arrays ( | ■Çalışmanın amacı; BCR-ABL pozitif bireylerde genomik anomalilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. | IKZF1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre;IKZF1 delesyonları %63 olarak saptanmıştır. | (229) |
| **49** | Iacobucci (2012), İspanya | n:144 | öncü B-ALL yetişkin | ■SNP Mikroarray analiz,Affymetrix250 K NspI and Genome-Wide Human SNP 6.0 arrays (Affymetrix□, Q-PCR, Sekanslama | ■Çalışmanın amacı; IKZF-1 (IKAROS) değişimi ise daha az sıklıkla ve genellikle delesyonlar ve nokta mutasyonları şeklinde ve yüksek risk grubunda bulunmaktadır. IKZF1 değişimi direkt olarak lösemi transkriptomunu etkileyebilir ve BCR-ABL pozitif olmadığı halde benzer bir kinaz aktivasyonu göstermekte olduğu ve bu nedenle BCR-ABL like lenfoblastik lösemi olarak adlandırılan bir alt tipin oluşmasına neden olmakta olduğu bildirilmiştir. IKZF1 lenfopoiezis ve kanser oluşumundaki rolü iyi çalışılmış bir transkripsiyon faktörüdür. Bu çalışmada IKZF1 mutasyonları belirlenmeye çalışılmıştır. | IKZF1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; IKZF1 delesyonları öncü B-hücreli ALL bireylerde sıklığı %71 olarak belirlenmiştir. | (230) |
| **50** | Mi (2012), Çin | n:1091 | ALL, yetişkin/ pediatrik | ■Konvensi□□nel sitogenetik/ FISH/ Q-PCR | ■Çalışmanın amacı; Büyük bir çalışma grubu hazırlanmıştır ve bu çalışma grubunda sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin değerlendirilip büyük bir veri elde edilmesi amaçlanmıştır. | CRLF□, JAK2, IKZF1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; Ph negatif lösemili bireylerde IKZF1 mutasyonları ve CRLF2 ekspresyonu yüksekliği belirlenmiştir. | (231) |
| **51** | Chaprio (2010), Fransa | n:60 | öncü B-ALL yetişkin/ pediatrik | Sekanslama,Q-PCR | ■Çalışmanın amacı; öncü b-hücreli lösemili bireylerde JAK2-TSLP genleri ifade düzeyleri ve mutasyonların etkisi incelenmesi amaçlanmıştır. | TSLPR,JAK2 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; TSLP mutasyonlarının öncü b-hücreli lösemi patogenezine sebep olabileceği rapor edilmiştir. | (232) |
| **52** | Bhatta (2012), Amerika | n:13 | B-hücre hatları | ■ Q-PCR, metilasyon analizi, protein analizi | ■Çalışmanın amacı; Epigenetik mekanizmalarda görev alan genlerin, ilaç dirençi, yeniden programlama, nüks belirteci olarak görev yapıp yapmadığını araştırmayı amaçlamışlardır. | Epigenetik yeniden programlama | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; Nüks ve ilaç etki mekanizmaları epigenetik mekanizmalar ile düzenlen□ektedir. | (233) |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **53** | Tesfai (2012,), Avusturalya | n:66 | Pediatrik öncü B-ALL | ■Mikroarray analizi | ■ Çalışmanın amacı, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisinin n pathogenezini ve biyolojini aydınlatabilmek için bu yolaklar ile ilgili yeni aday □enler belirleyebilmektir. | CTG,CXCR4,BMP-2,ILR7 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; İlgili genlerde gen ifade analizi değişimleri gözlemlenmiş ve bu genlerin prognostik belirteç olabileceği öngörülmüştür. | (234) |
| **64** | Fuka (2011), Avusturya | E/R-silenced REH (n:3)cells, AT-2 (n:3) cells (E/R-positive lösemik hücre hattı) | lösemik hücre hattı | ■ HG-U133-Plus 2 Array (Affimetrix) ile hücre hattında E/R knock-down gen ekspresyon değişimine bakılmış. | ■Çalışmanın amacı: Fonksiyonel değişimlere ait bir gen haritasının oluşturulabilmesidir. | ETV/RUNX1 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; KD Model analizine göre, endogenous backgrounddaki E/R ekspresyon sonuçlarının fonksiyonel haritasını oluşturmuşlar. | (235) |
| **55** | El Roubry (1993), Amerika | n:53 | B-CLL yetişkin | ■PCR, RFLP | ■Çalışmanın amacı; B-ALL bireylerde P53 geni gen anomalilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. | P53 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; P53 gen anomalilerin prognostik belirteç ve ilaç direnci ile ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır. | (236) |
| **56** | Cario (2010), Almanya | n:49 | 1-18 yaş arası | ■FISH, Q-PCR | ■Çalışmanın amacı; CRLF2 ifadlenme seviyesinin yüksek olması ile tedaviden sonuç alınması arasında bir ilişki olduğunu hipotez etmişlerdir. | CRLF2 | ■Çalışmanın sonuçlarına göre; Yüksek seviyelerde ifadelenmiş CRLF2, öncü B-hücreli lösemi için çocukluk çağı grubunda tedavi de önemlidir. | (237) |
| **57** | Usvasova (2009), Finlandiya | n: 231 | ALL (10- 25 yaş arası genç yeti□kin ve adolesens) . | ■İfadeleme analizi | ■P23 ısı şok proteini (Hsp90) şaporen kompleksinin önemli bir bileşenedir ve östrojen reseptor (ER) çalışmasında sinyal çevirici ve telomeraz aktivitesinde görev almaktadır. Ayrıca P23 telomer uzunluğu bakımı için gereklidir ve birden çok kanser tipinde malignant dokuların regüle edilmesinde rol oynadığı bildirilmişti.r■ Daha önce yapılan çalışmalarında 100 ALL çocuk kemik iliği örneğinde P23 ün over eksprese olduğunu rapor etmişlerdir fakat mekanizmasını açıklayamamışlardır. Bu çalışmanın amacı;p23 ekspresyon □atterninin belirlenmesi ve miRNA yanlış düzenlemesi ile p 23 over ekspresyonun lösemiye sebep olup olmadığıdır. | □p23 | ■Sonuç olarak, p23 ün miRNA 101 tarafından regüle edildiği ve çalışma grubunun tamamında down regüle olduğu belirlenmiştir. P23'ün anti□lösemik terapi için potansiyel bir aday olabileceği öngörülmüştür. | (208) |
| **58** | Liu ( 2012), Çin | n:100 | Çocukluk çağı ALL | ■Affim□trix Human Gene Focus Array çalışma sırasında kullanılmştır. | ■Çalışma sonucunda her iki hastada da 26 adet genin up regüle olduğunu, 5 genin ise ( terminal deoxynucleotidyl transferase,heparin-binding epidermal growth factorlike growth factor, pre-Blymphocytegenes 1 and 3, and immunoglobulin l-like polypeptide) down regüle olduğu sonucuna varmışladır. | 26 spesifik gen up regülasyonu/ 5 spesifik genin down regülasyonu | | (238) |
| **59** | Trentin (2009), Almanya. | n: 20 ( B-öncü ALL yetişkin birey) Tüm hastalar t( 4;11) ve (q21;23) pozitiftirler). | | MLL, HOX, AF4 gene HG-U133 Plus 2.0 oligonükleotid array kullanımıştır. | ■Bu çalışmada nadir bulunan t(4;11) translokasyonuna göre sınıflandırılan bireylerdeki genomik ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve deneysel veriler ile bir klinik belirteç bulunması amaçlanmıştır. | | ■186 adet genin regülayonunda farklılık olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma sayesinde,t (4;11) temelli 2 önemli tanımlayıcı işaret belirlenmiştir. Ayırıcı MLL translokasyonları ile birlikte olarak HOXA5, HOXA9 ve HOXA10 genlerinin up ve down regülasyonu tanımlanmıştır. | (239) |
| 60 | Breslin (2005), İsveç. | ER,IL-1,fMLP,TLR,EDAR, ınsulin, TPO6, PRLN6, EGF, VEGF,PDGFVS. | | TRANSPAC ve TRANSPATH sinyal yolakları | ■Sinyal çevirici yolaklar, transkripsiyon faktörlerine bilgilerin aktarılmasında görev yapmaktadırlar, bu faktörlerin uyardığı genlerin ekspresyonu için mikroarray kullanılmaktadır..Bu yolaklar ile yapılan mikroarray çalışmaları skorlanarak sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. | | ■Çalışmanın sonuçlarında transkripsyon faktörlerinin down regüle etmiş olduğu sinyal yolaklarından bazıları belirlenmiştir. Bu sinyal yollaklar bilgileri TRANSPATH ve TRANPAC veritabanından alınmıştır. | (240) |

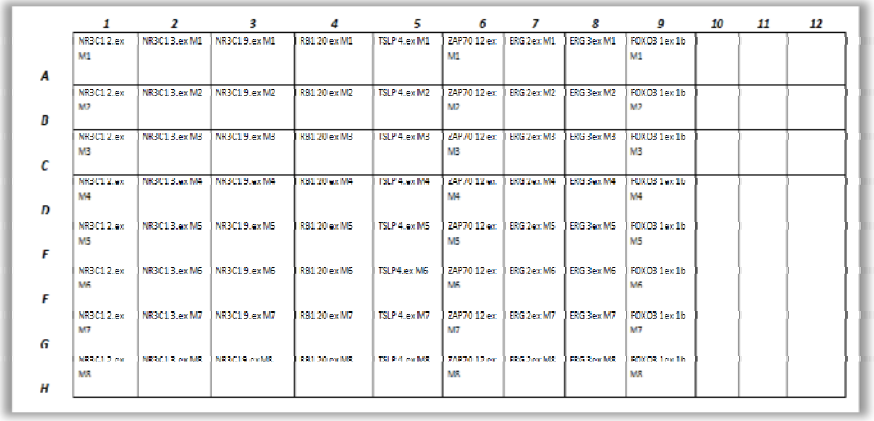
## EK-3

### Mutasyon analizleri aşamalarında kullanılmış olan primer çiftlerinin yerleşimi

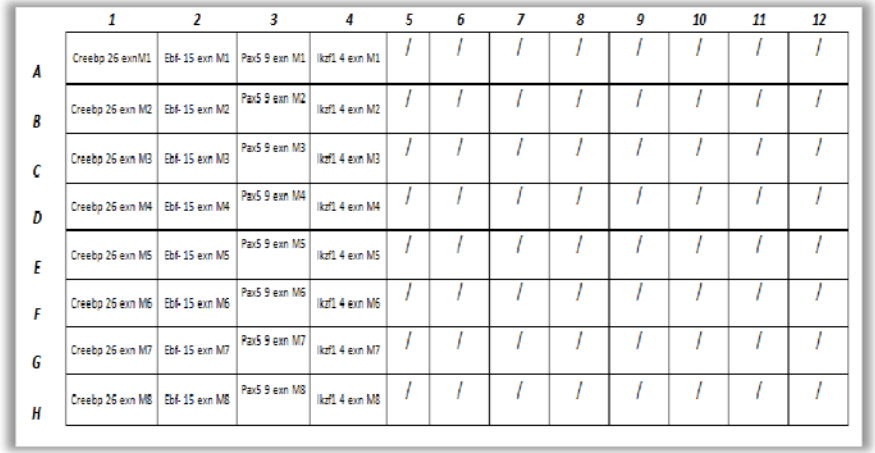
Çizelge 8.2. Primer çiftlerinin 96 kuyulu çalışma platelerine yerleşim görüntüsü



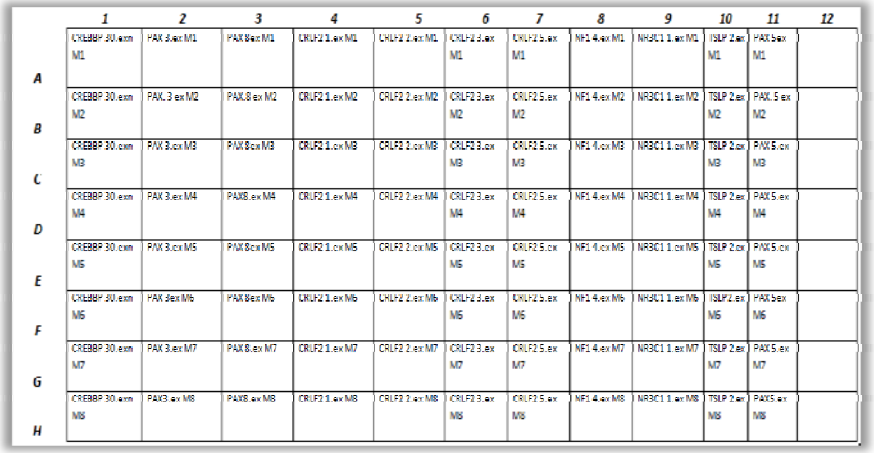
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | EBF 1 1. exn M1 | Pax5 10 exn M1 | IKZF1 7 exn M1 | JAK2 15 exn M1 | RB1 19 exn M1 | RB1 25 exn M1 | ZAP70 1 exn M1 | ZAP70 5 exn M1 | ZAP70 11 exn M1 | | | |
| B | EBF-1 1. exn M2 | Pax5 10 exn M2 | IKZF1 7 exn M2 | JAK2 15 exn M2 | RB1 19 exn M2 | RB1 25 exn M2 | ZAP70 4 exn M2 | ZAP70 5exn M2 | ZAP70 11 exn M2 | | | |
| C | EBF-1 1. exn M3 | Pax5 10 exn M3 | IKZF1 7 exn M3 | JAK2 15 exn M3 | RB1 19 exn M3 | RB1 25 exn M1 | ZAP70 4 exn M2 | ZAP70 5 exn M3 | ZAP70 11 exn M3 | | | |
| D | EBF-1 1. exn M4 | Pax5 10 exn M4 | IKZF1 7 exn M4 | JAK2 15 exn M4 | RB1 19 exn M4 | RB1 25 exn M1 | ZAP70 4 exn M1 | ZAP70 5 exn M1 | ZAP70 11 exn M1 | | | |
| E | EBF-1 1 exn M5 | Pax5 10 exn M5 | IKZF1 7 exn M5 | JAK2 15 exn M5 | RB1 19 exn M5 | RB1 25 exn M1 | ZAP70 4 exn M5 | ZAP70 5 exn M5 | ZAP70 11 exn M5 | | | |
| F | EBF 1 1. exn M6 | Pax5 10 exn M6 | IKZF1 7 exn M6 | JAK2 15 exn M6 | RB1 19 exn M6 | RB1 25 exn M1 | ZAP70 4 exn M6 | ZAP70 5 exn M6 | ZAP70 11 exn M6 | | | |
| G | EBF-1 1. exn M7 | Pax5 10 exn M7 | IKZF1 7 exn M7 | JAK2 15 exn M7 | RB1 19 exn M7 | RB1 25 exn M1 | ZAP70 4 exn M7 | ZAP70 5 exn M7 | ZAP70 11 exn M7 | | | |
| H | EBF-1 1. Exn M8 | Pax5 10 exn M8 | IKZF1 7 exn M8 | JAK2 15 exn M8 | RB1 19 exn M8 | RB1 25 exn M1 | ZAP70 4 exn M8 | ZAP70 5 exn M8 | ZAP70 11 exn M8 | | | |



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | NR3C1 2.ex M1 | NR3C1 3.ex M1 | NR3C1 9.ex M1 | RB1 20 ex M1 | TSLP 4.ex M1 | ZAP70 12 ex M1 | ERG 2ex M1 | ERG 3ex M1 | FOXO3 1 ex 1b M1 | | | |
| B | NR3C1 2.ex M2 | NR3C1 3.ex M2 | NR3C1 9.ex M2 | RB1 20 ex M2 | TSLP 4.ex M2 | ZAP70 12 ex M2 | ERG 2ex M2 | ERG 3ex M2 | FOXO3 1 ex 1b M2 | | | |
| C | NR3C1 2.ex M3 | NR3C1 3.ex M3 | NR3C1 9.ex M3 | RB1 20 ex M3 | TSLP 4.ex M3 | ZAP70 12 ex M3 | ERG 2ex M3 | ERG 3ex M3 | FOXO3 1 ex 1b M3 | | | |
| D | NR3C1 2.ex M4 | NR3C1 3.ex M4 | NR3C1 9.ex M4 | RB1 20 ex M4 | TSLP 4.ex M4 | ZAP70 12 ex M4 | ERG 2ex M4 | ERG 3ex M4 | FOXO3 1 ex 1b M4 | | | |
| E | NR3C1 2.ex M5 | NR3C1 3.ex M5 | NR3C1 9.ex M5 | RB1 20 ex M5 | TSLP 4.ex M5 | ZAP70 12 ex M5 | ERG 2ex M5 | ERG 3ex M5 | FOXO3 1 ex 1b M5 | | | |
| F | NR3C1 2.ex M6 | NR3C1 3.ex M6 | NR3C1 9.ex M6 | RB1 20 ex M6 | TSLP4.ex M6 | ZAP70 12 ex M6 | ERG 2ex M6 | ERG 3ex M6 | FOXO3 1 ex 1b M6 | | | |
| F | NR3C1 2.ex M7 | NR3C1 3.ex M7 | NR3C1 9.ex M7 | RB1 20 ex M7 | TSLP 4.ex M7 | ZAP70 12 ex M7 | ERG 2ex M7 | ERG 3ex M7 | FOXO3 1 ex 1b M7 | | | |
| G | NR3C1 2.ex M8 | NR3C1 3.ex M8 | NR3C1 9.ex M8 | RB1 20 ex M8 | TSLP 4.ex M8 | ZAP70 12 ex M8 | ERG 2ex M8 | ERG 3ex M8 | FOXO3 1 ex 1b M8 | | | |



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Creebp 26 exnM1 | Ebf- 15 exn M1 | Pax5 9 exn M1 | Ikzf1 4 exn M1 | / | / | / | / | / | / | / | / |
| B | Creebp 26 exn M2 | Ebf- 15 exn M2 | Pax5 9 exn M2 | Ikzf1 4 exn M2 | / | / | / | / | / | / | / | / |
| C | Creebp 26 exn M3 | Ebf- 15 exn M3 | Pax5 9 exn M3 | Ikzf1 4 exn M3 | / | / | / | / | / | / | / | / |
| D | Creebp 26 exn M4 | Ebf- 15 exn M4 | Pax5 9 exn M4 | Ikzf1 4 exn M4 | / | / | / | / | / | / | / | / |
| E | Creebp 26 exn M5 | Ebf- 15 exn M5 | Pax5 9 exn M5 | Ikzf1 4 exn M5 | / | / | / | / | / | / | / | / |
| F | Creebp 26 exn M6 | Ebf- 15 exn M6 | Pax5 9 exn M6 | Ikzf1 4 exn M6 | / | / | / | / | / | / | / | / |
| G | Creebp 26 exn M7 | Ebf- 15 exn M7 | Pax5 9 exn M7 | Ikzf1 4 exn M7 | / | / | / | / | / | / | / | / |
| H | Creebp 26 exn M8 | Ebf- 15 exn M8 | Pax5 9 exn M8 | Ikzf1 4 exn M8 | / | / | / | / | / | / | / | / |



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | CREBBP 30.exn M1 | PAX 3.ex M1 | PAX8 ex M1 | CRLF2 1.ex M1 | CRLF2 2.ex M1 | CRLF2 3.ex M1 | CRLF2 5.ex M1 | NR1 4.ex M1 | NR3C1 1.ex M1 | TSLP 2.ex M1 | PAX5 ex M1 | |
| B | CREBBP 30.exn M2 | PAX. 3 ex M2 | PAX.8 ex M2 | CRLF2 1.ex M2 | CRLF2 2.ex M2 | CRLF2 3.ex M2 | CRLF2 5.ex M2 | NR1 4.ex M2 | NR3C1 1.ex M2 | TSLP 2.ex M2 | PAX.5 ex M2 | |
| C | CREBBP 30.exn M3 | PAX 3.ex M3 | PAX8 ex M3 | CRLF2 1.ex M3 | CRLF2 2.ex M3 | CRLF2 3.ex M3 | CRLF2 5.ex M3 | NR1 4.ex M3 | NR3C1 1.ex M3 | TSLP 2.ex M3 | PAX5.ex M3 | |
| D | CREBBP 30.exn M4 | PAX 3.ex M4 | PAX8.ex M4 | CRLF2 1.ex M4 | CRLF2 2.ex M4 | CRLF2 3.ex M4 | CRLF2 5.ex M4 | NR1 4.ex M4 | NR3C1 1.ex M4 | TSLP 2.ex M4 | PAX5.ex M4 | |
| E | CREBBP 30.exn M5 | PAX 3.ex M5 | PAX8 ex M5 | CRLF2 1.ex M5 | CRLF2 2.ex M5 | CRLF2 3.ex M5 | CRLF2 5.ex M5 | NR1 4.ex M5 | NR3C1 1.ex M5 | TSLP 2.ex M5 | PAX5.ex M5 | |
| F | CREBBP 30.exn M6 | PAX 3ex M6 | PAX8 ex M6 | CRLF2 1.ex M6 | CRLF2 2.ex M6 | CRLF2 3.ex M6 | CRLF2 5.ex M6 | NR1 4.ex M6 | NR3C1 1.ex M6 | TSLP 2.ex M6 | PAX 5ex M6 | |
| G | CREBBP 30.exn M7 | PAX 3.ex M7 | PAX8.ex M7 | CRLF2 1.ex M7 | CRLF2 2.ex M7 | CRLF2 3.ex M7 | CRLF2 5.ex M7 | NR1 4.ex M7 | NR3C1 1.ex M7 | TSLP 2.ex M7 | PAX5.ex M7 | |
| H | CREBBP 30.exn M8 | PAX3.ex M8 | PAX8.ex M8 | CRLF2 1.ex M8 | CRLF2 2.ex M8 | CRLF2 3.ex M8 | CRLF2 5.ex M8 | NR1 4.ex M8 | NR3C1 1.ex M8 | TSLP 2.ex M8 | PAX5.ex M8 | |

## EK-4

### Gen ifade analizleri aşamalarında çalışma örneklerinin yerleşimi

Çizelge 8.3. Çalışma örneklerinin çalışma platelerine yerleşimi

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | H1 | H1 | H1 | H9 | H9 | H9 | K5 | K5 | K5 | Std 2 | Std 2 | Std 2 |
| B | H2 | H2 | H2 | H10 | H10 | H10 | K6 | K6 | K6 | Std 3 | Std 3 | Std 3 |
| C | H3 | H3 | H3 | H11 | H11 | H11 | K7 | K7 | K7 | Std 4 | Std 4 | Std 4 |
| D | H4 | H4 | H4 | H12 | H12 | H12 | K8 | K8 | K8 | Std 5 | Std 5 | Std 5 |
| E | H5 | H5 | H5 | K1 | K1 | K1 | K9 | K9 | K9 | Std 6 | Std 6 | Std 6 |
| F | H6 | H6 | H6 | K2 | K2 | K2 | K10 | K10 | K10 | Std 7 | Std 7 | Std 7 |
| G | H7 | H7 | H7 | K3 | K3 | K3 | IM-9 hücre hattı | IM-9 hücre hattı | IM-9 hücre hattı | Neg kontrol | Neg kontrol | Neg kontrol |
| H | H8 | H8 | H8 | K4 | K4 | K4 | Std 1 | Std 1 | Std 1 | / | / | / |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | H13 | H13 | H13 | H21 | H21 | H21 | H29 | H29 | H29 | Std 2 | Std 2 | Std 2 |
| B | H14 | H14 | H14 | H22 | H22 | H22 | H30 | H30 | H30 | Std 3 | Std 3 | Std 3 |
| C | H15 | H15 | H15 | H23 | H23 | H23 | H31 | H31 | H31 | Std 4 | Std 4 | Std 4 |
| D | H16 | H16 | H16 | H24 | H24 | H24 | H32 | H32 | H32 | Std 5 | Std 5 | Std 5 |
| E | H17 | H17 | H17 | H25 | H25 | H25 | H33 | H33 | H33 | Std 6 | Std 6 | Std 6 |
| F | H18 | H18 | H18 | H26 | H26 | H26 | H34 | H34 | H34 | Std 7 | Std 7 | Std 7 |
| G | H19 | H19 | H19 | H27 | H27 | H27 | IM-9 hücre hattı | IM-9 hücre hattı | IM-9 hücre hattı | Neg kontrol | Neg kontrol | Neg kontrol |
| H | H20 | H20 | H20 | H28 | H28 | H28 | Std 1 | Std 1 | Std 1 | / | / | / |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | H35 | H35 | H35 | H43 | H43 | H43 | Std 5 | Std 5 | Std 5 | / | / | / |
| B | H36 | H36 | H36 | H44 | H44 | H44 | Std 6 | Std 6 | Std 6 | / | / | / |
| C | H37 | H37 | H37 | H45 | H45 | H45 | Std 7 | Std 7 | Std 7 | / | / | / |
| D | H38 | H38 | H38 | IM-9 hücre hattı | IM-9 hücre hattı | IM-9 hücre hattı | Neg kontrol | Neg kontrol | Neg kontrol | / | / | / |
| E | H39 | H39 | H39 | Std 1 | Std 1 | Std 1 | / | / | / | / | / | / |
| F | H40 | H40 | H40 | Std 2 | Std 2 | Std 2 | / | / | / | / | / | / |
| G | H41 | H41 | H41 | Std 3 | Std 3 | Std 3 | / | / | / | / | / | / |
| H | H42 | H42 | H42 | Std 4 | Std 4 | Std 4 | / | / | / | / | / | / |

## EK- 5 Çalışma örneklerine ait elde edilen demografik, klinik ve tanısal bilgiler

Çizelge 8.4.Hasta ve kontrol grubu örneklerine ait demografik, klinik ve tanısal parametreler

| Örnek No | Adı-Soyadı | Cinsiyet | Yaş | Tanı | Tedavi Durumu | Risk Grubu | Verilen protokol | WBC Count | Relaps - Remisyon Durumu | Sağ Kalım Analiz Sonuçları | SSS Tutulumu | Glukokortikoid Direnci | KİT durumu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **H-1** | MAT | Erkek | NA | MY+ Pre-B ALL | TD | Orta | ALL BFM 95 | 3600 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-2** | NA | Kız | 8 | My+ Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 10200 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-3** | AA | Erkek | 9 | My+Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 2002 | 2300 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-4** | OK | Erkek | 11 | My+Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 8600 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-5** | ŞK | Kız | 4 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Standart | ALLIC BFM 2002 | 3000 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-6** | MT | Kız | 7 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 12500 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-7** | YE | Erkek | 4 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 2600 | Remisyon | SAĞ | YOK | VAR | HAYIR |
| **H-8** | RD | Kız | 7 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 3200 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-9** | BA | Kız | 10 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 3800 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-10** | ÖS | Kız | 6 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Yüksek | CCG 1961 | 3500 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-11** | EY | Kız | 3 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 2200 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-12** | EG | Kız | 12 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Yüksek | ALL BFM 95 | 43900 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-13** | ZD | Kız | 9 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 4500 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-14** | MAK | Erkek | 9 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 96 | 8400 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-15** | YD | Erkek | 3 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 600 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-16** | MEG | Erkek | 3 | My+ Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 23000 | Remisyon | SAĞ | VAR | YOK | HAYIR |
| **H-17** | ESD | Kız | 2 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Orta | ALLIC BFM 2002 | 131000 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-18** | UÖ (R) | Erkek | 8 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Yüksek | BFM 95 CCG | 1100 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-19** | HS | Kız | 15 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 36000 | TEDAVİ SIRASINDA EX | EX | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-20** | MAY | Erkek | 4 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 25300 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-21** | MKÜ | Erkek | 4 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Standart | ALLIC BFM 2002 | 1300 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-22** | EA | Erkek | 6 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Orta | ALL BFM 95 | 20300 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-23** | HB | Kız | 13 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | NA | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-24** | DA | Kız | 8 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 39500 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-25** | KE | Erkek | 15 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 12400 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-26** | BÖ | Erkek | 11 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Yüksek | ALL BFM 95 | 125000 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-27** | SNG | Kız | 9 | My+ pre B ALL | TD | Orta | ALL BFM 2002 | 6400 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-28** | AEA | Erkek | 9 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 118000 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-29** | RA | Kız | 11 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Yüksek | ALL BFM 95 | 12500 | Remisyon | SAĞ | YOK | VAR | HAYIR |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **H-30** | HEİ | Kız | 7 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Yüksek | ALL BFM 95 | 125700 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-31** | RY | Kız | 3 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 4100 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-32** | ÖD | Kız | 11 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 1850 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-33** | MA | Erkek | 4 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Standart | ALLIC BFM 2009 | 2000 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-34** | BA | Erkek | 2 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Orta | ALLIC BFM 2009 | NA | Exitus | EX | | | HAYIR |
| **H-35** | NG | Kız | 3 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Standart | ALLIC BFM 2009 | 5100 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-36** | MOA | Erkek | 6 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Orta | ALL BFM 95 | 19000 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-37** | ÖP | Kız | 4 aylık | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Yüksek | ALL BFM 95 | NA | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | EVET |
| **H-38** | LS | Erkek | 8 | Prekürsör B hücreli ALL | TD | Orta | ALL BFM 95 | 19000 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-39** | SF | Kız | 15 | Erken Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 1700 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-40** | BK | Kız | 15 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 1780 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-41** | AEK | Erkek | 4 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Standart | ALL BFM 95 | 14200 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-42** | BK | Erkek | 6 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Yüksek | ALL BFM 95 | 94000 | Remisyon | SAĞ | YOK | VAR | HAYIR |
| **H-43** | ATÇ | Erkek | 10 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 2610 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **H-44** | ATT | Erkek | 10 | My+ PrePrekürsör B hücreli ALL | TB | Yüksek | ALL BFM 95 | 26600 | Remisyon | SAĞ | YOK | VAR | HAYIR |
| **H-45** | BA | Erkek | 12 | Prekürsör B hücreli ALL | TB | Orta | ALL BFM 95 | 1200 | Remisyon | SAĞ | YOK | YOK | HAYIR |
| **K-1** | EA | Erkek | 13 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-2** | BÇ | Kız | 9 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-3** | GG | Kız | 8 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-4** | ZG | Kız | 8 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-5** | GG | Kız | 7 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-6** | ÖS | Erkek | 13 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-7** | SG | Kız | 11 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-8** | YA | Erkek | 9 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-9** | ZS | Kız | 6 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |
| **K-10** | İÇ | Erkek | 7 | Sağlıklı Çocuk | | | | | | | | | |

(R ): Relaps
TB:TedavisiBiten
TD: Tedavisi Devam Eden

## EK- 6 Mutasyon analizleri aşamalarında yapılmış olan picogreen ölçüm sonuçları

Çizelge 8.5.Pürifikasyon sonrası amplikon kütüphanelerinin picogreen ölçüm sonuçları

| Hasta No | *EBF1* (1 ekz) | *EBF1* ( 15 ekz) | *CREEBP* (26 ekz) | *CREEBP* (30 ekz) | *IKZF1* (4 ekz) | *IKZF1* (7 ekz) | *IKZF1* (8 ekz) | *PAX5* (3 ekz) | *PAX5* (5 ekz) | *PAX5* (6 ekz) | *PAX5* (8 ekz) | *PAX5* (9 ekz) | *PAX5* (10 ekz) | *CRLF2* (1 ekz) | *CRLF2* (2 ekz) | *CRLF2* (3 ekz) | *CRLF2* (4 ekz) | *CRLF2* (5 ekz) | *JAK2* (12 ekz) | *JAK2* (14 ekz) | *JAK2* (15 ekz) | *JAK2* (16 ekz) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 27,62 | 31,06 | 33,27 | 3,64 | 31,58 | 39,39 | 35,58 | 31,23 | 26,08 | 25,25 | 4,83 | 25,88 | 32,31 | 37,42 | 15,42 | 32,90 | 23,96 | 42,76 | 12,05 | 9,35 | 19,34 | 3,73 |
| **2** | 19,49 | 19,46 | 30,53 | 3,32 | 33,28 | 31,37 | 23,70 | 33,29 | 26,62 | 16,74 | 5,75 | 11,88 | 16,00 | 5,12 | 10,89 | 3,55 | 8,59 | 15,95 | 5,37 | 3,97 | 10,37 | 9,12 |
| **3** | 30,70 | 21,75 | 25,24 | 4,11 | 37,08 | 39,93 | 25,41 | 44,77 | 43,70 | 28,68 | 19,14 | 20,14 | 43,18 | 12,72 | 23,93 | 15,08 | 11,05 | 41,49 | 24,25 | 9,40 | 31,86 | 22,00 |
| **4** | 29,79 | 28,68 | 45,52 | 4,00 | 46,49 | 39,61 | 33,85 | 41,98 | 40,22 | 38,58 | 15,56 | 11,47 | 42,01 | 31,49 | 12,22 | 55,22 | 21,04 | 50,67 | 20,63 | 27,54 | 38,42 | 18,15 |
| **5** | 36,42 | 29,36 | 45,84 | 4,00 | 42,50 | 29,12 | 36,73 | 52,72 | 50,86 | 30,06 | 17,70 | 31,41 | 16,28 | 36,15 | 20,84 | 33,90 | 21,37 | 26,77 | 16,14 | 30,48 | 29,78 | 7,42 |
| **6** | 41,89 | 29,10 | 43,98 | 3,38 | 40,77 | 35,27 | 27,17 | 37,78 | 29,29 | 35,78 | 19,47 | 18,99 | 31,44 | 32,18 | 49,55 | 42,95 | 36,12 | 39,29 | 2,82 | 5,50 | 39,59 | 19,27 |
| **7** | 26,26 | 23,15 | 35,87 | 3,01 | 39,54 | 24,64 | 30,22 | 32,07 | 35,16 | 18,06 | 7,53 | 10,20 | 26,46 | 8,13 | 12,83 | 7,92 | 11,87 | 26,80 | 3,74 | 4,41 | 29,22 | 27,84 |
| **8** | 34,59 | 43,97 | 42,11 | 3,74 | 42,93 | 16,09 | 37,38 | 40,80 | 40,80 | 44,14 | 26,00 | 39,43 | 32,34 | 34,77 | 37,60 | 19,37 | 42,40 | 34,55 | 35,49 | 7,20 | 33,77 | 10,39 |
| **9** | 7,96 | 27,35 | 12,50 | 4,03 | 3,02 | 21,24 | 32,53 | 2,53 | 3,38 | 51,28 | 15,33 | 4,04 | 52,18 | 1,82 | 4,06 | 13,46 | 38,24 | 2,67 | 30,94 | 2,42 | 25,86 | 8,14 |
| **10** | 9,19 | 10,09 | 35,12 | 2,52 | 2,22 | 20,57 | 61,38 | 2,73 | 12,58 | 72,79 | 20,17 | 3,41 | 71,16 | 2,42 | 14,30 | 3,80 | 71,89 | 3,10 | 46,13 | 1,89 | 71,87 | 14,66 |
| **11** | 9,23 | 39,44 | 42,23 | 16,07 | 2,56 | 41,47 | 71,24 | 5,92 | 9,83 | 74,42 | 23,25 | 2,38 | 56,15 | 2,55 | 3,04 | 4,55 | 65,02 | 2,76 | 31,70 | 2,05 | 42,33 | 15,27 |
| **12** | 10,86 | 28,63 | 53,89 | 9,34 | 14,72 | 53,88 | 64,68 | 4,73 | 7,59 | 67,81 | 20,27 | 6,68 | 52,91 | 3,18 | 5,40 | 3,65 | 56,01 | 4,67 | 24,54 | 28,53 | 42,86 | 19,39 |
| **13** | 9,42 | 26,12 | 36,44 | 13,11 | 7,00 | 33,37 | 90,02 | 6,93 | 7,29 | 70,51 | 18,37 | 3,41 | 52,63 | 3,13 | 4,33 | 5,18 | 68,84 | 3,40 | 18,73 | 3,30 | 46,79 | 13,27 |
| **14** | 11,94 | 41,72 | 41,44 | 10,21 | 3,78 | 42,66 | 66,78 | 12,55 | 7,80 | 68,36 | 5,80 | 4,01 | 69,11 | 8,42 | 4,52 | 5,42 | 60,50 | 9,53 | 15,62 | 2,03 | 23,12 | 9,32 |
| **15** | 9,87 | 27,28 | 50,47 | 3,40 | 3,65 | 8,41 | 98,95 | 3,21 | 5,25 | 70,95 | 5,86 | 3,88 | 61,18 | 2,24 | 4,84 | 6,32 | 37,69 | 3,11 | 19,94 | 3,93 | 32,07 | 12,17 |
| **16** | 8,99 | 21,45 | 2,30 | 3,31 | 4,43 | 20,16 | 94,02 | 3,14 | 13,90 | 62,62 | 11,86 | 2,49 | 39,18 | 3,05 | 2,83 | 5,42 | 54,58 | 3,24 | 36,87 | 2,17 | 17,29 | 23,48 |
| **17** | 6,58 | 10,28 | 19,97 | 2,64 | 4,87 | 7,69 | 56,80 | 4,62 | 4,54 | 21,49 | 8,63 | 7,68 | 6,61 | 33,78 | 18,33 | 6,06 | 16,52 | 11,50 | 38,00 | 26,54 | 19,20 | 28,85 |
| **18** | 12,55 | 10,42 | 44,77 | 3,29 | 13,23 | 8,95 | 70,00 | 8,73 | 4,62 | 30,02 | 4,93 | 44,48 | 20,97 | 27,60 | 69,92 | 17,96 | 34,23 | 9,21 | 33,13 | 62,09 | 21,05 | 34,11 |
| **19** | 14,01 | 13,85 | 38,51 | 5,89 | 3,29 | 14,78 | 105,12 | 11,58 | 8,73 | 35,54 | 26,94 | 4,14 | 8,02 | 42,33 | 78,07 | 3,59 | 34,71 | 16,78 | 41,68 | 73,77 | 38,87 | 44,38 |
| **20** | 10,49 | 10,10 | 42,74 | 7,78 | 10,52 | 15,72 | 101,32 | 24,91 | 11,58 | 22,55 | 25,27 | 15,37 | 15,66 | 49,75 | 56,10 | 51,17 | 19,15 | 13,93 | 26,62 | 58,32 | 28,99 | 30,19 |
| **21** | 4,31 | 7,26 | 49,42 | 13,97 | 9,65 | 19,20 | 93,65 | 10,25 | 24,91 | 4,12 | 19,70 | 32,54 | 46,52 | 76,00 | 78,03 | 61,59 | 21,16 | 19,11 | 44,44 | 59,58 | 28,68 | 45,29 |
| **22** | 9,92 | 9,90 | 17,69 | 15,48 | 17,71 | 17,45 | 84,24 | 11,21 | 10,25 | 3,92 | 25,49 | 30,52 | 23,32 | 58,32 | 60,75 | 11,62 | 29,80 | 13,57 | 31,68 | 70,01 | 31,20 | 35,55 |
| **23** | 10,14 | 9,46 | 41,96 | 8,85 | 8,97 | 7,72 | 52,21 | 6,86 | 11,21 | 27,25 | 38,91 | 31,35 | 12,06 | 28,19 | 46,51 | 24,47 | 11,50 | 8,55 | 14,27 | 51,09 | 21,97 | 28,47 |
| **24** | 10,36 | 7,30 | 35,20 | 6,77 | 20,14 | 7,81 | 55,89 | 4,19 | 6,86 | 25,31 | 23,18 | 35,28 | 8,56 | 26,20 | 27,12 | 15,71 | 32,21 | 7,60 | 37,79 | 35,79 | 31,13 | 38,61 |
| **25** | 10,59 | 4,94 | 18,23 | 22,22 | 25,12 | 4,24 | 4,56 | 26,25 | 0,00 | 23,56 | 14,20 | 23,56 | 13,96 | 28,55 | 9,20 | 6,55 | 1,56 | 3,52 | 20,53 | 3,29 | 6,02 | 38,21 |
| **26** | 17,88 | 4,24 | 27,22 | 20,55 | 24,10 | 3,73 | 36,00 | 10,00 | 0,00 | 56,20 | 12,20 | 27,55 | 3,24 | 3,11 | 0,00 | 46,00 | 8,25 | 12,51 | 89,44 | 8,97 | 13,47 | 44,17 |
| **27** | 23,14 | 5,20 | 17,88 | 26,56 | 10,56 | 4,20 | 7,24 | 3,45 | 0,00 | 14,22 | 10,45 | 26,89 | 11,36 | 2,45 | 3,04 | 12,44 | 41,50 | 11,85 | 54,11 | 10,56 | 13,62 | 11,16 |
| **28** | 6,06 | 4,28 | 19,15 | 13,12 | 23,31 | 3,73 | 4,00 | 4,88 | 0,00 | 20,05 | 4,44 | 40,51 | 7,76 | 3,04 | 4,84 | 12,00 | 3,66 | 3,09 | 21,55 | 4,65 | 4,64 | 7,45 |
| **29** | 28,20 | 6,58 | 21,16 | 5,89 | 26,12 | 15,06 | 6,48 | 7,56 | 0,00 | 4,56 | 5,48 | 66,23 | 15,71 | 65,20 | 56,10 | 10,37 | 63,51 | 41,55 | 12,07 | 36,51 | 10,40 | 71,40 |
| **30** | 27,12 | 3,53 | 19,11 | 24,20 | 7,87 | 46,00 | 20,52 | 19,10 | 0,00 | 78,12 | 5,09 | 98,78 | 7,31 | 88,23 | 0,00 | 5,40 | 5,78 | 2,86 | 2,85 | 3,57 | 12,85 | 9,44 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **31** | 8,55 | 3,95 | 31,56 | 19,19 | 4,65 | 4,19 | 19,56 | 12,55 | 0,00 | 6,51 | 5,11 | 10,55 | 3,94 | 22,20 | 0,00 | 3,52 | 12,10 | 2,55 | 12,09 | 6,01 | 5,45 | 12,89 |
| **32** | 31,20 | 3,45 | 4,62 | 10,56 | 18,55 | 8,79 | 12,58 | 4,44 | 0,00 | 23,00 | 8,56 | 10,89 | 13,47 | 8,44 | 0,00 | 65,00 | 64,89 | 6,51 | 16,05 | 4,00 | 12,09 | 10,44 |
| **33** | 4,62 | 15,11 | 5,21 | 3,28 | 6,52 | 0,00 | 20,97 | 12,34 | 3,89 | 18,98 | 5,37 | 0,00 | 30,88 | 6,27 | 17,48 | 17,05 | 6,01 | 10,19 | 0,00 | 21,03 | 68,57 | 0,00 |
| **34** | 5,86 | 7,55 | 5,41 | 3,51 | 4,02 | 0,00 | 19,61 | 8,27 | 6,33 | 24,00 | 3,25 | 0,00 | 26,12 | 6,97 | 19,92 | 8,99 | 22,53 | 3,11 | 0,00 | 33,03 | 36,37 | 0,00 |
| **35** | 5,75 | 10,25 | 3,55 | 4,39 | 5,17 | 0,00 | 19,78 | 6,09 | 5,54 | 23,21 | 6,78 | 0,00 | 6,55 | 6,37 | 22,97 | 5,83 | 25,37 | 5,89 | 0,00 | 11,30 | 20,22 | 0,00 |
| **36** | 4,23 | 5,56 | 8,72 | 5,78 | 6,40 | 0,00 | 54,19 | 5,56 | 6,03 | 30,73 | 4,51 | 0,00 | 4,78 | 14,77 | 22,76 | 18,86 | 31,72 | 5,25 | 0,00 | 31,20 | 12,08 | 0,00 |
| **37** | 3,45 | 16,11 | 3,06 | 4,13 | 5,60 | 0,00 | 10,98 | 4,03 | 6,53 | 32,56 | 6,82 | 0,00 | 10,20 | 4,89 | 14,31 | 37,28 | 17,11 | 4,30 | 0,00 | 22,96 | 9,14 | 0,00 |
| **38** | 10,11 | 20,10 | 12,52 | 3,88 | 36,51 | 0,00 | 41,78 | 24,21 | 16,91 | 15,46 | 16,65 | 0,00 | 31,20 | 22,53 | 7,97 | 10,29 | 19,98 | 14,66 | 0,00 | 13,81 | 5,93 | 0,00 |
| **39** | 12,85 | 5,12 | 4,30 | 4,28 | 32,52 | 0,00 | 26,07 | 11,19 | 10,18 | 14,47 | 10,18 | 0,00 | 13,84 | 32,61 | 28,22 | 10,02 | 12,20 | 6,00 | 0,00 | 44,52 | 4,52 | 0,00 |
| **40** | 3,15 | 4,18 | 11,55 | 2,64 | 0,00 | 0,00 | 12,00 | 13,80 | 10,40 | 27,57 | 7,70 | 0,00 | 4,00 | 38,29 | 49,44 | 30,05 | 4,05 | 5,09 | 0,00 | 17,63 | 4,36 | 0,00 |
| **41** | 5,31 | 8,89 | 6,50 | 3,23 | 3,02 | 18,87 | 39,22 | 6,41 | 5,58 | 12,88 | 4,21 | 7,88 | 7,80 | 8,01 | 10,08 | 4,34 | 31,37 | 6,03 | 4,67 | 25,14 | 5,60 | 6,45 |
| **42** | 3,97 | 15,40 | 13,71 | 3,33 | 5,73 | 15,75 | 40,87 | 11,53 | 5,25 | 45,96 | 6,54 | 11,18 | 4,95 | 9,18 | 6,78 | 12,66 | 45,55 | 7,74 | 10,09 | 37,05 | 6,14 | 8,17 |
| **43** | 5,24 | 15,04 | 8,09 | 5,11 | 4,38 | 18,52 | 58,80 | 7,65 | 7,20 | 29,06 | 4,39 | 15,09 | 6,22 | 6,52 | 6,67 | 5,41 | 42,98 | 7,82 | 7,62 | 43,00 | 9,38 | 26,01 |
| **44** | 4,18 | 16,17 | 10,60 | 5,06 | 3,57 | 21,61 | 57,50 | 10,04 | 3,21 | 36,72 | 5,17 | 16,63 | 8,91 | 9,63 | 7,41 | 6,05 | 33,31 | 5,45 | 12,96 | 35,15 | 7,77 | 3,49 |
| **45** | 3,40 | 7,53 | 9,43 | 52,12 | 3,48 | 36,86 | 52,39 | 9,62 | 3,06 | 47,13 | 7,16 | 19,95 | 7,54 | 9,39 | 6,21 | 31,96 | 62,36 | 8,65 | 8,37 | 43,10 | 6,18 | 6,08 |
| **46** | 4,64 | 13,78 | 61,12 | 4,78 | 4,82 | 32,07 | 48,01 | 6,35 | 7,25 | 4,41 | 4,02 | 6,35 | 36,33 | 5,28 | 5,03 | 9,52 | 21,40 | 12,96 | 14,53 | 20,98 | 7,00 | 11,07 |
| **47** | 3,65 | 2,68 | 45,42 | 4,82 | 4,63 | 23,36 | 33,73 | 7,25 | 4,59 | 4,03 | 5,17 | 4,02 | 24,21 | 6,83 | 4,56 | 12,00 | 5,02 | 44,10 | 16,70 | 32,62 | 3,36 | 8,60 |
| **48** | 3,51 | 2,59 | 44,25 | 4,63 | 6,87 | 13,24 | 52,98 | 4,59 | 5,01 | 4,53 | 6,40 | 4,64 | 15,48 | 6,42 | 6,60 | 10,29 | 62,54 | 22,62 | 15,70 | 14,00 | 3,28 | 8,23 |
| **49** | 5,02 | 4,41 | 18,17 | 6,87 | 5,75 | 14,99 | 53,41 | 5,01 | 5,63 | 4,59 | 7,98 | 5,60 | 8,72 | 5,15 | 8,37 | 18,59 | 25,28 | 26,38 | 14,28 | 28,14 | 2,89 | 15,72 |
| **50** | 5,78 | 3,72 | 51,82 | 5,75 | 4,85 | 14,10 | 73,09 | 5,63 | 6,42 | 3,83 | 4,05 | 5,46 | 4,03 | 4,92 | 18,59 | 5,78 | 38,15 | 18,75 | 51,82 | 27,35 | 8,24 | 2,71 |

## EK- 7 ZNRF1 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.6.ZNRF1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *ZNRF1* | Delesyon | E1 | c.86delG | p.Gly26Glu | Stop AA162 | Tanımlanmamış | 6 | - | H17-H18-H19-H20-H22-H23 | - | - |
| **2** | *ZNRF1* | Delesyon | E1 | c.222delC | p.Ala75Pro | Stop AA162 | Tanımlanmamış | 8 | - | H17-H18-H19-H20-H22-H23-H27 | | K2 |
| **3** | *ZNRF1* | Missense Nükleotid Değişim | E1 | c.320G>A | p.Gly107Asp | G->D (107) | Tanımlanmamış | 4 | H1-H6-H17-H22 | - | - | - |
| **4** | *ZNRF1* | Missense Nükleotid Değişim | E1 | c.54C>T | p.Val18Phe | VS->FS 18 | Tanımlanmamış | 1 | - | H1 | - | - |
| **5** | *ZNRF1* | Missense Nükleotid Değişim | E1 | c.224C>G | p.Ala75Gly | A->G(75) | Tanımlanmamış | 8 | | H17-H18-H19-H20-H22-H23-H27 | | K2 |
| **6** | *ZNRF1* | Missense Nükleotid Değişim | E1 | c.110A>T | p.Tyr37Phe | Y->F (37) | rs149929766 | 2 | | H8-H22 | | |
| **7** | *ZNRF1* | İndel | E1 | c.52..56delinsTTCTT | p.Val18_ SerdelinsPheSer | VS->FS (18..19) | Tanımlanmamış | 1 | - | H1 | - | - |
| **8** | *ZNRF1* | İndel | E1 | c.49_51delinsCGA | p.Gly17delinsArg | G->R(17) | Tanımlanmamış | 2 | | H6-H22 | - | - |
| **9** | *ZNRF1* | İndel | E1 | c.321_322delinsAGT | p.Gly108 Val | Stop AA112 | Tanımlanmamış | 2 | H3-H27 | - | - | - |
| **10** | *ZNRF1* | İndel | E1 | c.46_51 delinsTCGCGT | p.Pro16_Gly17 delinsSerArg | PG->SR (16..17) | Tanımlanmamış | 1 | - | H8 | - | - |
| **11** | *ZNRF1* | İndel | E1 | c.86_88delinsA | p.Gly29Glu | Stop AA111 | rs372749787 | 1 | | | | K2 |
| **12** | *ZNRF1* | Duplikasyon | E1 | c.200dupT | p.Pro68Ala | Stop AA112 | Tanımlanmamış | 2 | - | H19-H27 | - | - |
| **13** | *ZNRF1* | Duplikasyon | E1 | c.55dupT | p.Ser19Phe | Stop AA22 | Tanımlanmamış | 6 | - | H4-H5-H6-H19-H21-H22 | - | - |
| **14** | *ZNRF1* | İnsersiyon | E1 | c.285_286insG | p.Thr96Asp | Stop AA112 | Tanımlanmamış | 2 | - | H19-H22 | - | - |

## EK- 8 TSLP geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.7.TSLP geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| 1 | *TSLP* | Delesyon | E5-SSU | c.388delA | p.Arg130Gly | Stop AA156 | Tanımlanmamış | 26 | - | H1-H9-H10-H11-H12-H13-H14-H15-H16-H17-H21-H24-H33-H35-H36-H37-H39-H41-H42-H43 H44-H45 | - | K1-K2-K3-K4 |
| 2 | *TSLP* | Delesyon | E5-SSU | c.393dupA | p.Val132Ser | Stop AA136 | Tanımlanmamış | 4 | - | H9-H11-H12 | - | K1 |
| 3 | *TSLP* | Delesyon | E5-SSU | c.404delA | p.Asn135Ile | Stop156 | Tanımlanmamış | 5 | - | H43-H44-H45 | - | K3-K4 |
| 4 | *TSLP* | Duplikasyon | E5-SSU | c.397dupA | p.Thr113Asn | Stop AA136 | Tanımlanmamış | 6 | - | H16-H41-H42-H43-H44-H45 | - | - |
| 5 | *TSLP* | İndel | E3-WD | c.180_184delinsCACTG | p.Glu62Val | Stop AA70 | rs12048764 | 2 | - | H12-H20 | - | - |
| 6 | *TSLP* | İndel | E3-WD | c.174_185delinsAC | p.Lys59Arg | StopAA79 | Tanımlanmamış | 1 | - | H21 | - | - |

## EK- 9 ERG geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.8.ERG geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | DeğişimTipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a Değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| 1 | *ERG* | Delesyon | E2 | c.236+19delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 10 | - | H1-H17-H33-H42-H9 | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| 2 | *ERG* | Delesyon | E2 | c.236+14delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 11 | - | H10-H11-H14-H15-H16-H42-H9 | - | K2-K3-K4-K5 |
| 3 | *ERG* | Delesyon | E2-PNTD | c.53delT | Leu18Cys | StopAA33 | Tanımlanmamış | 9 | - | H10-H11-H12-H14-H15-H16-H34-H37-H42 | - | - |
| 4 | *ERG* | Delesyon | E2-PNTD | c.182delC | Pro61 Gln | StopAA75 | Tanımlanmamış | 1 | - | H33 | - | - |
| 5 | *ERG* | Indel | E2-PNTD | c.46_49delinsCGT | Glu16Gln | StopAA 20 | Tanımlanmamış | 8 | - | H1-H17-H25-H33-H41-H9 | | K1-K2 |
| 6 | *ERG* | Indel | E2-PNTD | c.41_48delinsCGT | Glu14Ala | Stop AA 18 | Tanımlanmamış | 8 | H1-H17-H25-H33-H41-H9 | - | K1-K2 | - |
| 7 | *ERG* | Indel | E2-PNTD | c.32_delinsACAC | Val11_Gln16delinsAsp | VVSEDQ->DT | Tanımlanmamış | 1 | H37 | - | - | - |
| 8 | *ERG* | Duplikasyon | E2-PNTD | c.182dupC | Ala62Ser | StopAA71 | Tanımlanmamış | 4 | - | H33-H35-H36-H37 | - | - |
| 9 | *ERG* | Duplikasyon | E2 | c.236+19dupC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H41 | - | - |
| 10 | *ERG* | Missense nükleotid Değişim | E2 | c.68A>C | Tyr53Ser | Y->S (53) | Tanımlanmamış | 3 | - | - | - | - |
| 11 | *ERG* | Missense nükleotid Değişim | E2-PNTD | c.46 C>G | p.Gln16Glu | Q->E (16) | Tanımlanmamış | 2 | - | H22-H6 | - | - |
| 12 | *ERG* | İnsersiyon | E2-PNTD | c.152_153insA | p.GLn53Ser | StopAA71 | Tanımlanmamış | | | H27 | | |

## EK- 10 CREBBP geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.9.CREBBP geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | DeğişimTipi | Lokasyonu | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *CREBBP* | Delesyon | E 30-HAT | c.4963delC | Leu1655Cys89 | Stop AA 1743 | Tanımlanmamış | 4 | - | H1-H12-H13-H14 | - | - |
| **2** | *CREBBP* | Delesyon | E 30-HAT | c.4956delC | Asp1653Thrfs91 | Stop AA 1743 | Tanımlanmamış | 6 | | H1-H13- H14 | | K1-K-K4 |
| **3** | *CREBBP* | Delesyon | E 30-HAT | c.5114delA | Tyr1705Ser | Stop AA 1743 | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K1 |
| **4** | *CREBBP* | Delesyon | E 30-HAT | c.4895delT | Phe1632Ser | StopAA1634 | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K1-K2 |
| **5** | *CREBBP* | Delesyon | E 30-HAT | c.4892delT | Val1632Ala | StopAA1634 | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K2 |
| **6** | *CREBBP* | Duplikasyon | E 30-HAT | c.5096dupG | Gln1700Pro35 | Stop AA 1734 | Tanımlanmamış | 1 | - | H1 | - | - |
| **7** | *CREBBP* | Duplikasyon | E 30-HAT | c.5092dupC | Gln1698Pro | Stop AA 1734 | Tanımlanmamış | 3 | - | H11-H12-H13 | - | - |
| **8** | *CREBBP* | Duplikasyon | E 30-HAT | c.4920dupG | Pro1641Ala | Stop AA 1659 | Tanımlanmamış | 2 | - | H12-H13 | - | - |
| **9** | *CREBBP* | Duplikasyon | E 30-HAT | c.4947dupC | Val1650Arg | StopAA1659 | Tanımlanmamış | 5 | | H19-H20 | | K1-K2-K4 |
| **10** | *CREBBP* | Duplikasyon | E 30-HAT | c.4944dupC | ıle1649His | StopAA1659 | Tanımlanmamış | 3 | - | H37-H38 | | K1 |
| **11** | *CREBBP* | Duplikasyon | E 30-HAT | c.4966dupC | Leu1656Pro | StopAA1659 | Tanımlanmamış | 3 | - | - | - | K1-K2-K4 |
| **12** | *CREBBP* | Duplikasyon | E 30 | c.4891-14dupC | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 3 | - | - | - | K1-K2-K4 |
| **13** | *CREBBP* | Duplikasyon | E 30 | c.4891-19dupA | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 3 | - | - | - | K1-K2-K4 |
| **14** | *CREBBP* | Indel | E 30 | c.5093delinsCAG p.Gln1698Pro | | StopAA1744 | Tanımlanmamış | 2 | - | H12-H13 | - | - |
| **15** | *CREBBP* | Indel | E30-HAT | c.5127_5132delinsAC | Cys1715Ser | StopAA1743 | Tanımlanmamış | 1 | - | - | | K1 |
| **16** | *CREBBP* | Indel | E30-HAT | c.5110_5114delinsTGCT | Cys1715Ser | StopAA1743 | Tanımlanmamış | 1 | - | - | | K1 |
| **17** | *CREBBP* | Indel | E30-HAT | c.4964_4965delinsC | Leu1656Ala | StopAA1659 | Tanımlanmamış | 3 | - | - | | K1-K2-K4 |
| **18** | *CREBBP* | Indel | E30-HAT | c.5088_5089insG | Thr1699Asp | StopAA1743 | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K2-K4 |

## EK- 11 ZAP70 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.10.ZAP70 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a Değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *ZAP70* | Delesyon | E5-intron | c.564-13delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 15 | - | H1-H25-H29-H33-H34-H35-H37-H17-H16-H15-H13-H12-H10-H9 | - | K3 |
| **2** | *ZAP70* | Delesyon | E4-SH2(C) | c.541delG | p.Ala181Arg | Stop AA189 | Tanımlanmamış | 8 | - | H25-H16-H15-H14-H12-H11-H10-H9 | - | |
| **3** | *ZAP70* | Delesyon | E11 | c.1290-8delC | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 31 | - | H3-H5-H6-H8-H33-H34-H35-H37-H43-H44-H45-H24-H23-H22-H21-H20-H19-H18-H17-H16-H15-H14-H13-H12-H11-H10-H9- | - | K1-K2-K3-K4 |
| **4** | *ZAP70* | Delesyon | E11 | c.1290-17delC | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 32 | - | H3-H5-H6-H8-H33-H34-H43-H44-H45-H24-H23-H21-H20-H19-H18-H17-H16-H15-H14-H13-H12-H11-H10-H9 | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **5** | *ZAP70* | Delesyon | E13-KD | c.1669_1675delCGGATGG | p.Arg557Ser | StopAA570 | Tanımlanmamış | 6 | - | H3-H27-H43-H45-H19-H1 | - | |
| **6** | *ZAP70* | Delesyon | E11 | c.1382delA | | StopAA543 | Tanımlanmamış | 4 | - | | - | K1-K2-K3-K4 |
| **7** | *ZAP70* | Duplikasyon | E13 | c.1624-12dupC | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 17 | - | H-1-H33-H34-H35-H36-H37-H39-H40-H42-H44-H23-H22-H20-H19-H18 | - | K4 |
| **8** | *ZAP70* | Duplikasyon | E5-SH2 (C) | c.587dupG | p.Thr197His | StopAA230 | Tanımlanmamış | 2 | - | H15-H16 | - | - |
| **9** | *ZAP70* | Duplikasyon | E11 | c.1290-3dupC | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 2 | - | H15-H16 | - | - |
| **10** | *ZAP70* | İndel | E13-KD | c.1668_1671delinsACGC | p.Lys556Arg | KR->KR (556..557) | Tanımlanmamış | 1 | - | H1 | - | - |
| **11** | *ZAP70* | İndel | E5 | c.564-13_564-10delinsTT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H1 | - | - |
| **12** | *ZAP70* | İndel | E4-SH2 (C) | c.412dupC | p.Leu138Pro | StopAA171 | Tanımlanmamış | 5 | - | H16-H14-H15-H12-H11 | - | - |
| **13** | *ZAP70* | İnsersiyon | E4- SH2 (C) | c.404dupG | p.Glu136Arg | StopAA171 | Tanımlanmamış | 4 | - | H16-H14-H15-H12 | - | - |
| **14** | *ZAP70* | İnsersiyon | E11-KD | c.1292_1293insC | p.Glu431Asp | StopAA471 | Tanımlanmamış | 4 | - | | | K1-K2-K3-K4 |

## EK- 12 JAK2 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.11. JAK2 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılım

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *JAK2* | Delesyon | E14-PKD | c.1864+50delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 3 | - | H1H2-H6 | - | - |
| **2** | *JAK2* | Delesyon | E14- PKD | c.1777-7delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 25 | - | H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H40-H36-H33-H29-H28-H26-H25-H24-H22-H21-H20-H19-H18-H17 | - | K1-K3-K4 |
| **3** | *JAK2* | Delesyon | E14- PKD | c.1777-8_1777-7 delTT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 20 | - | H1-H2-H3-H4-H5-H7-H8-H40-H36-H33-H29-H24-H22-H21-H20-H18-H17 | - | K3-K4 |
| **4** | *JAK2* | Delesyon | 5'UTR | c.-9delA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 4 | - | H17-H18-H20-H28 | - | - |
| **5** | *JAK2* | Delesyon | E16-PKD | c.2033delA | p.Asn678Ile | Stop AA730 | Tanımlanmamış | 5 | - | H17-H18-H36 | - | K1-K2 |
| **6** | *JAK2* | Delesyon | E14-PKD | c.1864+13delA | c.1864+13delA | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | H28-H29 | - | K2-K3-K4 |
| **7** | *JAK2* | Delesyon | E14-PKD | c.1864+23delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | H36 | - | K1-K2-K3-K4 |
| **8** | *JAK2* | Duplikasyon | E14- PKD | c.1777dupT | p.Ser593Phe | Stop AA596 | Tanımlanmamış | 6 | - | H17-H18-H28-H29 | - | K3-K4 |
| **9** | *JAK2* | Duplikasyon | E14-PKD | c.1832dupTT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 6 | - | H2-H23-H19-H22 | - | K1-K2 |
| **10** | *JAK2* | Duplikasyon | E14-PKD | c.1864+42dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 6 | - | H20-H28-H29 | - | K2-K3-K4 |
| **11** | *JAK2* | Duplikasyon | E14-PKD | c.1864+58dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 7 | - | H3-H4-H44-H6-H7-H8 | - | K4 |
| **12** | *JAK2* | Duplikasyon | E14- PKD | c.1864dupG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 3 | - | H41-H43-H44 | - | - |
| | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **13** | *JAK2* | Duplikasyon | İntron 13 | c.1715-5dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | H41-H43 | - | - |
| **14** | *JAK2* | Duplikasyon | E16-PKD | c.2016dupG | p.Asn673Glu | Stop AA698 | Tanımlanmamış | 5 | - | H45-H44-H43-H42-H41 | - | - |
| **15** | *JAK2* | Duplikasyon | E16 | c.2120dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 4 | - | - | - | K1-K2-K3-K4 |
| **16** | *JAK2* | Duplikasyon | E14-PKD | c.1777-19dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K1-K4 |
| **18** | *JAK2* | Silence Nükleotid Değişim | E14-PKD | c.1777-16T>G | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 17 | - | H1-H3-H4-H8-H40-H36-H33-H29-H28-H24-H22-H21-H20-H19-H18-H17 | - | K1 |
| **19** | *JAK2* | İnsersiyon | E14-PKD | c.1864+50_1864+51insA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 11 | - | H19-H20-H21-H22-H24-H25-H28-H29-H36 | - | K1-K2 |
| **20** | *JAK2* | İnsersiyon | E14-PKD | c.1821_1822delinsT | p.His608Ser | Stop AA642 | rs121912472 | 4 | - | - | - | K1-K2-K3-K4 |

## EK- 13 IKZF1 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.12.IKZF1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyonu | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *IKZF1* | Delesyon | 3'UTR | c.188delT | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **19** | - | H1-H10-H11-H12-H14-H15-H16-H2-H3-H8-H9-H7-H5-H6-H13-H4-H34-H33 | - | K4 |
| **2** | *IKZF1* | Delesyon | 3'UTR | c.194delT | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **24** | - | H4-H5-H3-H7-H9-H10-H14-H17-H18-H19-H20-H21-H22-H23-H24-H26-H27-H36-H37-H39-H42 | - | K1-K2-K3 |
| **3** | *IKZF1* | Delesyon | E4-DBD | c.409del A | Arg137Glu | Stop AA192 | Tanımlanmamış | **4** | - | H22-H25-H43-H44 | - | - |
| **4** | *IKZF1* | Delesyon | E8-DD | c.136_141delTTTTTT | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **2** | - | H23-H42 | - | - |
| **5** | *IKZF1* | Delesyon | E4-DBD | c.317delG | Gly106Glu | Stop AA 117 | Tanımlanmamış | **1** | - | - | - | K2 |
| **6** | *IKZF1* | İnsersiyon | 3'UTR | c.383_384insAC | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **8** | - | H1-H17-H33-H37-H41-H9 | - | K1-K2 |
| **7** | *IKZF1* | İnsersiyon | 3'UTR | c.177delinsTGA | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **3** | - | H11-H42 | - | K4 |
| **8** | *IKZF1* | İnsersiyon | 3'UTR | c.183_184insG | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **9** | - | H10-H13-H14-H26-H28-H29-H39 | - | K4-K5 |
| **9** | *IKZF1* | İnsersiyon | 3'UTR | c.383_394insAG | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **4** | - | H16-H28-H32-H18 | - | - |
| **10** | *IKZF1* | İnsersiyon | E6-DD | c.704_705insTC | Thr235Arg | StopAA215 | Tanımlanmamış | **7** | | H19-H20-H27-H3-H4-H41 | | K3 |
| **11** | *IKZF1* | İnsersiyon | 3'UTR | c.199_200insT | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **5** | - | - | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **12** | *IKZF1* | İndel | 3'UTR | c.188_190delinsA | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **20** | - | H1,H14,H18,H2,H21,H23,H24,H25,H3,H33,H34,H35,H36,H37,H39,H4,H42,H5,H8,H9 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **13** | *IKZF1* | İndel | İntron 5 | c.715+7_715+20delinsCTTTCTAAACTGGC | - | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | **33** | | H1,H10,H11,H12,H13,H14,H16,H17,H18,H19,H2,H20,H21,H22,H23,H24,H27,H3,H33,H37,H4,H40,H44,H5,H6,H7,H8,H9 | | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **14** | *IKZF1* | İndel | E6 | c.714_715+1delinTTTAAACA | - | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | **24** | | H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H24-H23-H21-H20-H19-H18-H17-H16-H13-H11-H10 | | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **15** | *IKZF1* | İndel | İntron 5 | c.384_403delinsC | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **5** | H5-H6-H21-H14-H13 | - | - | - |
| **16** | *IKZF1* | İndel | E4-DBD | c.270_272delinsAAATG | Lys91Asn | StopAA93 | Tanımlanmamış | **7** | H24-H23-H19-H17 | - | - | K1-K2-K3 |
| **17** | *IKZF1* | İndel | E6-DD | c.677_691delinsGAACCCTTTAAACATAA | | StopAA 226 | rs373583058 | **2** | - | H2-H18 | - | - |
| **18** | *IKZF1* | İndel | E6-DD | c.668_670delinsCG | | Stop AA 214 | Tanımlanmamış | **2** | - | H2-H18 | - | - |
| **19** | *IKZF1* | Missense Nükleotid Değişim | E6-DD | c.709T>A | Tyr237Asn | Y->N(237) | Tanımlanmamış | **20** | - | H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H24-H23-H20-H19-H18-H16-H13-H11-H10 | | K1-K2-K5 |
| **20** | *IKZF1* | Silence Nükleotid Değişim | 3'UTR | c.137T>A | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **10** | - | H3-H6-H7-H8-H24-H23-H19-H16-H15-H11 | | |
| **21** | *IKZF1* | Silence Nükleotid Değişim | 3'UTR | c.364C>A | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **3** | | H17-H9 | | K1 |
| **22** | *IKZF1* | İndel | E6-DD | c.697_704delinsTCTAA | Pro233_Thr235delinsSerTer | PGT->S (Stop)(233..235) | Tanımlanmamış | **3** | - | H2-H7-H18 | | |
| **23** | *IKZF1* | Missense Nükleotid Değişim | E6-DD | c.704C>G | Thr235Arg | T->R (235) | Tanımlanmamış | **3** | H22-H40 | | K2 | |
| **24** | *IKZF1* | Silence Nükleotid Değişim | 3'UTR | c.398G>C | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **3** | | H8-H28-H31 | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **25** | *IKZF1* | Nonsence Nükleotid Değişim | E6-DD | c.703 A>T | Phe235Ter | T->[Stop] (235) | Tanımlanmamış | **1** | | H7 | | |
| **26** | *IKZF1* | Missense Nükleotid Değişim | E6-DD | c.700 G>T | Gly234Cys | G->C (234) | Tanımlanmamış | **1** | | H7 | | |
| **27** | *IKZF1* | Missense Nükleotid Değişim | E6-DD | c.691 G>A | Gly231Ser | G->S (231) | Tanımlanmamış | **1** | | H7 | | |
| **28** | *IKZF1* | Missense Nükleotid Değişim | E6-DD | c.686G>A | Ser229Asn | S->N (229) | Tanımlanmamış | **1** | | H7 | | |
| **29** | *IKZF1* | Missense Nükleotid Değişim | E6-DD | C.673A>T | Asn225Tyr | N->Y(225) | Tanımlanmamış | **1** | | H7 | | |
| **30** | *IKZF1* | Missense Nükleotid Değişim | E6-DD | c.643T>C | Ser215Pro | S->P (215) | Tanımlanmamış | **1** | | H7 | | |

## EK- 14 NR3C1 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.13.NR3C1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *NR3C1* | Delesyon | 3'UTR | c.100delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 42 | - | H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H45-H44-H43-H42-H41-H37-H36-H35-H34-H33-H31-H26-H25-H24-H23-H22-H21-H20-H19-H18-H17-H16-H15-H14-H13-H12-H11-H10-H9 | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **2** | *NR3C1* | Delesyon | İntron 1 | c.1185-9delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 9 | - | H1-H7-H18-H17-H15-H14-H12-H11-H9 | - | - |
| **3** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.346delG | p.Glu116Lys | Stop AA 119 | Tanımlanmamış | 5 | - | H1-H3-H4-H8-H17 | - | - |
| **4** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.314delC | p.Pro10His | Stop AA 119 | Tanımlanmamış | 7 | - | H1-H2-H3-H-4-H5-H8-H39 | - | - |
| **5** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.283delA | p.Thr95Gln | Stop AA 97 | Tanımlanmamış | 5 | - | H1-H3-H4-H25-H17 | - | - |
| **6** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.100del A | p.Arg34Glu | Stop AA29 | Tanımlanmamış | 5 | - | H25-H16-H13-H10-H9 | - | - |
| **7** | *NR3C1* | Delesyon | 3'UTR | c.121delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 16 | - | H43-H42-H33-H26-H25-H24-H17-H16-H12-H11-H10-H9 | - | K5-K4-K3-K2 |
| **8** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.366G>A | p.Leu122Thr | Stop AA170 | Tanımlanmamış | 15 | - | H5-H8-H38-H37-H14-H11-H10-H14-H15-H16-H35-H36-H39-H9-H17 | - | - |
| **9** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.45delC | p.Ser16Ala | Stop AA26 | Tanımlanmamış | 11 | - | H25-H24-H23-H22-H21-H20-H19-H17-H16-H13-H11 | - | - |
| **10** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.26_35delCTGGTAGAGA | p.Pro9Gln | Stop AA23 | Tanımlanmamış | 3 | - | H35-H27-H11 | - | - |
| **11** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.25_28delCCTG | p.Pro9Val | Stop AA25 | Tanımlanmamış | 5 | - | H4-H36-H28-H20-H12 | - | - |
| **12** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.288del A | p.Val97Ter | Stop AA97 | Tanımlanmamış | 6 | - | H39-H38-H37-H36-H34-H25 | - | - |
| **13** | *NR3C1* | Delesyon | E3-NTD | c.1188delC | p.Ser397Ala | Stop AA398 | Tanımlanmamış | 3 | - | H45-H44-H35 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **14** | *NR3C1* | Delesyon | E2-NTD | c.337delT | p.Ser113Pro | Stop AA119 | Tanımlanmamış | 2 | - | H36-H25 | - | - |
| **15** | *NR3C1* | Delesyon | E3-DBD | c.1334delT | p.Phe445Ser | Stop AA486 | Tanımlanmamış | 3 | - | - | - | K2-K4-K5 |
| **16** | *NR3C1* | Delesyon | E3-DBD | c.1331delT | p.Phe444Ser | Stop AA486 | Tanımlanmamış | 2 | H44-H45 | | | |
| **17** | *NR3C1* | Duplikasyon | 3'UTR | c.100dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | H1 | - | - | - |
| **18** | *NR3C1* | Duplikasyon | E2-NTD | c.94dupA | p.Thr32Asn | Stop AA64 | Tanımlanmamış | 7 | - | H1-H3-H4-H5-H8-H38-H14 | | - |
| **19** | *NR3C1* | Duplikasyon | E2-NTD | c.64dupG | p.Glu22Gly | Stop AA31 | Tanımlanmamış | 7 | | H15-H14-H13-H12-H11-H10-H9 | | |
| **20** | *NR3C1* | Duplikasyon | E2-NTD | c.1188dupC | p.Ser39Gln | Stop AA 426 | Tanımlanmamış | 4 | | H34-H13-H12-H10 | | |
| **21** | *NR3C1* | Duplikasyon | E2-NTD | c.314dupC | p.Gln106Thr | Stop AA131 | Tanımlanmamış | 16 | | H39-H38-H37-H36-H35-H34-H33-H29-H28-H25-H23-H17-H13-H12-H11-H10 | | |
| **22** | *NR3C1* | Duplikasyon | E2-NTD | c.323dupG | p.Gln109Pro | Stop AA119 | Tanımlanmamış | 13 | | H39-H38-H36-H33-H29-H25-H24-H22-H18-H15-H11-H10-H9 | | |
| **23** | *NR3C1* | Duplikasyon | E9 | c.156dupG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | | H42-H41-H15-H14-H13 | | |
| **24** | *NR3C1* | Duplikasyon | E3-DBD | c.1309dupA | p.Phe444Ser | Stop AA442 | Tanımlanmamış | 2 | | H43-H18 | | |
| **25** | *NR3C1* | Duplikasyon | E2-NTD | c.356dupT | p.Leu119Phe | Stop AA131 | Tanımlanmamış | 2 | | H38-H39 | | |
| **26** | *NR3C1* | İndel | 3'UTR | c.93-95delinsA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 13 | | H1-H33-H24-H21-H16-H15-H14-H13-H12-H11-H9 | | K2-K1 |
| **27** | *NR3C1* | İndel | E2-NTD | c.31_34delinsCGAC | p.Arg11_Glu12delinsArg | RE->RQ | Tanımlanmamış | 3 | | H18-H12-H9 | | |
| **28** | *NR3C1* | İndel | E2-NTD | c.23_32delinsTTCCGGCCGGA | p.Thr81Ile | Stop AA31 | Tanımlanmamış | 2 | | H14-H13 | | |
| **29** | *NR3C1* | İndel | E2-NTD | c.2_4delinsCGC | p.Met1_Asp2delinsThrHis | MD->TH (1..2) | Tanımlanmamış | 1 | H19 | | | |
| **30** | *NR3C1* | İndel | E2-NTD | c.34_35delinsCACG | p.Glu12His | Stop AA 27 | Tanımlanmamış | 4 | H5-H37-H29-H21 | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **31** | *NR3C1* | İndel | E2-NTD | c.365_372delins GTAGAG | p.Leu122Cys | Stop AA130 | Tanımlanmamış | 1 | H39 | | | |
| **32** | *NR3C1* | İndel | E2 | c.121_123delins G | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | H1 | | | |
| **33** | *NR3C1* | Missense Nükleotid Değişimi | E2-NTD | c.35A>T | p.Glu12Val | E->V(12) | Tanımlanmamış | 4 | | H1-H33-H29-H25 | | |
| **34** | *NR3C1* | Missense Nükleotid Değişimi | E2-NTD | c.212G>T | p.Ser17Ile | S->I (71) | Tanımlanmamış | 2 | | H13-H23 | | |
| **35** | *NR3C1* | Missense Nükleotid Değişimi | E2-NTD | c.366G>A | p.Leu122Thr | StopAA170 | Tanımlanmamış | 7 | | H5-H8-H38-H37-H14-H11-H10 | | |
| **36** | *NR3C1* | Missense Nükleotid Değişimi | E3-NTD | c.1237A>G | p.Thr413Ala | T->A (413) | rs145046100 | 2 | | H27-H17 | | |
| **37** | *NR3C1* | Silence Nükleoitid Değişimi | E2-NTD | c.36A>G | | E->E (12) | Tanımlanmamış | 3 | | H22-H37-H39 | | |
| **38** | *NR3C1* | Silence Nükleoitid Değişimi | 3'UTR | c.93-95delinsA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 3 | | H35-H34-H33 | | |
| **39** | *NR3C1* | Silence Nükleoitid Değişimi | E2-NTD | c.144G>A | | L->L (48) | Tanımlanmamış | 1 | | H37 | | |
| **40** | *NR3C1* | İnsersiyon | İntron 8 | c.208_209insT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 6 | | H20-H21-H22-H24-H27-H29 | | |
| **41** | *NR3C1* | İnsersiyon | İntron 8 | c.267_268insA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | | H27-H29 | | |
| **42** | *NR3C1* | İnsersiyon | İntron 8 | c.94_95insG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | | | | K5 |

## EK- 15 EBF1 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.14.EBF1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyonu | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *EBF1* | Delesyon | E15-TAD | c.1703delC | p.Pro568His | Stop AA 586 | Tanımlanmamış | 18 | - | H1-H38-H37-H36-H33-H29-H25-H22-H17-H15-H14-H13-H12-H11-H10-H9 | - | K1-K2 |
| **2** | *EBF1* | Delesyon | 5'UTR | c.-22delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | H1-H8 | - | - |
| **3** | *EBF1* | Delesyon | 5'UTR | c.-55_46 delinsAA | | Translasyon olmayan bölge | rs5872586 | 1 | - | H1 | - | - |
| **4** | *EBF1* | Delesyon | 5'UTR | c.-79delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | H1-H8 | - | - |
| **5** | *EBF1* | Delesyon | 5'UTR | c.-93delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 4 | - | H1-H7-H27-H17 | - | - |
| **6** | *EBF1* | Delesyon | 5'UTR | c.-100_-99insT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 3 | - | H1-H5-H8 | - | - |
| **7** | *EBF1* | Delesyon | 5'UTR | c.-111delA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 8 | - | H1-H4-H6-H27-H23-H21-H20-H17 | - | - |
| **8** | *EBF1* | Delesyon | 5'UTR | c.-177delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 9 | - | H1-H3-H4-H5-H6-H7-H23-H21-H20 | - | - |
| **9** | *EBF1* | Delesyon | E15-TAD | c.1710delC | p.Thr571Pro | Stop AA 586 | Tanımlanmamış | 8 | - | H41-H33-H29-H27-H25-H17 | | K1-K2 |
| **10** | *EBF1* | Delesyon | İntron 14 | c.1550-18 dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K1-K2 |
| **11** | *EBF1* | Delesyon | E15-TAD | c.1706delC | p.Pro569Leu | Stop AA 586 | Tanımlanmamış | 8 | - | H16-H15-H14-H13-H12-H11-H10-H9-H8-H1 | - | - |
| **12** | *EBF1* | Delesyon | E15-TAD | c.1705delC | p.Pro569Leu | Stop AA 586 | Tanımlanmamış | 18 | - | H1-H38-H37-H36-H33-H29-H25-H22-H17-H15-H14-H13-H12-H11-H10-H9 | - | K1-K2 |
| **13** | *EBF1* | Silence Nükleotid Değiişim | 5'UTR | c.-46T>A | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 11 | - | H1-H3-H4-H6-H8-H31-H27-H23-H21-H20-H17 | - | - |
| **14** | *EBF1* | Silence Nükleotid Değiişim | 5'UTR | c.-63T>G | | Translasyon olmayan bölge | rs79510724 | 10 | - | H1-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H27-H20-H17 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **15** | *EBF1* | Silence Nükleotid Değiişim | 5'UTR | c.-122G>A | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | H6-H7 | - | - |
| **16** | *EBF1* | Duplikasyo n | E15-TAD | c.1693dupC | p.Gln565Pro | Stop AA 587 | Tanımlanmamış | 6 | - | H41-H16-H14-H10 | - | K1-K2 |
| **17** | *EBF1* | Duplikasyo n | E1-DBD | c.6dupT | p.Gly3Trp | Stop AA 55 | Tanımlanmamış | 3 | - | H20-H21-H23 | - | - |
| **18** | *EBF1* | Duplikasyo n | 5'UTR | c.-172dupA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 7 | - | H1-H3-H4-H6-H7-H8-H17 | - | - |
| **19** | *EBF1* | Duplikasyo n | E15-TAD | c.1660dupC | p.Gln554Pro | Stop AA 587 | Tanımlanmamış | 4 | - | H41-H23-H21-H20 | - | - |
| **20** | *EBF1* | Duplikasyo n | 5'UTR | c.-177dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | H4-H8 | - | - |
| **21** | *EBF1* | Indel | 5'UTR | c.-31_-29delinsTA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 8 | - | H1-H3-H4-H27-H23-H21-H20-H17 | - | - |
| **22** | *EBF1* | Indel | 5'UTR | c.-54_46delinsAA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 6 | - | H1-H3-H5-H6-H7-H8 | - | - |
| **23** | *EBF1* | Indel | 5'UTR | c.122-119delins AG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 7 | - | H1-H3-H4-H5-H6-H8-H17-H2-,H27 | - | - |
| **24** | *EBF1* | İnsersiyon | 5'UTR | c.-39_-38insT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 11 | - | H1-H3-H4-H5-H6-H8-H31-H23-H21-H20-H17 | - | - |
| **25** | *EBF1* | İnsersiyon | E15-TAD | c.1585_1586ins C | p.Ser529Thr | Stop AA 587 | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K1-K2 |
| **26** | *EBF1* | İnsersiyon | 5'UTR | c.-32_-31insT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | H4-H5-H6-H31-H21 | - | - |

## EK- 16 FOXO3A geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.15.FOXO3A geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *FOXO3A* | Delesyon | İntron 1 | c.621+10delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **4** | - | H25-H1-H24-H33 | - | - |
| **2** | *FOXO3A* | Delesyon | 5'UTR | c.-53delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **3** | - | H1-H27 | - | K5 |
| **3** | *FOXO3A* | Delesyon | 5'UTR | c.-68delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **17** | - | H1-H17-H19-H2-H21-H22-H23-H27-H3,H14-H41-H5-H6-H7-H8 | - | K2-K5 |
| **4** | *FOXO3A* | Delesyon | E1-FHD | c.527_530 delAACG | p.Lys176Ser | Stop AA 357 | Tanımlanmamış | **6** | H18-H34-H37-H45 | - | K2-K5 | - |
| **5** | *FOXO3A* | Delesyon | E1-FHD | c.519_522 delCCCG | p.Pro174Thr | Stop AA 357 | Tanımlanmamış | **2** | H2-H18 | - | - | - |
| **6** | *FOXO3A* | Delesyon | 5'UTR | c.-13delG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **4** | - | H27-H41 | - | K2-K5 |
| **7** | *FOXO3A* | Delesyon | 5'UTR | c.-123-3delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **1** | - | H3 | - | - |
| **8** | *FOXO3A* | Delesyon | E1-FHD | c.576delC | p.Tyr93Thr | Stop AA358 | Tanımlanmamış | **3** | - | H33-H37-H40 | - | - |
| **9** | *FOXO3A* | Delesyon | 5'UTR | c.-9delG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **2** | - | - | - | K2-K5 |
| **10** | *FOXO3A* | Delesyon | 5'UTR | c.-58delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **4** | - | H18-H19-H21-H22 | - | - |
| **11** | *FOXO3A* | Indel | 5'UTR | c.-58_-56delinsG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **3** | - | H17 | - | K1-K2 |
| **12** | *FOXO3A* | Indel | 5'UTR | c.552_558delinsG GACAGAGTCT CGGAGGGG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **8** | - | H18-H19-H42-H43-H44-H41-H45 | - | K3 |
| **13** | *FOXO3A* | Indel | İntron 1 | c.514_530delinsT GCG | p.Ser172-Arg177delins | SSPDKR->CG | Tanımlanmamış | **3** | - | H22 | - | K1-K2 |
| **14** | *FOXO3A* | Indel | 5'UTR | c.-13_-11delinsG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **2** | - | - | - | K2-K5 |
| **15** | *FOXO3A* | Duplikasyon | E2-FHD | c.541dupT | p.Ser181Phe | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **5** | - | H21-H37 | - | K2-K3-K5 |
| **16** | *FOXO3A* | Duplikasyon | 5'UTR | c.-26dupC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **1** | - | H3 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **17** | *FOXO3A* | Duplikasyon | 5'UTR | c.-48dupC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **1** | - | H41 | - | - |
| **18** | *FOXO3A* | İnsersiyon | İntron 1 | c.621+20_621+21 insC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **2** | - | - | - | K2-K4 |
| **19** | *FOXO3A* | Duplikasyon | E1 | c.590dupA | p.Asp199Arg | Stop AA218 | Tanımlanmamış | **1** | - | - | - | K4 |
| **20** | *FOXO3A* | Duplikasyon | 5'UTR | c.-67dupG | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | **1** | - | H33 | - | - |
| **21** | *FOXO3A* | Missense Nükleotid Değişim | E1 | c.13C>G | p.Pro5Ala | P->A(5) | rs757315159 | 3 | H1-H41 | - | H1 | |
| **22** | *FOXO3A* | Nonsense Nükleotid Değişim | E1-FHD | c.558G>A | p.Trp186Ter | W->STOP(186) | Tanımlanmamış | 2 | H14 | - | K2 | - |
| **23** | *FOXO3A* | Silence Nükleotid Değişim | E1 | c.522G>A | | P->P (174) | rs149189425 | 2 | H3-H5 | - | - | - |
| **24** | *FOXO3A* | Silence Nükleotid Değişim | İntron 1 | c.621+5G>A | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K3 |
| **25** | *FOXO3A* | İnsersiyon | E1-FHD | c.539insT | p.Ser181Val | Stop AA197 | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K1-K2 |

## EK- 17 PAX5 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.16.PAX5 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyonu | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *PAX5* | Delesyon | İntron 4 | c.271delA | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 12 | - | H4-H5-H6-H8-H20-H21-H22-H35-H36-H37 | - | K1-K2 |
| **2** | *PAX5* | Delesyon | E8-TAD | c.1024delT | p.Ser342Pro | StopAA380 | Tanımlanmamış | 1 | - | H21 | - | - |
| **3** | *PAX5* | Delesyon | 3'UTR | c.284delC | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | H25-H35 | - | - |
| **4** | *PAX5* | Delesyon | 3'UTR | c.399delA | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | H40- H4-H42-H44 | - | K2 |
| **5** | *PAX5* | Delesyon | 3'UTR | c.444delC | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K4 |
| **6** | *PAX5* | Delesyon | 3'UTR | c.440delC | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 3 | - | - | - | K1-K2-K4 |
| **7** | *PAX5* | Delesyon | 3'UTR | c.440delT | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | H9-H10-H11-H12-H14 | - | - |
| **8** | *PAX5* | Delesyon | E5-HD | c.565delT | p.Ser189Pro | StopAA277 | Tanımlanmamış | 3 | - | H9-H10-H15 | - | - |
| **9** | *PAX5* | Delesyon | E6-HD | c.658delC | p.Leu220Ser | StopAA277 | Tanımlanmamış | 6 | - | H9-H11-H13-H14-H15-H16 | - | - |
| **10** | *PAX5* | Delesyon | E8-TAD | c.1046delC | p.Pro349Leu | StopAA380 | Tanımlanmamış | 2 | - | H12-H41 | - | - |
| **11** | *PAX5* | Delesyon | E5-HD | c.565_566insA | p.Ser189Tyr | StopAA242 | Tanımlanmamış | 2 | - | H11-H12 | - | - |
| **12** | *PAX5* | Delesyon | E3-PD | c.295delA | p.ıle99Ser | StopAA158 | Tanımlanmamış | 2 | | H14-H15 | | |
| **13** | *PAX5* | Delesyon | İntron 4 | c.582delC | p.Asn195Thr | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H15 | - | - |
| **14** | *PAX5* | Delesyon | E5-OD | c.563delC | p.Thr188Ser | StopAA277 | Tanımlanmamış | 7 | - | H17-H18-H19-H20-H22-H24-H27 | - | - |
| **15** | *PAX5* | Delesyon | 3'UTR | c.274delA | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 6 | - | H17-H18-H19-H20-H21-H22 | - | - |
| **16** | *PAX5* | Duplikasyon | E5-OD | c.570dupC | p.Ser191Gln | StopAA242 | Tanımlanmamış | 12 | - | H1-H2-H11-H13-H16-H33-H34-H35-H36-H37-H39-H38 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **17** | *PAX5* | Duplikasyon | E3-PD | c.309dupA | p.Arg104Thr | StopAA125 | Tanımlanmamış | 1 | - | H12 | - | - |
| **18** | *PAX5* | Duplikasyon | 3'UTR | c.284dupC | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | H19,H24 | - | - |
| **19** | *PAX5* | Duplikasyon | E5-PD | c.295dupA | p.Ile99Asn | StopAA101 | Tanımlanmamış | 15 | - | H3-H4-H6-H8-H15-H19-H22-H23-H24-H25-H26-H29-H32 | - | K2-K3 |
| **20** | *PAX5* | Duplikasyon | E10-HD | c.647dupG | p.Arg217Gln | StopAA242 | Tanımlanmamış | 2 | - | H40-H43 | - | - |
| **21** | *PAX5* | Duplikasyon | E3-PD | c.244dupG | p.Val282Gly | StopAA101 | Tanımlanmamış | 3 | - | H41-H42-H44 | - | - |
| **22** | *PAX5* | Missense Nükleotid Değişim | 3'UTR | c.342C>T | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | H1-H4-H43-H44 | - | K4 |
| **23** | *PAX5* | Missense Nükleotid Değişim | E3-PD | c.356T>C | p.Leu119Pro | L->P(119) | Tanımlanmamış | 1 | - | H19 | - | - |
| **24** | *PAX5* | Silence Nükleotid Değişim | E9 | c.1029G>A | p.Gly343Gly | G->G (343) | rs35469494 | 2 | - | H43 | - | K3 |
| **25** | *PAX5* | İndel | 3'UTR | c.271_273delinsT | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 3 | - | H20-H21-H22 | - | - |
| **26** | *PAX5* | İndel | E5-OD | c.563_565delinsGTC | p.Thr188_Ser189delinsSerPro | TS->TP(188..189) | Tanımlanmamış | 9 | - | H33-H34-H35-H36-H37-H38-H39-H40 | - | K5 |
| **27** | *PAX5* | İndel | 3'UTR | c.440_442delinsA | - | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K5 |
| **28** | *PAX5* | İnsersiyon | E3-PD | c.269_270insA | p.Ala91Arg | StopAA101 | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K5 |
| **29** | *PAX5* | İnsersiyon | E3-PD | c.298_299insA | p.Ala100Asp | StopAA101 | Tanımlanmamış | 5 | - | - | - | K1-K2-K3-K4-K5 |

## EK- 18 RB1 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.17.RB1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | DeğişimTipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *RB1* | Duplikasyon | E19-BD | c.2051dupT | p.Gln685Pro | StopAA691 | Tanımlanmamış | 11 | - | H1-H3-H6-H7-H9-H33-H34-H36-H37-H38-H39-H40 | - | - |
| **2** | *RB1* | Duplikasyon | E19- BD | c.1959dupA | p.Val654Ser | StopAA667 | Tanımlanmamış | 14 | - | H1-H3-H4-H7-H8-H25-H26-H27-H28-H29-H31-H32-H33-H35 | - | - |
| **3** | *RB1* | Duplikasyon | E19- BD | c.1848dupA | p.Gly617Arg | StopAA652 | Tanımlanmamış | 15 | - | H26-H27-H28-H29-H1-H18-H19-H25-H31-H33-H35-H43-H6-H7-H8 | - | - |
| **4** | *RB1* | Duplikasyon | E19- BD | c.2167dupA | p.Ile723Ala | StopAA750 | Tanımlanmamış | 3 | - | H11-H12-H13 | - | - |
| **5** | *RB1* | Duplikasyon | E19- BD | c.2139dupA | p.Val714Ser | StopAA720 | Tanımlanmamış | 4 | - | H11-H12-H14-H15 | - | - |
| **6** | *RB1* | Duplikasyon | İntron 20 | c.2017-16dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | H9-H11-H13 | - | K1-K2 |
| **7** | *RB1* | Duplikasyon | E19- BD | c.1836_1837insA | p.Pro613Thr | StopAA652 | Tanımlanmamış | 8 | - | H26-H27-H28-H29-H31-H32 | - | K3-K5 |
| **8** | *RB1* | Duplikasyon | E19- BD | c.1855dupA | p.Thr619Asn | StopAA652 | Tanımlanmamış | 3 | - | H29 | - | K3-K5 |
| **9** | *RB1* | Duplikasyon | İntron 20 | c.2211+16dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K1-K5 |
| **10** | *RB1* | Duplikasyon | E20-BD | c.2104dupC | p.Gln720Pro | Q720P | Tanımlanmamış | 3 | - | - | - | K2-K4-K5 |
| **11** | *RB1* | Duplikasyon | E20- BD | c.2044dupA | p.Thr682Asn | StopAA691 | Tanımlanmamış | 4 | - | - | - | K2-K3-K4-K5 |
| **12** | *RB1* | Duplikasyon | E20- BD | c.1929_1930insC | p.Ser644Leu | StopAA652 | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K3-K5 |
| **13** | *RB1* | Delesyon | İntron 20 | c.2017_delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 3 | - | H9-H11-H13 | - | - |
| **14** | *RB1* | Delesyon | İntron 18 | c.1961-14delT | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 5 | - | H6-H33-H34-H36-H39 | - | - |
| **15** | *RB1* | Delesyon | İntron 20 | c.2107-20delT | | Translasyon | Tanımlanmamış | 1 | - | H14 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | olmayan bölge | | | | | | | |
| **16** | *RB1* | Delesyon | İntron 18 | c.1960+4delA | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K3-K5 |
| **17** | *RB1* | Delesyon | E19- BD | c.1841delA | p.Lys614Arg | StopAA622 | Tanımlanmamış | 3 | - | H33-H35-H40 | - | - |
| **18** | *RB1* | Silence Nükleotid Değişim | E19-BD | c.1848A>G | | K->K (616) | Tanımlanmamış | 3 | - | H3-H35-H43 | - | - |
| **19** | *RB1* | Missense Nükleotid Değişim | E19- BD | c.1949T>C | p.Phe650ser | F->S (650) | Tanımlanmamış | 1 | - | H32 | - | - |
| **20** | *RB1* | Silence Nükleotid Değişim | E19-BD | c.1941T>C | | L->L(647) | Tanımlanmamış | 1 | - | H32 | - | - |
| **21** | *RB1* | Missense Nükleotid Değişim | E19- BD | c.1867A>G | p.Asn623Asp | N->D (623) | Tanımlanmamış | 1 | - | H32 | - | - |
| **22** | *RB1* | Missense Nükleotid Değişim | E19- BD | c.2176A>G | p.Thr726Ala | T->A(726) | Tanımlanmamış | 1 | - | H33 | - | - |
| **23** | *RB1* | Silence Nükleotid Değişim | İntron 18 | c.1833A>G | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H31 | - | - |
| **24** | *RB1* | Silence Nükleotid Değişim | E19-BD | c.1833A>G | | R->R (611) | Tanımlanmamış | 1 | - | H31 | - | - |
| **25** | *RB1* | Silence Nükleotid Değişim | E19-BD | c.1848A>G | | K->K (616) | Tanımlanmamış | 3 | - | H31-H33-H35 | - | - |
| **26** | *RB1* | Missense Nükleotid Değişim | E19- BD | c.1959A>C | p.Lys653Asn | K->N (653) | Tanımlanmamış | 1 | - | H43 | - | - |
| **27** | *RB1* | İnsersiyon | İntron 20 | c.1961-5_1961-4insT | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 1 | - | H31 | - | - |
| **28** | *RB1* | İnsersiyon | İntron 20 | c.1960+11_1960+12insT | | Splice Bölgesi | Tanımlanmamış | 1 | - | H32 | - | - |
| **29** | *RB1* | İnsersiyon | E19- BD | c.1946_1947insA | p.Phe650Val | StopAA652 | Tanımlanmamış | 1 | - | H32 | - | - |
| **30** | *RB1* | İnsersiyon | E20-BD | c.2047_2048ins | p.Leu683Pro | StopAA 696 | Tanımlanmamış | 1 | - | H9 | - | - |
| **31** | *RB1* | İndel | E19 | c.1960_1960delinsAGGTT | | Splice Bölgesi | rs483352690 | 2 | - | - | - | K3-K5 |
| **32** | *RB1* | İndel | E19- BD | c.1959-1960insC | p.Val654Arg | StopAA667 | Tanımlanmamış | 14 | - | H1-H3-H4-H7-H8-H25-H26-H27-H28-H29-H31-H32-H33-H35 | - | - |

## EK- 19 CRFL2 geninde saptanan değişimlerin analiz sonuçları

Çizelge 8.18.CRFL2 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | DeğişimTipi | Lokasyonu | Nt Değişimi | a.a Değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *CRLF2* | Duplikasyon | 5'UTR | c.66dupG | Gln23Ala | StopAA65 | Tanımlanmamış | 1 | - | H14-H33-H14 | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **2** | *CRLF2* | Duplikasyon | E4-FN3 | c.354dupA | Pro119Thr | StopAA140 | Tanımlanmamış | 2 | - | H12-H13 | - | - |
| **3** | *CRLF2* | Duplikasyon | E3-IG_Like | c.249dupG | Cys84Val | StopAA140 | Tanımlanmamış | 6 | - | H11-H15-H16-H41-H44-H45 | - | - |
| **4** | *CRLF2* | Duplikasyon | E2 | c.182+13dupC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 8 | - | H1-H17-H33-H34-H37-H38-H41-H44 | - | |
| **5** | *CRLF2* | Duplikasyon | 5'UTR | c.-33dupC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H14 | - | - |
| **6** | *CRLF2* | Duplikasyon | 5'UTR | c.79+10dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H28 | - | - |
| **7** | *CRLF2* | Duplikasyon | E4-FN3 | c.459_460insT | | StopAA154 | Tanımlanmamış | 1 | - | H31 | - | - |
| **9** | *CRLF2* | Duplikasyon | 5'UTR | c.-6dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H37 | - | - |
| **10** | *CRLF2* | Duplikasyon | E4-FN3 | c.365dupC | Lys123Glu | StopAA140 | Tanımlanmamış | 3 | - | H41-H44-H45 | - | - |
| **11** | *CRLF2* | Duplikasyon | E4-FN3 | c.357dupC | Ser129Gln | Stop AA140 | Tanımlanmamış | 3 | - | H41-H44-H45 | - | - |
| **12** | *CRLF2* | Duplikasyon | 5'UTR | c.-81dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | - | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **13** | *CRLF2* | Duplikasyon | E3-FN3 | c.253_254insG | Leu85Arg | StopAA140 | Tanımlanmamış | 5 | - | - | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **14** | *CRLF2* | Duplikasyon | 5'UTR | c.-81dupT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 5 | - | - | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **15** | *CRLF2* | Delesyon | İntron 1 | c.182+13delC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 4 | - | H12-H13-H14-H41 | - | - |
| **16** | *CRLF2* | Delesyon | E3-FN3 | c.315delC | Pro105Phe | Stop AA 105 | Tanımlanmamış | 2 | - | H14-H16 | - | - |
| **17** | *CRLF2* | Delesyon | 5'UTR | c.-96delA | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 6 | - | H31-H33 | - | K1-K2-K3-K5 |
| **18** | *CRLF2* | Delesyon | 5'UTR | c.-100delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 2 | - | - | - | K1-K2 |
| **19** | *CRLF2* | Delesyon | 5'UTR | c.-105delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K2 |
| **20** | *CRLF2* | İnsersiyon | İntron 1 | c.182+18_182+19insC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 8 | - | H41-H42-H44 | - | K1-K2-K3-K4-K5 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **21** | *CRLF2* | İnsersiyon | İntron 1 | c.182+4_182+5insC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 8 | - | H41-H42-H44 | - | K1-K2-K3-K4-K5 |
| **22** | *CRFL2* | TNP | İntron 4 | c.484-18G>A | | Translasyon olmayan bölge | rs376858148 | 2 | - | H1-H5 | - | - |
| **23** | *CRFL2* | Silence Nükleotid Değişim | E1 | c.33C>G | | A->A(11) | rs14085985 | 4 | - | H17-H37-H22 | - | K2 |
| **24** | *CRFL2* | TNP | 5'UTR | c.-43T>C | | Translasyon olmayan bölge | rs150166261 | 10 | - | H8-H4-H37-H34-H20-H27-H33-H31-H17 | - | K2 |
| **25** | *CRFL2* | Missense Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.337A>G | Met113Val (Korunmuş değil) | M->V(113) | Tanımlanmamış | 1 | - | H22 | - | - |
| **26** | *CRFL2* | Missense Nükleotid Değişim | E2-IG_Like | c.133A>G | Thr45Ala | T->A(45) | Tanımlanmamış | 1 | - | H27 | - | - |
| **27** | *CRFL2* | Silence Nükleotid Değişim | E2-IG_Like | c.182+20C>T | | | Tanımlanmamış | 2 | - | H33-H41 | - | - |
| **28** | *CRFL2* | Missense Nükleotid Değişim | E2-IG_Like | c.110T>C | Phe37Ser | F->S(37) | Tanımlanmamış | 1 | - | H33 | - | - |
| **29** | *CRFL2* | Missense Nükleotid Değişim | E2-IG_Like | c.101T>C | Ile34Thr | I->T(34) | Tanımlanmamış | 2 | - | H33-H41 | - | - |
| **30** | *CRFL2* | Missense Nükleotid Değişim | E2-IG_Like | c.124G>A | Val42Met | V->M (42) | Tanımlanmamış | 1 | - | H34 | - | - |
| **31** | *CRFL2* | Missense Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.343T>C | Tyr115His | Y->H (115) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K4 |
| **32** | *CRFL2* | Nonsense Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.271C>T | Arg91Ter | R->Stop [91] | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K4 |
| **33** | *CRFL2* | Silence Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.345T>C | | Y->Y (115) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K5 |
| **34** | *CRFL2* | Missense Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.257T>C | Leu86Pro | L->P (86) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K5 |
| **35** | *CRFL2* | Silence Nükleotid Değişim | E1 | c.39T>C | | F->F(13) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K5 |
| **36** | *CRLF2* | İndel | 5'UTR | c.-105_-102delinsCC | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H14 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **37** | *CRLF2* | Silence Nükleotid Değişim | İntron 1 | c.80-20A>G | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H44 | - | - |
| **38** | *CRLF2* | Missense Nükleotid Değişim | E3-FN3D | c.617T>C | | V_>A (206) | Tanımlanmamış | 1 | - | H5 | - | - |
| **39** | *CRLF2* | Silence Nükleotid Değişim | 5'UTR | c.-76A>G | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H8 | - | - |
| **40** | *CRLF2* | Missense Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.322A>G | Thr108Ala | T->A (108) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K1 |
| **41** | *CRLF2* | Silence Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.312C>T | | H->H (104) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K1 |
| **42** | *CRLF2* | Missense Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.301A>G | Asn101Asp | N->D (101) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K1 |
| **43** | *CRLF2* | Missense Nükleotid Değişim | E3-IG_Like | c.299G>A | Arg100Lys | R->K(100) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K1 |
| **44** | *CRLF2* | Missense Nükleotid Değişim | E2-IG_Like | c.127C>A | Gln43Lys | Q->K (43) | Tanımlanmamış | 1 | - | - | - | K3 |
| **45** | *CRLF2* | Silence Nükleotid Değişim | İntron 1 | c.80-3T>A | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H4 | - | - |
| **46** | *CRLF2* | Silence Nükleotid Değişim | İntron 1 | c.80-13T>C | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 1 | - | H44 | - | - |
| **47** | *CRLF2* | Silence Nükleotid Değişim | E2-IG_Like | c.111T>C | | F->F (37) | Tanımlanmamış | 1 | - | H41 | - | - |

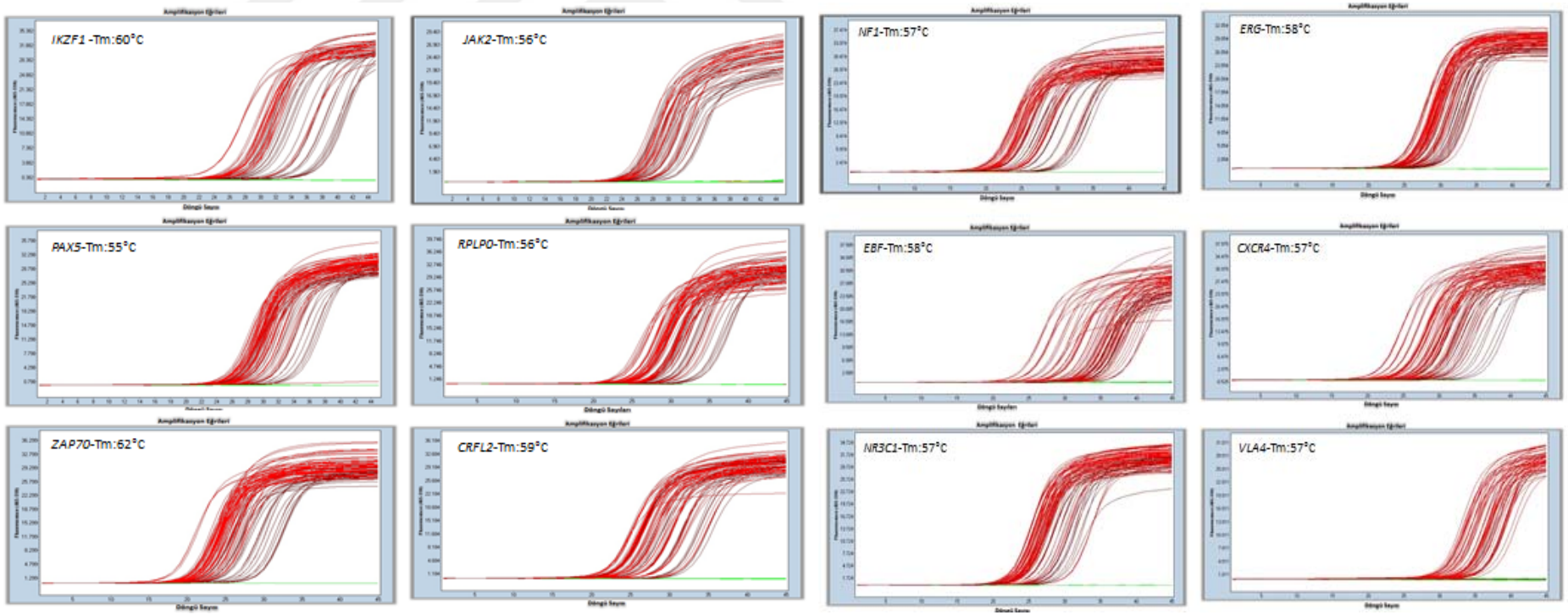
## EK- 20 NF1 geninde saptanan değişimlerin analizsonuçları

Çizelge 8.19.NF1 geninde saptanan değişimlerin özellikleri, sınıflandırılması ve çalışma örneklerinde dağılımı

| No | Gen | Değişim Tipi | Lokasyon | Nt Değişimi | a.a değişimi | Sonucu | Rs Numara | Taşıyan Örnek Sayısı | Hasta | | Kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Homozigot | Heterozigot | Homozigot | Heterozigot |
| **1** | *NF1* | Silence Nükleotid Değişimi | E21-GRD | c.2568C>T | | S->S (856) | Tanımlanmamış | 2 | - | H10-H35 | - | - |
| **2** | *NF1* | Missence Nükleotid Değişimi | E21-GRD | c.2546G>A | p.Arg855Lys | R->K (855) | Tanımlanmamış | 1 | - | H11 | - | - |
| **3** | *NF1* | Silence Nükleotid Değişimi | E21-GRD | c.2499 C>T | | S->S (833) | Tanımlanmamış | 3 | - | H11-H16-H35 | - | - |
| **4** | *NF1* | Missence Nükleotid Değişimi | E21-GRD | c.2474 C>G | p.Ser825Cys | S->C (825) | Tanımlanmamış | 3 | - | H11-H16-H35 | - | - |
| **5** | *NF1* | Missence Nükleotid Değişimi | E21-GRD | c.2461A>C | p.Ser821Arg | S->R (821) | Tanımlanmamış | 3 | - | H11-H16-H35 | - | - |
| **6** | *NF1* | Delesyon | E21-GRD | c.2615_2616delAA | | StopAA873 | Tanımlanmamış | 3 | H3-H11-H18 | - | - | - |
| **7** | *NF1* | Delesyon | E21-GRD | c.2604_2610delTCCAGTC | | StopAA875 | Tanımlanmamış | 3 | H3-H11-H18 | - | - | - |
| **8** | *NF1* | Delesyon | E40 | c.5922delT | | StopAA 1978 | Tanımlanmamış | 6 | H2-H3-H6-H9-H14 | - | K1 | - |
| **9** | *NF1* | Delesyon | E21-GRD | c.2546delG | p.Gly849Glu | StopAA 877 | Tanımlanmamış | 12 | - | H16-H18-H19-H21-H22-H23-H24-H25-H28 | - | K1-K2-K5 |
| **10** | *NF1* | Delesyon | E4 | c.5813-5delT | | Translasyon olmayan bölge | Tanımlanmamış | 4 | - | H19-H23-H20-H22 | - | - |
| **11** | *NF1* | Delesyon | E21-GRD | c.2533delT | p.Cys845Val | Stop AA 877 | Tanımlanmamış | 1 | - | H28 | - | - |
| **12** | *NF1* | İndel | E21-GRD | c.2603_2606delinsTGTCG | p.Gly868Val | StopAA 872 | Tanımlanmamış | 11 | - | H5-H6-H13-H20-H21-H22-H28-H29-H37-H45 | - | K5 |
| **13** | *NF1* | İnsersiyon | E21-GRD | c.2602_2603insCGT | p.Gly867insAlaCys | G->AC (868) | Tanımlanmamış | 11 | - | H2-H4-H10 H12-H18-H25-H26-H28-h34-H42 | - | - |

**EK-21**

**Gen ifade analizi genlere ait amplifikasyon eğri grafikleri**




Şekil 8.3. Genlere ait amplifikasyon eğrileri grafik görselleri

## EK-22

### Gen ifade analizi çalışma örneklerine ait Cp değerleri

Çizelge 8.20.Örneklerin ortalama Cp değerleri

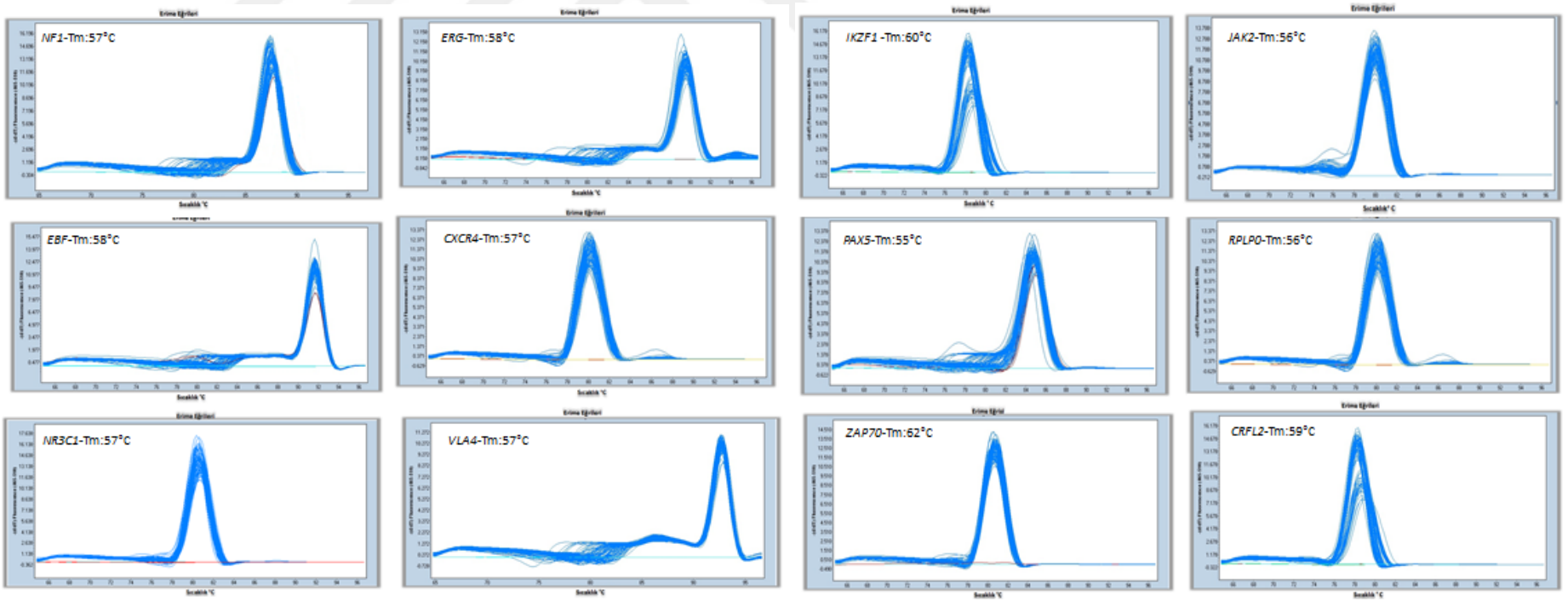
| | *RPLP0* | *NR3C1* | *PAX5* | *JAK2* | *ERG-1* | *CRLF2* | *IKZF1* | *VLA-4* | *ZAP70* | *NF1* | *CXCR4* | *EBF-1* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **H-1** | 21,22 | 30,47 | 28,17 | 27,41 | 28,80 | 28,01 | 29,48 | 24,97 | 29,14 | 28,10 | 24,92 | 27,78 |
| **H-2** | 22,54 | 26,94 | 26,44 | 24,12 | 32,17 | 36,24 | 25,27 | 22,89 | 23,91 | 26,78 | 22,65 | 26,30 |
| **H-3** | 21,84 | 26,98 | 26,87 | 24,59 | 33,33 | 26,80 | 26,81 | 23,67 | 24,13 | 26,93 | 22,91 | 26,20 |
| **H-4** | 22,70 | 28,39 | 28,89 | 25,26 | 31,40 | 37,28 | 28,28 | 24,09 | 25,01 | 27,90 | 24,97 | 28,06 |
| **H-5** | 20,42 | 25,95 | 23,36 | 23,71 | 26,30 | 20,60 | 26,37 | 22,46 | 23,86 | 24,53 | 21,92 | 22,72 |
| **H-6** | 21,01 | 26,75 | 26,34 | 24,46 | 33,21 | 26,78 | 27,07 | 22,70 | 23,98 | 26,24 | 23,25 | 26,31 |
| **H-7** | 21,98 | 28,03 | 28,71 | 25,02 | 32,63 | 26,40 | 26,81 | 23,69 | 25,14 | 27,12 | 24,14 | 27,73 |
| **H–8** | 20,83 | 26,70 | 26,07 | 24,77 | 33,42 | 28,58 | 25,56 | 22,47 | 23,53 | 26,09 | 22,74 | 25,66 |
| **H-9** | 21,04 | 27,87 | 26,58 | 25,54 | 34,79 | 26,26 | 27,02 | 23,09 | 24,75 | 26,70 | 23,85 | 27,39 |
| **H-10** | 24,67 | 31,09 | 30,95 | 28,57 | 30,51 | 39,16 | 31,78 | 28,36 | 29,75 | 29,49 | 27,06 | 29,60 |
| **H-11** | 21,26 | 26,08 | 25,32 | 24,12 | 33,85 | 22,66 | 26,52 | 22,57 | 23,92 | 26,57 | 23,41 | 25,77 |
| **H-12** | 22,86 | 29,65 | 31,84 | 26,31 | 30,57 | 29,89 | 28,84 | 26,80 | 27,68 | 29,03 | 25,40 | 31,96 |
| **H-13** | 21,64 | 25,58 | 29,64 | 21,49 | 26,97 | 34,25 | 27,60 | 23,13 | 26,44 | 26,91 | 24,31 | 29,86 |
| **H-14** | 21,56 | 25,00 | 24,98 | 21,75 | 34,76 | 31,47 | 24,22 | 20,42 | 23,08 | 25,92 | 23,54 | 20,36 |
| **H-15** | 21,55 | 24,92 | 29,82 | 21,69 | 32,27 | 31,32 | 27,30 | 21,99 | 23,11 | 26,66 | 23,79 | 29,59 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **H-16** | 24,11 | 28,51 | 30,56 | 24,86 | 34,37 | 33,82 | 35,65 | 25,57 | 26,90 | 29,81 | 27,76 | 31,66 |
| **H-17** | 23,13 | 26,11 | 30,34 | 23,83 | 35,37 | 35,14 | 29,67 | 25,00 | 25,45 | 28,56 | 25,64 | 29,53 |
| **H-18** | 22,39 | 25,28 | 26,81 | 22,29 | 33,65 | 35,36 | 26,35 | 21,71 | 22,30 | 26,69 | 24,25 | 27,76 |
| **H-19** | 22,65 | 24,50 | 27,81 | 20,45 | 34,75 | 36,11 | 27,81 | 22,70 | 24,98 | 25,95 | 24,64 | 26,91 |
| **H-20** | 20,94 | 26,07 | 25,52 | 21,95 | 34,45 | 32,07 | 26,15 | 20,85 | 21,92 | 25,95 | 23,16 | 26,36 |
| **H-21** | 22,88 | 32,75 | 28,26 | 24,92 | 29,32 | 35,56 | 34,42 | 30,04 | 31,51 | 27,99 | 23,87 | 31,10 |
| **H-22** | 21,51 | 24,43 | 27,92 | 23,45 | 26,54 | 30,23 | 27,70 | 22,57 | 25,56 | 26,82 | 24,44 | 24,89 |
| **H-23** | 23,32 | 24,70 | 27,25 | 22,26 | 32,75 | 28,80 | 27,10 | 23,78 | 24,45 | 26,95 | 23,19 | 27,88 |
| **H-24** | 20,10 | 24,86 | 25,59 | 23,33 | 25,08 | 31,76 | 28,83 | 21,90 | 27,45 | 26,13 | 22,18 | 21,51 |
| **H-25** | 20,86 | 24,08 | 24,85 | 21,88 | 23,60 | 35,95 | 26,00 | 23,51 | 24,36 | 24,89 | 22,83 | 22,75 |
| **H-26** | 21,20 | 23,76 | 26,62 | 39,98 | 30,80 | 32,38 | 24,88 | 21,18 | 23,57 | 31,21 | 30,66 | 25,03 |
| **H-27** | 21,09 | 24,91 | 25,48 | 21,59 | 29,12 | 34,01 | 23,78 | 21,95 | 24,53 | 26,81 | 22,46 | 24,87 |
| **H-28** | 20,84 | 24,81 | 27,03 | 21,34 | 32,06 | 34,64 | 24,93 | 20,63 | 23,43 | 25,86 | 23,63 | 26,61 |
| **H-29** | 21,91 | 26,66 | 26,68 | 21,64 | 34,24 | 34,65 | 28,18 | 22,01 | 23,62 | 26,90 | 23,69 | 27,17 |
| **H-30** | 21,68 | 23,20 | 26,67 | 21,01 | 32,70 | 33,62 | 24,42 | 21,83 | 24,52 | 25,59 | 22,53 | 27,29 |
| **H-31** | 21,81 | 23,58 | 25,68 | 20,69 | 30,94 | 30,86 | 23,37 | 20,55 | 22,20 | 25,68 | 23,07 | 26,14 |
| **H-32** | 21,16 | 24,80 | 25,70 | 21,19 | 33,41 | 34,67 | 25,23 | 21,84 | 23,39 | 25,84 | 23,34 | 25,55 |
| **H-33** | 21,91 | 24,74 | 25,95 | 22,21 | 24,67 | 33,29 | 26,46 | 23,20 | 23,20 | 26,15 | 22,22 | 23,83 |
| **H-34** | 21,81 | 21,73 | 26,38 | 27,70 | 27,74 | 35,07 | 33,36 | 25,97 | 28,82 | 28,23 | 24,63 | 28,14 |
| **H-35** | 25,65 | 32,95 | 30,92 | 26,91 | 32,55 | 29,47 | 30,94 | 25,55 | 27,77 | 30,83 | 29,40 | 30,83 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **H-36** | 21,22 | 26,43 | 22,05 | 24,20 | 28,47 | 32,91 | 26,75 | 22,05 | 24,18 | 25,80 | 20,87 | 25,80 |
| **H-37** | 25,11 | 30,22 | 28,18 | 25,57 | 34,80 | 33,69 | 28,30 | 23,77 | 24,24 | 29,87 | 25,72 | 29,90 |
| **H-38** | 24,69 | 28,72 | 28,86 | 24,25 | 34,27 | 34,94 | 27,05 | 23,10 | 24,15 | 28,57 | 25,08 | 28,57 |
| **H-39** | 24,10 | 29,97 | 28,05 | 25,15 | 35,72 | 34,07 | 26,32 | 24,17 | 24,15 | 28,54 | 24,22 | 28,54 |
| **H-40** | 23,53 | 27,62 | 28,60 | 22,47 | 34,23 | 35,15 | 26,93 | 22,64 | 23,59 | 27,76 | 23,97 | 27,76 |
| **H-41** | 25,05 | 29,65 | 31,11 | 23,27 | 37,95 | 33,94 | 28,57 | 25,03 | 25,19 | 28,97 | 26,12 | 28,97 |
| **H-42** | 23,59 | 28,96 | 29,16 | 23,09 | 33,31 | 35,80 | 25,97 | 22,63 | 24,13 | 28,42 | 25,70 | 28,42 |
| **H-43** | 25,39 | 31,67 | 30,43 | 26,68 | 34,38 | 36,16 | 33,48 | 28,25 | 25,02 | 30,63 | 27,63 | 30,63 |
| **H-44** | 22,30 | 26,51 | 23,04 | 22,54 | 35,58 | 32,49 | 24,21 | 21,13 | 23,52 | 25,87 | 21,56 | 25,87 |
| **H-45** | 29,09 | 40,00 | 36,69 | 40,60 | 33,13 | 35,04 | 27,74 | 23,75 | 25,61 | 31,51 | 30,40 | 31,51 |

**EK-23**

**Gen ifade analizi yapılan genlere ait erime eğrisi grafikleri**




Şekil 8.4.Genlere ait erime eğrileri (Melting Curve) görselleri

## EK-24

**Gen ifade analizi yapılan çalışma örneklerine ait gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanındaki karşılıkları**

Çizelge 8.21.Örneklerin gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları

| Örnek No | *VLA4* | *CRLF2* | *NR3C1* | *NF1* | *PAX5* | *EBF-1* | *JAK2* | *CXCR4* | *ZAP70* | *IKZF1* | *ERG1* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **K-1** | 5,40 | 5,51 | 2,84 | 1,66 | 0,41 | 1,44 | 1,87 | 6,94 | 7,78 | 5,50 | -1,09 |
| **K-2** | 5,02 | 3,21 | 1,72 | 0,87 | -0,92 | 0,35 | 1,21 | 5,71 | 6,91 | 3,85 | -1,17 |
| **K-3** | 5,30 | 4,25 | 1,67 | 1,61 | 1,44 | 2,26 | 1,14 | 7,50 | 7,74 | 4,41 | -1,44 |
| **K-4** | 6,06 | 3,76 | 3,23 | 2,76 | 1,56 | 1,55 | 2,45 | 7,79 | 7,20 | 4,94 | -1,24 |
| **K-5** | 7,61 | 6,78 | 3,12 | 3,52 | 2,93 | 3,23 | 3,37 | 7,97 | 9,77 | 6,38 | 1,26 |
| **K-6** | 5,16 | 3,30 | 1,14 | 2,41 | 0,84 | 1,69 | 2,33 | 6,90 | 7,05 | 4,96 | -0,55 |
| **K-7** | 6,56 | 1,71 | 2,99 | 3,68 | 1,90 | 1,57 | 2,86 | 9,05 | 8,14 | 5,32 | 1,71 |
| **K-8** | 4,89 | 2,32 | 1,67 | 1,31 | 0,04 | 0,80 | 0,93 | 6,43 | 6,25 | 3,63 | -1,45 |
| **K-9** | 6,04 | 3,28 | 2,38 | 2,16 | 0,72 | 3,85 | 3,99 | 7,21 | 9,64 | 6,02 | 1,83 |
| **K-10** | 4,51 | 1,22 | 0,59 | 0,24 | -0,86 | -0,99 | 0,55 | 5,40 | 5,79 | 2,20 | -2,53 |
| **H-1** | 3,32 | 4,36 | -1,78 | -0,48 | -1,37 | 0,23 | -0,26 | 4,49 | 3,37 | 2,63 | 3,14 |
| **H-2** | 6,10 | 0,50 | 2,43 | 2,14 | 1,33 | 2,76 | 3,80 | 7,83 | 9,24 | 7,16 | 0,49 |
| **H-3** | 4,87 | 5,64 | 1,77 | 1,36 | 0,33 | 2,25 | 2,77 | 6,96 | 8,43 | 5,31 | -1,43 |
| **H-4** | 5,30 | 0,00 | 1,31 | 1,04 | -0,70 | 1,27 | 2,94 | 5,74 | 8,39 | 4,88 | 1,50 |
| **H-5** | 4,58 | 8,18 | 1,43 | 2,74 | 2,22 | 4,24 | 2,31 | 6,68 | 7,43 | 4,42 | 5,26 |
| **H-6** | 4,90 | 4,93 | 1,25 | 1,39 | 0,08 | 1,42 | 2,17 | 5,91 | 7,84 | 4,38 | -2,02 |
| **H-7** | 4,98 | 6,01 | 1,00 | 1,27 | -1,17 | 0,95 | 2,52 | 5,91 | 7,64 | 5,44 | -0,52 |
| **H-8** | 4,92 | 3,67 | 1,13 | 1,39 | 0,16 | 1,85 | 1,73 | 6,24 | 8,08 | 5,43 | -2,42 |
| **H-9** | 4,62 | 5,27 | 0,31 | 0,90 | -0,11 | 0,44 | 1,23 | 5,36 | 7,17 | 4,44 | -3,78 |
| **H-10** | 3,71 | 0,58 | 0,70 | 1,03 | -0,81 | 1,57 | 1,74 | 5,46 | 5,84 | 3,81 | 4,23 |
| **H-11** | 5,22 | 7,66 | 2,05 | 1,25 | 1,20 | 2,14 | 2,68 | 5,98 | 8,11 | 5,04 | -2,53 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **H-12** | 3,34 | 4,65 | 0,36 | -0,05 | -3,18 | -2,21 | 2,15 | 5,47 | 6,13 | 4,58 | 2,58 |
| **H-13** | 5,53 | 1,84 | 2,85 | 1,24 | -2,02 | -1,54 | 5,52 | 5,73 | 5,92 | 4,45 | 5,76 |
| **H-14** | 7,92 | 2,71 | 3,24 | 2,24 | 1,84 | 7,70 | 5,20 | 6,48 | 8,61 | 6,95 | -3,65 |
| **H-15** | 6,48 | 2,75 | 3,30 | 1,44 | -2,25 | -1,35 | 5,25 | 6,20 | 8,58 | 4,60 | -0,67 |
| **H-16** | 5,47 | 4,16 | 2,64 | 0,26 | -0,63 | -1,13 | 4,52 | 4,25 | 7,72 | 0,50 | -0,94 |
| **H-17** | 5,14 | 2,86 | 3,73 | 0,76 | -1,30 | 0,10 | 4,63 | 5,64 | 8,05 | 4,19 | -2,99 |
| **H-18** | 7,47 | 2,13 | 3,75 | 2,14 | 1,03 | 1,17 | 5,43 | 6,45 | 9,99 | 6,06 | -1,58 |
| **H-19** | 6,81 | 2,10 | 4,61 | 3,18 | 0,41 | 2,24 | 7,39 | 6,28 | 8,01 | 5,18 | -2,68 |
| **H-20** | 6,98 | 1,96 | 1,83 | 1,66 | 0,83 | 1,27 | 4,46 | 6,32 | 9,02 | 4,93 | -3,82 |
| **H-21** | 0,33 | 2,49 | -1,89 | 1,16 | 0,23 | -1,66 | 3,38 | 7,29 | 2,83 | 0,35 | 4,03 |
| **H-22** | 5,92 | 3,09 | 3,66 | 1,22 | -0,68 | 3,22 | 3,56 | 5,48 | 6,53 | 4,26 | 6,16 |
| **H-23** | 6,41 | 5,17 | 5,04 | 2,68 | 1,48 | 1,88 | 6,28 | 8,41 | 9,04 | 6,31 | 0,32 |
| **H-24** | 5,28 | 1,32 | 2,07 | 0,73 | 0,04 | 5,28 | 2,42 | 6,63 | 3,72 | 2,15 | 6,67 |
| **H-25** | 4,49 | 0,58 | 3,37 | 2,75 | 1,34 | 4,74 | 4,47 | 6,61 | 6,94 | 4,97 | 9,11 |
| **H-26** | 6,91 | 2,09 | 3,93 | -3,82 | 0,14 | 2,80 | -12,31 | -1,38 | 7,89 | 6,13 | 0,78 |
| **H-27** | 6,11 | 1,44 | 2,91 | 0,87 | 1,01 | 2,86 | 4,94 | 7,20 | 7,01 | 6,87 | 2,70 |
| **H-28** | 7,09 | 1,00 | 2,76 | 1,67 | -0,52 | 0,94 | 4,96 | 5,75 | 7,69 | 5,77 | -1,04 |
| **H-29** | 6,78 | 1,94 | 2,20 | 1,48 | 0,71 | 1,33 | 5,61 | 6,62 | 8,47 | 4,24 | -2,72 |
| **H-30** | 6,74 | 2,08 | 4,80 | 2,70 | 0,52 | 1,01 | 6,00 | 7,64 | 7,53 | 6,90 | -1,08 |
| **H-31** | 8,01 | 3,13 | 4,61 | 2,73 | 1,47 | 2,25 | 6,42 | 7,19 | 9,55 | 7,81 | 1,15 |
| **H-32** | 6,27 | 1,27 | 3,05 | 1,97 | 0,88 | 2,26 | 5,38 | 6,33 | 8,00 | 5,82 | -2,38 |
| **H-33** | 5,69 | 2,40 | 3,76 | 2,30 | 1,33 | 4,60 | 5,07 | 8,18 | 8,82 | 5,55 | 8,75 |
| **H-34** | 3,09 | 1,71 | 6,12 | -0,04 | 0,88 | 0,29 | -0,19 | 5,54 | 4,11 | 0,21 | 4,99 |
| **H-35** | 7,40 | 7,99 | 0,20 | 1,55 | 0,17 | 1,49 | 4,76 | 4,68 | 9,06 | 6,21 | 4,46 |
| **H-36** | 5,86 | 1,62 | 1,91 | 2,35 | 4,46 | 2,29 | 2,83 | 8,72 | 7,89 | 4,62 | 3,50 |
| **H-37** | 8,27 | 4,90 | 2,18 | 2,00 | 2,30 | 1,91 | 5,39 | 7,75 | 11,59 | 7,38 | 2,11 |
| **H-38** | 8,39 | 3,73 | 3,15 | 2,90 | 1,24 | 2,84 | 6,13 | 7,97 | 11,26 | 7,77 | 2,13 |
| **H-39** | 6,99 | 3,69 | 1,44 | 2,36 | 1,45 | 2,30 | 4,78 | 8,24 | 10,69 | 7,68 | 0,39 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **H-40** | 7,63 | 2,49 | 3,05 | 2,60 | 0,38 | 2,54 | 6,55 | 7,93 | 10,63 | 6,74 | 1,05 |
| **H-41** | 7,23 | 4,69 | 2,65 | 2,85 | -0,58 | 2,79 | 7,33 | 7,31 | 10,71 | 7,15 | -0,50 |
| **H-42** | 7,69 | 2,15 | 1,87 | 1,99 | -0,11 | 1,93 | 6,08 | 6,30 | 10,22 | 7,41 | 1,85 |
| **H-43** | 5,04 | 3,66 | 1,12 | 1,50 | 0,40 | 1,44 | 4,70 | 6,16 | 11,18 | 4,33 | 2,72 |
| **H-44** | 7,62 | 2,92 | 2,88 | 3,32 | 4,54 | 3,26 | 5,31 | 9,09 | 9,50 | 7,29 | -1,23 |
| **H-45** | 12,12 | 7,91 | -2,96 | 4,18 | -2,07 | 4,12 | -3,78 | 7,02 | 14,24 | 11,57 | 7,30 |

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı**: Dilara Fatma AKIN

**Doğum Yeri**: İstanbul

**Doğum Tarihi**: 10.05.1984

**Medeni Hali**: Evli

**Yabancı Dili:** İngilizce, Almanca (başlangıç seviyesinde)

**Eğitim Durumu**

**Lise**: Muğla Turgut Reis Lisesi (1998-2002)

**Lisans:** Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji (2003-2007)

**Yüksek Lisans:** Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji(2008-2010)

**İş Tecrübesi**

**Kurumu:** Özel LÖSANTE Çocuk ve Yetişkin Hastanesi

**Görevi:** Genetik Laboratuvarı /Moleküler Genetik Laboratuvar Birim sorumlusu

**Yılları:** 2010-halen

**Kurumu:** Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) İmmunoloji Alerji Bölümü,

**Görevi:** Stajyer **Yılları:** 2012 6 ay

**Kurumu:** Encorium OY LTD

**Görevi:** Veri Koordinatörü **Yılları:** 2009-2010

## 10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Akın D.F, Öner D, Mumcuoğlu M, Bahçe M, Kurekci E, Ezer Ü, Akar N. Detection of TET2, KRAS and CBL variants by Next Generation Sequencing and analysis of their correlation with JAK2 and FLT3 in childhood AML. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2016 Apr;17(2):209–215. doi:10.1016/j.ejmhg.2015.09.002.

**Doktora Öncesi Yayınlar**

Öner D, Akın DF, Mumcuoğlu M, Kurekci E, Ezer Ü, Akar N Screening of Variations in CD22 Gene in Children with B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. Unpublish. (Genetic Testing and Molecular Biomarkers PubMed PMID: 27486888).

Mumcuoğlu M, Akın DF, Ezer Ü, Akar N. Ankaferd Blood Stopper induces apoptosis and regulates PAR1 and EPCR expression in human leukemia cells. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2015 Jan;16;83(1): 19-27.

Akın DF, Eğin Y, Akar N. Does FVL have an effect on longevity? The Egyptian Journal of Medical Human Geneticis. 2014 July; 15(3):281–285.

Akın DF, Akar N. Effect of Factor V Leiden on Thrombosis in Childhood Leukemia. Open Journal of Blood Diseases. 2013 Sep;3: 100-103.

Akın DF, Akkaya E, Kürekçi AE, Arslan C, Ezer U, Akar N. A Novel Homozygous Nucleotide Deletion in the JAK2 Gene in a Pediatric Patient with B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. Turk J Haematol. 2012 Jun;29(2):185-7.

Akın DF, Sipahi K, Kayaalp T, Eğin Y, Taşdelen S, Kürekçi E, Ezer U, Akar N. Factor V Leiden and Prothrombin 20210A Mutations among Turkish Pediatric LeukemiaPatients. Leuk Res Treatment. 2012;250432.

## KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

Akın DF, Sipahi K, Kayaalp T, Eğin Y, Tasdelen S, Kürekçi AE, Ezer Ü, Akar N. Factor V Leiden and Prothrombin 20210A Mutations Among Turkish Pediatric Leukemia Patients. 22nd International Congress on Thrombosis, 6-9 October 2012, Nice Acropolis, France.

### Ulusal Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

Akın DF, Aşlar D, Mumcuoğlu M, Öztürk M, Ezer Ü, Akar N, Kürekçi AE. Yüksek Doz Metotreksat Alan Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda, AANAT Gen Polimorfizmi Ve Gen İfadelenme Düzeyine Etkisinin Araştırılması.40. Ulusal Hematoloji Kongresi, 22-25 Ekim 2014, Antalya.

Akın DF, Aşlar D, Mumcuoğlu M, Ezer Ü, Kürekçi AE, Akar N. Yeni Nesil Sekanslama Tekniği İle Tet2, KRAS Ve CBL Gen Değişimlerinin Saptanması Ve Jak2 V617F/FLT3-ITD Mutasyonları İle Pediatrik AML'li Hastalarda Birlikteliğinin Değerlendirilmesi. 40. Ulusal Hematoloji Kongresi, 22-25 Ekim 2014, Antalya.

Akın DF, Aşlar D, Mumcuoğlu M, Ezer Ü, Kürekçi AE, Akar N.Çocukluk çağı Akut LenfoblastikLösemili hastalarda RFC G80A polimorfizminin sıklığı ve MTHFR polimorfizmleri ile ilişkilendirilmesi,23-27 Haziran 2014, Eskişehir.

Akın DF, Mumcuoğlu M, Öztürk M, Bahçe M, Ezer Ü, Kürekçi AE, Akar N. HDAC5, HDAC7, HDAC9 m-RNA Ekspresyonlarının, Çocukluk Cağı Akut Lösemilerinin Farklı Tiplerinde, Tedavi Başı, Tedavi Sonrası ve Sağlıklı Çocuklarla Karşılaştırmalı Analizi. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, 23-26 Ekim 2013, Antalya.

Akın DF, Mumcuoğlu M, Kürekçi AE, Bahçe M, Ezer Ü. RUNX-1 Gen Değişimlerinin Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi Hastalarında Yeni Nesil Sekanslama Teknolojisi ile Taranması. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, 23-26 Ekim 2013, Antalya.

The Egyptian Journal of Medical Human Genetics (2016) 17, 209–215

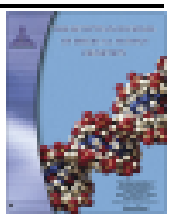
HOSTED BY

ELSEVIER

Ain Shams University

The Egyptian Journal of Medical Human Genetics

www.ejmhg.eg.net
www.sciencedirect.com



ORIGINAL ARTICLE

# Detection of *TET2*, *KRAS* and *CBL* variants by Next Generation Sequencing and analysis of their correlation with *JAK2* and *FLT3* in childhood AML

Dilara Fatma Akin [a,*], Deniz Aslar Oner [a], Mine Mumcuoglu [a], Ustun Ezer [b], Muhterem Bahce [c], Emin Kurekci [b], Nejat Akar [d]

[a] *LOSEV the Foundation for Children with Leukemia, Cancer Genetics Research Laboratory, Ankara, Turkey*
[b] *LOSEV/Losante, The Hospital for Children with Leukemia, Ankara, Turkey*
[c] *Gene-Lab Genetic Diseases Diagnosis Center, Ankara, Turkey*
[d] *TOBB-ETU Hospital, Ankara, Turkey*

Received 30 July 2015; accepted 9 September 2015
Available online 1 October 2015

KEYWORDS:

Childhood acute myeloid leukemia;
Mutation;
*TET2*;
*KRAS*;
*CBL*;
Next Generation Sequencing

**Abstract** *Background:* Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous clonal disorder in terms of cytogenetic and molecular aberrations. Ten-Eleven-Translocation 2 (*TET2*), Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*), and Casitas B-cell lymphoma (*CBL*) have an important role pathogenesis of acute myeloid leukemia (AML) and their activated mutations confer proliferative and survival signals.

*Aim:* In this study, we aimed to find possible genetic markers for molecular analysis in childhood AML by screening hot-spot exons of *TET2*, *KRAS*, and *CBL* using Next Generation Sequencing (NGS) analysis. In addition, association between found variants and mutations of Janus Kinase-2 (*JAK2*) and Fms-Related Tyrosine Kinase (*FLT3*) were analyzed which are important prognostic risk factors for AML.

*Methods:* Eight patients who were diagnosed with pediatric AML at Losante Pediatric Hematology–Oncology Hospital were included to the study. Hot-spot exons of *TET2*, *KRAS* and *CBL* genes were screened using the NGS method. Furthermore, *FLT3*-Internal Tandem Duplicate (*FLT3-ITD*) and *JAK2*-V617F were analyzed by Real Time Polymerase chain Reaction (Real Time-PCR).

* Corresponding author at: LOSEV Foundation for Children with Leukemia, Cancer Genetics Research Laboratory, Konya – Hayrana Yolu, Koparan Koyu Mevkii Golbasi, Incek, Ankara, Turkey. Tel.: +90 5363026816; fax: +90 312 499 43 81.
E-mail address: dilara2684@hotmail.com (D.F. Akin).

Peer review under responsibility of Ain Shams University.

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2015.09.002
1110-8630 © 2015 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Ain Shams University.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

*Results:* In total, we identified 20 variants in studied genes by NGS. In our patient group, 16 variants in the *TET2* (seven novel, seven missense and two silent), two variants in the *KRAS* (one missense and one intronic) and two variants in the *CBL* (two novel) were found. All of AML patients were found negative for JAK V617 F. Three of the eight patients (37.5%) showed mutations of both FLT3-ITD and *TET2*, *KRAS*, *CBL*.

*Conclusion:* We found novel mutations for *TET2*, *KRAS*, and *CBL*. The detected variants in this article seem to be the first screening results of genes studied by NGS in childhood AML patients. Our results also showed some degree of association between FLT3-ITD and *TET2*, *KRAS*, *CBL* mutations.

© 2015 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Ain Shams University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 1. Introduction

AML is a heterogeneous clonal neoplasm characterized by accumulated genetic aberrations, which causes enhanced proliferation, maturation arrest, increased survival of the leukemic blast cells and variable response to therapy [1–5].

During the past decades, a number of recurrent cytogenetic and molecular genetic abnormalities have been identified in AML such as *t*(8;21), inv(16), *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *TET2*, *KRAS*, and *CBL*.

TET family gene members (*TET1*, *TET2*, and *TET3*) have functions mostly in hematopoietic differentiation. The TET oncogene family member 2 (*TET2*) gene located at chromosome band 4q24 catalyzes the conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine [1,6,7]. *TET2* mutations are frequently detected during progression of MPN (myeloproliferative neoplasms) or MDS (myelodysplastic syndromes) to AML [1]. *TET2* mutations may contribute to leukemogenesis by altering epigenetic regulation of transcription via DNA methylation. The incidence of *TET2* mutations is approximately 10–20% in AML [2].

RAS (Rat Sarcoma Virus) proteins including *HRAS* (Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog), *KRAS* and *NRAS* (Neuroblastoma RAS Viral V-Ras Oncogene Homolog) are members of the small GTPases superfamily [8]. Abnormal *RAS* function is related to hyperproliferative developmental diseases and cancers [2]. *RAS* mutations, especially *KRAS*, represent about 90% of cancer-associated mutations. RAS proteins play a major role in cell signaling pathway of cell proliferation, differentiation, and survival [9]. The *RAS* mutations are the most common mutations in AML which are seen in approximately 25–44% of patients. Among RAS mutations, *KRAS* mutations are the most frequently seen and found in 10–15% of these patients [10].

*CBL*, *CBL-B*, *and CBL CJ1* are the members of the *CBL* which is localized on human chromosome 11 q23 containing several functional domains [11]. *CBL* is a mammalian gene encoding the protein CBL which is an E3 ubiquitin-protein ligase involved in cell signaling and protein ubiquitination. Mutations of this gene have been implicated in a number of human cancers, particularly in AML. These mutations have also been observed in 1% of AML. *CBL* mutations have been reported in myeloid malignancies and uniformly affect either the linker region or the RING finger domain. Loss of ubiquitination of activated receptor tyrosine kinases is thought to contribute to the transforming potential of leukemia-associated mutant CBL proteins [12].

JAK2 (located in chromosome 9p24) encodes a cytoplasmic tyrosine kinase. JAK2V617F presents a somatic point mutation (including exon 12 of the *JAK2*) resulting in the substitution of valine by phenylalanine amino acid at codon 617. This mutation, which causes JAK homology 2 (JH2) negative regulatory domain, derails JAK2 kinase regulatory activity which effects cytokine independent proliferation of hematopoietic cells [13]. The JAK2 V617F mutation is found in 1.8–28% of patients with AML [14].

FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) is a member of the receptor tyrosine kinase (RTK) III subfamily. The *FLT3* receptor gene (located in chromosome 13q12) encodes a 993 amino acid protein. This protein is expressed in bone marrow, thymus and lymph nodes [15]. *FLT3* plays a major role in cell survival, proliferation, and differentiation of hematopoietic stem cells [16]. *FLT3-ITD* is found in about one quarter of newly diagnosed AML patients. This mutation causes the main activation of the receptor tyrosine kinase activity in the absence of ligand [17].

In our study, we aimed to screen whole *TET2*, *KRAS*, and *CBL* by NGS analysis, evaluating the association of mutations of JAK2 and FLT3 which is known as prognostic risk factors and finding possible genetic markers for molecular leukemia analysis. The NGS method is a powerful tool to discover novel disease mutations and candidate biomarkers. Therefore we chose NGS as a screening method for our study.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Subjects

The study population consisted of eight patients aged between one and 15 years who were admitted to Lozanic Hospital for Children with Leukemia with the diagnosis of AML. An informed written consent was obtained from all the patients' parents. Patient characteristics of the eight pediatric AML cases are shown in Table 1.

### 2.2. Cytogenetic techniques

Bone marrow samples were collected with Heparin-containing tubes, and chromosome analysis was performed using G-banding. After the slide preparation, G-banding using Giemsa-staining was carried out according to the standard procedures. On each slide 20 metaphases were analyzed by a light microscope (Nikon, JAPAN). Karyotypes were described according to ISCN [24].

**Table 1** Demographic characteristics and *TET2*, *KRAS*, and *CBL* variants of children with AML.

| No | Gender/ age/ | Diagnosis | FAB | Risk group | Cytogenetics/Molecular abnormalities | TET2 | | | | CBL | | | | KRAS | | | | FLT3 ITD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Rs number | Nucleotide change | Localization | Amino acid change | Rs number | Nucleotide change | Localization | Amino acid change | Rs number | Nucleotide change | Localization | Amino acid change | |
| 1 | M/13 | AML | M1 | HR | 46, XY, monosomy, Trisomy 14 | Novel | 3261 A > G | Exon 11 | Leu-Val | – | – | – | – | – | – | – | – | Negative |
| 2 | M/13 | AML | M1 | HR | t(9;22) | Rs 12498609 | 86 G > C | Exon 3 | Pro-Arg | Rs 17551085 | 112 A > T | Exon 3 | Gln-Leu | – | – | – | – | Negative |
| | | | | | | | | | | Rs 111836509 | 310 A >C | Exon 3 | Tyr-Ser | | | | | |
| 3 | F/8 | AML | M5 | SR | 46, XX | Rs 17250972 | 1088 C > T | Exon 3 | Pro-Leu | – | | – | – | Novel | 1367 T del | Exon 8 | Gly-Gly | Negative |
| | | | | | | Novel | 1162 G del | Exon 3 | Gly-Gly | | | | | | | | | |
| | | | | | | Rs 142173806 | 3162 T > G | Exon 11 | Ser-Ser | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 46 A del | Exon 4 | – | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 780 A del | Exon 3 | Trp-Ile | | | | | | | | | |
| 4 | F/3 | AML + T-ALL | M4 | HR | 47, XX (+21) c 21 der(14) (14q1,2→q 32)c 1q21 → q13),der(19)(19qter) → p13.3c11q13)(11q1 [9], 49,22) | Rs 200527650 | 2216 C > T | Exon 3 | Pro-Leu | Rs 111836509 | 310 A > C | Exon 3 | Tyr-Stop | Novel | 1367 T del | Exon 8 | Gly-Gly | Positive |
| | | | | | | Rs 112576062 | 2306 G > C | Exon 3 | Ser-Ser | | | | | | | | | |
| | | | | | | Rs 17250972 | 1088 C > T | Exon 3 | Pro-Leu | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 1162 G del | Exon 3 | Gly-Gly | | | | | | | | | |
| | | | | | | Rs 142173806 | 3162 T > G | Exon 11 | Ser-Ser | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 46 A del | Exon 4 | – | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 780 A del | Exon 3 | – | | | | | | | | | |
| 5 | M/3 | AML | M4 | SR | 46, XY, monosomy 7 | Novel | 1162 G del | Exon 3 | Gly-Gly | Rs 111836509 | 310 A > C | Exon 3 | Tyr-Stop | Novel | 1367 T del | Exon 8 | Gly-Gly | Positive |
| | | | | | | Novel | 46 A del | Exon 4 | – | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 780 A del | Exon 3 | – | | | | | | | | | |
| | | | | | | Rs 14438629 | 2309 T > C | Exon 3 | His-Arg | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 3163 A > G | Exon 11 | His-Val | | | | | | | | | |
| | | | | | | Rs 372489795 | 3361 C > T | 3' UTR | Thr-Ile | | | | | | | | | |

(continued on next page)

**Table 1** (continued)

| No | Gender/ age/ | Diagnosis | FAB | Risk group | Cytogenetics/Molecular abnormalities | TET2 | | | | CBL | | | | KRAS | | | | FLT3 ITD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Rs number | Nucleotide change | Localization | Amino acid change | Rs number | Nucleotide change | Localization | Amino acid change | Rs number | Nucleotide change | Localization | Amino acid change | |
| 6 | M/7 | AML | M4 | HR | 47, XY, + 22[12] Inv (16;16), Fragile X syndrome | Rs 17250972 | 1088 C > T | Exon 3 | Pro-Leu | – | – | – | – | Novel | 1367 T del | Exon 8 | Gly-Gly | Negative |
| | | | | | | Novel | 1162 G del | Exon 3 | Gly-Gly | | | | | | | | | |
| | | | | | | Rs 142173806 | 3162 T > G | Exon 11 | Leu-Trp | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 46 A del | Exon 4 | – | | | | | | | | | |
| | | | | | | Rs 150290543 | 100 C > T | Exon 3 | Trp-Ile | | | | | | | | | |
| | | | | | | Rs 68131430 | 652 G > A | Exon 3 | Val-Met | | | | | | | | | |
| | | | | | | Novel | 3333 A > G | Exon 11 | His-Arg | | | | | | | | | |
| 7 | F/9 | AML | M2 | SR | 46, XX | Novel | 1162 G del | Exon 3 | Gly-Gly | Rs 111836509 | 310 A > C | Exon 3 | Tyr-Stop | Novel | 1367 T del | Exon 8 | Gly-Gly | Negative |
| | | | | | | Novel | 46 A del | Exon 4 | – | | | | | | | | | |
| 8 | M/8 | AML+ MDS | M5 | HR | 46, XX | Rs 12498609 | 86 G > C | Exon 3 | Pro-Arg | – | – | – | – | Novel | 1367 T del | Exon 8 | Gly-Gly | Positive |
| | | | | | | Novel | 1162 G del | Exon 3 | Gly-Gly | | | | | Novel | 1111 T > C | Exon 8 | Tyr-His | |
| | | | | | | Novel | 46 A del | Exon 4 | – | | | | | | | | | |

HR high risk; SR standard risk; FAB French–American–British classification.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed on interphase nuclei and metaphase chromosomes of bone marrow cells using dual-color/dual-fusion probes for translocations of inv (16;16), t(9;22), t(4;14), chromosome 19, and dual-color/deletion probe for del 7q, labeled in green and red spectra according to the manufacturer's protocol provided by Cytocell, UK. Counterstaining was performed with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). At least 100 nuclei were analyzed under the Fluorescence microscope, and image capture was performed using Nikon Eclipse 80i equipped with a CCD-camera (CoolCube1), appropriate filters and Isis software (MetaSystems).

### *2.3. DNA Isolation and Next Generation Sequencing*

Blood samples were collected with EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)-containing tubes and DNA was extracted from peripheral blood and bone marrow leukocytes with MagNA Pure automatic DNA isolation instrument (Roche Diagnostics, Manheim, Germany).

We used NGS to study three candidate genes at *TET2*, *KRAS* and *CBL*. All coding exons of *TET2* (exons 3 and 11) were presented by 27 amplicons. Besides, two primer pairs were amplified known mutational hotspot regions to describe the RING finger domain and linker sequence for *CBL* (exons 8 and 9) and *KRAS* (exons 2 and 3). The analyses were performed as previously described by Kohlmann et al. [18].

Next Generation Sequencing was carried out using 454 GS Junior System Instrument Roche Applied Science. The Data were analyzed using the GS Amplicon Variant Analyzer software version 2.3. (Roche Applied Science, Germany). We used filters which were adjusted to show variants in more than 1% of bidirectional reads per amplicon and per patient to determine the variants.

### *2.4. Real time PCR*

FLT3-ITD and JAK V 617 F mutation were analyzed by Real Time PCR on Light Cycler 480 II instrument (Roche Diagnostics, Gmbh, Mannheim, Germany). Results were analyzed with the High Resolution Melting (HRM) method using genotype profiles. Different plots were created by selecting negative controls as the base-line. Therefore, fluorescence of the all other samples was diagramed relative to this sample. Fluorescence signals were analyzed and significant differences used as indicators of mutations [17,18].

## 3. Results

In this study, we analyzed mutations affecting the *TET2* coding sequence (exons 3–11), *KRAS* (exons 2–3) and *CBL* (exons 8–9) in our patients with pediatric AML. In total, 20 variants were detected by NGS mutation screening method. The results are shown in Table 1. We detected 16 variants in *TET2*, two variants both *KRAS* and *CBL* genes. Table 1 shows the summary of the association of patients' characteristics and variants of *TET2*, *KRAS* and *CBL* profiles.

Karyotype analysis was normal in three of the eight (37.5%) patients. Trisomy 14, Trisomy 19, Trisomy 22, monosomy 7, monosomy 14, inv (16;16), t(9;22) were found using chromosome banding and FISH analyses. We screened all patients during treatment or relapse. While one patient had 6 *TET2*, 1 *KRAS* gene variants, the other patient had 7 *TET2* variants. Two relapse patients (number 4 and 5) had the same *CBL* variants.

Fig. 1 displays distribution of amplicon reads for patients. The most of TET2 variants were described in the largest exon 3 and 11; 1842 G > -(6/8 patients, 75%) and 1088 C > T(5/8, 62.5%) variants, 5162 T > G(5/8, 62.5%) in exon 3 and exon

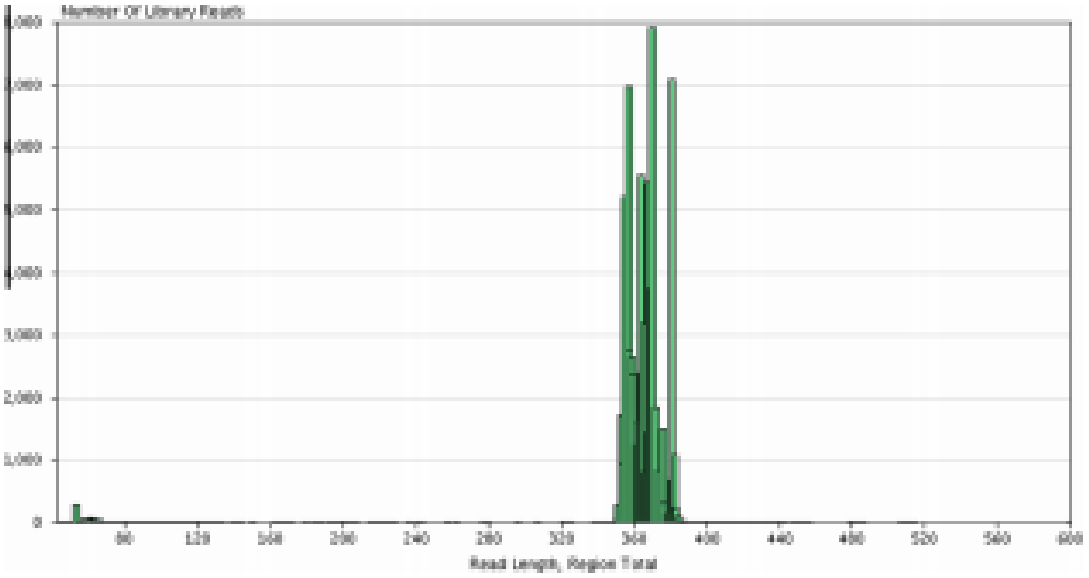



**Figure 1** Distribution of generated amplicon sequence reads per patient.

11 of *TET2* gene, respectively. 310 A > C(7/8 87.5%) variation was the highest among the variants in intron 2 of *KRAS* gene. 1347 T > -in exon 8 of *CBL* gene was detected in 6 out 8 patients (75%).

All of AML patients were found negative for JAK V617 F. Three (37.5%) of the eight patients were only FLT3-ITD mutation positive.

## 4. Discussion

AML is a heterogeneous disorder of hematopoietic stem cells, characterized by multiple genetic events which have an impact on proliferation and differentiation. Some of the genetic and epigenetic alterations play a major role in leukemogenesis; gene mutations, deletions, translocations, and DNA methylation. Recent studies have reported that several genes such as *TET2, KRAS, CBL, FLT3, JAK2* involve in the pathogenesis of AML [1,3,6,10,11,18]. Activated *TET2, RAS* and *CBL* mutations confer proliferative and survival signals.

In this study, we screened the mutations of *TET2, KRAS* and *CBL* genes in childhood AML patients. We used an amplicon based sequencing method to find possible new genetic markers for leukemia diagnosis. *TET2, KRAS* and *CBL* genes were selected based on recent studies on genetic abnormalities in AML and other hematologic malignancies. In all patients, we reported novel mutations at *TET2* and *CBL* genes. 7 of 16 substitutions were missense mutations in the exon and UTR (Untranslated region). These mutations may result in truncated translation of protein.

There are very few studies in childhood AML regarding TET2 mutations. The frequency of TET2 mutations have been reported to be lower in childhood AML when compared with the adult AML [20]. Conneu et al. have performed PCR and sequencing analyses in order to compare childhood AML with the adult AML. They have shown that the frequency of CBL was similar (1–2%). Sano et al. have presented a study using PCR and sequencing analyses and have shown that 29 (18.5%) of the 157 childhood AML patients carried RAS mutations [3]. However, RAS mutations were reported 25–44% in adult AML [8–10].

In this study, we found 16 variants of which 7 of them are novel. The variants were found to be localized from exon 3 to exon 11 in TET2 gene (Fig. 2). Metzeler et al. demonstrated that the patients with favorable risk (according to European Leukemia Net (ELN)) and carrying *TET2* mutations had lower response ratios and higher risk of relapse or death when compared to the patients with *TET2* wild type [6]. *TET2* mutations that have frame shift, nonsense and missense mutations are acquired JAK2 mutations [2]. Our data suggest that TET2 variants are more frequent than CBL and KRAS variants in childhood AML.

Mutant *CBL* affects oncogenic phenotype in different cell lines and induces growth factor independence. Schnittger et al. analyzed 636 patients (MPN/MDS, secondr AML, CMML (Chronic Myelomonocytic Leukemia) and showed several *CBL* mutations localized in LINKER and RING domains in their study group. In addition, the frequency of *CBL* mutations was reported to be higher in patients with mutated JAK2 V617 F when compared to the patients with JAK2 V617 wild type [21]. Reindl et al. have detected exons 8 and 9 deletion transcripts of CBL in three of 279 AML/MDS patients. In PCR screening of AML/MDS patients, one of 116 patients carried a substitution of arginine to glycine at position 420. In addition, PCR screening revealed loss of the transcripts of mutant CBL lacking exons 8 and 9 in remission samples [11].

Several studies have shown that CBL promoted down-regulation of FLT3 activity. Sargin et al. searched the role of c-Cbl in FLT3 regulation and showed that deregulated FLT3 activity has significant roles in AML pathogenesis [22]. Reindl et al. revealed that four of 279 AML/MDS patients were found positive for expression of abnormal CBL transcripts, and hypothesized that CBL mutations might cause the high FLT3 expression and activation of abnormal FLT3 [11]. In a previous study, CBL variants have been detected at the rate of 1–2% [23]. In our study we also confirmed that AML patients had only two CBL variants.

Sano et al. studied 157 pediatric AML patients and reported that *RAS* mutation frequency was higher in AML M4–M5 types than other AML types [3]. Liang et al. searched for mutations in the *RAS* gene in 130 pediatric AML patients. *KRAS* mutation frequency was higher in MLL positive AML patients than MLL negative AML patients; without statistical significance ($P = 0.069$) [23]. Our screening results showed that seven of the eight patients (87.5%) have the same novel KRAS variant (1347 T del), and one patient has two novel variants (1347 T del and 1111 T > C). Relapse patients (number 4 and 5) are showing the same 3 novel TET2 variants, and same KRAS and CBL variants. In addition, they present FLT3-ITD positivity.

We think that 1347 T del (novel KRAS variant) and 1842 G del, 46 A del, 730 A del (3 novel TET2 variants) could be important prognostic markers for childhood AML/relapse patients and should need further study in a larger group of patient.

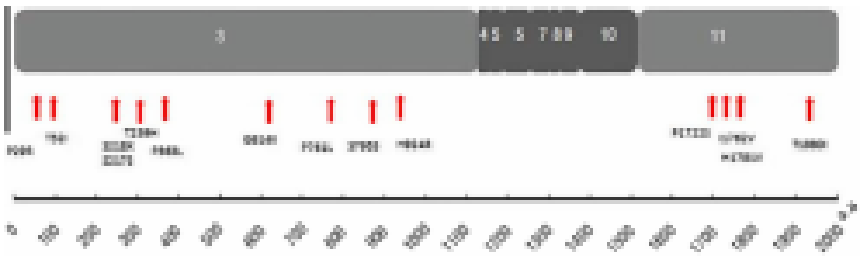


Figure 2 Localization of sequence variations in relation to the TET2 coding sequence.

## 5. Conclusion

**In conclusion, *TET2* mutations are more frequent than *KRAS*, and *CBL* mutations in pediatric AML. In addition, *TET2*, *KRAS*, and *CBL* may potentially be genetic markers for leukemia diagnosis. However, these results need to be confirmed by further studies on a larger number of patients.**

## Conflict of interest

**The authors of this paper have no conflicts of interest, including specific financial interests, relationships, and/or affiliations relevant to the subject matter or materials included.**

## References


[1] Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. Leukemia 2012;26:934–42.

[2] Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. Int J Hematol 2013;98:648–57.

[3] Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, et al. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Int J Hematol 2012;95:509–15.

[4] Fernandez-Mercado M, Yip BH, Pellagatti A, Davies C, Larrayoz MJ, Kondo T, et al. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. PLoS ONE 2012;7:e42334.

[5] Fernandes MS, Reddy MM, Croteau NJ, Walz C, Weisbach H, Podar K, et al. Novel oncogenic mutations of CBL in human acute myeloid leukemia that activate growth and survival pathways despite its increased metabolism. J Biol Chem 2010;285:32598–605.

[6] Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group Study. J Clin Oncol 2011;29:1373–81.

[7] Yamazaki J, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR, Shen L, et al. Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. Epigenetics 2012;7:201–7.

[8] Zhao S, Zhang Y, Sha K, Tang Q, Yang X, Yu C, et al. KRAS (G12D) cooperates with AML1/ETO to initiate a mouse model mimicking human acute myeloid leukemia. Cell Physiol Biochem 2014;33:78–87.

[9] Sabnis AJ, Cheung LS, Dail M, Kang HC, Santaguida M, Hermiston ML, et al. Oncogenic Kras initiates leukemia in hematopoietic stem cells. PLoS Biol 2009;7:e59.

[10] Chan IT, Kutok JL, Williams IR, Cohen S, Kelly L, Shigematsu H, et al. Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease. J Clin Invest 2004;113:528–38.

[11] Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, Greif PA, Benthaus T, Argiropoulos B, et al. CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. Clin Cancer Res 2009;15:2238–47.

[12] Cosmen EA, Driessen EM, Zwaan CM, Stary J, Baruchel A, de Haas V, et al. CBL mutations do not frequently occur in paediatric acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2012;158:577–84.

[13] Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med 2007;356:459–68.

[14] Jekarl DW, Han SB, Kim M, Lim J, Oh EJ, Kim Y, et al. JAK2 V617F mutation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable, refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis, and acute myeloid leukemia. Korean J Hematol 2010;45:46–50.

[15] Nasiri N, Shahkhy M, Zaker F, Hosseini S, Mousavi SA, Marjani AJ. Detection and biological characteristic of FLT3 gene mutations in children with acute leukemia. Arch Iran Med 2014;17:258–61.

[16] Elyamany G, Awad M, Fadalla K, Albalawi M, Al Shahrani M, Al Abdulaaly A. Frequency and prognostic relevance of FLT3 mutations in saudi acute myeloid leukemia patients. Adv Hematol 2014;141360.

[17] Tan AY, Westerman DA, Carney DA, Seymour JF, Juneja S, Dobrovic A. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3-internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia. J Hematol Oncol 2008;1:1–10.

[18] Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. J Clin Oncol 2010;28:3858–65.

[19] Murugesan G, Aboudola S, Szpurka H, Verbic MA, Maciejewski JP, Tubbs RR, et al. Identification of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders using FRET probes and melting curve analysis. Am J Clin Pathol 2006;125:625–33.

[20] Langemeijer SM, Jansen JH, Hooijer J, van Hoogen P, Stevens-Linders E, Massop M, et al. TET2 mutations in childhood leukemia. Leukemia 2011;25:189–92.

[21] Schnittger S, Bacher U, Alpermann T, Reiter A, Ulke M, Dicker F, et al. Use of CBL exon 8 and 9 mutations in diagnosis of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative disorders: an analysis of 636 cases. Haematologica 2012;97:1890–4.

[22] Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, Schmidt MH, Grundler R, Rensinghoff M, et al. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. Blood 2007;110:1004–12.

[23] Liang DC, Shih LY, Fu JF, Li HY, Wang HI, Hung IJ, et al. K-Ras mutations and N-Ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. Cancer 2006;106:950–6.

[24] ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Basel: S. Karger and Cytogenetic and Genome Research; 2013.

[25] Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. Leukemia 2010;24:1128–38.