



T.C.

**BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PEDİATRİK PHILADELPHIA BENZERİ
AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLERİN BİYOLOJİSİ**

ECEM EFENDİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2019

ECEM EFENDİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PEDİATRİK PHILADELPHIA
BENZERİ AKUT
LENFOBLASTİK
LÖSEMİLERİN BİYOLOJİSİ**

Ecem EFENDİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)
DANIŞMAN:
Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
OUAP(T)-2019/7

BURSA-2019

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Pediyatrik Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemilerin Biyolojisi**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

ECEM EFENDİ




Tarih ve İmza

13.03.2018



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ecem EFENDİ tarafından hazırlanan **Pediyatrik Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemilerin Biyolojisi** konulu Yüksek Lisans tezi ...19.../...08.../...2019...günü, ...11:00...-...12:00... saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER	
Üye	Prof. Dr. Ünal EGELİ	
Üye	Prof. Dr. Feray KÖÇKAR	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun20.08.2019..... tarih ve2019/23..... sayılı toplantısında alınan19..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

31/09/2019

Adı Soyadı: Ecem EFENDİ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

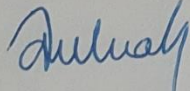
Tez Konusu: Pediatrik Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemilerin Biyolojisi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

İmza:



İÇİNDEKİLER

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
1.GİRİŞ	9
2. GENEL BİLGİLER.....	12
2.1 Akut Lenfoblastik Lösemi	12
2.1.1 Epidemiyolojisi	13
2.1.2 Etiyolojisi	15
2.1.2.1 Çevresel Faktörler.....	15
2.1.2.1.1 Radyasyon.....	15
2.1.2.1.2 Enfeksiyonlar	15
2.1.2.1.3 Kimyasal Maddeler	16
2.1.2.1.4 Diyet.....	16
2.1.2.2 Genetik Faktörler	16
2.1.2.2.1 Edinsel Genetik Değişimler	16
2.1.2.2.2 Kalıtsal Hastalıklar	17
2.1.3 Patogenezi	17
2.1.4 Sınıflandırma	17
2.1.4.1 Morfolojik Sınıflandırma	18
2.1.4.2 İmmünolojik Sınıflandırma	18
2.1.4.3 Sitogenetik Sınıflandırma	19
2.1.5 Risk Grupları.....	20
2.2 Philadelphia Kromozomu.....	22
2.2.1 Philadelphia Kromozomu Pozitif Akut Lenfoblastik Lösemi.....	27
2.2.2. Philadelphia Kromozomu Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi.....	27
2.2.2.1. Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi Tanı Yöntemleri	34
2.2.2.1.1 Akış (Flow) Sitometri Yöntemi	34
2.2.2.1.2 Gen Ekspresyon Profilleri	36
2.2.2.1.3 Sitogenetik.....	37

2.2.2.1.4 Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH)	37
2.2.2.1.5 Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	37
2.2.2.1.6 Dizileme Teknolojileri.....	38
2.3 Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemide Etkili Olan JAK/STAT Sinyal Yolağı.....	38
2.3.1 JAK/STAT Sinyal Yolağı	39
2.4 Tedavi.....	46
2.4.1 Genel Tedavi	46
2.4.2 Philadelphia Kromozomu Pozitif Akut Lenfoblastik Lösemi Tedavisi .	50
2.4.3 Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi Tedavisi	50
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	55
3.1 Gereç.....	55
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	55
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler	55
3.2 Hasta Grubu ve Klinik Özellikler	56
3.2.1 Etik Kurul	56
3.2.2 Hastaların Klinik Özellikleri.....	56
3.3 Yöntem	57
3.3.1 Kemik İliğinden Total RNA İzolasyonu.....	57
3.3.2 RT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizlerinin Gerçekleştirilmesi	59
3.3.3 İstatistiksel Analizler	63
4. BULGULAR	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	94
6. KAYNAKLAR	103
7. SİMGELER ve KISALTMALAR	108
8. TEŞEKKÜR	113
9. ÖZGEÇMİŞ.....	114

TÜRKÇE ÖZET

Pediyatrik Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemilerin Biyolojisi

Philadelphia (Ph) benzeri akut lenfoblastik lösemi (ALL), yüksek risk sınıflamasında yer alan ve kötü prognoz gösteren B- hücreli akut lenfoblastik lösemnin (B-ALL) alt grubudur. Gen ekspresyon profili olarak Ph pozitif ALL'ye benzemektedir, ancak bu alt tipte *BCR-ABL1* füzyonu mevcut değildir. Hastalık genetik olarak heterojendir. Ayrıca, etnik kökenleri farklı olan Ph benzeri ALL vakalarının genetik değişimleri de farklılık göstermektedir. Ph benzeri ALL vakalarının B-ALL'li hastalar arasından ayırt edilerek sınıflandırılabilmesi etkin tedavi almaları için önemlidir. Son yıllarda, Ph benzeri ALL alt grubuna ait vakaların tanımlanması için, B-ALL vakalarında genetik ve klinik bulgular değerlendirilmesinin yanı sıra, gen ifade farklılıklarının analiz edildiği panellerin tasarlanması gündemdedir.

Bu amaçla, Ph benzeri grubun tanımlanabilmesi için Bursa Uludağ Üniversitesi Çocuk Hematoloji AD.'na başvuran hastalar arasından Ph pozitif ve Ph negatif vakalar projeye dahil edildi. Mevcut tez çalışması dahilinde; Türk popülasyonuna özgü, Ph benzeri ALL vakalarının tanımlanmasında kullanılacak gen panelinin oluşturulması amaçlanmıştır. 23 kemik iliği materyali ile gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonrasında RT-qPCR yöntemi ile mRNA gen ekspresyon profilleri analiz edildi. Çalışma dahilinde hazırlanan custom mRNA gen paneli içerisinde 96 gen değerlendirildi ve kontrol örneği ile benzer ifadeye sahip 36 gen, Ph benzeri ALL vakalarının tanımlanmasında biyobelirteç paneli olabileceği öngörüldü.

Mevcut çalışmada, pediyatrik B-ALL'li hastalar arasında yer alan Ph benzeri alt gruba ait hastaların gen profillerinin belirlenmesi ile ön ayırıcı tanı gerçekleştirildi. İleri analizler sonucunda; Türk popülasyonuna ait gen paneli ile tanımlanan Ph benzeri ALL alt grubunun tedavi protokollerine hedefe yönelik tirozin kinaz inhibitörlerinin ilave edilmesi sağlanarak prognozun iyileştirilmesi ve sağkalım oranlarının yükseltilmesine katkı sağlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Philadelphia benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi, Pediyatrik, Gen ekspresyonu, RT-qPCR

İNGİLİZCE ÖZET

Biology of Pediatric Philadelphia-like Acute Lymphoblastic Leukemia

Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia is a subgroup of B-ALL with high-risk classification and poor prognosis. The gene expression profile is similar to Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia, but this subtype does not have BCR-ABL1 fusion. The disease is genetically heterogeneous. Besides, genetic alterations of Ph-like ALL cases with different ethnic backgrounds differ. It is important that ph-like ALL cases can be classified and differentiated from B-ALL patients to receive effective treatment. In recent years, to identify cases of the Ph-like ALL subgroup, in addition to the evaluation of genetic and clinical findings in B-ALL cases, the design of panels in which gene expression differences are analyzed is on the agenda.

For this purpose, to identify the Ph-like group, Ph-positive and Ph negative cases were included in the project among the patients who applied to Bursa Uludağ University Department of Pediatric Hematology. Within the current thesis; This study aimed to establish a gene panel to be used to identify Ph-like ALL cases specific to the Turkish population. After RNA isolation with 23 bone marrow materials, mRNA gene expression profiles were analyzed by RT-qPCR method. In the custom mRNA gene panel prepared within the study, 96 genes were evaluated and 36 genes with a similar expression as the control group could be a biomarker panel may be used to identify cases of Ph-like ALL.

In the present study, a pre-differential diagnosis was made by determining the gene profiles of the Ph-like subgroup among the pediatric B-ALL patients. As a result of advanced analysis; By adding targeted tyrosine kinase inhibitors to the treatment protocols of the Ph-like ALL subgroup defined by the gene panel of the Turkish population, it will contribute to improve the prognosis and increase survival rates.

Keywords: Philadelphia-like, Acute Lymphoblastic Leukemia, Pediatric, Gene Expression, RT-qPCR

1. GİRİŞ

Çevresel ve genetik faktörlerin etkisi ile hematopoetik kök hücrelerde meydana gelen değişimler sonucu kemik iliğinde blastik hücreler çoğalmaktadır. Bu hücreler kan veya diğer organlara yayılım göstermektedir (Tasian ve ark., 2015). Kan kanseri olarak da bilinen lösemi birçok alt gruba ayrılmaktadır. B hücreli akut lenfoblastik lösemi (ALL), pediatrik vakaların %85'inde görülmektedir (Judith M. Boer ve ark.,2017). Son yıllarda doğru risk sınıflaması, etkin tedavi protokolleri ve önemli terapötik hedeflerin belirlenmesi ile pediatrik ALL vakalarının sağkalım süreleri önemli oranda artmıştır. Gelişmiş ülkelerde bu oran, 5 yıllık sağkalım süresi baz alındığında %90 olarak belirtilmektedir. Ancak ilerleyen yıllarda hastaların %10-12'lik diliminde relaps görülmektedir (Ching ve ark., 2015; Woo ve ark., 2014; Judith ve ark.,2017).

Prekürsör B-ALL'nin sitogenetik alt tipleri incelendiğinde yüksek hiperdiploidi, *ETV6-RUNX1* ve *TCF3-PBX1* füzyonu iyi prognoz olarak tanımlanırken, *BCR-ABL1* füzyonu ve *KMT2A* yeniden düzenlenmesi kötü prognoz olarak tanımlanmaktadır (Judith ve ark.,2017). B-ALL vakalarında *BCR-ABL1* füzyonuna sahip Ph pozitif olarak tanımlanan bir alt grup mevcuttur. Son yıllarda yine vakaların kötü prognoz ile ilerlediği yeni bir alt grup tanımlanmıştır. Bu alt grup Ph benzeri ALL'dir. Ph benzeri ALL, gen ekspresyon profili olarak Ph pozitif ALL vakalarına benzemesine rağmen Ph negatif ALL vakaları gibi Ph kromozomunun füzyon proteinine sahip değildir. Bu grup, gen ekspresyon panelleri ile tanımlanmaktadır ve genetik olarak heterojen bir yapıya sahiptir. Ph benzeri alt grup, pediatrik prekürsör B hücreli ALL'nin %15-20'sinde bulunmaktadır. Ph benzeri ALL'li hastaların tanımlanması oldukça güç olduğundan, son yıllarda yapılan çalışmalar ile farklı tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Günümüzde, farklı pediatrik çalışma grupları; hastaların etnik kökenine, test edilecek hasta sayısına, tanı laboratuvarlarındaki genom/transkriptom dizileme altyapısının kullanılabilirliğine ve klinik hedefe dayanarak Ph benzeri ALL'nin teşhisi ve karakterize edilmesi için farklı

stratejiler geliştirmektedir. Tanı yöntemlerini uygularken dikkat edilmesi gereken en önemli parametreler; moleküler karakterizasyonun dikkate alınması ve hedeflenen tedaviye potansiyel olarak uygun olan moleküler lezyonların tanımlanabilmesidir.

Gen ekspresyon analizi, Ph benzeri ALL'nin tanısında ‐altın standart‐ olarak kabul edilmektedir. İki farklı araştırma grubu, 2009 yılında Ph benzeri ALL vakalarının tanımlanması için düşük yoğunluklu gen ekspresyon panellerini (LDA) geliştirmişlerdir. Ph benzeri vakaların tanısında kullanılan LDA'lar yüksek özgünlüğe sahip olmasına rağmen Wells J. ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada iki panelin birbiri ile örtüşen hasta profilini %18 olarak belirlemiştir. Bu oran Ph benzeri ALL vakaları için tanının ne kadar spesifik olduğunu ifade etmektedir (Boer ve ark.,2017). Ph pozitif ALL vakalarının tedavi protokollerinde *ABL1* genini hedefleyen tirozin kinaz inhibitörler bulunmaktadır ve hedefe yönelik tedaviler sayesinde sağkalım oranlarında artışlar gözlenmektedir. Bu duruma paralel genetik değişimlerin benzer olduğu Ph benzeri ALL grubunda da tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanılması ile tedavide olumlu cevapların alınacağı öngörülmektedir (Boer ve ark.,2017).

Mevcut tez çalışmasında; Türk popülasyonunda ilk kez Ph kromozomu negatif ve pozitif ALL hastalarının gen ifade profilleri incelenerek, Ph negatif ALL'li hastalar arasından Ph benzeri grubun tanısal ayrımının yapılması ve Ph pozitif hastalara verilen etkin tedavi protokollerinden, Ph benzeri grubunun da fayda görebilmesi için tanı ve etkin tedaviye yönelik güncel genomik biyobelirteçlerin araştırılması amaçlanmıştır. Gruplar arası ayrımın yapılabilmesi için custom mRNA array analizleri gerçekleştirilmiştir ve benzer gen ifade profilleri saptanmıştır. Vakaların ekspresyon profilindeki farklılıklarına göre ilgili gruplara dahil hastaların klinik parametreleri istatistiksel anlamlılık açısından karşılaştırılmıştır. Gerçekleştirilen tez çalışmasında literatür ile popülasyonumuza ait vakaların gen ifade profillerindeki farklılıklar ve benzerlikler tartışılmıştır. Önemli görülen genlerin bazılarının elimizdeki hasta grubunda hiç eksprese olmadığı belirlenmiştir. Bu durum, tanı için onaylanmış panellerin hasta profilinin etnik kökenine göre farklılıklar içerebileceğini göstermektedir. Ph benzeri grubun tanımlanması amacıyla gerçekleştirilen mevcut çalışmadaki bulgularımız Türk toplumuna özgü farklılıkları belirtmektedir.

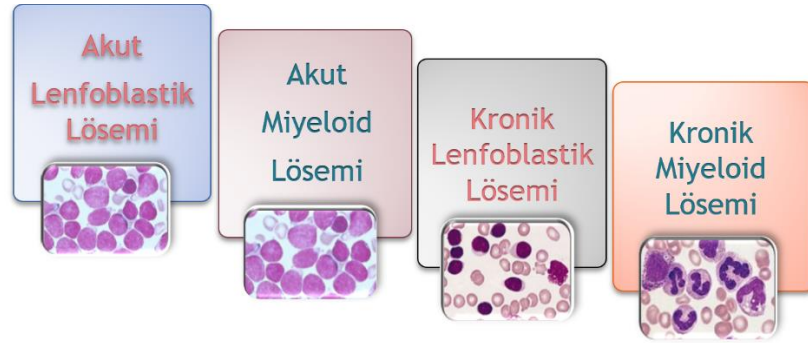
Ph benzeri ALL alt grubunun tanımlanmasında ve genetik değişimlerinin belirlenmesinde farklı deney basamakları uygulanmaktadır. Yapılan alışmalar doğrultusunda, LDA prob setleri ile Ph benzeri grubun ayrımı gerçekleştirilmektedir ve tanımlanan bu alt grubun füzyon, mutasyon ve ileri analiz teknikleri (Transkriptom profil analizi, RNAseq analizi vb.) ile genetik yapıları değerlendirilmektedir. Mevcut tez çalışması ile Ph benzeri alt grubun tanımlanmasında kullanılabilcek ön veriler elde edilmiştir. Bu alışma sonrasında, Ph benzeri ALL grubunun daha doğru bir şekilde tanımlanabilmesi amacı ile tanı basamağından sonra genetik yapılarının incelenebilmesi için ileri analiz basamakları planlanmıştır.

Mevcut tez kapsamında elde edilen veriler doğrultusunda, Türk Ph benzeri ALL alt grubu hastalarına özgü ekspresyon bulguları, klinik parametreler ve bu iki grubun karşılaştırılması değerlendirilmiştir. Mevcut ve ileriki çalışmalarımızın sonucu olarak, Türk pediatrik vakalarda Ph benzeri grubun moleküler biyobelirteçler ile kesin tanı alması sağlandığında, tedavi protokollerine tirozin kinaz inhibitörlerinin eklenebilmesi amacı ile T.C. Sağlık Bakanlığından izin alınacaktır. Planlanan ileriki deneyler sonucunda Ph benzeri grup için hazır olacak protokol ile T.C. İlaç Eczacılık Dairesi Endikasyon dışı ilaç birimine başvuru yapılarak Ph benzeri alt grubun etkin tedavi alması sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Akut Lenfoblastik Lösemi

Lösemi; hematopoietik hücrelerin malign transformasyonu sonucu, hematopoezin belli bir farklılaşma evresinde duraklaması ve kontrolsüz çoğalarak anormal hücre klonunu oluşturması ile karakterize edilen heterojen ve neoplastik bir hastalıktır. Bu kanser grubu, morfolojik olarak lösemik hücre dizisinin miyeloid veya lenfoid ve proliferen olan blastik hücrenin genç ya da olgunlaşmış olmasına göre akut veya kronik olarak dört grup altında sınıflandırılmaktadır (Şekil 1) (Pui ve ark., 2015).



Şekil 1: Lösemi Alt Grupları

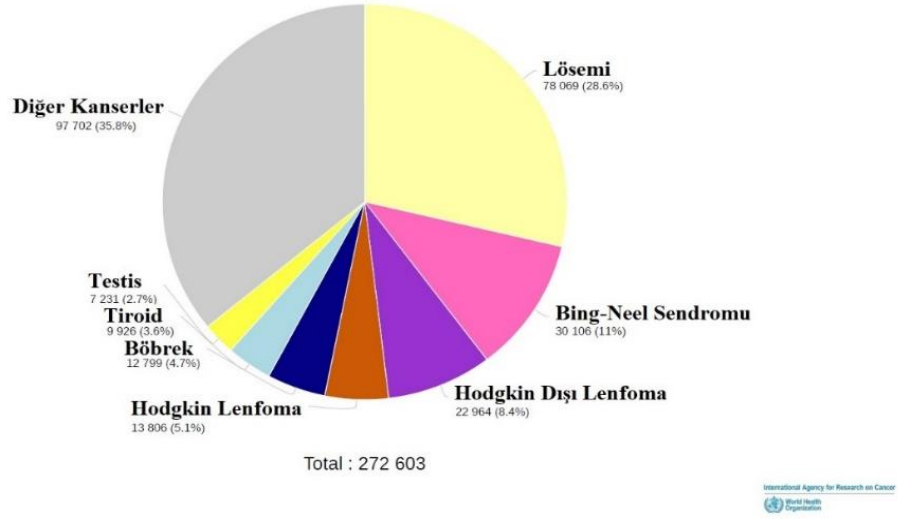
Akut lösemiler, progenitör veya öncül B/T lenfoid hücrelerinin farklılaşması, farklılaşmanın ardından lenfoid hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve kemik iliğinde blastik hücrelerin birikmesi sonucu oluşmaktadır (Malouf ve Ottersbach, 2018). Akut lenfoblastik lösemi (ALL) çocukluk çağında en sık görülen kanserdir ve geliştirilen etkin tedavi modelleri sayesinde genel sağkalım oranları yüksektir. 1960'lı yıllardan beri, ALL'li çocukların genel sağkalım oranları <math><10\%</math>dan yaklaşık %90'a yükselmiştir. Bu başarının nedeni; tedavi protokollerinin iyileştirilmesi, çok ajanlı kemoterapi rejimlerinin etkinliği, lösemi biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve tedavi yanıtının bir ölçüsü olarak değerlendirilen minimal rezidüel hastalığın izlenmesidir (Tran ve ark., 2016).

Lösemilerin %75-80'ini ALL oluşturmaktadır. ALL, T- ve B-lenfosit yolağında kendini farklılaşmaya adanmış kan progenitör hücrelerindeki çeşitli genetik mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar hücrelerin kontrolsüz çoğalabilme yeteneği kazanmalarına ve bunun sonucunda gelişim evrelerine özgü blokaja neden olmaktadır. Olgunlaşmamış B- veya T-lenfosit klonları kemik iliğinde birikmekte ve normal hematopoez süreci baskılanmaktadır. ALL'nin %80-85'i B-hücre (B-hücre prekürsör ALL, BCP-ALL) ve %15-20'si T-hücre (T-ALL) kökenlidir. Pediatrik ALL'nin %75'inde translokasyonlar saptanmaktadır. Translokasyonlar, lösemilerde gözlenen en sık karyotipik değişikliklerdir ve hastalığın bazı tiplerinde diagnostik amaçla kullanılacak kadar sık ve spesifiklerdir. Hastalarda gözlenen *TEL-AML1* [t(12;21)(p13;q22)] genlerinin füzyonu ve yüksek hiperploidi iyi prognoz göstergesi olurken, *BCR-ABL1* [t(9;22)(q34;q11)] geninin füzyonu, *MLL* (11q23 lokusunda) genine ait düzensizlikler ve hipodiploidi kötü prognoz belirtisidir (Fletcher ve ark., 1991; Graux ve ark., 2011; Hillman ve ark., 2010; Pui ve ark., 2008).

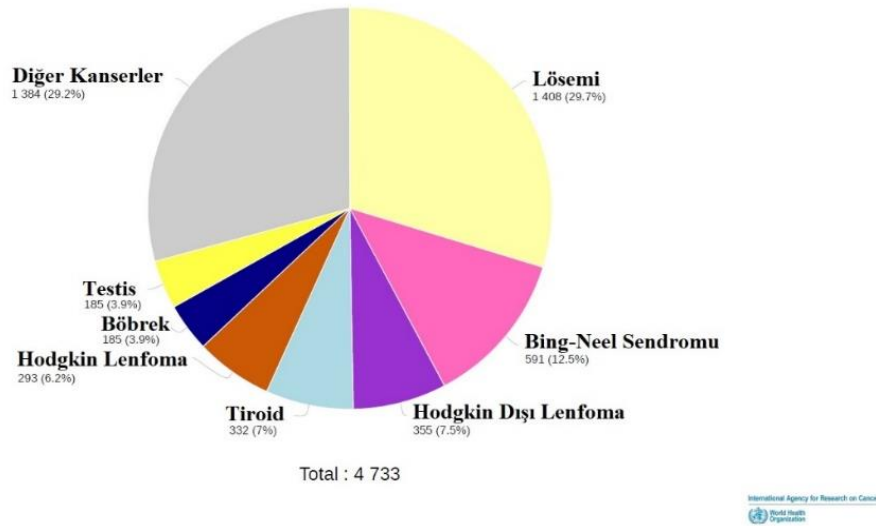
2.1.1 Epidemiyolojisi

Lösemi insidansı etnik kökene ve coğrafik bölgeye göre değişebilmektedir ve pediatrik kanser türleri içerisinde Dünya'da görülme oranı %30'dur (Şekil 2). ALL, çocuklar arasında en yaygın olan lösemi türü olarak görülmektedir. 15 yaş altı çocuklar arasında tanımlanan kanserlerin yaklaşık %25'i ve yeni tanı lösemilerde yaklaşık %75'i ALL'dir. Lösemi insidansı Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da en düşük, sanayileşmiş batı ülkelerinde en yüksek oranda görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde (sanayileşmiş batı ülkelerinde) ALL en sık 2-5 yaş arasındaki çocuklarda görülmektedir ve yine bu ülkelerin endüstrileşme dönemlerinin son 30 yıl içerisindeki artışı ile hastalık açısından %20'lik bir kümülatif artışın görülmesi dikkat çekmektedir. Lösemide en düşük insidansın görüldüğü ülkeler Kuzey Afrika ve Orta Doğu'dur. Bu durum, çevresel etkenlerin lösemi gelişimine katkısını düşündürmektedir. Türkiye'de ise Türk pediatrik onkoloji grubu, çocuklarda yeni tanı kanser olguları içinde lösemilerin ilk sırada yer aldığını ve %30 sıklıkta olduğunu bildirmektedir (Şekil 3). Amerika Birleşik Devletleri'nde 15 yaşın altında lösemi sıklığı 100.000'de 4 olarak belirtilirken, Türkiye'de bu sıklık 100.000'de 1,5 olarak belirtilmektedir (www.saglik.gov.tr). Akut lösemiler erkeklerde ve beyaz ırkta daha sık görülmektedir. Cinsiyet prognoz açısından önemli bir gösterge olup, kızlarda yaşam oranı daha

yüksektir. En sık oran 1-4 yaş arasında saptanmaktadır. Kız/Erkek oranı ise 1/1.2-1.3'tür (Hrusak ve ark., 2002; Roganovic, 2012; Ünal ve ark., 2004).



Şekil 2: Dünyadaki Farklı Kanser Türlerinde 0-19 Yaş Aralığında Tanı Almış Vaka Sayıları (<https://gco.iarc.fr/>)



Şekil 3: Ülkemizdeki Farklı Kanser Türlerinde 0-19 Yaş Aralığında (Kız/Erkek) Tanı Almış Vaka Sayıları (<https://gco.iarc.fr/>)

2.1.2 Etiyolojisi

Lösemi multifaktöriyel bir hastalıktır ve nedeni tam olarak bilinmemektedir. Kalıtsal bir hastalık olarak kabul edilmemekle birlikte, etiyolojisinde temel olarak çevresel ve genetik faktörlerin rolü vardır (Puckett ve Chan, 2019). Lösemi patogeneğinde geçmiş yıllarda daha çok çevresel faktörler ön planda tutulurken, günümüzde viral enfeksiyonların, immün yetmezliklerin ve son yıllarda genetik faktörlerin rol oynadığı görülmektedir. ALL'nin gelişimine yol açan kesin patogenetik nedenler bilinmemektedir. Akut lösemnin ortaya çıkmasında genetik faktörlerin önemli bir rolü olduğu vurgulanmaktadır. Bazı ailelerde bu hastalığın çok sık görüldüğü ve akut lösemili hastaların kardeşlerinde lösemi sıklığının beklenenden 2-4 kat fazla olduğu bildirilmektedir (Greaves, 1997; Lag ve ark., 1999).

2.1.2.1 Çevresel Faktörler

Lösemi gelişiminde rol oynayan çevresel faktörler arasında radyasyon, enfeksiyonlar, kimyasal maddeler ve diyet yer almaktadır (Feychting ve ark., 1993).

2.1.2.1.1 Radyasyon

Radyasyon, çift sarmal yapıdaki DNA zincirinde kırılmalar gerçekleştirerek veya onkogen virüs replikasyonunu artırarak lösemi gelişimine neden olmaktadır. 1945 yılında Hiroshima ve Nagasaki'ye atılan atom bombasına genç yaşlarda maruz kalan bireylerin lösemi gelişimi için artmış risk faktörüne sahip oldukları belirtilmektedir. Risk oranını, radyasyon dozu, maruz kalma süresi ve maruz kalma sırasındaki bireyin yaşı belirlemektedir (Buka ve ark., 2007; Couto ve ark., 2005; Kusuyama ve ark., 1997).

İyonize ışınlar, pediatrik lösemiler içerisinde özellikle akut miyeloid lösemiye (AML) neden olmaktadır. Radyoaktif ortamda çalışan veya gebelik döneminde röntgen incelemesi yapılan bireylerin bebeklerinde lösemi riski 1,5-2 kat arttığı belirtilmektedir (Belson ve ark., 2007; Couto ve ark., 2005; Greaves, 2004).

2.1.2.1.2 Enfeksiyonlar

Maligniteler ile ilişkili onkogenik virüsler lösemi patogeneğinde de rol almaktadır. Annenin gebelik döneminde geçirdiği enfeksiyon, bebeklerde çocukluk çağı kanserlerinin görülme oranını arttırmaktadır. Özellikle gebelik döneminde

Epstein-Barr virus (EBV) IgM pozitif ve *Mycoplasma pneumoniae* pozitif olan annelerin bebeklerinde ilerleyen yıllarda lösemi gelişimi arasında ilişki bulunmaktadır (Greaves, 2004; Pui, 1996; Tsukasaki, 2012; Yamagishi ve ark., 2012).

2.1.2.1.3 Kimyasal Maddeler

Pediyatrik lösemiler ile ilişkili en iyi bilinen kimyasallar hidrokarbonlar ve pestisitlerdir. En sık kullanılan hidrokarbon ise benzendir. Benzen, boya ve plastik üretiminde ve motor yakıtlarında bir bileşen olarak bulunan kimyasaldır. Gebelik döneminde veya erken çocukluk yıllarında pestisit maruziyeti ev, çim ve bahçe alanlarında olmaktadır (Bailey ve ark., 2015; Belson ve ark., 2007).

2.1.2.1.4 Diyet

Gebelik döneminde anne beslenmesi önemli görülmektedir. Annenin demir ve folik asit kullanımını doğrultusunda ALL riskinin azaldığı, alkol ve esrar tüketiminin AML riskini arttırdığı belirtilmektedir. Anneye gebelik öncesi dönemde veya gebelik sırasında vitamin ve folik asit takviyesinin yapılması, emzirme süreci uzunluğu ve çocukluk çağında geçirilen enfeksiyonlar immün sistemi güçlendirmektedir ve çocukluk çağında lösemi görülme riski azalmaktadır. Yapılan araştırmalar doğrultusunda anne sütünün pediatrik akut lösemilere karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmektedir (Belson ve ark., 2007; Shu ve ark., 1999; Wen ve ark., 2002; Whitehead ve ark., 2016).

2.1.2.2 Genetik Faktörler

Genetik faktörler ise, edinsel genetik değişiklikler ve kalıtsal hastalıklar olarak iki ayrı kategoride incelenmektedir.

2.1.2.2.1 Edinsel Genetik Değişimler

Akut lösemilerin %80'inde blastik hücrelerin klonlarında edinsel kromozom değişiklikleri saptanmaktadır. Normal hücre klonlarında ise bu genetik bozukluklar görülmemektedir. Edinsel değişikliklerde sayısal ve yapısal değişiklikler görülmektedir. Sayısal değişikliklerde, hiperdiploidi (>50 kromozom) iyi prognoz, hipodiploidi (<45 kromozom) ise kötü prognoz ile ilişkilidir. Yapısal değişiklikler ise; translokasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar, gen amplifikasyonları ve nokta mutasyonlarıdır. Translokasyonlar, lösemi vakalarında en sık görülen (%80) yapısal

değişikliklerdir. Translokasyon sonucu, bir proto-onkogen aktive olmaktadır veya kromozomda meydana gelen delesyon ile tümör baskılayıcı gen kaybolmaktadır ve blast hücrelerinin kemik iliğinde çoğalması tetiklenmektedir.

2.1.2.2 Kalıtsal Hastalıklar

Bloom sendromu, Fanconi aplastik anemisi, Kostmann sendromu, Li-fraumeni sendromu, Ataksi telenjektazi, Nörofibromatozis ve Poland sendromlarında lösemi sıklığı normal popülasyona göre daha fazla görülmektedir. Down Sendromu'nda da lösemi normal popülasyona oranla görülme olasılığı 20 kat daha yüksektir.

2.1.3 Patogenezi

Lösemi gelişimi, normal hücre çoğalmasını ve olgunlaşmasını kontrol eden genetik yollarda meydana gelen mutasyonlar sonucu veya çevresel etmenlere bağlıdır. Genetik değişiklikler, ALL'nin patogenezi ve klinik sınıflamasında çok önemli görülmektedir (Inaba ve ark., 2013). Kromozomlardaki yeniden düzenlemeler, translokasyonlar, delesyonlar, gen amplifikasyonları, nokta mutasyonları gibi olaylarla gen ürünleri değişikliğe uğramaktadır. Bu yeni oluşan ürünler normal hematopoez gelişiminin ve regülasyonunun bozulup hücrel proto-onkogenlerin onkogen karakteri kazanmasına yol açmaktadır. Kemik iliğinde sürekli bölünme özelliği kazanmış lösemik blastlar normal hücrelerin gelişmesine engel olmaktadır ve blast oranı toplam hücrelerin %60'ını aştığında klinik belirtiler görülmeye başlamaktadır. Klinik belirti olarak; anemi, trombositopeni, lökopeni, lökositozaya bağlı gelişen halsizlik, solukluk, çabuk yorulma, kanamalar, enfeksiyonlar ve kemik ağrıları örnek verilmektedir. Lösemik blastların organ infiltrasyonu sebebiyle hepatomegali, splenomegali, lenfadenomegali de izlenmektedir. Ayrıca santral sinir sistemi, kemik, akciğer, karaciğer, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistemde de infiltrasyona bağlı semptomlar görülmektedir.

2.1.4 Sınıflandırma

ALL'de en uygun tedavi kararının belirlenebilmesi için; lösemik hücrelerin, morfolojik (French-American-British; FAB), immünolojik ve sitogenetik özellikleri değerlendirilerek sınıflandırılmaktadır.

2.1.4.1 Morfolojik Sınıflandırma

Bennett ve ark.'nın 1976 yılında yayınladığı Fransız, Amerikan ve İngiliz hematologlarının ortak çalışması olan FAB sınıflandırması 'morfolojik sınıflandırma' olarak kabul edilmektedir. Bu sınıflandırmada; ışık mikroskopunda lenfoblastlar morfolojik olarak tanımlanır. Lösemik hücreler; hücre boyutu, nükleusun kromatin yapısı, nükleolus sayısı, nükleus ve sitoplazma arasındaki oran ve sitoplazmik bazofili/vakuol varlığına göre sınıflandırılmaktadır. Pediatrik ALL, periferik kan ve kemik iliğindeki lenfositlerin morfolojilerine göre L1, L2, L3 olarak 3 ayrı sınıfta incelenmektedir (Faderl ve ark., 2003).

FAB sınıflandırmasına göre gruplar aşağıda açıklandığı gibi değerlendirilmektedir;

L1 tip: Dar sitoplazmalı, küçük ve homojen nükleusa sahip blastik hücrelerdir. Çocuklarda en yaygın görülen alt tiptir ve pediatrik ALL vakalarının %84'ünde görülmektedir (Roganovic, 2012).

L2 tip: Blastik hücrelerin sitoplazmaları daha büyük ve heterojen yapıdadır. Nükleusları düzensiz ve en az bir adet büyük nükleolus içermektedir. Erişkinlerde en sık rastlanan ALL tipi olup, pediatrik ALL'nin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır (Roganovic, 2012).

L3 tip: Bu morfolojideki blastik hücrelerin sitoplazmaları büyük, homojen, bazofilik ve vakuollüdür. Pediatrik ALL vakalarının %1'inde görülmektedir (Roganovic, 2012).

Derin bazofilik sitoplazma ve sitoplazmik vakuolizasyon için dikkat çeken L3 tipi lenfoblastlar, morfolojik olarak Burkitt'in translokasyonları içeren lenfoma hücreleri ile aynıdır.

2.1.4.2 İmmünolojik Sınıflandırma

İmmünolojideki gelişmeler sonucu, B ve T hücreleri ile ilgili elde edilen yeni bilgiler, immünfloresans ve akım sitometrisi yöntemleri ile hücrelerin immünfenotipik olarak tanımlanmasına ve sınıflandırılmasına imkân vermektedir. Lenfositlerin gelişim aşamalarında yüzey belirteçleri olarak tanımlanan ve kaybolan farklı antijenik belirteçlere yüzey farklılaşma antijenleri (Cluster of differentiation, CD)

denilmektedir. CD olarak adlandırılan bu antijenler, etiket gibi o hücrenin hangi gelişim aşamasında olduğu hakkında bilgi vermektedir ve lösemilerin sınıflandırılmasına yardımcı olmaktadır. Bu sınıflandırma klinik olarak daha anlamlıdır ve temeli lösemi hücre yüzeyindeki CD'lerin ekspresyonuna dayanmaktadır. İmmünofenotipleme ile ALL, B ve T hücreli olarak 2 ana gruba ve 4 alt tipe ayrılmaktadır.

Erken Pre-B Hücreli ALL: Pediatrik ve yetişkin ALL vakalarının yaklaşık %70'i bu grupta yer almaktadır. Hastaların laboratuvar sonuçlarında düşük lökosit sayıları görülmektedir. 1 yaşından küçük pediatrik vakaların %50'si, 1 yaşından büyük pediatrik vakaların %10'u ve yetişkinlerin %10-40'ı CD10 antijenini eksprese etmemektedir. Bu grupta yer alan vakalarda CD10 ekspresyonunun eksikliği ve yüksek lökosit sayısı kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Roganovic, 2012).

Pre-B Hücreli ALL: Bu grup, sitoplazmik immüoglobulin ağır zincirlerinin ekspresyonu ile tanımlanmaktadır. Tüm ALL vakalarının yaklaşık olarak %20'si bu alt grupta bulunmaktadır ve pre-B hücreleri, erken pre-B hücrelerine benzer CD10 ekspresyon değerleri vermektedir. Hastaların laboratuvar bulguları değerlendirildiğinde, hemoglobin seviyesi, lökosit sayısı ve laktik dehidrogenaz seviyelerinin normale göre yüksek olduğu belirtilmektedir.

Olgun B-Hücreli ALL: Morfolojik olarak FAB sınıflandırmasının L3 tip grubuna dahil olan bu grubun vakalarda görülme oranı %5'ten daha azdır (Yang ve ark., 2003). Hastalarda abdominal lenfadenopati ve sıklıkla merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu izlenmiştir.

T-Hücreli ALL: Pediatrik ALL vakalarının %13-15'lik kısmını oluştururlar. Bu gruptaki hastalar ileri yaş, yüksek lökosit sayısı, MSS tutulumu ve mediastinal kitlelerle ilişkilendirilmektedir.

2.1.4.3 Sitogenetik Sınıflandırma

ALL sınıflandırılmasının bir diğer temeli sitogenetik anomalilerinin varlığına dayanmaktadır. Pediatrik vakalarda sitogenetik anomaliliklerin değerlendirilmesi, tanı, risk sınıflaması, tedavi ve prognozuna önemli katkılar sağlamaktadır. Pediatrik vakaların %70'inde sitogenetik ve moleküler genetik teknikleri ile tanımlanabilen

spesifik genetik değişikliklere rastlanmaktadır. Günümüzde kullanılan gelişmiş moleküler genetik teknikler, genetik değişimleri en doğru şekilde tespit etmemizi sağlamaktadır (Roganovic, 2012).

Sitogenetik anomalilerin varlığı iki farklı basamakta tanımlanmaktadır:

1- Anöplöidi:

- a) Hiperdiploidi; pediatrik hastalarda daha sık gözlenmektedir ve iyi prognoz sergilemektedirler.
- b) Hipodiploidi; pediatrik hastalarda daha seyrek görülmektedir ve kötü prognoz sergilemektedirler.

2- **Translokasyonlar:** Tüm pediatrik ALL vakalarının yaklaşık yarısı tekrarlayan translokasyonlara sahiptir. Translokasyonlar sonucu kimerik proteinler meydana gelir ve lösemik hücrelerin ivme kazanarak artmalarına neden olurlar. Oluşan translokasyonlar, hastaların prognozlarını iyi ve/veya kötü yönde etkilemektedir. Tedavi protokollerinin belirlenmesinde translokasyonlar göz önüne alınmaktadır.

2.1.5 Risk Grupları

Hastalar ilk anemnez/klinik verilerine göre risk gruplarına ayrılmaktadır. Sınıflandırmada dikkate alınan parametreler ise laboratuvar bulguları, sitogenetik özellikleri ve tedavi yanıtlarıdır. ALL tedavisinde farklı kohortlar, farklı tedavi protokolleri tercih etmektedir ve tedavi protokollerine göre risk sınıflamaları değişiklik gösterebilmektedir. Günümüzde uygulanan protokollere örnek olarak BFM, St. Jude's, Dana Farber, Children Cancer Group-CCG protokolleri verilebilmektedir. Günümüzde ALL hastalarına doğru risk sınıflaması yapılarak uygulanan protokoller sayesinde sağkalım oranlarında büyük başarılar elde edilmektedir. Hastaların tedaviye verdikleri yanıt ve relaps gelişim süreleri protokollerin başarı kriterlerini oluşturmaktadır. Tedavi stratejileri, hastaların 3 alt risk grubuna ayrılması ile belirlenir. Bu gruplandırma; lökosit sayısı, yaş, 8.günde incelenen periferdeki blast hücre sayısı, 15. ve 33.gün değerlendirilen kemik iliği materyalindeki blastik hücre sayısı gibi kriterlerle beraber *BCR/ABL1* ve *MLL/AF4* gibi translokasyonların varlığına göre şekillendirilmektedir.

ALL-BFM 2009 protokolünde hastalar özellikle relaps gelişim olasılıklarına göre risk gruplarına ayrılmaktadır. Yüksek riskli hastalar daha yoğun kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Tedavi; remisyon induksiyonu, konsolidasyon, idame ve MSS profilaksisi olmak üzere dört fazdan oluşmaktadır.

ALL-BFM 2009 Protokolü Sınıflandırması (ALL IC-BFM 2009; Kocak ve ark., 2012; Trujillo ve ark., 2016);

1- Standart Risk (SR)

2- Orta Risk (MR)

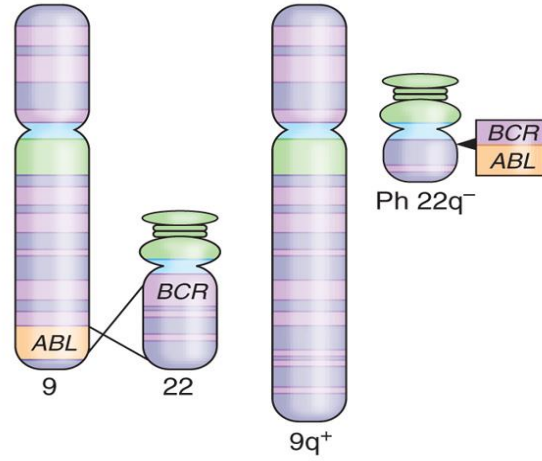
3- Yüksek Risk (HR) şeklindedir.

Tablo 1: ALL IC-BFM 2009 Protokolüne Göre Risk Grubunun Sınıflandırılması

Standart Risk Grubu	Orta Seviye Risk Grubu	Yüksek Risk Grubu
Tanı yaşı ≥ 1 yıl veya < 6 yıl	Tanı yaşı < 6 yıl veya > 10 yıl	Tanı yaşı ≥ 10 yıl
Lökosit sayısı $< 20.000/\text{mm}^3$	Lökosit sayısı $> 20.000/\text{mm}^3$	Lökosit sayısı $> 50.000/\text{mm}^3$
Periferik kandaki 8. gün blast sayısı $< 1000 / \text{mm}^3$	Periferik kandaki 8. gün blast sayısı $< 1000 / \text{mm}^3$	Periferik kandaki 8. gün blast sayısı $> 1000/\text{mm}^3$
Kemik iliğindeki 15. gün blast yüzdesi $< \%5$ veya $> \%5/\leq \%25$	Kemik iliğindeki 15. gün blast yüzdesi $< \%5$ ya da $< \%5$ veya $> \%5/\leq \%25$	Kemik iliğindeki 15. gün blast sayısı $> \%25$
Kemik iliğindeki 33. gün blast yüzdesi $< \%5$	Kemik iliğindeki 33. gün blast yüzdesi $< \%5$ veya $< \%5/\leq \%25$	Kemik iliğindeki 33. gün blast yüzdesi $< \%5$ veya $> \%5/\leq \%25$ ya da $> \%25$
		t (9;22)[BCR/ABL1] veya t (4;11)[MLL/AF4] pozitifliği
		Hipodiploidi ≤ 45
! Hastalar yukarıda belirtilen tüm kriterlere dahil olmalıdır.	! Standart veya yüksek risk gruplarının kriterlerine tam olarak uymayan hastalar bu sınıfta yer almaktadır.	! Hastaların yukarıda belirtilen bir kritere dahil olması yeterlidir.

2.2 Philadelphia Kromozomu

Philadelphia kromozomu (Ph), kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları arasındaki resiprokal translokasyon sonucu akrosentrik yapıdaki 22. kromozom için kullanılan bir tanımlamadır (Şekil 4). İlk olarak 1973'te KML hasta grubunda Rowley tarafından Ph kromozomu olarak tanımlanmasının ardından kısa bir süre sonra ALL hasta gruplarında da kromozomun varlığı saptanmıştır (Tosi ve Reid, 2016).



Şekil 4: Kromozom 9 ve 22 Translokasyonu Sonucu Philadelphia Kromozomu Oluşumu (Lydon N; 2009)

BCR GENİ

“Breakpoint Cluster Region” olarak tanımlanan *BCR* geni 22. kromozomun q kolunun 11.2 olarak tanımlanan bölgesinde lokalizedir (Şekil 5A) (Druker, 2001). Bu gen, 160 kDa büyüklüğünde işlevi tam anlaşılamayan bir serin-treonin kinaz sitoplazmik proteinini sentezlemektedir (Cowan ark., 2004; Kang, 2016; Tosi ve Reid, 2016). Transkripsiyon, 5' yönünden 3' yönüne ilerlemektedir ve bu bölgeden iki adet mRNA transkribe edilmektedir.

BCR proteini, en çok insan beyin dokusunda ve hematopoetik hücrelerde eksprese olmaktadır. Serin-tirozin kinaz proteinleri, hücre siklusu düzenlenmesi, protein fosforilasyonu, küçük GTPase aracılı proteinler ile sinyal iletimi gibi birçok biyolojik süreçte moleküler fonksiyona sahiptir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda protein konumları incelenmiştir ve bölünmenin gerçekleşmediği hücrelerde sitoplazmada lokalizeyken, mitoz bölünme evresinde kromozom çevresinde lokalize

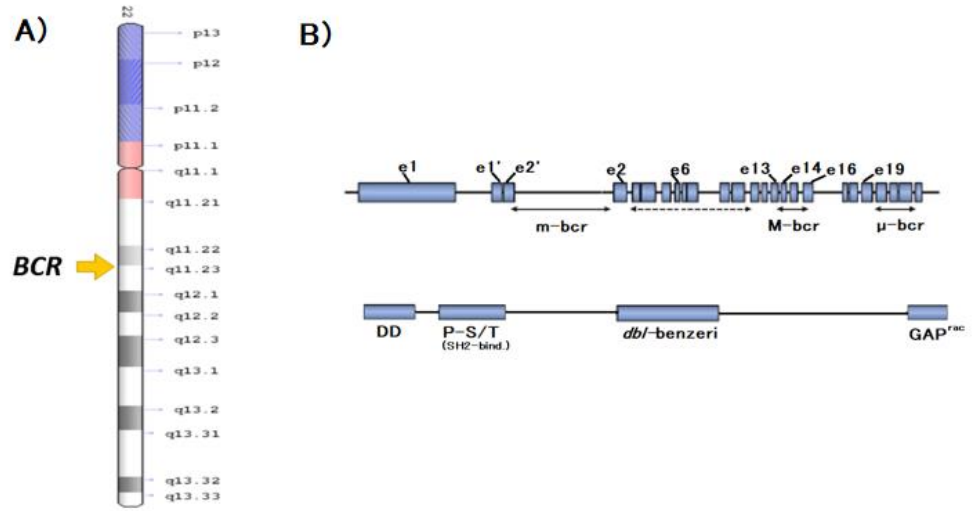
halde görülmektedir. Protein N-terminal, merkez ve C terminal uç bölgelerinden oluşmaktadır. N-terminal bölgesi serin-treonin kinaz kodlamaktadır. Yine bu bölgede bulunan coiled-coil, in vivo ortamda dimer oluşumuna izin veren domain olarak görev yapmaktadır. Merkezde dbl benzeri ve pleckstrin-homoloji (PH) bölgeleri yer almaktadır. PH bölgeleri, Rho guanidin değişim faktörleri üzerindeki guanidin trifosfatın (GTP) guanidin difosfata (GDP) dönüşümünü uyarmaktadır. Rho guanidin değişim faktörleri de *NF-K β* gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlamaktadır. Proteinin C-terminal bölgesi ise, RAS sinyal yolağında yer alan GTPazları aktive etme yeteneğine sahip bir alanı kodlamaktadır. Bu alan Ras guanozin trifosfat-aktivatör protein (RAC-GAP) bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Hanfstein ve ark., 2011).

BCR geni üç ana kırılma noktasına sahiptir (Hanfstein ve ark., 2011). Bunlar,

makro-bcr (M-bcr); KML hastalarının çoğunda ve Ph-pozitif ALL hastalarının üçte birinde görülmektedir. Kırılma, e12 ila e16 ekzonlarını içine alan 6 kb'lik bir bölgede meydana gelmektedir. Kırılma sonucunda 210 kDa ağırlığında, e13a2 veya e14a2 bölgelerinden transkripte edilen p210BCR-ABL1 olarak tanımlanan bir füzyon proteini oluşmaktadır (Şekil 5B) (Rowley ve ark., 2015).

minör-bcr (m-bcr); Ph-pozitif ALL hastaların çoğunluğunda ve nadiren KML vakalarında görülmektedir. *BCR* geninin 1. ekzondan sonra “e2' ve e2” olarak tanımlanan 54 kb'lık ekzon bölgesinde meydana gelen küçük kırılma alanıdır. Kırılma sonucunda 190 kDa ağırlığında transkripte edilen p190BCR-ABL1 olarak tanımlanan bir füzyon proteini oluşmaktadır (Şekil 5B) (Rowley ve ark., 2015).

mikro-bcr (μ -bcr); KML ve nötrofilik KML vakalarında görülmektedir (Hanfstein B. vd. , 2011). Bu kırılma noktası 19. ekzondan sonra gerçekleşmektedir ve 230 kDa büyüklüğünde füzyon proteini kodlamaktadır (Şekil 5B) (Rowley ve ark., 2015).



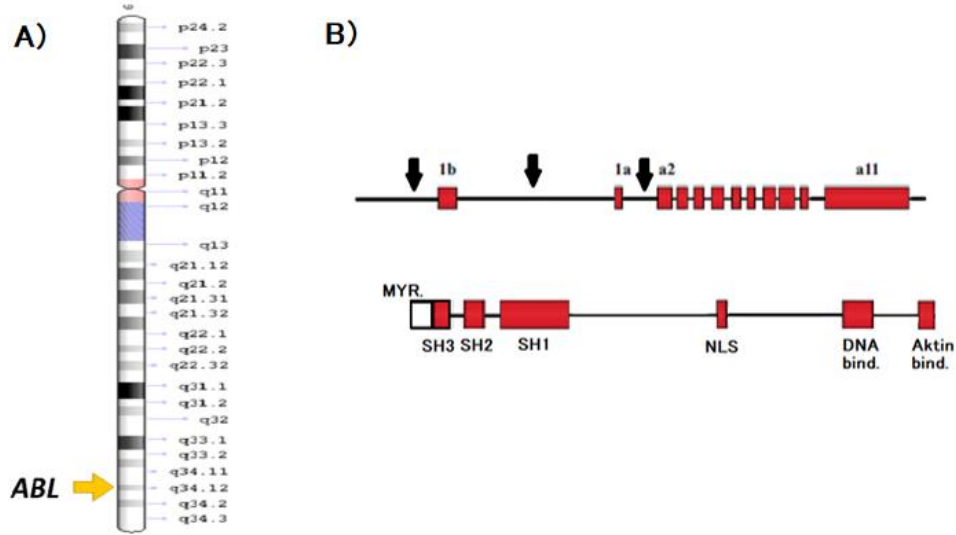
Şekil 5: *BCR* Geninin Kromozomal Lokasyonu (A), Gen Kırılma Noktaları (Yan oklar ile gösterilmiştir.) ve Protein Bölgeleri (B) (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCR>; Rowley ve ark., 2015)

***ABL1* GENİ**

ABL1 geni, 9. kromozomun uzun kolunda “q34.12” bölgesinde yer almaktadır (Şekil 6A). Bu gen, *v-ABL* (*Abelson murin Lösemi Virüs*) adlı onkogenin insandaki homologudur (Ailles ve ark., 2004, Apperley, 2007; Ito, 2013; Jamieson ve ark., 2004; Kang, 2016; Tosi ve Reid, 2016). Abl1 proteini, belirli pozisyonlara oksijen ve fosfat grubu ekleyerek diğer proteinlerin aktivitesini değiştiren kinaz enzimi olarak işlev görmektedir. 145 kDa büyüklüğünde eksprese edilen protein, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre farklılaşması, hücre adezyonu, integrin sinyal iletimi, hücre göçü ve hücrenin genotoksik strese cevabı gibi birçok farklı işleve sahip sitoplazmik ve nükleer nonreseptör tirozin kinazdır.

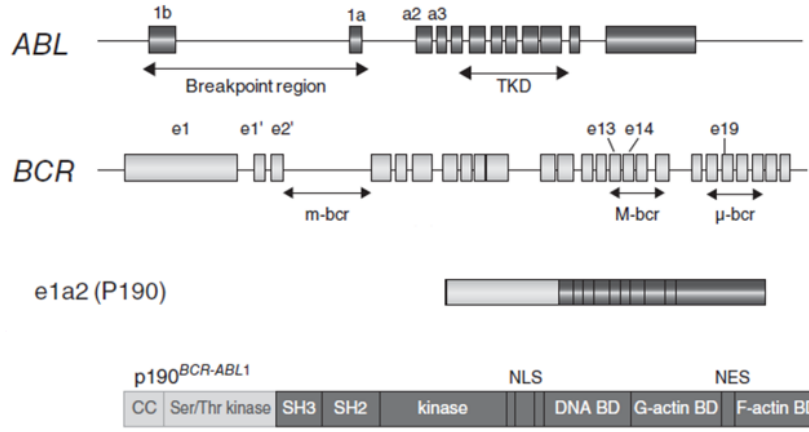
ABL'in tirozin kinaz aktivitesini N-terminal ucunda bulunan üç SRC Homoloji (SH) bölgesi belirlemektedir (Şekil 6B). Bu bölgeler SH1, SH2 ve SH3'tür. SH1 bölgesi tirozin kinaz aktive bölgesidir ve SH bölgeleri içerisinde en önemli olanıdır (Laneuville ve ark., 1995). SH3 bölgesi, SH1 bölgesinin negatif düzenleyicisidir. SH2 bölgesinin fonksiyonel bozukluğu sonucunda fosfotirozine bağlanma ilgisi kaybolmaktadır ve *ABL1*'in transforme olma kapasitesinde azalma meydana gelmektedir (Deininger ve Vierra, 2000). C-terminal bölgesi ise, nükleer lokalizasyon sinyallerini ve ayrıca DNA ve aktin bağlayıcı motifleri içermektedir. *ABL1* geninin kırılma noktaları çoğunlukla ilk ekzondaki 150 kb'lik bölgede görülmektedir. Nadir

durumlarda ise ekzon 1b'nin üst veya ekzon 1a'nın alt kısmında gerçekleşmektedir. ALL'de görülen p190 proteini e1a2 bölgesinden transkribe edilmektedir (Rowley ve ark., 2015).



Şekil 6: *ABL* Geninin Kromozomal Lokasyonu (A), Gen Kırılma Noktaları (Dik oklar ile gösterilmiştir.) ve Protein Bölgeleri (B) (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABL1>; Rowley ve ark., 2015)

BCR/ABL1 translokasyonu (Ph kromozomu) pediatrik ALL vakalarının yalnızca %3-5'inde meydana gelmektedir. *BCR-ABL1* füzyon geni [t(9:22)(q34;q11)] olarak da tanımlanmaktadır (Sarah ve ark., 2017; Tasian ve ark., 2017). Meydana gelen füzyon proteini sonucu protein kinaz ya da transkripsiyon faktörleri aktifleşmektedir. Kırılan *BCR* gen bölgesi her zaman *ABL1* geninin a2 ekzon bölgesine transloke olmaktadır. Bu nedenle *ABL1*'in N-terminal bölgesi hariç tüm bölgeleri ifade edilmektedir. Oluşan her bir füzyon proteininde *ABL* tirozin kinaz aynı bölge ile kodlanmaktadır. Oluşan proteinlerdeki farklılık *BCR*'ın N-terminal bölgesindeki kırılma noktalarından kaynaklanmaktadır. Pediatrik *BCR/ABL1* pozitif ALL vakalarında 190-kb protein (p190) üretilirken (Şekil 7), KML'de 210-kb (p210) büyüklüğünde protein sentezlenmektedir. Ph kromozomu, erişkin vakaların %25'inde ve KML vakalarının %95'inde mevcuttur. Pediatrik ALL'de görülen Ph kromozomu, genellikle büyük yaş ve tanı anında yüksek lökosit sayısı ile ilişkilidir. İmmünofenotip sınıflandırmada tipik olarak pre-B-hücreli ALL, morfolojik sınıflandırmada ise L1 ve L2 tipleri görülmektedir. ALL vakaları içerisinde Ph kromozomunun görülmesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.



Şekil 7: ALL'de *BCR-ABL1* Translokasyonu Sonucu Oluşan p190 kDa Protein Şeması (Rowley ve ark., 2015)

BCR/ABL1 füzyon proteininin 4 yoldan malignite oluşumunu tetiklediği belirtilmektedir. Bu yollar;

1. Hücrenin adezyon özelliklerini değiştirmek,
2. Mitojenik aktivasyona yol açmak,
3. Apoptozu inhibe etmek,
4. Tirozin kinaz aktivitesini inhibe edici proteinlerin yıkımına yol açmaktır.

Hastaların klinik tanılarından sonra planlanan tedavi protokollerinde Ph kromozomunun varlığı çok belirleyicidir. Kromozom varlığının belirlenmesinin ardından etkin ilaçların tedavi protokollerine eklenmesi, hastaların prognostik seyirlerini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle vakaların sitogenetik sınıflandırılması yapılırken birçok translokasyon göz önüne alınmaktadır (Tosi ve Reid, 2016).

Pediyatrik ALL vakalarında Ph kromozomunun varlığı ya da yokluğu Ph pozitif ve/veya Ph negatif grup olarak tanımlanmaktadır. 2009 yılında birbirinden bağımsız iki çalışma grubunun elde ettiği sonuçlar doğrultusunda Ph benzeri ALL grubu tanımlanmıştır. Ph pozitif kromozom yapısına sahip ALL hastalarında p190kB büyüklüğünde füzyon proteini oluşmaktadır ve bu protein yüksek tirozin kinaz

aktivitesine neden olmaktadır. Ph negatif ve Ph benzeri ALL hastalarda ise füzyon proteini bulunmamaktadır. Füzyon proteinleri dışında, gruplar arasında gen ifade profilleri karşılaştırılmıştır ve Ph benzeri grubun Ph pozitif hasta grubuna benzer profile sahip olduğu bildirilmektedir. Ph benzeri ALL grubu, füzyon proteini açısından Ph negatif ALL gibi tanımlanan ve uygulanan tedavilere cevap alınamayıp yüksek mortalite oranlarına sahip, Ph pozitif gen ifade profillerine benzer gen ifade profillerinin görüldüğü hasta grubu olarak tanımlanmaktadır. Ph benzeri hasta grubunun tanımlanmasından sonra etkin tedavi protokolleri, Ph pozitif tedavi protokolleri ile iletılmekte ve sağkalım oranlarının yükseldiği yapılan çalışmalar ile gözlemlenmektedir.

2.2.1 Philadelphia Kromozomu Pozitif Akut Lenfoblastik Lösemi

ALL'de yüksek riskli alt grup olarak tanımlanan Ph kromozomu pozitif, yapısal olarak aktif bir tirozin kinaz olan *BCR-ABL1* füzyon proteinini transkripte etmektedir. *BCR-ABL1* füzyonu, KML vakalarının %95'inde, pediatrik ALL vakalarının ~%3 ila %5'inde ve %25 oranında yetişkin ALL'de görülmektedir (Kang, 2016). Ph pozitif ALL, tüm yaş gruplarında kötü prognoz, tanıda yüksek CNS tutulumu, yüksek lökosit sayısı ve erken dönem çoklu ilaç direnci gelişimi ile ilişkilidir ve yaklaşık %70'inde *IKZF1* delesyonu bulunmaktadır (Bernt ve Hunger, 2014; Fielding, 2010).

2.2.2. Philadelphia Kromozomu Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi

Kanserin moleküler karakterizasyonu ve farklı alt tiplerinin keşfi; tanı ve/veya prognozu öngörebilecek biyobelirteçleri tespit edilmesi, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinin önünü açmıştır (Pui ve ark., 2015;Wells ve ark., 2017). Tıbbın temelini oluşturan moleküler alt tiplendirmeler 1970'li yıllarda, lösemi hastalarının prognozunu belirlemek için T hücreli membran belirteçlerinin kullanılmasıyla başlamıştır (Pui ve ark., 2015;Wells ve ark., 2017). Ph kromozomu olarak tanımlanan (*BCR/ABL1* füzyonu), t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan *BCR/ABL1* kimerik/füzyon proteini, pediatrik ALL'nin %3-5'inde ve yetişkin ALL olgularının yaklaşık %25'inde bulunmaktadır. Sitoplazmik tirozin kinaz ailesinde yer alan ABL1 proteininin translokasyon sonucu aktif forma dönmesi ile KML'de protein ağırlığı 210 kd ve ALL'de protein ağırlığı 190 kd olarak ortaya çıktığı bilinmektedir. Ortaya çıkan

kimerik protein, protein kinaz aktivitesini arttırarak miyeloid ve lenfoblastik hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olmaktadır (Bernt ve Hunger, 2014).

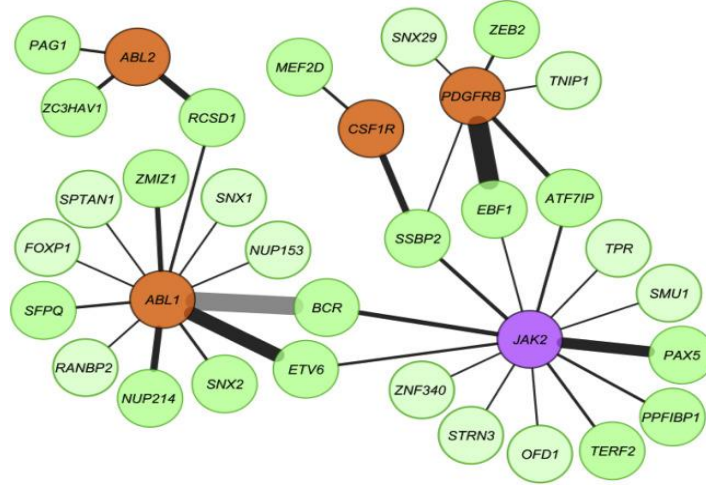
Lösemik lenfoblastların sitogenetik ve moleküler genetik özelliklerinin incelenmesi ile birbirinden bağımsız iki araştırma grubu, 2009 yılında Ph benzeri ALL'yi tanımlamıştır (Pui ve ark., 2015; Pui ve ark., 2017). Ph benzeri ALL, yeni tanımlanmış yüksek riskli pre B-hücreli ALL alt tipidir. Ph pozitif ALL'ninkine benzer bir gen ekspresyon profili ile karakterize edilmekle birlikte, bu alt tipte *BCR-ABL1* füzyonu mevcut değildir (Pui ve ark., 2015; Wells ve ark., 2017). Ph benzeri ALL prevalansı; yaşa, cinsiyete, etnik kökene ve Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'ne (NCI) göre tanımlanmış risk grupları ile belirlenmektedir (Pui ve ark., 2017). Ph benzeri ALL, B-ALL'nin SR sınıflamasında yer alan çocukların %10'unda ve NCI'a başvuran çocukların %15'inde görülmektedir ve neredeyse Ph-pozitif ALL'den 3 kat daha yaygındır. Minimal rezidüel hastalık (MRD) seviyelerinin değerlendirildiği ilk klinik çalışma olan St. Jude Total XV'de, Ph benzeri ve Ph benzeri olmayan ALL hasta grupları karşılaştırılmıştır. Cinsiyetin erkek olması, Down sendromlu olması ve remisyon indüksiyonu sırasında ve/veya sonrasında MRD'nin yüksek seviyesi iki grup arasındaki farkı oluşturmaktadır. Ph benzeri grup, Ph benzeri olmayan hasta grubuna göre daha yüksek MRD seviyelerine sahiptir ve bu nedenle Ph benzeri gruba daha yoğun post-remisyon tedavisi uygulanmaktadır (Ph benzeri %60, Ph benzeri olmayan %41) (Pui ve ark., 2017). Ph pozitif ALL ile benzer şekilde Ph benzeri ALL hastalarında da yaş artıkça kötü prognoz görülmekte ve bu hastalarda tanı sırasında $>50.000/\mu\text{L}$ başlangıç lökosit değeri tespit edilmektedir (Loh ve Tran, 2016). Bunun yanında, Ching-Hon Pui ve arkadaşları 2017'de yayınlanan çalışmalarında, Ph benzeri ALL hastalarının genomik değişimlerinin diğer yüksek riskli kohortlar için bildirilenlerden farklı olabileceğine dikkat çekmiştir (Pui ve ark., 2017).

Ph benzeri ALL'de görülen genetik değişimler mevcut sitokin reseptörü veya kinaz füzyonunun tipine bağlı olarak 5 ayrı alt grupta incelenmektedir:

1. *CRLF2*'nin yeniden düzenlenmesi ve *JAK2* mutasyonları (Şekil 8),
2. *ABL* sınıfı genlerin yeniden düzenlenmeleri veya mutasyonları (Şekil 8),
3. *EPOR* geninin yeniden düzenlenmesi,

4. JAK-STAT/MAPK sinyal yollarını aktive eden delesyonlar veya dizi mutasyonları ve

5. Nadir görülen Ras yolağı (*KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PTPN11*) mutasyonlarıdır.



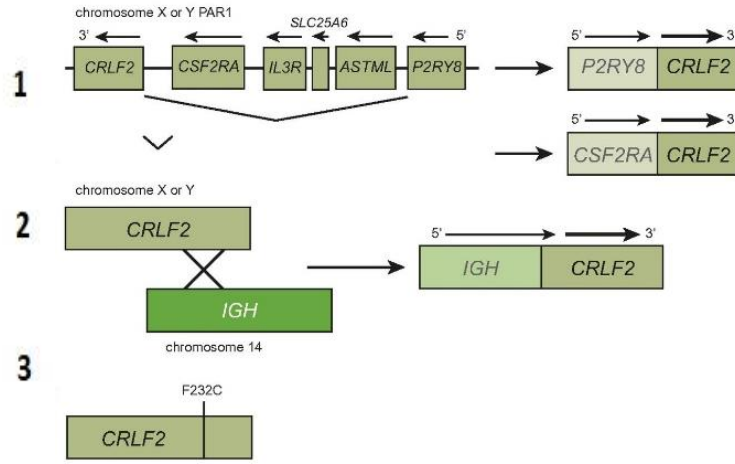
Şekil 8: B hücreli ALL'de *ABL* ve *JAK2* sınıfı tirozin kinaz aktive edici füzyonlar (Boer ve Den Boer , 2017)

IKZF1 geni; lenfoid transkripsiyon faktörü Ikaros'u kodlamaktadır. Ikaros'taki değişiklikler, tirozin kinaz ile aktive olan Ph benzeri vakalarında sıklıkla görülmektedir. Delesyonlar ve mutasyonlar da dahil olmak üzere *IKZF1* değişiklikleri; *ABL/JAK* sınıfı füzyon vakalarının %50-100'ünde, *EPOR*'un yeniden düzenlendiği hastaların yaklaşık %78'inde ve *CRLF2*-yeniden düzenlenmiş hastaların ise %40-70'inde görülmektedir (Şekil 11). Ph benzeri hastalarda, Ph pozitif ALL hasta gruplarındaki genetik değişimlere benzer şekilde *IKZF1* değişiklikleri görülmektedir. Ph pozitif ALL'de en sık görülen *IKZF1* değişimleri ekzon 4 ve 7'de görülen delesyonlardır. Günümüzde, çeşitli *IKZF1* delesyon tipleri arasındaki patobiyolojik farklar yeterince bilinmemektedir, ancak *IKZF1* delesyonlarının tüm tipleri kötü prognosis ile ilişkilendirilmiştir. Deneysel modellerdeki moleküler çalışmalar, Ikaros'un Ph pozitif hücrelerinde hücre siklusunu durdurduğunu ve lösemi regresyonuna aracılık eden bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü belirtmektedir (Boer ve Den Boer, 2017). *IKZF1*'deki delesyonlar ve mutasyonlar, Ph pozitif ve Ph benzeri B-ALL'de görülme oranı sırasıyla %70 ve %40'dır (Woo ve ark., 2014). Ph benzeri ALL tanısı almış 15 çocuğun dahil edildiği bir araştırmada; hastalara ait transkriptom analizleri ve tüm genom dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. 15 hastada da sitokin reseptörü,

tirozin kinaz genlerinin düzenini bozan ALL kromozomal yeniden düzenlemeleri veya dizi mutasyonları tanımlanmıştır (Roberts ve ark., 2014). Ayrıca kinaz aktive edici bazı sınıflar da tanımlanmıştır. Bunlar: JAK/STAT sinyalizasyonunu aktive eden değişimler (*CRLF2*, *JAK2*, *EPOR*), *ABL* sınıfı füzyonları (*ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFR α* , *PDGFR β*) ve RAS sinyal yolu mutasyonları (*KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PTPN11*)'dır. En büyük tirozin kinaz aktivasyon lezyonları, JAK/STAT sinyal yolunun aktifleşmesi sonucu oluşmaktadır (Pui ve ark., 2017). Sitokin reseptörlerinin ve *JAK* ailesi üyelerinin rolü, B-ALL çalışmalarında büyük öneme sahiptir. *JAK* ailesi, JAK-STAT sinyal yolağı ile ilişkili reseptör olmayan dört tirozin kinazı (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *TYK2*) kodlar. Kodlanan tirozin kinazlarda meydana gelen mutasyonlar, yüksek riskli pediatrik B-ALL vakalarının yaklaşık %10'unda görülmektedir (Woo ve ark., 2014).

CRLF2'deki değişimler (Xp22.3/Yp11.3); pediatrik B-ALL vakalarının %8'inde, yüksek riskli B-ALL vakalarının ise %15'inde görülmektedir. Ph benzeri ALL hasta grubunun yaklaşık %50'sinde *CRLF2* yeniden düzenlenmesinin söz konusu olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak, *CRLF2*'nin aşırı ekspresyonuna neden olan birkaç genetik düzenlenme vardır. Bu düzenlenmeler 3 yolla gerçekleşmektedir (Şekil 9):

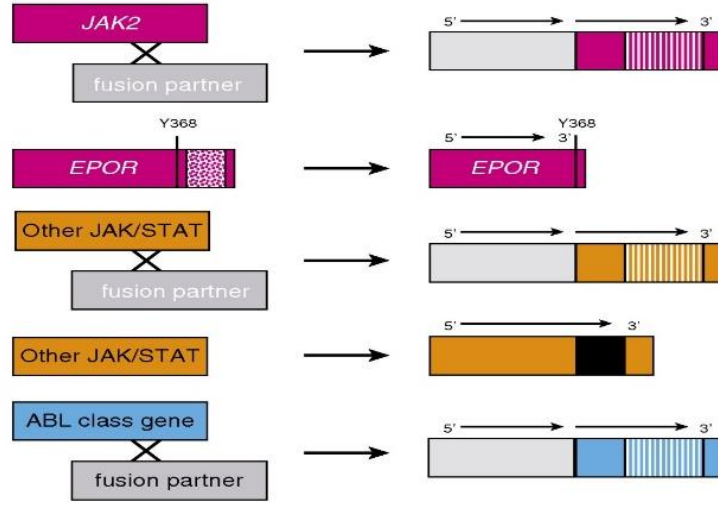
1. *P2RY8-CRLF2* füzyonuna neden olan cinsiyet kromozomlarının psödoautozomal bölgesinin fokal interstisyel delesyonu,
2. *CRLF2*'nin, immüoglobülinin ağır zincir arttırıcı bölgesine translokasyonu (*IGH-CRLF2*) veya,
3. *CRLF2*'yi aktifleştiren F232C nokta mutasyonu.



Şekil 9: Ph benzeri ALL'de *CRLF2* düzenlenmeleri (Tasian ve ark., 2017)

CRLF2 yeniden düzenlenmeleri, çoğunlukla lökomogeneze yol açan STAT5 yolağının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Son dönemde gerçekleştirilen çalışmalar ile, PI3K/mTOR sinyal yolağı da lökomogenez sürecine dahil edilmiştir (Pui ve ark., 2017; Woo ve ark., 2014). *CRLF2* yeniden düzenlenmenin görüldüğü çocukluk ve ergenlik çağı hastalarının yaklaşık yarısında, Janus Kinaz genlerinden *JAK1* ve *JAK2*'nin aynı zamanda aktive olacağı mutasyonlar görülmüştür ve bu durum JAK-STAT sinyalizasyonunun aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Düzenlenmenin görüldüğü vakaların yaklaşık %40'ı *JAK2* mutasyonlarını barındırmaktadır. En sık görülen mutasyon psödokinaz bölgesinde bulunan R683G nokta mutasyonudur (Pui ve ark., 2017; Woo ve ark., 2014). Lökomogenez sürecinin incelendiği çalışmalarda, *ABL* kinaz sınıfı ve *JAK2* genlerinin oluşturduğu yeni translokasyonlar saptanmıştır ve bu füzyon proteinlerinin Ph benzeri gruplara özel olduğu belirtilmektedir. *ABL* sınıfı ve *JAK2* füzyon proteinleri, pediatrik ve yetişkin Ph benzeri hastaların %18.25'inde görülmektedir. Füzyon proteinlerinin subselüler konumunun araştırılması ile birçok *JAK2* füzyonu hücre düzeyinde incelenmiş ve bu proteinlerin çoğunun (*PAX-JAK2* füzyon proteini hariç) sitoplazmik olduğu görülmüştür (Boer ve Den Boer, 2017).

Ph benzeri ALL'nin %13'ünü içeren ikinci ana alt grup, *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRβ* ve *CSF1R* gibi *ABL* sınıfı genlerin yeniden düzenlenmeleri görülmektedir. *JAK2* ve *EPOR* düzenlenmelerinin birlikte görülme oranı, Ph benzeri ALL'li hastalarda %11'dir. Tek başına *EPOR* düzenlenmeleri ise Ph benzeri ALL'nin ~%4'ünde tanımlanmıştır (Şekil 10) (Loh ve Tran, 2016).

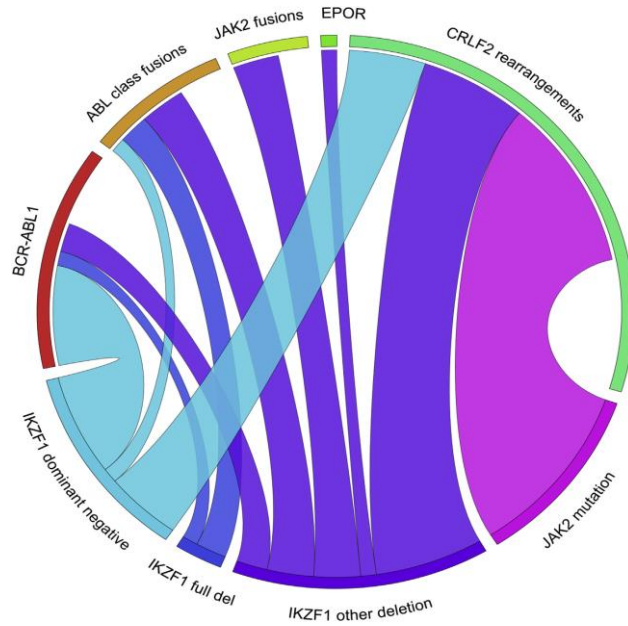


Şekil 10: Ph Benzeri ALL’de *ABL* Sınıfı kinaz füzyonları ve diğer JAK sinyal yolu değişimleri (Tasian ve ark. 2017).

Ph benzeri ALL, gen ekspresyon profillerinin analiz edildiği çalışmalar ile tanımlanabilmektedir. Ayrıca bu alt grup, ekspresyon profili olarak Ph pozitif alt gruba benzer gen ifade profilleri göstermektedir. Ph benzeri hastaların kemoterapi süreçleri kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Tanı amaçlı gerçekleştirilen sitogenetik testler sonucu Ph benzeri ALL hastaları kimerik proteini bulunmadığı için Ph negatif grup olarak tanı almaktaydı. Bu nedenle Ph benzeri hasta grubuna Ph negatif tanısı almış hastaların klasik tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalar ışığında, *ABL* sınıfı füzyonları görülen Ph benzeri ALL vakalarının tedavilerine *ABL* inhibitörlerinin eklenmesi ile remisyon sağlandığı belirtilmiştir. Ph benzeri hasta grubunda çoğunlukla *ABL* sınıfı ve JAK-STAT sinyal yolağı değişiklikleri görülse de, *ABL* sınıfı veya *JAK* inhibitörleri tarafından inhibe edilemeyen birkaç kinaz değişiklikleri de vardır (örn.,*BLNK*, *NTRK3* ve *TYK2*). Gelecekteki çalışmalar, bu kinazları hedefleyebilecek inhibitörler için planlanmalıdır. Ph benzeri ALL’nin tedavi protokollerine Ph pozitif için kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) eklenmesi hasta grubunun etkin tedavi almasını sağlamaktadır (Pui ve ark. 2017).

Tirozin kinaz aktive edici lezyonları olan hastaların çoğunluğu induksiyon kemoterapisine zayıf yanıt verir. Pediatrik çalışmalarda bu hastalara kök hücre transplantasyonu ile kombine edilmiş yoğun kemoterapi uygulandığı ve beş yıllık olaysız sağkalım oranlarının *ABL* sınıfı füzyonlarda %50-89, *JAK2/EPOR/CRFL2*

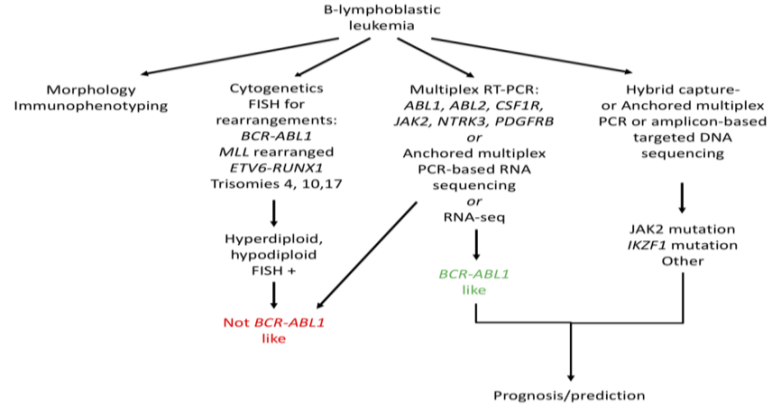
sapmaları için %67 oranının altında olduğu bildirilmiştir (Şekil 9) (Pui ve ark. 2017). Translokasyonlar sonucu oluşan “füzyon” genlerinin sentezlediği yeni proteinler, hastalığın seyrine etkisinin bilinmesi ve yeni tedavi prensiplerinin geliştirilmesi açısından yol gösterici olmaktadır. Spesifik kromozomal düzensizliklerin hastalığın tanısı ve tedavisi sonrasında kalitatif ve kantitatif olarak saptanması; hastalığın takibi, terapötik ilaca verilen yanıtın değerlendirilmesi ve MRD takibi bakımından da büyük önem taşımaktadır (Pui ve ark. 2017).



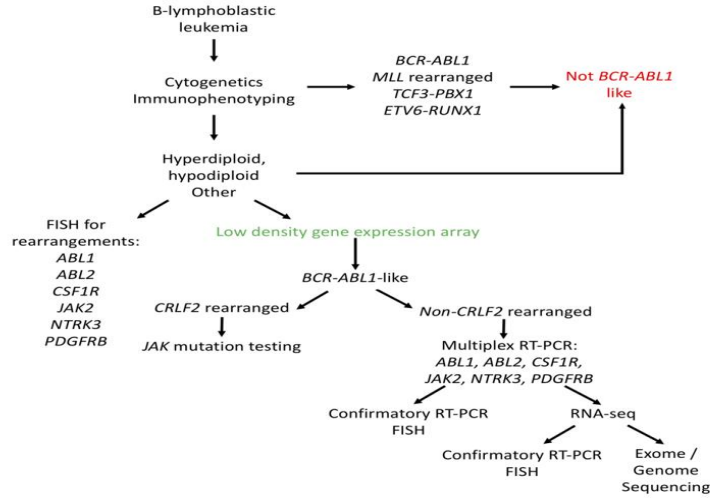
Şekil 11: Tirozin kinaz füzyonuna sahip hastalarda; *IKZF1* delesyonları sık görülürken, *CRLF2*'nin yeniden düzenlendiği hastalar çoğunlukla *JAK2* mutasyonlarına sahiptir (Boer ve Den Boer, 2017).

Ph benzeri ALL'li hastaların tanı alması oldukça güç olduğundan, son yıllarda yapılan çalışmalar çeşitli ayırt edici tanı yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. 2016 yılında, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2008 baskısını revize ederek bu hasta grubunun tanısal güçlüğüne dikkat çekmiştir. Günümüzde, farklı pediatrik çalışma grupları ve merkezleri klinik çalışmaların coğrafi yapısına, hastaların etnik kökenine, test edilecek hasta sayısına, tanı laboratuvarlarındaki genom/transkriptom dizileme altyapısının kullanılabilirliğine ve klinik hedefe dayanarak Ph benzeri ALL'nin teşhisi ve karakterize edilmesi için farklı stratejiler geliştirmektedir. Tanı yöntemlerini uygularken dikkat edilmesi gereken en önemli parametreler; moleküler karakterizasyonun dikkate alınması ve hedeflenen terapiye potansiyel olarak uygun olan moleküler lezyonların tanımlanabilmesidir (Pui ve ark., 2017).

A



B



Şekil 12: Ph benzeri ALL’de Tanı Algoritmaları, A: Geniş tabanlı Ph benzeri ALL Tanı Algoritması, B: Aşamalı Ph benzeri ALL Tanı Algoritması (Siegele ve Nardi, 2018)

2.2.2.1. Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi Tanı Yöntemleri

Ph benzeri ALL’nin patolojik tanısı ve alt sınıflandırmasında kullanılan metodolojiler avantaj ve dezavantajları yönünden ele alındığında 6 alt başlık altında değerlendirilebilir (Şekil 12).

2.2.2.1.1 Akış (Flow) Sitometri Yöntemi

Akış sitometri, B-ALL tanısı için yaygın olarak kullanılan, hızlı ve uygulama kolaylığı olan bir yöntemdir. Akım sitometresi yönteminde süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin

lazer önünden geçerken verdikleri sinyaller göz önüne alınarak analiz gerçekleştirilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklüğü, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabileceği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilmektedir. Deney sonucunda hücre ya da partikülün immünofenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli ve canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi elde edilmektedir. Akış sitometri yönteminde perifer kan örneği, kemik iliği aspirasyon materyali ve biyopsileri, ince iğne aspirasyon materyalleri ve tüm vücut sıvılarındaki hücrelerin analizi gerçekleştirilebilir. Akut lösemilerin %95 i temel antikorların kullanıldığı bir panel ile tanımlanmaktadır (Tablo 1). Ph benzeri ALL tanısında akış sitometri yönteminden faydalanmak prognostik açıdan önemlidir. Ph benzeri ALL vakalarında da B-ALL alt tiplerindeki gibi CD19⁺ ve CD10⁺ varlığı görülmektedir. Ph benzeri ALL vakalarının tanısında, yüksek *CRLF2* ekspresyon seviyeleri; *JAK2/JAK1*, *IL7R* genlerindeki mutasyonlar da dahil olmak üzere, JAK-STAT sinyal yolundaki genetik değişimler de değerlendirilmektedir. Her yöntemde olduğu gibi akım sitometrisinden yararlanırken de tanı için standardize edilmiş yöntemlerin tercih edilmesi, cihazın optimum koşullara uygun olması ve cihaz kalibrasyonu testin güvenilirliği açısından önemlidir (Dalva K, 2012; Siegele ve Nardi, 2018).

Tablo 2: Akut Lösemi Tanısında Kullanılan Temel Antikorlar ve İmmünolojik Alt Tipler

HÜCRE SERİSİ	TİPİK BELİRTEÇLER
B Hücre Serisi	CD19 ⁺ , CD22 ⁺ , CD79a ⁺ , sIg [±] , sIgμ ⁺ , sIgκ ⁺ veya sIgλ ⁺ ; CD19 [*] , CD34 ^{**} , CD10 ^{***} , CD20 ^{***} , CD22 ^{***} , sIgκ ^{***} , sIgλ ^{***}
Prekürsör (Pre)-Pre-B	CD19 ⁺ , CD22 ⁺ , CD79a ⁺ , sIgκ ⁺ , yIgμ ⁻ , HLA-DR ⁺ CD10 ⁻
Erken Pre-B	CD10 ⁺ , TdT ⁺
Pre-B	CD10 [±] , sIg ⁺
Common	CD3 ⁺ , sIg ⁻
T Hücre Serisi	CD7 ⁺ , sCD3 ⁺ ; CD7 [*] , CD34 ^{**} , TdT ^{**} , CD1 ^{***} , CD2 ^{***} , CD3 ^{***} , CD5 ^{***} , CD4 ^{***} , CD8 ^{***}
T Hücreli	CD2 ⁺ , CD1 [±] , CD4 [±] , CD8 [±] , HLA-DR ⁻ , TdT [±]
Pre-T	CD2 ⁻ , CD1 ⁻ , CD4 ⁻ , CD8 ⁻ , HLA-DR [±] , TdT ⁺
M Hücre Serisi	CMPO [*] , CD13 [*] , CD33 [*] , CD34 ^{**} , CD117 ^{**} , CD11a ^{**} , CD11b ^{**} , HLA DR ^{**} , CD14 ^{***} , CD68 ^{***} , CD41 ^{***} , CD61 ^{***} , cCD235a(Gly-A) ^{***}

Temel Antikorlar; *Hücre Seri Belirteci, **Matürasyon Belirteci, ***Diğer Karakteristik Belirteçler

sCD3: sitoplazmik CD3, **sIg:** sitoplazmik immünooglobulin, **yIg:** yüzey immünooglobulin, **TdT:** terminaldeoksinitrokleotid transferaz,

B: B lenfosit hücresi, **T:** T lenfosit hücresi, **M:** Miyeloid hücresi, “+”: pozitif, “-”: negatif, “±”: değişken

2.2.2.1.2 Gen Ekspresyon Profilleri

Mikroarray'ler (mikroçipler ve mikrodizilimler), birçok biyolojik sistemde olduğu gibi, hematolojide de yüksek çıktılı gen ifade analizleri için rutin olarak kullanılma amacıyla gelişen bir teknolojidir. Bu yöntem ile, aynı anda bir çok genin ifadesini analizlemek mümkündür. Çok sayıda DNA molekülünün lamalar ya da naylon membranlar üzerine noktalanması ile mikroarrayler oluşturulmaktadır. Kullanım alanları, gen ifade profillerinin araştırılması, mutasyon taraması ve analizi, genotipleme çalışmaları, genlerin ve klonların haritalanması, mikrodelyasyon ve kromozomal aberasyonların tespiti olarak sıralanabilir. Hastalık tanısında kullanılan mikroarray platformlarının en önemli avantajları, aynı anda birçok gen ile ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi, deney sürecinin kısa olması, güvenilir olması ve sistemin optimizasyonu sonrasında diğer yöntemlere göre daha ucuz olmasıdır. Mikroarray'ler hematolojik malignitelerin moleküler tanısının doğru olarak yapılmasında yaygın olarak kullanılmaya aday gösterilmektedir. Ayrıca mikroarray analizleri tümör gelişiminde hangi genlerin ve biyolojik süreçlerin sorumlu olabileceğini göstermektedirler. Mikroarray uygulamaları, günümüzde yaygın olarak Illumina, Agilent ve Affymetrix platformlarında gerçekleştirilir. Ticari olarak kullanılan mikroarrayler Affymetrix platformlarıdır. Gen ekspresyon analizi, Ph benzeri ALL'nin tanısında "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Yöntem; mRNA ekstraksiyonu ve ardından gen ekspresyon analizini içermektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar doğrultusunda Affymetrix platformları ile yüksek uyum gösteren, TaqMan tabanlı, 8 veya 15 genli düşük yoğunluklu dizi (Taqman Low-Density Array/TLDA) platformları geliştirilmiştir. Bu yöntem sadece Klinik Laboratuvar İyileştirme Değişiklikleri (Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA, klinik denemeler ve temel araştırmalar hariç, Amerika Birleşik Devletleri'nde insanlar üzerinde yapılan tüm klinik laboratuvar testlerine uygulanan ABD federal mevzuat standartlarıdır.) onaylı laboratuvarlarda Ph benzeri ALL teşhisinde kullanılmaktadır. Bu metodoloji genel olarak, hematolojik malignitelerin ön bilgi olmadan sınıflandırılmasında, yeni alt grupların belirlenmesinde, hastalığın tanısının doğru olarak yapılmasında, tedaviye cevabın ve relapsın önceden belirlenmesinde ve en önemlisi tedavi için yeni hedeflerin bulunmasında mikroarray platformları büyük önem taşımaktadır (Boylu, 2012; Siegele ve Nardi, 2018).

2.2.2.1.3 Sitogenetik

Geleneksel karyotipleme yöntemi, kromozomal anomalilerin belirlenmesinde ve bilinmeyen veya beklenmeyen yeniden düzenlenmelerin tespitinde kullanılmaktadır. Sitogenetik yöntemler ile Ph benzeri ALL vakalarında görülen *ETV6-RUNX1* ve *CRLF2*'nin interstisyel delesyonlarının belirlenemeyecek olması yöntemin sınırlayıcı yönünü oluşturmaktadır (Siegele ve Nardi, 2018). Ayrıca, Ph benzeri alt grubuna ait çok sayıda genin ifadesindeki değişikliğin sitogenetik analizler ile ayırt edilebilmesi mümkün olmadığından bu yöntem ciddi sınırlamaya sahiptir.

2.2.2.1.4 Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH)

FISH yöntemi, çalışılacak gen problemlerinin önceden belirlenmesi koşuluyla geleneksel karyotiplemeden daha yüksek hız ve çözünürlükte kromozomal anomalilerin tanımlanmasını sağlamaktadır. Ph benzeri hastaların tanısında spesifik FISH panelleri kullanılmaktadır ancak analizin pozitif bulgusu sonucunda tespit edilen translokasyonları tanımlamak için ek füzyon problemlerine veya ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi ek testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Birkaç genin (örn; inv (9) *PAX5-JAK2* füzyonu, del(X)(p22p22)/del(Y)(p11p11) sonucu oluşan *P2RY8-CRLF2* füzyonu gibi) yeniden düzenlenme bulgularını eş zamanlı olarak bu metodoloji ile tespit etmek mümkün değildir ancak CLIA onaylı laboratuvarlar; Ph benzeri ALL vakalarının tanı ve karakterizasyon basamaklarında kullanılmak üzere çok yönlü FISH testlerini önermektedir (Siegele ve Nardi V, 2018).

2.2.2.1.5 Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR; RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyon analizlerinin yapılabildiği cDNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan hızlı, hassas ve füzyon partnerlerinin varlığını tanımlayabilmek için kullanılan multipleks özellikte bir yöntemdir. Bu metodoloji ile reaksiyon başına 30 veya 50 gen probu kullanılarak geniş bir translokasyon aralığı testi gerçekleştirilir ancak yeni oluşan füzyonlar RT-PCR yöntemi ile tespit edilemez. CLIA sertifikalı laboratuvarın bazılarında Ph benzeri ALL'nin tanı ve karakterizasyonu için multipleks RT-PCR panelleri kullanılmaktadır (Pehlivan, 2003; Sayitoğlu, 2012; Siegele ve Nardi, 2018).

2.2.2.1.6 Dizileme Teknolojileri

Ph benzeri ALL'de genomik düzenlenmelerin ve klinik sonuçlar ile yapılacak korelasyonların tespiti için dizileme teknolojilerinin çalışmalara dahil edilmesi önem taşımaktadır. Ph benzeri ALL hastalarının tanısında kullanılan Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemleri birçok avantaj ve dezavantaja sahiptir. Yeni oluşan füzyonların belirlenebilmesi, sekonder mutasyonların analizlenebilmesi, daha hassas ve duyarlı sonuçların elde edilebiliyor olması sistemin dikkat çeken avantajlarını oluştururken, NGS tabanlı bazı yöntemlerde yeni füzyon partnerlerinin tanımlanamaması, yüksek maliyet, tanı sürelerinin uzun olması ve altın kural sayılan temel yöntemler ile doğrulanma gerekliliği bu yöntemin dezavantajı olarak görülmektedir. Kullanılan yöntemler; Hibrit yakalama (Capture)-bazlı hedefli NGS, Kanca (Anchored) multipleks PCR-bazlı hedefli NGS, Tüm ekzom dizileme, Tüm transkriptom dizileme ve Tüm genom dizileme yöntemleridir (Siegele ve Nardi, 2018).

2.3 Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemide Etkili Olan JAK/STAT Sinyal Yolağı

Sinyal yolakları, hücre fonksiyonlarının devamlılığı için gerekli olan iletişim ve etkileşimde görev almaktadırlar. Hematopoez süreci, sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin önemli rol oynadığı bir dizi sinyal yolağı etkisi altında gerçekleşmektedir. Hücre-hücre sinyalleşmesinde etkili olan sitokinler, salgılanan polipeptitler veya düşük moleküler ağırlığa sahip olan proteinlerdir ve otokrin, endokrin veya parakrin salgılama ile etki etmektedir. Sitokinler, vücuttaki çoğu doku tarafından salgılanmaktadır ve özellikle immün ve inflamatuvar cevabın oluşum sürecini etkilemektedir.

Kanserleşmede somatik mutasyonlar onkolojik süreçleri uyarmaktadır. ALL patogenezi ile ilişkili hücre içi sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açan onkolojik süreçler, çeşitli hücrel olayları değiştirerek lösemogeneze neden olmaktadır. Transkripsiyon faktörleri, hematopoez sürecinde hücrel kökeni etkilemektedir. Bu faktörlerde meydana gelen genetik değişimler, lenfoid farklılaşmasını ve gelişimini kontrol eden mekanizmaları değiştirmektedir. Pluripotent hematopoietik kök hücrelerden lenfoid ve miyeloid hücreler kemik iliğinde olgunlaşmaktadır. Lenfoid

gelişim ve farklılaşma süreçlerinde rol oynayan önemli transkripsiyonel faktörler; *EBF1*, *ETV6*, *PAX5*, *RUNX1* ve *TCF3*'dir. Bu faktörler yapısal yeniden düzenlenme mekanizmalarında yer almaktadır.

Adrián Montaña ve ark.'nın (2018) gerçekleştirdikleri çalışmada, B hücreli ALL vakalarında *MYC*, *ERG*, *ETV6*, *IKZF1*, *IKZF2*, *IKZF3*, *LEF1*, *PAX5* ve *TBLIXRI*'de somatik mutasyonlar tespit edilmiştir. *IKZF1* transkripsiyon faktörü, B lenfoid hücrelerin gelişimi için önemli bir faktördür. Düzenlenmesi veya mutasyona uğraması durumunda B-ALL sürecinin hızlandığı belirtilmektedir. Transkripsiyon faktörlerindeki somatik mutasyonlar, sinonim olmayan tek nükleotit değişimlerin yanı sıra frameshift ve nonsense mutasyonları da içermektedir. Tanımlanması zor olan ancak hastalık açısından önemli görülen *ETV6*, *ERG*, *GATA3*, *LEF1*, *LMO2*, *RUNX1*, *TALI(SCL)* gibi genlerdeki delesyonlar NGS yöntemi ile tanımlanmışlardır. Fokal delesyonlar ve sekans mutasyonları pediatrik B-ALL vakalarının %15'inde görülürken, Ph kromozomuna sahip vakaların %80'inde görülmektedir. Tekrarlayan *PAX5* mutasyonları, B-ALL'nin 1/3'ünde görülürken Ph pozitif ALL vakalarının yarısında görülmektedir. *EBF1* mutasyonları ise Ph pozitif ALL'nin yaklaşık %14'ünde görülmektedir. Meydana gelen mutasyonlar ile klinik anlamlılık ilişkili bulunmuştur. *IKZF1* delesyonları veya mutasyonları tedavi direnci ile ilişkilendirilmiştir ve relapsı tetiklediği bilinmektedir. Özellikle *RUNX1*'in RUNT ve TAD domainlerinde meydana gelen mutasyonlar kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Mullighan ve ark., 2009)

2.3.1 JAK/STAT Sinyal Yolağı

JAK/STAT sinyal yolu sitokinler tarafından aktiveleştirilmektedir. Sitokinler, kan ve immün sistemindeki hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında, hücre göçü ve apoptoz gibi hücresel süreçlerde önemli roller almaktadır.

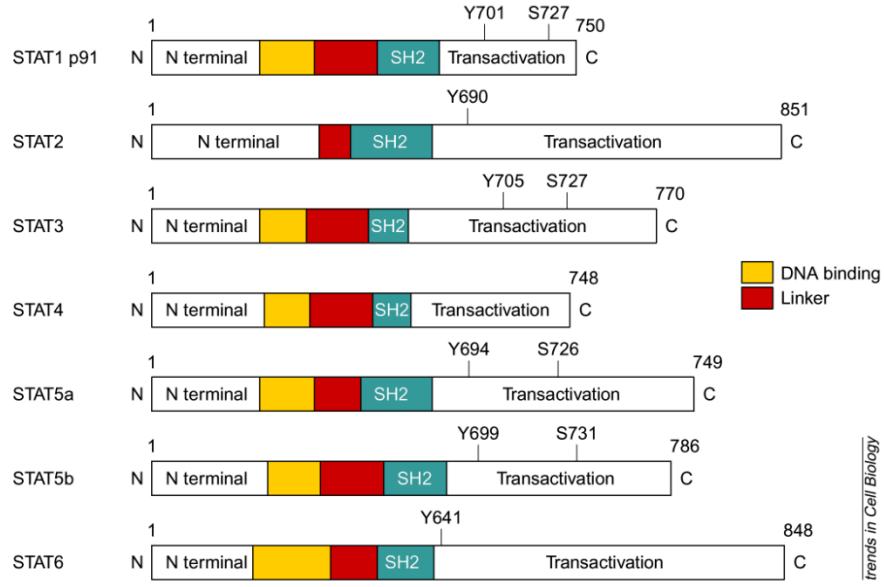
İnsan genomu, sitokin reseptör süper ailesine ait 30'dan fazla sitokin reseptörü tarafından sinyalleşmeye aracılık eden, sitokin reseptörleri ile birleşen reseptör olmayan tirozin kinazlar olarak tanımlanan dört *JAK* (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3* ve tirozin kinaz 2 [*TYK2*]) ve *SH2* bölgesine sahip, JAK kinazların en önemli hedefleri konumundaki yedi STAT (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5A, Stat5B ve Stat6) proteinini kodlamaktadır (Vainchenker ve Constantinescu, 2013).

JAK proteinleri, 7 adet Janus homoloji domaini (JH1-7) içeren 120-140 kDa büyüklüğüne sahip proteinlerdir (Şekil 13). Kinaz aktivitesine sahip domain JH1'dir. JH2 domaini, psodökinaz domaini olarak bilinmektedir ve bu domain kinaz aktivitesine sahip değildir. JH2 domaini, JH1 aktivitesini düzenlediği düşünülmektedir. Janus Kinaz ailesinden *JAK1* geni kromozom 1, *JAK2* geni kromozom 9, *JAK3* ve *TYK2* genleri kromozom 19 üzerinde konumlanmaktadır.



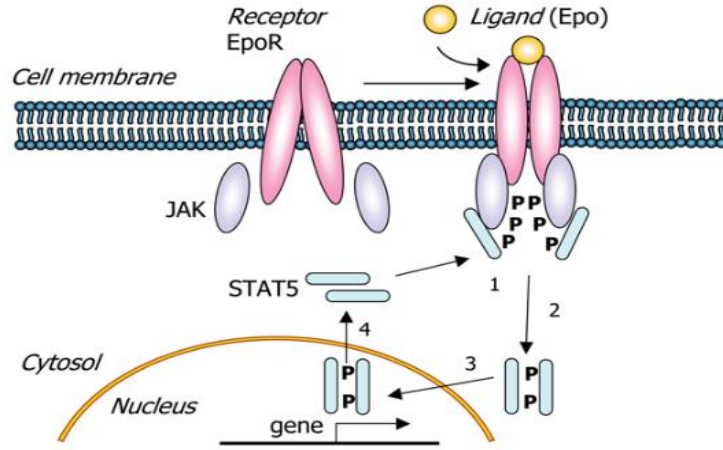
Şekil 13: JAK proteini ve domainleri (Johnson ve ark., 2014)

STAT proteinlerinin her biri farklı hücrelerdeki farklı genleri aktive etmektedir. Memeli hücrelerindeki interferon sinyal yolağında tanımlanan ilk STAT proteinleri Stat1 ve Stat2'dir ve ilerleyen yıllarda Stat3, Stat4, Stat5A, Stat5B ve Stat6 proteinleri tanımlanmıştır (Şekil 14). STAT proteinlerini kodlayan genler 3 farklı kromozom üzerinde lokalizedir. *STAT1* ve *STAT4* kromozom 2; *STAT3*, *STAT5A* ve *STAT5B* kromozom 17; *STAT2* ve *STAT6* da kromozom 12 üzerinde bulunmaktadır (Benekli ve ark., 2009). STAT proteinleri yaklaşık 700-850 amino asit uzunluğunda, N-terminal DNA bağlanma bölgesi, sitokin reseptörlerinin sitozolik bölgelerine bağlanan SH2 bölgesi ve trans-aktivasyon bölge olarak tanımlanan kritik tirozin aminoasiti taşıyan C-terminal bölgesini içermektedir. Reseptöre bağlanan STAT proteininin C-terminal bölgesi JAK kinaz tarafından fosforillenmektedir. Bu fosforillenmeye örnek olarak eritropoietin reseptörünün Stat5 proteinini aktiflemesi verilmektedir. Fosforillenen STAT reseptörden ayrılır ve fosforillenmiş iki STAT proteininin SH2 bölgeleri, fosfotirozine bağlanacak şekilde resiprokal bağlanma ile dimer oluşturmaktadır. Dimerleşme sonucunda nüklear yerleşim bölgesi açıkta kalır ve oluşan STAT dimeri, hedef genlerini kontrol eden enhancerlara bağlanabilmek için nukleusa geçmektedir (Schindler ve Plumlee, 2008).

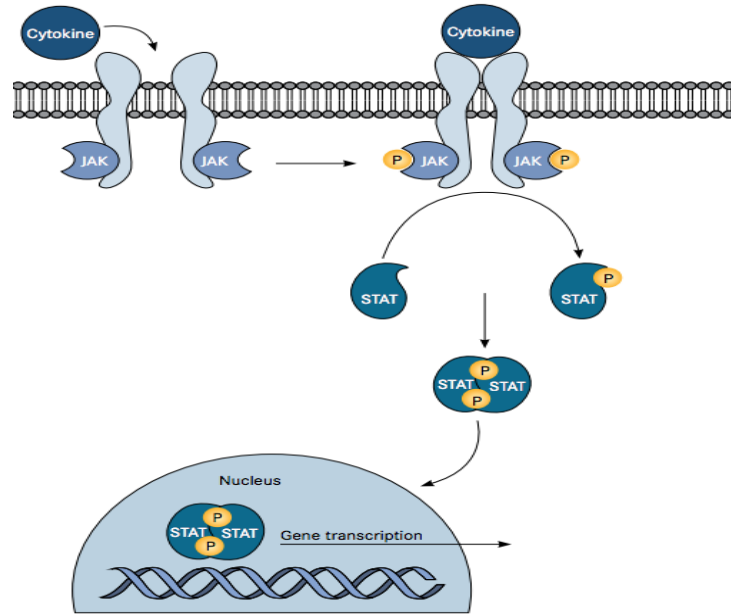


Şekil 14: STAT protein ailesi (Johnson ve ark., 2014)

Sinyal molekülleri arasında sitokinler, interferonlar ve büyüme faktörleri bulunmaktadır. Bu moleküller, tirozin kinaz aktivitesi olmayan tek geçişli yüzey reseptörlerine bağlanmaktadır (Sitokin reseptör süper ailesi) ve bu yüzey reseptörleri sinyali iletebilmek için tirozin kinaz aktivitesine sahip JAK proteinlerine ihtiyaç duymaktadır. Ligand reseptöre bağlandığında iki reseptör dimer oluşturur ve sitoplazmik kısımda JAK proteinleri reseptörlere bağlanmaktadır. Eritropoetin ya da büyüme faktörleri bağlandığında reseptörler homodimer oluşturmaktadır. İnterferon ve interlökinler bağlandığında ise reseptörler heteromultimerler oluşturmaktadır (Şekil 15) (Harrison, 2012).



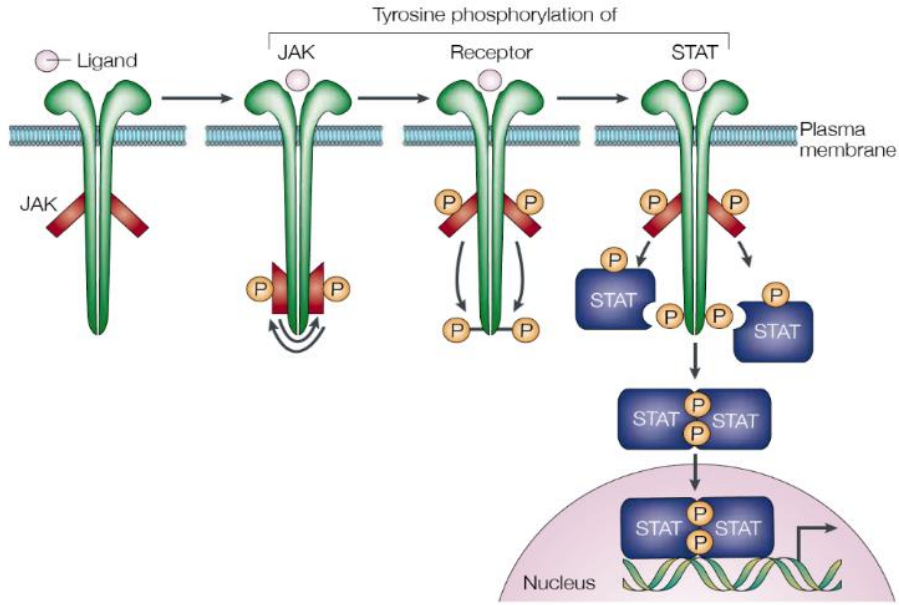
Şekil 15: JAK2'nin Epo aracılı aktivasyonu, dimerizasyonu ve nukleusa taşınması (Klipp ve Liembermeister, 2006)



Şekil 16: Sitokinler aracılığıyla JAK/STAT sinyal yolağı aktivasyonu (Lartigue, 2018)

JAK proteinleri birbirlerine yakın konuma gelince fosforillenerek aktifleşmektedir. Tirozin bölgelerine fosfor bağlanan reseptörler, STAT proteinlerinin SH2 domainleri aracılığıyla bağlanma için uygun hale gelir. Reseptöre bağlanan STAT proteinleri JAK tarafından fosfat bağlanarak aktifleşmektedir. Aktifleşen STAT

proteinleri serbest kalarak dimer oluşturmaktadır ve dimerleşmenin ardından hücre çekirdeğine transloke olmaktadır. Çekirdeğe transloke olan STAT proteinleri hedef genleri aktifleştirmektedir (Şekil 16-17) (Kang, 2016).



Şekil 17: Genel olarak ifade edilen, aktifleşmiş JAK/STAT sinyal yolağı şeması (Levy ve Darnell, 2002)

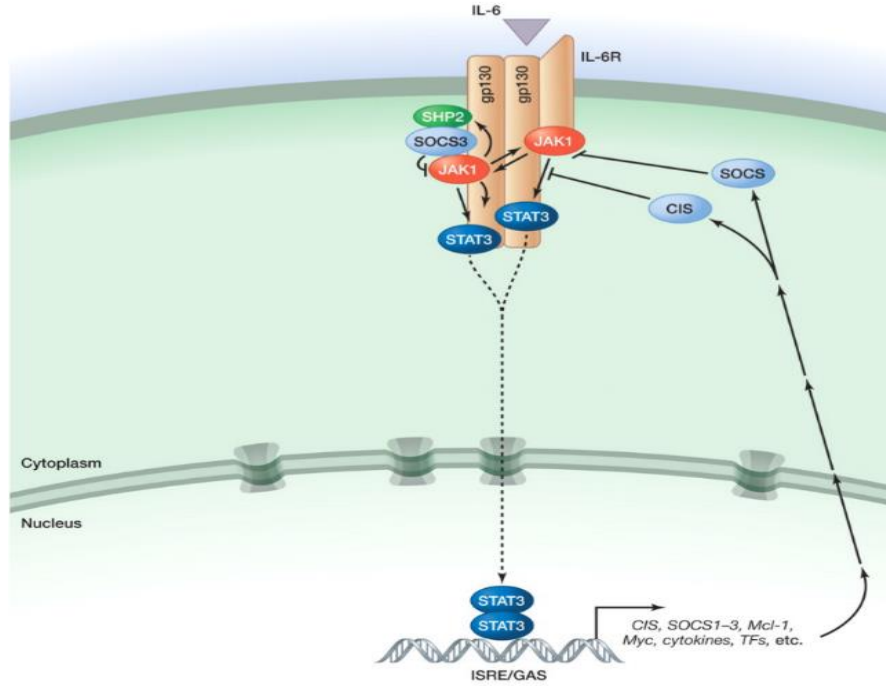
EGF, PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü) ve FGF (fibroblast büyüme faktörü) gibi intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler, JAK'lar aracılığı ile dolaylı yoldan veya doğrudan STAT proteinlerini aktive etmektedir (Garcia ve ark., 2001; Yuh ve ark., 2001).

JAK/STAT sinyal yolu inaktivasyonu birçok şekilde negatif olarak düzenlenmektedir. SHP-2 (SH2 bölgesi içermektedir) fosforile olan JAK ya da reseptöre bağlanıp defosforilasyon aracılığıyla sinyalin iletilmesini engelleyen fosfotazdır (Lim ve Cao, 2006).

SOCS protein ailesinin 8 üyesi bulunmaktadır ve bu proteinler SH2 bölgelerine sahiptir. JAK/STAT sinyal yolağı hedef genlerinin ürünleridir ve negatif düzenleyici döngüsünü oluşturmaktadır. Eksprese olan SOCS proteinleri STAT veya JAK'ları baskılamaktadır ya da reseptöre bağlanmak için birbirleri ile yarışarak inhibe etmektedir (Vainchenker ve Constantinescu, 2013).

Negatif düzenlenme döngüsü üç farklı basamakta ele alınmaktadır:

- 1- SOCS-1, doğrudan JAK1 tirozin kinaz ile etkileşerek aktivitesini baskılamaktadır.
- 2- SOCS-3, ilk olarak fosforillenmiş reseptör ile, ardından JAK'larla etkileşime girerek doğrudan JAK1'in aktivitesini baskılamaktadır.
- 3- CIS proteini ise STAT proteinleri ile fosforile sitokin reseptörlerindeki bağlanma bölgesi için yarışmaktadır (Lartigue, 2018; Lim ve Cao, 2006).

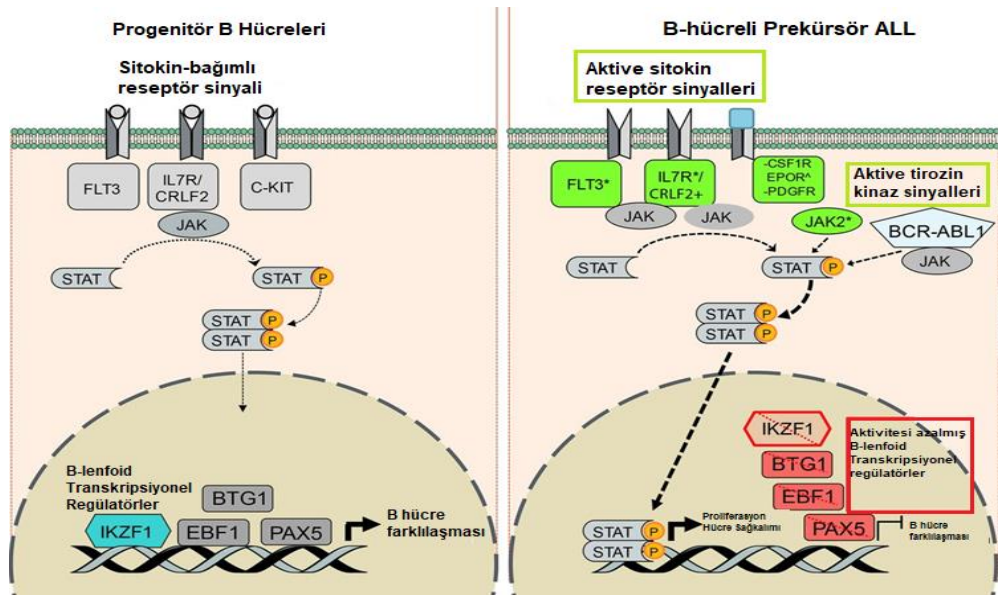


Şekil 18: JAK/STAT sinyal yolağı inaktivasyonu. JAK/STAT yolağı inaktivasyonu için sitokinler reseptöre bağlanmaktadır ve reseptörlerde oligomerizasyon gerçekleşmektedir. Dimerizasyon sonucu JAK'lar aktifleşmektedir ve STAT'ların yardımı ile reseptörün sitoplazmadaki alanı fosforillenmektedir. Sitoplazmadaki alan, SHP-2 ve SOCS/CIS proteinlerinin bağlanma bölgesidir. SHP-2 proteini JAK1 tarafından aktive edilirse, reseptör JAK ve STAT'ı defosforile etmektedir. STAT'ların JAK'lar tarafından aktive edilmesi, negatif feedback döngüsü ile gerçekleşmektedir. STAT aktivitesini inhibe eden fosforeseptör için SOCS/CIS proteinlerinin ekspresyonu ve çekirdeğe translokasyonu gözlenmektedir. SOCS-1, doğrudan JAK ile etkileşerek JAK aktivitesini baskılamaktadır. SOCS-3, ilk olarak fosforillenmiş reseptör ile daha sonra JAK'lar ile doğrudan etkileşime girerek aktivitelerini baskılamaktadır. CIS proteini ise, STAT proteinleri ile fosforile sitokin reseptörlerindeki bağlanma bölgesi için yarışmaktadır (Harrison, 2012; Lim ve Cao, 2006)

Lenfoblastik hücrelerin gelişiminde JAK/STAT sinyal yolağı önemli bir rol almaktadır. JAK/STAT sinyal yolağı genlerinde meydana gelen mutasyonlar (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *IL7R*) B-ALL ve T-ALL'de gözlenmiştir. JAK kinazlardaki ve *IL7R*'deki mutasyonlar, JAK-STAT yolağının aktifleşmesine neden olmaktadır. Yapılan

çalışmalar doğrultusunda, *IKZF1* delesyonları veya mutasyonları, *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri gibi genetik değişimler *JAK* genlerini (öncelikle *JAK2*, daha sonra *JAK1* ve *JAK3*) aktive eden mutasyonlar ile ilişkili bulunmaktadır. *JAK* mutasyonları, en sık psödokinaz bölgesinde missense mutasyonlar olarak görülmektedir. R683 noktasındaki missense mutasyon *JAK2* geninde yaygındır ve JH2 bölgesinin yapısını değiştirmektedir. Bu mutasyon, hücre proliferasyonuna neden olmaktadır ve B-ALL vakaları için biyobelirteç önemi taşımaktadır. Son çalışmalar, JH2 alanının N ve C lobları arasındaki bölgede bulunan amino asit kalıntısı p.R683'ün, *JAK2*'nin aktivitesini, yapısal stabilitesini ve katlanmasını korumak için önemli olduğunu göstermiştir (Vainchenker ve Constantinescu, 2013).

B-hücre farklılaşması için gerekli olan transkripsiyon faktörü *IKZF1*'de meydana gelen değişimler sonucu fonksiyon kaybı görülmektedir. *IKZF1* değişimleri tirozin kinaz sinyal yollarını aktive etmektedir ve B hücrelerinde artmış proliferasyon ve hücre sağkalımına neden olmaktadır (Şekil 19) (Marke ve ark., 2018).



Şekil 19: Lösemi patogenezinde *IKZF1* değişimleri ile işbirliği yapan JAK/STAT yolu. Soldaki şemada, B hücrelerin normal koşullardaki farklılaşma ve sitokin reseptörlerinin aktifleşmesinde görev alan sinyal yolları gösterilmektedir. Sağdaki şemada ise, bu yollarda meydana gelen değişimler sonucu b-hücreli prekürsör akut lenfoblastik lösemiye neden olmaktadır. Sağdaki şemada, *IKZF1* delesyonları, *FLT3*, *IL7R*, *JAK2* de meydana gelen aktive edici mutasyonlar, *CRLF2*(+)'nin ve *EPOR* (^)' u up-regülasyonu, *PDGFR*, *CSF1R*(-) ve *BCR*'nin kromozomal translokasyonu sonucu meydana gelen füzyon proteinleri *STAT* aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca *IKZF1* de meydana gelen değişiklikler, B-lenfoid transkripsiyonel regülatörlerin aktivitesini etkiler ve bu durum B hücre farklılaşmasına engel olmaktadır (Marke ve ark., 2018).

JAK1 mutasyonları T-ALL vakalarında ve *JAK2* mutasyonları Down sendromlu vakalarda görülmektedir ve her iki gende meydana gelen mutasyonlar, sıklıkla yüksek riskli B-ALL vakalarında tespit edilmektedir. Ph benzeri ALL vakalarında da sıklıkla *JAK* gen mutasyonları, *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri ve yüksek seviyede sitokin-sinyal anomalilikleri görülmektedir (Montaño A ve ark., 2018). *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri, *JAK2* mutasyonları ile koreledir. Ph benzeri ALL vakalarında görülen (%50) *CRLF2*'nin yüksek ekspresyon seviyesi ve *JAK* mutasyonları (%30 *JAK2* mutasyonu) bu yolağın aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu genler, kinaz aktivasyonunu indükleyerek JAK/STAT yolağının aktifleşmesine ve lösemik hücrelerin gelişmesini kolaylaştırmaktadır (Montaño A ve ark., 2018).

Stat proteinlerinin aktivasyonu, özellikle Stat5 ve Stat3, lenfoid ve miyeloid malignitelerin patogenezinde önemli görülmektedir. Aktifleşen JAK/STAT sinyal yolağı lösemi hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını tetiklemektedir ve hastaların klinik seyirleri kötü prognoz ile ilerlemektedir. *JAK1/2* genlerini hedefleyen inhibitörler ve diğer epigenetik ilaçlar, JAK/STAT sinyal yolu mutasyonlarını barındıran vakaların tedavi protokollerine eklenmektedir ve olumlu sonuçlar elde edilmektedir (Montaño A ve ark., 2018).

2.4 Tedavi

2.4.1 Genel Tedavi

ALL multifaktöriyel bir hastalıktır ve prognostik faktörleri belirlenmiştir. Bu faktörler göz önüne alınarak risk gruplarına göre tedavi protokolleri geliştirilmektedir. ALL'de radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, kemik iliği nakli başlıca tedavi modelleridir. ALL'nin tedavisi remisyon indüksiyonu, konsolidasyon ve rezidüel hastalığı yok etmek için idame tedavisinden oluşur (Pui ve Evans, 2006). Uygulanan protokoller arasında fikir birliği sağlanan ve tedavide yüksek oranlarda başarıya ulaşılan lösemi grubu B-hücreli ALL'dir.

Vinkristin, Prednizon, Asparaginaz, Daunorubisin, Methotrexate, 6-Merkaptopurin, Siklofosfamid ve Sitozin Arabinozid ALL tedavisi protokollerinde yer alan ilaçlardır (Hillman ve ark., 2005). Tedavide yüksek dozlarda Metotreksat, Sitarabin ve Siklofosfamid'den oluşan kısa süreli, yoğun kemoterapi blokları uygulanmaktadır. Ayrıca hastalarda MSS relapsını önlemek için klinik seyrin erken

aşamalarında, genellikle konsolidasyon fazının arkasından MSS'ye yönelik tedavi protokolleri dahil edilmektedir.

İlk basamak olan indüksiyon tedavisinde amaç, lösemik hücrelerinin %99'undan fazlasını yok etmek ve normal hematopoez sürecini yeniden sağlamaktır. Bu yaklaşım bir glukokortikoid (prednisone ve dexamethasone), vinkristin ve üçüncü bir diğer ilacın (asparaginaz, antrasiklin veya her ikisinin birden kullanılması) uygulanmasını içermektedir. Üçlü ilaç kombini ile ilerletilen indüksiyon tedavisi, standart riske sahip hastalar için yeterli görülmektedir (Pui ve ark., 2008).

İkinci basamak olarak konsolidasyon (reindüksiyon/intensifikasyon) tedavisi, ilaca dirençli rezidüel lösemik hücreleri ortadan kaldırmak amacıyla indüksiyon tedavisinin ardından uygulanmaktadır. Böylece hastalarda relaps riskinin azaltılması öngörülmektedir. Yoğun geçen konsolidasyon tedavisi, pediatrik ALL'de oldukça önemlidir. Tedavide kullanılan yüksek doz metotreksat (veya diğer ilaç kombinasyonları) ile B-hücreli ALL vakalarının yaklaşık %70-80'inde remisyon sağlanmaktadır (Pui ve ark., 2008).

MSS koruyucu tedavi; MSS relapslarını önleyebilmek için 1970'li yıllardan itibaren yüksek doz (2400cGy) kranial ve spinal ışın tedavileri uygulanmaktadır. Rapyoterapi sonrası hastalarda, yüksek oranda morbidite ve geç komplikasyonlar görülmektedir. Bu doğrultuda, standart ve orta risk grubuna dahil olan ALL hastalarının yoğun intratekal bölgesi radyoterapi yerine metotreksat ile tedavi edilmektedir. Radyoterapideki kranial ışınlama dozları 1800 ve 1200 cGy düzeyindedir. Günümüzde kullanılan genel protokollerdeki kranial ışınlama ile tedavi, MSS relapsı için yüksek risk oluşturan hastalar ile sınırlandırılmaktadır (Möricke ve ark., 2008; Smith ve Han, 2006).

Protokollerdeki son basamak genellikle idame tedavisidir. Tüm kanser türleri içerisinde uzun süreli idame tedavisi sadece ALL'de gerekmektedir. 24 ay veya daha kısa sürdürülen idame tedavisi, remisyon oranlarını olumlu şekilde etkilememektedir ve yapılan çalışmalar doğrultusunda, 3 yıl veya 3 yıldan uzun tutulan tedavi süreci de gereksiz görülmektedir. İdame tedavisinde genel prensip, belirlenen ve hastanın dahil olduğu risk gruplarına uygun olacak şekilde relapsı önlemektir. ALL'deki tüm hastalar

2-2,5 yıl tedavi almaktadır. Uzun süreli idame tedavi protokolünde yer alan ilaçlar ise hastaların günlük kullandıkları 6-merkaptopürin ve haftada bir alınan metotreksat'tır (Möricke ve ark., 2008; Pui ve Evans, 1998; Pui ve ark., 2004).

Tedaviye yanıt alınamayan pediatrik ALL vakalarında ve bazı özel durumlarda (%5-10 oranında) kemik iliği nakli (KİT) uygulanmaktadır. Hastalara allojenik, kemik iliği doku bilgi bankası aracılığıyla veya göbek kordonu kanı temin edilebilecek sağlıklı donörlerden KİT gerçekleştirilmektedir. Allojenik KİT, genellikle ilk indüksiyon tedavisine iyi yanıt vermeyen veya hematolojik relapstan sonra remisyon sağlanan hastalara uygulanmaktadır. Otolog KİT yöntemi, pediatrik lösemilerde etkin cevap sağlamadığından tercih edilmemektedir (Pui CH, Evans WE, 1998; Pieters R, Carroll WL, 2008). Ph pozitif ALL tedavisinde sağlıklı akraba veya kemik iliği doku bankasından uygun donörü bulunan hastalara allojenik KİT yapılmaktadır ve hastaların hem olaysız sağkalım hem de ortalama toplam sağkalım sürelerinde belirgin iyileşmeler görülmektedir. Diğer lösemilerde KİT'in sağladığı fayda hala tam olarak ispatlanamamıştır (Balduzzi ve ark., 2005).

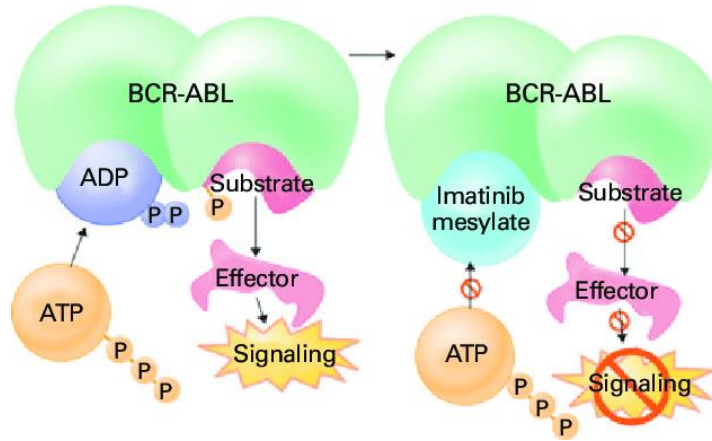
Klinik veriler değerlendirildiğinde yüksek lökosit sayısı, yüksek periferik blast sayısı, B-hücreli ALL de Ph kromozomu varlığı, L3 morfolojik yapı ve birden fazla indüksiyon ile remisyon tedavisinin görülmüş olması sağkalım oranlarını olumsuz etkileyen faktörler olarak belirtilmektedir. Standart riskli hastalarda uzun süreli sağkalım oranı %70 iken, yüksek riskli hastalarda bu oran %30 olarak belirlenmektedir.

Pediatrik vakalara uygulanan tedavilerden alınan yanıtlar ile olaysız sağkalımların oranı %85'lere ulaşmaktadır. Günümüze kadar yapılan kanser genom çalışmaları ve büyük ölçekli gerçekleştirilen entegre analizlerin iletilmesi sonucunda, ALL'nin yeni alt tipleri belirlenmiş ve ALL'de görülen genetik mekanizmalar hakkındaki bilgiler genişletilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmalar doğrultusunda önemli oranda fayda sağlayacak ilaç denemelerinin temelini oluşturan terapötik hedeflere ulaşılmaktadır.

Ph kromozomunun tedavi protokolleri ele alındığında, günümüze kadar erişkin Ph pozitif ALL vakalarında standart kemoterapi rejimleri ile ortalama sağkalım süresi

sadece 9 ay olarak belirtilmektedir. Bu hastalarda tek küratif tedavi yönteminin de allojenik kök hücre nakli olduğu kabul edilmektedir. Gelişen tedavi protokolleri sayesinde hedefe yönelik gerçekleştirilen tedaviler, olaysız ve ortalama sağkalım oranlarını yükseltmektedir (Gleissner ve ark., 2002).

Monoklonal antikor tedavileri sayesinde günümüze kadar uygulanmış geleneksel tedaviler ile karşılaşılan sınırlamalar aşılmaktadır. İmatinib ilk nesil TKI'dir ve *BCR/ABL1* onkoproteinini inhibe eden ticari bir ilaçtır (Golemevic ve ark, 2005). İmatib, ABL proteininin katalik bölgesine yani Adenozin trifosfatın (ATP) yerine bağlanarak *BCR/ABL1* otofosforilasyonunun ve substrat fosforilasyonunun inhibisyonunu gerçekleştirip, hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek, apoptozun indüklenmesi aracılığıyla translokasyon sonucu oluşan füzyon proteinini bloke etme mekanizması ile çalışmaktadır (Şekil 20) (Corbin ve ark., 2003).



Şekil 20: İmatinib'in *BCR-ABL1*'e etki mekanizması (Sholikah, 2017)

Tedavi sürecinde imatinibten istenilen etkinin sağlanamaması ve ilaca direnç gelişimi nedeni ile ikinci ve üçüncü nesil TKI'ler geliştirildi. İkinci nesil TKI, Dasatinib, Nilotinib ve Bosutinib'tir. Dasatinibin avantajları, ATP bağlanma bölgesine daha kuvvetli ve kolay bağlanması ve ABL kinazın hem inaktif hem de aktif formuna bağlanabilme yeteneğine sahip olmasıdır. Nilotinib *BCR/ABL1*'in sadece inaktif formuna bağlanmaktadır. Üçüncü nesil TKI'i olan Ponatinib bütün TKI'lere direnç geliştiren *T315I* mutasyonunu hedef alan bir ajandır. Hedef mekanizması olarak İmatinib'e benzerdir.

2.4.2 Philadelphia Kromozomu Pozitif Akut Lenfoblastik Lösemi Tedavisi

Pediyatrik Ph pozitif ALL'de, 3 yıllık olaysız sağkalım yaklaşık %25 idi. Bu hastalar yüksek risk sınıfında yer almaktadır. Klinik seyirleri kötü prognoz ile ilerlemektedir ancak geliştirilmiş tedavi protokolleri sayesinde (imatinib ve diğer ABL1 kinaz inhibitörlerinin eklenmesi ve kemik iliği nakli) sağkalım oranlarında artış görülmektedir. Ph pozitif ALL hastalarına uygulanan tedavi protokolleri yoğun kemoterapi, hedefe yönelik tirozin kinazların kullanımı ve KİT'tir. ABL TKI'nin gelişmesinden önce, Dünya genelinde Ph pozitif ALL'nin tedavisi konusunda ortak bir fikir birliği bulunmamaktaydı (Pui ve ark.,2015). Yapılan çalışmalar ışığında, pediyatrik vakaların tedavi protokollerine birinci nesil TKI'ü imatinibin eklenmesi ile %80 olaysız sağkalım oranları elde edilmektedir. İmanitib direnci görülen hastalarda geliştirilen diğer (ikinci ve üçüncü nesil) TKI'ler kullanılmaktadır. Ph pozitif hastalarda kullanılan TKI'ler, *BCR-ABL1* translokasyonunda *ABL1*'in tirozin kinaz aktive bölgesini hedeflemektedir (Fielding, 2010; .

Yüksek riskli kromozomal anomalilikleri olan pediyatrik vakalar, ister yüksek risk grubu isterse standart risk grubunda yer alsın günümüzde yoğun kemoterapi protokolleri ile tedavi edilmektedir. Yeni nesil tirozin kinazların (örneğin, imatinib, dasatinib, nilotinib vb.) tedavi protokollerine eklenmesi ile pediyatrik ve yetişkin ALL gruplarında gerçekleştirilen vaka çalışmaları, geleneksel kemoterapi ve kök hücre nakli ile elde edilen sonuçlara göre daha iyi tedavi cevabı sağladığı bulguları elde edilmektedir. Bu sayede KİT gerektiren vakaların sayısı azalmaktadır (Tasian ve ark., 2017).

2.4.3 Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi Tedavisi

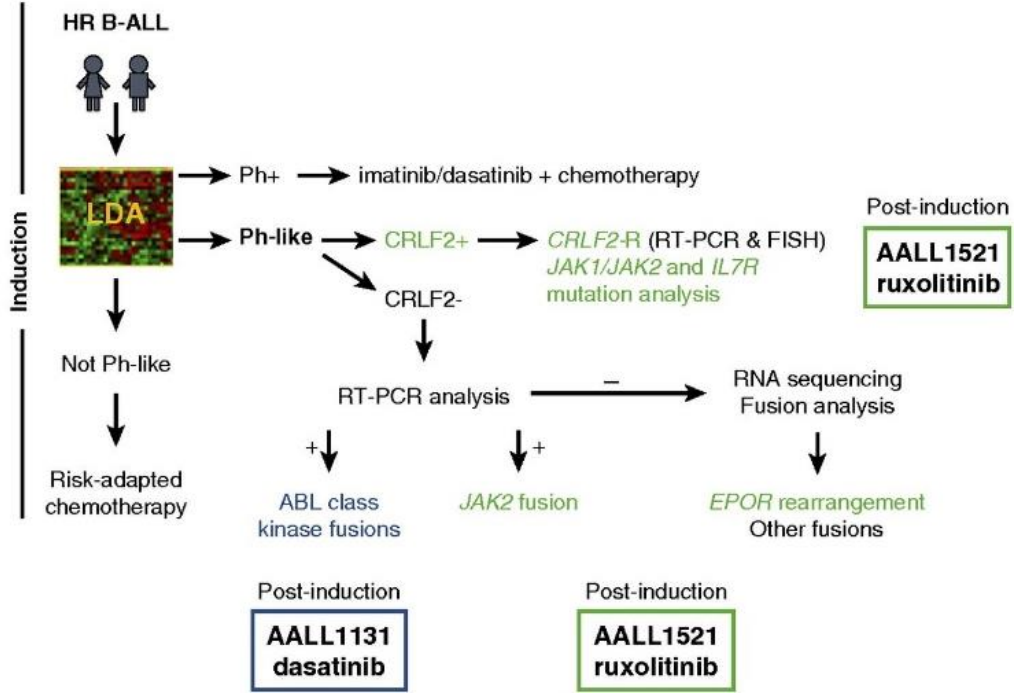
Pediyatrik lösemilerde risk grubuna bağlı olmakla beraber 5 yıllık olaysız sağkalım %80, genel sağkalım %85 oranlarındadır. Bu oranlar yüksek riskli hasta gruplarında oldukça düşüktür. Risk sınıflamasında yüksek risk grubunda yer almayan ancak yüksek riske benzer hatta çok yüksek riskli hastalar gibi kemoterapi yanıtı alınan Ph benzeri ALL grubunun sağkalım oranları çok düşüktür. Bu grubun aldığı etkin tedavi hala Dünya genelinde net değildir ve bu grup çok heterojendir. Tedavi algoritmalarında tam olarak nerede oldukları bilinmemektedir. Potansiyel tedavilerle

doğru hastaları eşleştirmek için, Ph benzeri alt grubunun dahi sınıflandırılmaya ihtiyaı vardır (Roganovic, 2012; Wells ve ark., 2017).

Ph benzeri hastalara uygulanan risk odaklı terapi (yoğun kemoterapi protokolleri ve allojenik kemik iliği nakli) olumsuz prognostik durumu ortadan kaldırabilmektedir. Ching-Hon Pui ve ark.'larının 2015 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, transplantasyona gerek kalmadan hastaların büyük çoğunluğunda *ABL* kinaz inhibitörleri ve potansiyel olarak *JAK* inhibitörleri ile inhibe edilmeye uygun genomik değişikliklerin olduğu belirtilmektedir (Pui ve ark., 2015).

Yapılan alışmalar ışığında, *BCR-JAK2* translokasyonuna sahip ksenograft fare modellerine uygulanan, *JAK2* inhibitörü olan Ruxolitinib'in tümör oluşumunu azalttığı gösterilmektedir. Aynı zamanda *CRLF2*'nin yeniden düzenlendiği ve *JAK2* mutasyonlu lösemik hücrelerin in vitro tedavisinde umut verici sonuçlar elde edilmektedir (Woo ve ark., 2014).

Tedavi sürecinde ALL hastalarına uygulanan ilk protokol indüksiyon tedavisidir. Genetik değişimlerine göre tedaviye eklenecek ilaçların belirlenmesi ve uygulanması gereken basamak konsolidasyon tedavi basamağıdır. Bu basamağa kadar Ph benzeri ALL'li hastaların teşhis edilmesi gerekmektedir. Ph benzeri alt grubunun ayırıcı tanısının gerçekleştirilip, sağkalım oranlarının arttırılması için klasik tedaviye hedefe yönelik yeni ilaçların eklenmesi gerekmektedir (şekil 21) (Roberts ve ark., 2014; Tasian ve ark., 2017).



Şekil 21: Çocuk Onkoloji Grubu tarafından kullanılan Güncel Ph-benzeri ALL genetik test algoritması (Roberts ve ark., 2014; Tasian ve ark., 2017).

Ph benzeri ALL tanısı almış vakalarda saptanan mutasyona göre tedaviye Tablo 3'deki ilaçların eklenmesinin yaşam sürelerine olumlu etkisi olduğu bildirilmektedir. Bunların yanı sıra tedaviye eklenebilecek yeni ilaçlarla ilgili çalışmalar da devam etmektedir (Roberts ve ark., 2014; Tasian ve ark., 2017).

Tablo 3: Ph benzeri ALL’de Tanımlanan Kinaz Füzyonları ve İnhibitörleri.

Kinaz Geni	Tirozin İnhibitörü	Kinaz	Füzyon Partnerleri	Hasta	5' Genler
<i>ABL1</i>	Dasatinib		6	14	<i>ETV6, NUP214, RCSD1, RANBP2, SNX2, ZMIZ1</i>
<i>ABL2</i>	Dasatinib		3	7	<i>PAG1, RCSD1, ZC3HAV1</i>
<i>CSF1R</i>	Dasatinib		1	4	<i>SSBP2</i>
<i>PDGFRB</i>	Dasatinib		4	11	<i>EBF1, SSBP2, TNIP1, ZEB2</i>
<i>CRLF2</i>	<i>JAK2</i> inhibitörü		2	30	<i>IGH, P2RY8</i>
<i>JAK2</i>	<i>JAK2</i> inhibitörü		10	19	<i>ATF7IP, BCR, EBF1, ETV6, PAX5, PPFIBP1, SSBP2, STRN3, TERF2, TPR</i>
<i>EPOR</i>	<i>JAK2</i> inhibitörü		2	9	<i>IGH, IGK</i>
<i>DGKH</i>	Bilinmiyor		1	1	<i>ZFAND3</i>
<i>IL2RB</i>	<i>JAK1</i> inhibitörü, <i>JAK3</i> inhibitörü ya da ikisi birden		1	1	<i>MYH9</i>
<i>NTRK3</i>	Krizotinib		1	1	<i>ETV6</i>
<i>PTK2B</i>	<i>FAK</i> inhibitörü		2	1	<i>KDM6A, STAG2</i>
<i>TSLP</i>	<i>JAK2</i> inhibitörü		1	1	<i>IQGAP2</i>
<i>TYK2</i>	<i>TYK2</i> inhibitörü		1	1	<i>MYB</i>

Ph benzeri ALL vakalarına genel tedavi protokollerinin yanında TKI’lerinin eklenmesi, kötü prognoz ve düşük sağkalım oranlarını iyi prognoz ve yüksek sağkalım oranlarına dönüştürmektedir. Relaps görülen pediatrik ve yetişkin ALL’de en önemli prognostik faktör, tedavi protokolündeki ilk remisyon süresidir. Pediatrik vakalarda görülen *CDKN2A/2B* delesyonları yapılan çalışmalar doğrultusunda erken relaps ile ilişkilendirilmektedir. Relaps odaklı spesifik genetik değişiklikleri inceleyen ilk kapsamlı çalışma, *CREBBP*’de tekrarlayan mutasyonları tanımlamaktadır. *CREBBP* mutasyonları genellikle *CREBBP*’nin histon asetiltransferaz etki alanı içinde meydana gelmektedir, özellikle relaps sırasında histon deasetilaz inhibitörleri ile tedaviye cevap verilebilmektedir. Tanımlanan diğer mutasyonlar, yeni klonlarda ortaya çıkan *RAS* ve

PRPS1 mutasyonlarıdır. Özellikle *NT5C2* mutasyonlarının kemoterapiye bir cevap olarak ortaya çıktığı tarif edilmektedir. Erken relapsta *CDKN2A/B* ve *PTPRD* değişimleri, geç relaps hastalarında ise daha fazla *IKZF1* değişikliği görülmektedir. Ph benzeri alt grup ile ilişkili *ZNF483* (n=3;Ph benzeri alt tip) mutasyonları yeni tanımlanmıştır ve sadece bir *IKZF1* mutasyonu sonucu gerçekleşmektedir (Harrison, 2013).

B-hücreli ALL hastalarında relapsın görülmesi morbidite ve mortalitenin önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. TKI tedavisinin tüm Ph pozitif hastalar için etkili olduğuna dair kanıtlara dayanarak, Ph benzeri ALL olarak tanımlanan ve Ph pozitif hasta grubuna benzer yeniden düzenlemelere sahip olan hastaların TKI tedavisine cevap vermesi muhtemel görülmektedir (Tablo 4).

Tablo 4: Ph benzeri ALL grubundaki genetik değişimler ve potansiyel ilaç hedefleri (Harrison, 2013)

Değişim	Gen(ler)	İlaç	İşlevi
Ph benzeri ALL			
<i>ABL1</i> füzyonları	<i>NUP214-ABL1</i> , diğer <i>ABL1</i> füzyonları	İmatinib ve türevleri	TKI
<i>PDGFRB</i> füzyonları	<i>EBDF1-PDGFRB</i> , diğer <i>PDGFRB</i> füzyonları	İmatinib ve türevleri	TKI
<i>CRLF2</i> yeniden düzenlenmeleri	<i>CRLF2</i> , <i>JAK2</i>	Ruxolitinib	JAK İnhibitörü
<i>IGH@-EPOR</i>	<i>EPOR</i>	Ruxolitinib	JAK İnhibitörü

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)
- Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Danimarka)
- Plate Santrifüj (Thermo, ABD)
- Isıtıcı blok (DB-2A) (Techne, İngiltere)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- -80°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -80°C derin dondurucu (Nüve, Türkiye)
- -20°C derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- -20°C derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- +4°C Buzdolabı (Samsung, Türkiye)
- UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD)
- Yatay Elektforez (Biorad, Kaliforniya, ABD)
- UV Görüntüleme Cihazı (Vilber Lourmat, Almanya)
- PCR UV Kabini (Biosan, Latvia)
- Light Cycler (LC) 480 II (Roche, İsviçre)

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler

- Trizol (HibriGen, Türkiye)
- Kloroform (Sigma Aldrich, ABD)
- İzopropil Alkol (Sigma Aldrich, ABD)
- Etanol (Sigma Aldrich, ABD)
- LightCycler® EvoScript RNA Probes Master Mix 1000 reaksiyon (Roche, İsviçre)
- RealTime ready Custom Panel 384-96 (Roche, İsviçre)

3.2 Hasta Grubu ve Klinik Özellikler

Mevcut tez çalışmasına; yeni B-ALL tanılı, radyoterapi ve kemoterapi almamış, laboratuvar bulguları ve genetik-sitogenetik testleri gerçekleştirilmiş, gönüllü olur formu ile bilgilendirilerek onayları alınmış 22 Ph kromozomu negatif hasta dahil edildi. Bunun yanında kontrol olarak sağlıklı olur formu onayı alınmış 1 Ph kromozomu pozitif hasta çalışmaya dahil edildi.

3.2.1 Etik Kurul

Hastaların projeye dahil edilebilmesi için gerekli olan etik kurul onayı, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20.02.2018 tarihli ve 2018-4/11 nolu kararı ile alındı.

3.2.2 Hastaların Klinik Özellikleri

Mevcut tez çalışma grubuna dahil edilen vakaların klinik özellikleri Tablo 5'te belirtildi.

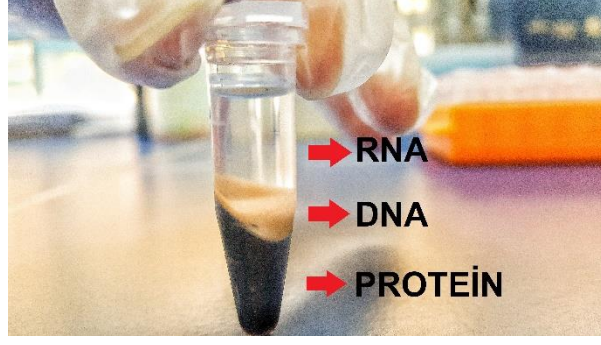
Tablo 5: Mevcut Çalışmaya Dahil Edilen Pediatrik Vakaların Klinik Verileri

Lökosit Sayısı	Hasta Sayısı
<10.000	16
10.000-49.999	6
>50.000	1
Hemoglobin	
<7.0	3
7.0-11.0	15
>11	5
Trombosit	
<20.000	0
20.000- 99.999	19
>100.000	4
Prognostik Değerler	
Yaş	Ortalama 6 yıl 42 ay
Boy	128 cm
Kilo	24,99 kg
Cinsiyet	
Kız	13
Erkek	10

3.3 Yöntem

3.3.1 Kemik İliğinden Total RNA İzolasyonu

Tanı amacıyla alınan kemik iliği materyalinden arta kalan EDTA'lı tüp içerisindeki materyal -80°C'de saklanır. Tanının belirlenmesini takiben -80°C'de saklanan materyal ebeveyninden hastanın bilgilendirilmiş olur formu onayı alındıktan sonra projeye dahil edildi. -80°C'de bekleyen kemik iliğinden total RNA izolasyonu yapıldı. Kontrol ve hasta materyalleri olarak tanımlanan kemik iliği örnekleri için birer ependorf tüp hazırlandı ve Trizol (HibriGen) protokolü ile izolasyon gerçekleştirildi. Trizol reaktifi, RNA izolasyonunun tek adımda yapılmasına olanak sağlayan fenol ve guanidyum izotiyosiyanatın tek fazlı bir çözeltisidir. Örneklerden 300 µl materyal ependorfa aktarıldı. Materyal üzerine 1000 µl Trizol reaktifi eklenerek maksimum hızda 15 saniye vorteks işlemi uygulandı. Oda ısısında 2-3 dakika inkübe edilen örnek üzerine 200 µl kloroform reaktifi eklendi ve tekrar maksimum hız seviyesinde homojen olana kadar vorteks işlemi uygulandı. +4°C'ye alınan mikrosantrifüj cihazında örnekler 12000 rpm hız ile 15 dakika santrifüj edildi. Kloroform ilavesinden sonra yapılan santrifüj işlemi ile birlikte solüsyon organik ve sulu faz olmak üzere iki faza ayrılır ve üst kısım RNA fazı, ara kısım DNA ve en alt faz protein olarak tanımlanmaktadır (Şekil 21). Total RNA izolasyonunun gerçekleşebilmesi için, her hastanın RNA içeren fazı temiz ependorflara aktarıldı. Sulu fazın transferinden sonra RNA, izopropil alkol ile çöktürülerek geri kazanılır. RNA materyali üzerine 500 µl izopropil alkol eklenerek hafif çalkalama işlemi yapıldı ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Örnekler 12000 rpm hız ile 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Oluşan RNA pelletine çok yaklaşılmamasına dikkat edilerek süpernatant kısmı atıldı. Pellet üzerine 1000 µl soğuk %75'lik etanol eklenerek yıkama işlemi başlatıldı. Yavaşça alt üst edilen tüpler 7500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Etanol ile yıkama basamakları 2 defa tekrarlandı. Etanolün uçurulmasını takiben pellet 100 µl RNaz içermeyen su ile çözüldü.



Şekil 21: Trizol ile İzolasyon Sırasında Elde Edilen Fazlar

Elde edilen total RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesinde 230, 260 ve 280 nm'deki dalga boylarında yapılan ölçümleri ve bu dalga boylarından elde edilen değerlerin birbirlerine olan oranları kullanıldı. RNA'ların konsantrasyon hesaplanması 260 nm'deki absorbansa dayanmaktadır ve saflıkları değerlendirilirken A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları esas alınmaktadır. RNA saflığının düşük olması protein kontaminasyonunun göstergesidir (Okamoto ve Okabe, 2000)

Mevcut tez çalışmasında izole edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi, UV-Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD) cihazı kullanılarak ölçüldü (Tablo 5) ve kullanılan panel protokolünde önerilen A_{260}/A_{280} oranının 1.8-2.0 aralığında olması göz önüne alınarak örnekler -80°C 'de muhafaza edildi.

Tablo 6: UV-Vis Spektrofotometre Cihazı ile Vakalara Ait Materyallerden Elde Edilen RNA Miktarları ve Kaliteleri

	OD1	CON1	OD2	CON2	OD3	CON3	OD4	CON4
HASTA 1	1,83	65	1,95	99	1,72	224	1,75	294
HASTA 2	1,98	346	1,93	413				
HASTA 3	1,93	32	1,98	203	1,63	484	1,85	527
HASTA 4	1,96	646	1,96	603				
HASTA 5	2,01	549	1,99	435				
HASTA 6	1,85	71	1,92	62	1,64	169	1,7	66
HASTA 7	1,83	37	1,7	178	1,68	240		
HASTA 8	1,91	486	1,87	738				
HASTA 9	1,82	181	1,59	148				
HASTA 10	1,92	311	1,72	551	1,74	571		
HASTA 11	1,9	598	1,92	166				
HASTA 12	1,9	578	1,86	523				
HASTA 13	1,83	574	1,81	782				
HASTA 14	1,72	29	1,95	94	1,7	195	1,67	237
HASTA 15	1,84	446	1,83	652				
HASTA 16	1,84	499	1,94	155				
HASTA 17	1,7	184	1,84	73				
HASTA 18	1,81	174	1,86	160	1,76	179		
HASTA 19	1,87	586	1,76	82				
HASTA 20	1,78	240	1,9	210				
HASTA 21	1,87	173	1,95	218	1,85	196	1,93	542
HASTA 22	1,93	128	1,9	210				
KONTROL 1	1,94	236	1,95	432				

3.3.2 RT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

Elde edilen total RNA materyalinden LightCycler® EvoScript RNA Probes Master mix protokolü ile gen ekspresyon testleri için yüksek özgülük ve yüksek hassasiyet sağlayan tek basamakta RT-PCR analizi gerçekleştirildi. Kit içeriğinde “*Vial 1*” ve “*Vial 2*” olarak tanımlanmış iki tüp bulunmaktadır. *Vial 1*; reaksiyon için gerekli tampon (buffer), enzim, dATP, dCTP, dGTP, dUTP ve Mg(OAc)₂'yi içermektedir. *Vial 2* ise su içermektedir. 384 kuyuluk plate protokolünde belirtilen son hacim miktarı, kuyu başına 10 µl olarak belirlendi. Bir reaksiyon için gerekli olan sarf malzemelerin miktarı ve analiz için kullanılacak program Tablo 7 ve Tablo 8’de belirtildi. Hazırlanan karışım, genlerin oligonükleotidlerinin implante edildiği custom panel üzerine yüklendi.

Tablo 7: RT-PCR Reaksiyonu İçin Oluşturulan Reaksiyon Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	
Primer	0,5 µl
Prob	0,5 µl
Vial 1 “Probes Master”	2 µl
Vial 2 “Water”	4,5 µl
RNA örneği	2,5 µl
Toplam:	10 µl

Reaksiyona dahil edilen RNA örneği amplifikasyon basamağından önce cDNA'ya dönüşmektedir.

Tablo 8: mRNA Ekspresyon Analizi İçin Kullanılan RT-PCR Programı

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ters (Revers)Transkripsiyon	60	15 dk	1
Pre-İnkübasyon	95	10 dk	1
Amplifikasyon	95	15 sn	45
	58	30 sn	
Soğuma	40	30 sn	1

Mevcut çalışmada, B-hücreli Ph benzeri ALL grubunun tanı sürecinde önemli görülen mRNA'ların değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda yapılan literatür araştırmaları ile mRNA'lar belirlendi. Belirlenen 96 farklı genin kontrol ve hasta grubu arasında gen düzeyinde ifade farklılıkları değerlendirildi. Kontrol materyali 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Çalışmada ayırıcı tanıyı oluşturmak amacıyla belirlediğimiz genler için dizayn edilen ve her biri 384 kuyudan oluşan panel (RealTime ready Custom Panel 384-96/Roche), 4 farklı örneğin değerlendirilmesine uygun olarak düzenlendi. Panel üzerinde, 4 ayrı örnek için 93 gen ve 3 housekeeping gen (*GAPDH*, *G6PD*, *ACTB*) ve yer almaktadır (Tablo 9).

RealTime ready Custom Panelleri, 96 ve 384 kuyucuk seçeneklerine sahip insan, fare ve sıçan türlerine özel gen hedefleri için kullanıma hazır haldeki test platformlarıdır. Her kuyucukta hedefli gen için planlanmış primer implante haldedir. Reaksiyon için gerekli diğer reaktiflerin hazırlanması ve kuyucuklara yüklenmesinin ardından paneller RT-PCR analizi için cihaza yerleştirilir.

Göreceli miktar tayin analizi, bir örnekteki iki farklı hedef genin ifadelerini karşılaştırır. Karşılaştırma sonucu elde edilen değer bu hedef genlerin oranıdır. Karşılaştırma yapılırken tercih edilen ikinci gen referans gen olarak seçilmektedir. Bu gen tüm test koşulları altında sabit kopya sayılarına sahip olan referans genidir. Endojen kontrol olarak da bilinen referans gen çalışılan örnekler arasındaki farklılıkların normalleştirilmesine temel oluşturmaktadır. LightCycler® 480 Software 1.5, göreceli miktar tayin analizi yaparken, her amplifikasyon eğrisinin döngü eşik değerini (Ct) belirleyerek her örnek için örnek/referans oranlarını otomatik olarak hesaplamaktadır. RealTime Ready Custom Paneli (384 kuyulu) için birden fazla farklı referans genin kullanılması gerekmektedir. Referans gen sayısı belirlenirken istatistiksel anlamlılıkta minimum sayı üç olduğu için, paneli tasarlanırken en az üç adet referans genin seçilmesi zorunludur. Çalışmamızda ham verilerden elde edilen Ct değerleri referans genler ile normalize edildi.

$$\text{Normalize Oran: } \left(\frac{\text{Hedef konsantrasyonu}}{\text{Referans konsantrasyonu}} \right)_{\text{Örnek}} : \left(\frac{\text{Hedef Konsantrasyonu}}{\text{Referans Konsantrasyonu}} \right)_{\text{Kontrol Gen}}$$

Eşik değer (Threshold cycle) olarak tanımlanan Ct değeri, floresan ışımda (ΔR_n) artışın başladığı ilk siklusu ifade eder. $R_n(+)$, yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu, $R_n(-)$ ise negatif kontrolün ve reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerin floresan emisyonu olarak tanımlanmaktadır. ΔR_n , $R_n(+)$ ve $R_n(-)$ arasındaki fark olup, Ct değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir. RT-PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen veriler, web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programı kullanılarak $2^{-\Delta CT}$ metodu ile değerlendirildi.

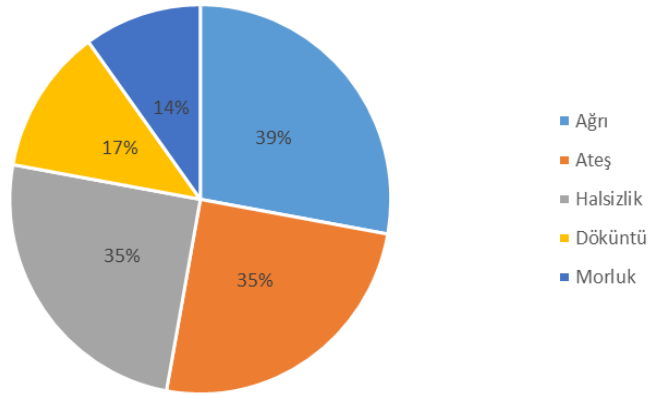
3.3.3 İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler ve hastaların klinik özellikleri Bağımsız T testi (parametrik, non-parametrik) ve Chi-Square testleri kullanılarak karşılaştırıldı. Elde edilen kantitatif sonuçlara göre tüm istatistiksel analizler için SPSS 25.0 ve GraphPad Prism 8.1 (ABD) programları kullanıldı. mRNA ekspresyon seviyeleri ve kat değişimleri, web tabanlı “Data Analysis Center-QIAGEN” platformundan yararlanılarak analizlendi. Tüm analizler %95 güven aralığında (%95 CI) gerçekleştirildi ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

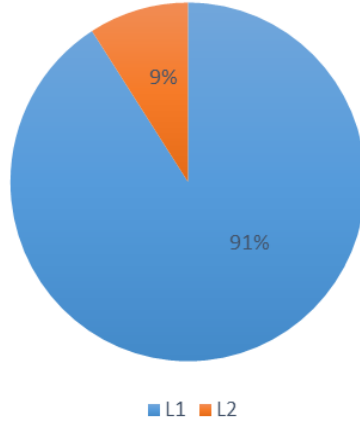
4. BULGULAR

4.1 Klinik Parametrelerin Değerlendirilmesi

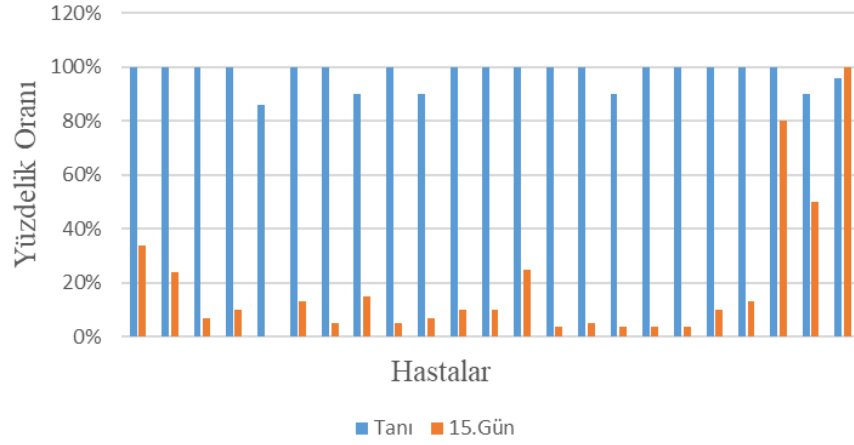
Mevcut tez çalışmasına, 2018-2019 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Çocuk Hematoloji AD'na başvuran 18 yaş altı pediatrik grup olarak tanımlanan prekürsör B-hücreli ALL tanısı almış ve tedavi süreci başlamamış toplam 23 vakanın kemik iliği materyali çalışmaya dahil edildi. Hasta profilindeki klinik bulguların dağılımları incelendiğinde; pediatrik vakaların yaş aralığı 2-17 arasında olup, ortalama yaş 6 yıl 5 ay olarak belirlendi. Çalışmamıza dahil edilen vakaların 13'ü kız (%56), 10'u erkek (%43) çocuktur. Vakaların hastaneye başvuru şikayetlerine ilişkin klinik bulgulara ait oranlar Şekil 22'de belirtildi. Vakalar ile ilgili diğer klinik özellikler ve laboratuvar bulguları Tablo 5, Şekil 23 ve Şekil 24'de gösterildi. Vakalar, klinik verilerine göre ALL IC-BFM 2009 protokolünde yer alan sınıflandırma kriterleri baz alınarak değerlendirildi ve çalışmaya dahil edilen vakaların %48'i standart, %35'i orta ve %17'si yüksek risk grubu olarak sınıflandırıldı (Şekil 25).



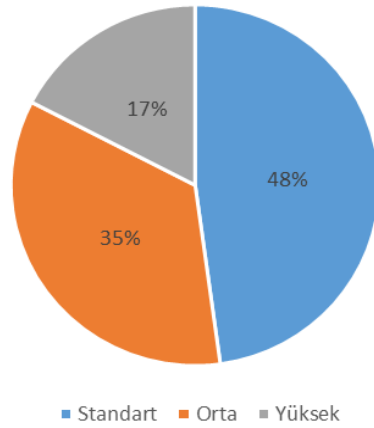
Şekil 22: Vakaların Hastaneye İlk Başvuru Bulguları ve Yüzdeleri



Şekil 23: Vakaların FAB Sınıflandırmasına Göre Yüzde Oranları



Şekil 24: Vakaların Tanı ve 15. Gün Blast Oranları



Şekil 25: Vakaların Klinik Verilerine Göre ALL IC-BFM 2009 Protokolünde Yer Alan Risk Sınıflandırması (Vakaların tanı yaşı, tanı anındaki WBC değerinin 20.000 mm³'ten düşük veya yüksek)

olması, 15. ve 33. gün blast oranları, kromozomal translokasyon gibi parametreler değerlendirilerek “ALL IC-BFM 2009” protokolünde verilen risk sınıflandırılması (ALLIC_BFM_2009.pdf)).

Tanı materyalindeki ortalama WBC değerleri 10,72 K/ μ L, HGB değerleri 11,1 g/dL ve PLT değerleri 113,3 K/ μ L olarak belirlendi.

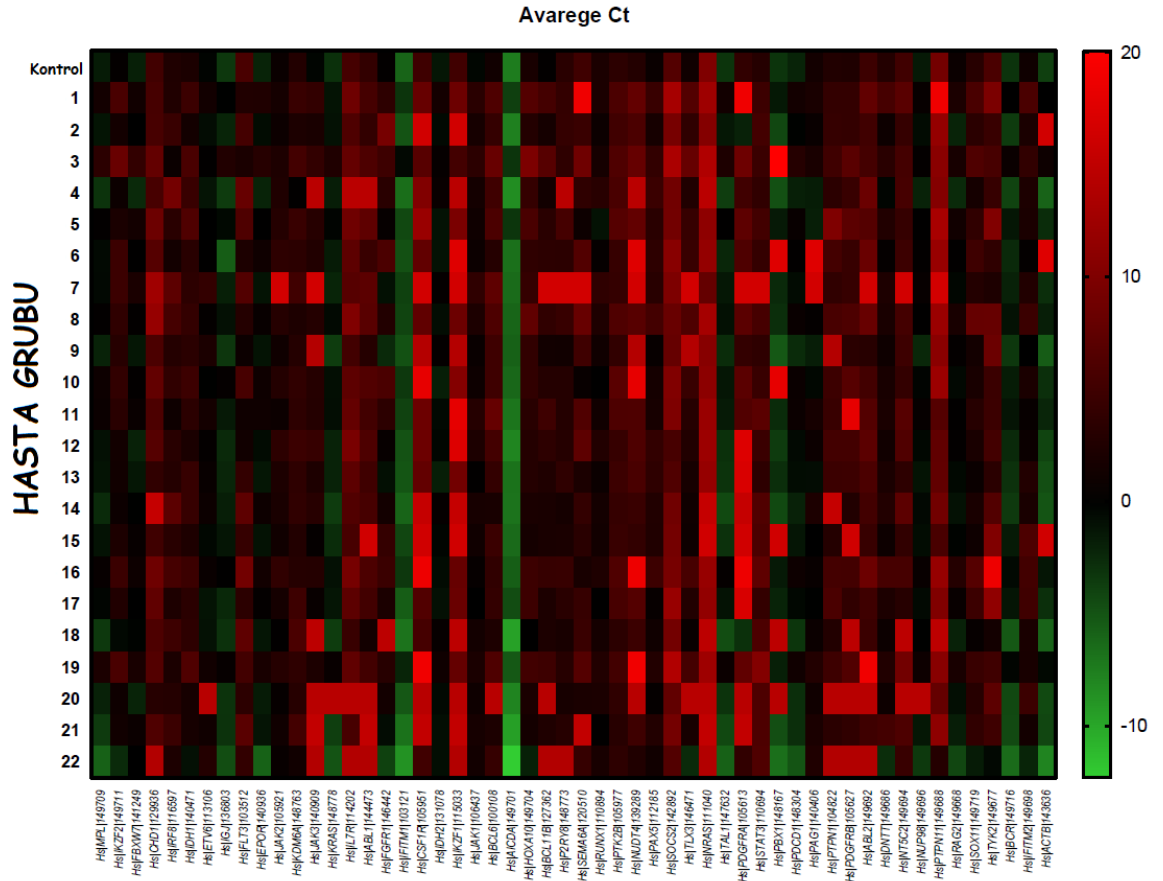
4.2. Mevcut Tez Çalışmasına Dahil Edilen Vakaların Ekspresyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Ph benzeri ALL'nin tanısal ayrımının yapılabilmesi amacıyla önemli görülen genlerin implante edildiği custom paneller dizayn edilerek, 23 prekürsör B-hücreli ALL'de 96 farklı genin ekspresyon analizi Real-Time PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Ph negatif vakaların belirlenen genlere ait ekspresyon seviyeleri ile Ph pozitif kontrol vakaların ekspresyon seviyeleri web tabanlı “Data Analysis Center–QIAGEN” platformu, SPSS 25.0 ve GraphPad Prism 8 programları ile karşılaştırıldı ve istatistikî değerler analiz edildi. Kullanılan testler istatistiksel parametreler ışığında veri türüne göre seçildi. Uygulanan istatistiksel analiz testleri; Pearson Chi-Square, Kruskal-Wallis H, ANOVA, Mann-Whitney U, Fisher's Exact ve Bağımsız T Testi'dir.

Mevcut tez çalışmasının hipotezine uygun ilk analiz basamağımız, kontrol örnek ile hasta grubu arasındaki benzerlik oranının belirlenmesidir. RT-qPCR yöntemi ile analiz edilen 96 gen içerisinde hasta ve kontrol örneğine ait elde edilen gen ekspresyon analiz değerleri incelenerek, hasta ve kontrol örneğinde ifadesi olmadığı için analiz edilemeyecek olan 41 gen sonraki analizlere dahil edilmedi. Ekspresyonu belirlenen 55 genin ekspresyon verileri web tabanlı Data Analysis Center–QIAGEN platformu (Student's T testi) kullanılarak değerlendirildi (Tablo 10) (Şekil 26).

Tablo 10: Kontrol ve Hasta Materyallerinde mRNA Ekspresyon Verilerinin Karşılaştırılması (p değeri sütünü *p<0,05; kat değişim sütünü “+” değerler yüksek ekspresye, “-” değerler düşük ekspresye olan genlerdir. Referans gen olarak GAPDH seçilmiştir.)

Genler	Kontrol	Hasta Grubu				
	2 ^{-Δ(-Avg.(Delta(Ct))}	2 ^{-Δ(-Avg.(Delta(Ct))}	Kat Değişimleri	95% CI	p Değeri	Kat Regülasyonu
Hs MPL 149709	3,109	1,803	0,580	(0,08, 1,08)	0,787	-1,725
Hs IKZF2 149711	0,833	0,157	0,189	(0,01, 0,37)	0,579	-5,304
Hs FBXW7 141249	3,655	0,874	0,239	(0,12, 0,36)	0,015*	-4,182
Hs CHD1 129936	0,029	0,005	0,181	(0,00001, 0,46)	0,234	-5,513
Hs IRF8 116597	0,187	0,076	0,406	(0,14, 0,67)	0,653	-2,463
Hs IDH1 140471	0,233	0,089	0,383	(0,17, 0,59)	0,882	-2,615
Hs ETV6 113106	1,2	0,432	0,360	(0,02, 0,70)	0,429	-2,779
Hs IGJ 136803	10,079	3,551	0,352	(0,11, 0,59)	0,618	-2,839
Hs FLT3 103512	0,019	0,045	2,286	(0,48, 4,10)	0,282	2,286
Hs EPOR 140936	4,326	1,157	0,267	(0,09, 0,44)	0,960	-3,740
Hs JAK2 105921	0,581	0,166	0,286	(0,00001, 0,81)	0,006*	-3,503
Hs KDM6A 148763	0,163	0,086	0,528	(0,00001, 1,37)	0,341	-1,894
Hs JAK3 140909	1,236	0,011	0,009	(0,00001, 0,02)	0*	-110,859
Hs KRAS 148778	7,516	1,976	0,263	(0,00001, 0,56)	0,659	-3,803
Hs IL7R 114202	0,023	0,003	0,140	(0,00001, 0,29)	0,022*	-7,150
Hs ABL1 144473	0,067	0,006	0,085	(0,00001, 0,22)	0,348	-11,751
Hs FGFR1 146442	0,86	0,143	0,167	(0,00001, 0,38)	0,831	-6,005
Hs IFITM1 103121	64,296	26,547	0,413	(0,16, 0,66)	0,843	-2,422
Hs CSF1R 105951	0,034	0,000	0,009	(0,00001, 0,02)	0*	-116,970
Hs IDH2 131078	2,508	1,246	0,497	(0,35, 0,64)	0,055	-2,012
Hs IKZF1 115033	0,031	0,000	0,005	(0,00001, 0,01)	0*	-210,596
Hs JAK1 106437	1,322	0,328	0,248	(0,09, 0,41)	0*	-4,037
Hs BCL6 100108	0,408	0,027	0,065	(0,01, 0,12)	0*	-15,411
Hs AICDA 149701	174,853	106,119	0,607	(0,00001, 1,26)	0,774	-1,648
Hs HOXA10 149704	0,27	0,081	0,299	(0,00001, 0,66)	0,978	-3,349
Hs BCL11B 127362	0,886	0,037	0,042	(0,00001, 0,10)	0*	-23,953
Hs P2RY8 148773	0,107	0,038	0,354	(0,00001, 0,86)	0,870	-2,822
Hs SEMA6A 120510	0,032	0,015	0,442	(0,00001, 1,20)	0,507	-2,260
Hs RUNX1 110894	0,237	0,358	1,509	(0,03, 2,99)	0,505	1,509
Hs PTK2B 105977	0,092	0,033	0,357	(0,20, 0,51)	0,016*	-2,799
Hs NUDT4 139289	0,154	0,001	0,008	(0,00001, 0,02)	0*	-128,796
Hs PAX5 112185	0,581	0,154	0,266	(0,01, 0,52)	0,011*	-3,762
Hs SOCS2 142892	0,011	0,001	0,131	(0,00001, 0,30)	0,004*	-7,627
Hs TLX3 146471	0,426	0,034	0,079	(0,00001, 0,19)	0,954	-12,601
Hs NRAS 111040	0	0,000	0,160	(0,00, 0,32)	0,201	-6,259
Hs TAL1 147632	9,021	3,871	0,429	(0,15, 0,71)	0,979	-2,330
Hs PDGFRA 105613	0,07	0,001	0,012	(0,00001, 0,04)	0,662	-82,963
Hs STAT3 110694	0,134	0,016	0,122	(0,00001, 0,31)	0*	-8,178
Hs PBX1 148167	8,979	0,218	0,024	(0,00001, 0,09)	0,774	-41,208
Hs PDCD1 148304	4,346	1,587	0,365	(0,06, 0,67)	0,814	-2,740
Hs PAG1 140406	0,371	0,230	0,619	(0,00001, 1,75)	0,529	-1,616
Hs PTPN1 104822	0,169	0,011	0,067	(0,00001, 0,16)	0*	-15,032
Hs PDGFRB 105627	0,192	0,007	0,034	(0,00001, 0,08)	0*	-29,468
Hs ABL2 149692	0,038	0,004	0,112	(0,00001, 0,34)	0*	-8,893
Hs DNMT1 149686	0,149	0,260	1,741	(0,00001, 4,97)	0,654	1,741
Hs NT5C2 149694	0,03	0,010	0,332	(0,00001, 0,82)	0,744	-3,015
Hs NUP98 149696	2,834	0,873	0,308	(0,00001, 0,62)	0,479	-3,246
Hs PTPN11 149688	0,001	0,001	0,328	(0,00001, 0,72)	0,707	-3,046
Hs RAG2 149668	0,565	1,112	1,967	(0,42, 3,52)	0,472	1,967
Hs SOX11 149719	0,125	0,114	0,908	(0,00001, 1,82)	0,639	-1,101
Hs TYK2 149677	0,017	0,013	0,718	(0,00001, 1,88)	0,623	-1,393
Hs BCR 149716	8,359	5,348	0,640	(0,14, 1,13)	0,804	-1,563
Hs IFITM2 149698	0,462	0,179	0,387	(0,00001, 0,88)	0,805	-2,583



Şekil 26: Hasta ve Kontrolde Değerlendirilen mRNA'ların Isı Analiz Haritası (HeapMap)

Ph benzeri grubun tanımlanması için; Ph negatif ve Ph pozitif vakaların mRNA ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında, Ph benzeri grubun Ph pozitif grup ile benzer ekspresyon profili göstermesi beklenmektedir. Bu nedenle istatistiksel analizlerde fark vardır tanımlaması ile anlamlılık ifade eden H_0 hipotezi çalışma grubumuzda anlamlılık ifade etmemektedir. Mevcut tez çalışmasında istatistiksel anlamlılığı; “fark yoktur” hipotezi doğrulamaktadır. Çalışmamızda analiz edilen hastalarda 55 gene ait mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirildi ve 37 genin Ph pozitif kontrol örneği ile benzer ekspresyon düzeylerine sahip olduğu belirlendi.

Tablo 11: Her Bir Hasta Grubunun Ph Pozitif Kontrol Örneğine Göre Benzerlik Oranları (Kat regülasyon verilerine göre benzerlik oranları belirlendi.)

Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13	Hasta 14	Hasta 15	Hasta 16	Hasta 17	Hasta 18	Hasta 19	Hasta 20	Hasta 21	Hasta 22
CHDI	MPL	ETV6	IKZF2	IRF8	IRF8	FLT3	ETV6	MPL	ETV6	CHDI	MPL	MPL	MPL	MPL	ETV6	IRF8	IKZF2	IRF8	MPL	IDH1	IRF8
IRF8	CHDI	IKZF1	FBNW7	ETV6	IRF8	EPOR	KDM6A	FBNW7	FLT3	JAK2	FBNW7	FBNW7	IKZF2	CHDI	KDM6A	IRF8	CHDI	FLT3	IRF8	IKZF2	JAK2
JAK2	DBH1	RUNX1	CHDI	FLT3	KDM6A	KRAS	IDH2	CHDI	IDH2	KDM6A	IRF8	IRF8	KRAS	IRF8	IDH2	JAK2	ETV6	P2R8	FBNW7	EPOR	CSF1R
P2R8	ETV6	P2R8	ETV6	FGFR1	ABL1	AICDA	RUNX1	IRF8	P2R8	IDH2	IDH1	ETV6	EPOR	IRF8	JAK1	IRF8	IGJ	RUNX1	IRF8	JAK2	SEM6A
RUNX1	FLT3	PAGI	IGJ	IDH2	IDH2	PTK2B	PBX1	IGJ	PAX5	AICDA	ETV6	EPOR	IFITM1	ETV6	RUNX1	JAK3	EPOR	DNTT	IDH1	KRAS	RUNX1
PAGI	JAK2	ABL2	EPOR	DNTT	AICDA	PBX1	DNTT	EPOR	ABL2	P2R8	IGJ	KDM6A	BCL6	EPOR	PAGI	IFITM1	JAK2	TYK2	IGJ	IL7R	PTK2B
KDM6A	CHDI	DNTT	IFITM1	NFSC2	P2R8	DNTT	NFSC2	JAK2	DNTT	RUNX1	KRAS	KRAS	AICDA	JAK2	NFSC2	IDH2	KRAS	IFITM2	EPOR	FGFR1	NDFY4
IL7R	NFSC2	NRAS	RAG2	PTK2B	SOX11	SOX11	SOX11	KDM6A	IFITM2	PAX5	FGFR1	IFITM1	HOKA10	KDM6A	JAK2	JAK2	IL7R	JAK2	IFITM1	IFITM1	PAX5
ABL1	RAG2	TAL1	SOX11	TAL1	TAL1			KRAS		PBX1	IDH2	IDH2	SEM6A	JAK3		P2R8	IFITM1		KDM6A	IDH2	SOC2
IDH2	TYK2	STAT3	IFITM2	IFITM2	NFSC2			IL7R		PAGI	AICDA	JAK1	RUNX1	KRAS		SEM6A	CSF1R		IFITM1	BCL6	PDGFRA
AICDA					RAG2			SEM6A		DNTT	HOKA10	AICDA	PTK2B	IL7R		PAX5	BCL6		IDH2	HOKA10	PAGI
HOKA10					BCR			RUNX1	RAG2	RAG2	P2R8	HOKA10	TLX3	HOKA10		ABL2	SEM6A		AICDA	P2R8	NFSC2
P2R8	NFSC2				IFITM2			PTK2B	SOX11	SOX11	RUNX1	P2R8	NRAS	RUNX1		DNTT	RUNX1		HOKA10	PTK2B	
SEM6A	NUP98							PAX5	IFITM2	IFITM2	PTK2B	SOC2	PDCD1	PTK2B		NUP98	PTK2B		RUNX1	TLX3	
PAX5	PTPN11							NRAS			SOC2	TLX3	PAGI	TLX3		RAG2	PAX5		PTK2B	NRAS	
NRAS	BCR							TAL1			TAL1	TAL1	PDGFRB	TAL1			TLX3		PAX5	PDCD1	
PAGI								PDGFRA			PBX1	STAT3	ABL2	PDCD1			NRAS		NRAS	PAGI	
ABL2								STAT3			PAGI	PBX1	DNTT	PTPN11			PAGI		TAL1	PTPN11	
NFSC2								PDCD1			RAG2	DNTT	NUP98	ABL2			PTPN11		PDCD1	ABL2	
NUP98								PDGFRB			TYK2	NUP98	PTPN11	NUP98			ABL2		PAGI	NFSC2	
SOX11								NFSC2			BCR	BCR	TYK2	SOX11			PTPN11		SOX11	NUP98	
BCR								NUP98			IFITM2		BCR				IFITM2			SOX11	
IFITM2								PTPN11					IFITM2								TYK2
								RAG2													IFITM2
								BCR													
11,11	42,59	18,52	29,63	18,52	24,07	14,81	12,96	46,30	16,67	25,93	42,59	40,74	42,59	37,04	12,96	29,63	40,74	12,96	40,74	46,30	22,22
																					Benzerlik Oranları

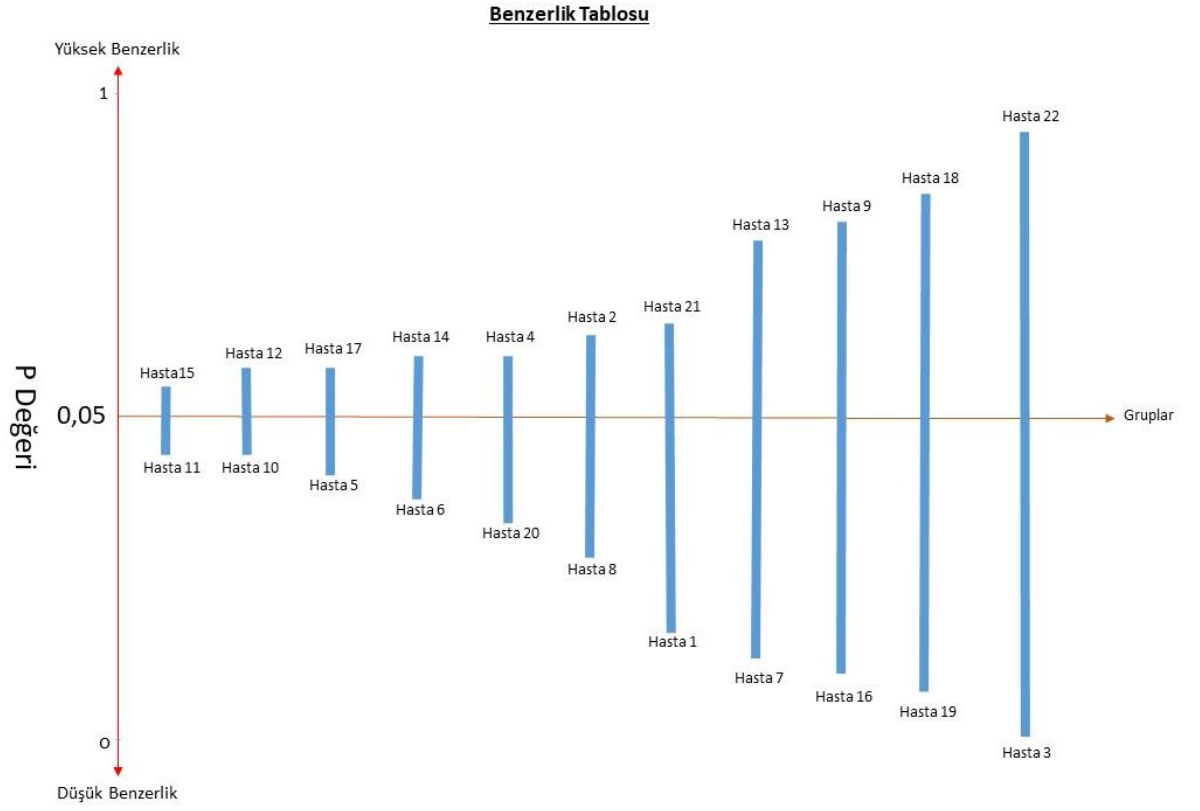
Tablo 12: Ph Negatif Grubu Arasında Ph Pozitif Grup ile İstatistiksel Anlamlılığı Belirlenemeyen Benzer Genlerin Ekspresyonları

Benzer Genler	Hasta Grubu p Değerleri
<i>Hs MPL/149709</i>	0,787
<i>Hs IKZF2/149711</i>	0,579
<i>Hs CHD1/129936</i>	0,234
<i>Hs IRF8/116597</i>	0,652
<i>Hs IDH1/140471</i>	0,881
<i>Hs ETV6/113106</i>	0,428
<i>Hs IGJ/136803</i>	0,617
<i>Hs FLT3/103512</i>	0,281
<i>Hs EPOR/140936</i>	0,96
<i>Hs KDM6A/148763</i>	0,34
<i>Hs KRAS/148778</i>	0,659
<i>Hs ABL1/144473</i>	0,348
<i>Hs FGFR1/146442</i>	0,83
<i>Hs IFITM1/103121</i>	0,843
<i>Hs IDH2/131078</i>	0,054
<i>Hs AICDA/149701</i>	0,774
<i>Hs HOXA10/149704</i>	0,978
<i>Hs P2RY8/148773</i>	0,87
<i>Hs SEMA6A/120510</i>	0,507
<i>Hs RUNX1/110894</i>	0,505
<i>Hs TLX3/146471</i>	0,954
<i>Hs NRAS/111040</i>	0,201
<i>Hs TAL1/147632</i>	0,979
<i>Hs PDGFRA/105613</i>	0,662
<i>Hs PBX1/148167</i>	0,773
<i>Hs PDCD1/148304</i>	0,813
<i>Hs PAG1/140406</i>	0,529
<i>Hs DNTT/149686</i>	0,654
<i>Hs NT5C2/149694</i>	0,744
<i>Hs NUP98/149696</i>	0,479
<i>Hs PTPN11/149688</i>	0,707
<i>Hs RAG2/149668</i>	0,471
<i>Hs SOX11/149719</i>	0,638
<i>Hs TYK2/149677</i>	0,623
<i>Hs BCR/149716</i>	0,803
<i>Hs IFITM2/149698</i>	0,804

Ekspresyon verilerimizden elde edilen kat regülasyon değerlerine göre hasta grupları arasındaki benzerlik yüzdeleri değerlendirildi (Tablo 13C). Kontrol ve hasta gruplarının ekspresyon bulguları normal dağılım testi ile analiz edildi (Tablo A: Grupların Normal Dağılım Test Parametreleri (Anlamlılık düzeyleri * $p < 0,05$; ** $p > 0,05$). Elde edilen veriler doğrultusunda anlamlılık değeri $p < 0,05$ ise non-parametrik, $p > 0,05$ ise parametrik testler seçildi. Vakaların Ph pozitif kontrol örneğine benzerlik seviyelerini belirleyebilmek için kontrol örneğine göre hasta grubunun Average Delta Ct değerleri T testi ile karşılaştırıldı (Tablo 13B). Elde edilen bulgular ışığında Hasta 5, Hasta 8 ve Hasta 13 Bağımsız T testi ile analiz edildi. Geri kalan hasta grupları Mann-Whitney U testi ile analiz edildi (Tablo 13A). Ph benzeri ALL vakalarının tanımlanmasında kullanılabilir benzerlik sınıflandırması için, hasta ve kontrol grupları arasındaki p değerleri normal dağılım testleri ile analiz edildi. $p = 0,05$ değeri benzerlik sınıflandırmasında sınır olarak kabul edildi. Analiz sonucunda, kontrol örneğine göre istatistiksel olarak fark içeren ($p < 0,05$) vakalar Ph pozitif kontrol örneğimize benzerliği düşük olarak tanımlandı. Kontrol örneğine göre istatistiksel olarak fark içermeyen ($p > 0,05$) değerindeki vakalar ise Ph pozitif kontrol örneğine yüksek benzerlik gösterdiği belirtildi (Tablo 13D: Kontrol Örneği Ekspresyon Değerlerine Göre Benzerlik Gruplaması ($p = 0,05$ eşik değer olarak baz alındı.).

Tablo 13: A; Grupların Normal Dağılım Test Parametreleri **, Bağımsız T Testi, *, Mann-Whitney U, B; Kontrol Örneğine Göre Hasta Gruplarının T Testi İle Belirlenen p Değerleri, C; Hasta Gruplarının Benzerlik Yüzdeleri, D; Kontrol Örneğinin Ekspresyon Değerlerine Göre Benzerlik Gruplaması (*p<0,05)

A		B		C		D	
Normal Dağılım Testi		Kontrol ve Hasta Avarage Delta CT		Hasta Gruplarının Benzerlik Yüzdesi		Kontrol ve Hasta Avarage Delta CT Benzerlik Gruplaması	
p Değeri	T test	p Değerleri	Kat Regilasyon Değerleri	p Değerleri	Benzerlik Gruplaması		
Kontrol	Bağımsız T Testi						
Hasta 1	Mann-Whitney U	0,001	11,11	0,001*	Düşük Benzerlik		
Hasta 2	Mann-Whitney U	0,18	42,59	0,18	Yüksek Benzerlik		
Hasta 3	Mann-Whitney U	0,0001	18,52	0,000*	Düşük Benzerlik		
Hasta 4	Mann-Whitney U	0,1749	29,63	0,174	Yüksek Benzerlik		
Hasta 5	Bağımsız T Testi	0,0135	18,52	0,013*	Düşük Benzerlik		
Hasta 6	Mann-Whitney U	0,0111	24,07	0,011*	Düşük Benzerlik		
Hasta 7	Mann-Whitney U	0,0008	14,81	0,000*	Düşük Benzerlik		
Hasta 8	Mann-Whitney U	0,0024	12,96	0,002*	Düşük Benzerlik		
Hasta 9	Bağımsız T Testi	0,44	46,3	0,44	Yüksek Benzerlik		
Hasta 10	Mann-Whitney U	0,0224	16,67	0,022*	Düşük Benzerlik		
Hasta 11	Mann-Whitney U	0,0254	25,93	0,025*	Düşük Benzerlik		
Hasta 12	Bağımsız T Testi	0,1124	42,59	0,112	Yüksek Benzerlik		
Hasta 13	Mann-Whitney U	0,422	40,74	0,422	Yüksek Benzerlik		
Hasta 14	Mann-Whitney U	0,1721	42,59	0,172	Yüksek Benzerlik		
Hasta 15	Mann-Whitney U	0,0848	37,04	0,084	Yüksek Benzerlik		
Hasta 16	Mann-Whitney U	0,0007	12,96	0,000*	Düşük Benzerlik		
Hasta 17	Mann-Whitney U	0,1244	29,63	0,124	Yüksek Benzerlik		
Hasta 18	Mann-Whitney U	0,5209	40,74	0,52	Yüksek Benzerlik		
Hasta 19	Mann-Whitney U	0,0005	12,96	0,000*	Düşük Benzerlik		
Hasta 20	Mann-Whitney U	0,0096	40,74	0,009*	Düşük Benzerlik		
Hasta 21	Mann-Whitney U	0,2064	46,3	0,206	Yüksek Benzerlik		
Hasta 22	Mann-Whitney U	0,7556	22,22	0,755	Yüksek Benzerlik		

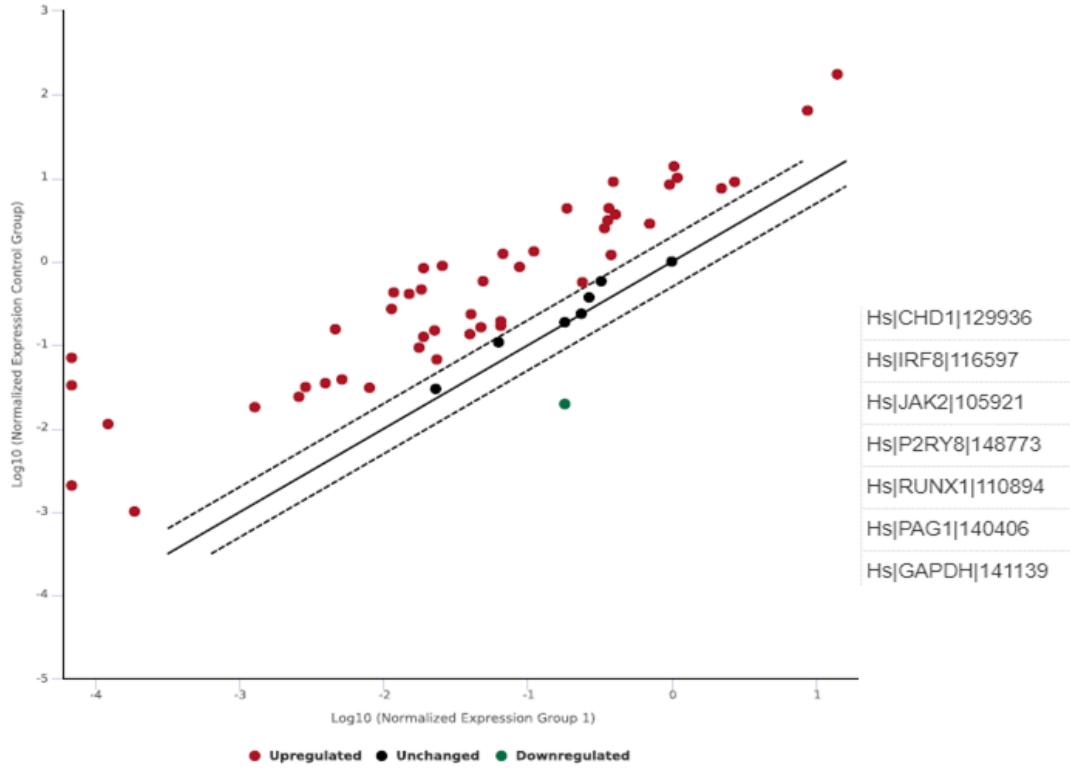


Şekil 27: Grupların p Değerlerine Göre Kontrol Örneğine Benzerlik Dağılım Tablosu

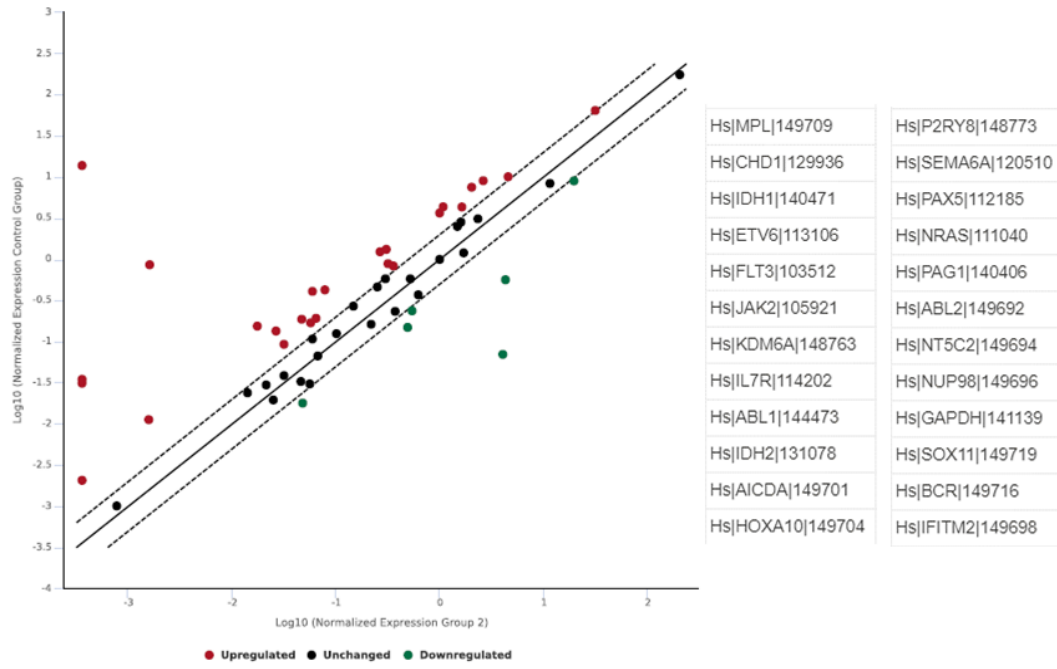
Tablo 14: Kontrol Örneği ile Ekspresyon Profili Bakımından Benzerlik Gösteren Genler ve Bu Genlerin Hasta Grubunda Görülme Frekansları.

Genler	Frekans	%
<i>Hs ETV6 113106</i>	13	59,1
<i>Hs RUNX1 110894</i>	13	59,1
<i>Hs IDH2 131078</i>	12	54,5
<i>Hs IRF8 116597</i>	11	50,0
<i>Hs P2RY8 148773</i>	11	50,0
<i>Hs PAG1 140406</i>	11	50,0
<i>Hs JAK2 105921</i>	10	45,5
<i>Hs PTK2B 105977</i>	10	45,5
<i>Hs DNTT 149686</i>	10	45,5
<i>Hs NT5C2 149694</i>	10	45,5
<i>Hs IFITM2 149698</i>	10	45,5
<i>Hs KDM6A 148763</i>	9	40,9
<i>Hs EPOR 140936</i>	8	36,4
<i>Hs KRAS 148778</i>	8	36,4
<i>Hs AICDA 149701</i>	8	36,4
<i>Hs PAX5 112185</i>	8	36,4
<i>Hs ABL2 149692</i>	8	36,4
<i>Hs NUP98 149696</i>	8	36,4
<i>Hs MPL 149709</i>	7	31,8
<i>Hs CHD1 129936</i>	7	31,8
<i>Hs IGJ 136803</i>	7	31,8
<i>Hs IFITM1 103121</i>	7	31,8
<i>Hs HOXA10 149704</i>	7	31,8
<i>Hs NRAS 111040</i>	7	31,8
<i>Hs TAL1 147632</i>	7	31,8
<i>Hs RAG2 149668</i>	7	31,8
<i>Hs BCR 149716</i>	7	31,8
<i>Hs IL7R 114202</i>	6	27,3
<i>Hs SEMA6A 120510</i>	6	27,3
<i>Hs PDCD1 148304</i>	6	27,3
<i>Hs SOX11 149719</i>	6	27,3
<i>Hs ACTB 143636</i>	6	27,3
<i>Hs FBXW7 141249</i>	5	22,7
<i>Hs IDH1 140471</i>	5	22,7
<i>Hs FLT3 103512</i>	5	22,7
<i>Hs TLX3 146471</i>	5	22,7
<i>Hs PBX1 148167</i>	5	22,7
<i>Hs TYK2 149677</i>	5	22,7
<i>Hs IKZF2 149711</i>	4	18,2
<i>Hs PTPN1 104822</i>	4	18,2
<i>Hs PTPN11 149688</i>	4	18,2
<i>Hs FGFR1 146442</i>	3	13,6
<i>Hs JAK1 106437</i>	3	13,6
<i>Hs BCL6 100108</i>	3	13,6
<i>Hs SOCS2 142892</i>	3	13,6
<i>Hs STAT3 110694</i>	3	13,6
<i>Hs JAK3 140909</i>	2	9,1
<i>Hs ABL1 144473</i>	2	9,1
<i>Hs CSF1R 105951</i>	2	9,1
<i>Hs PDGFRA 105613</i>	2	9,1
<i>Hs PDGFRB 105627</i>	2	9,1
<i>Hs IKZF1 115033</i>	1	4,5
<i>Hs NUDT4 139289</i>	1	4,5

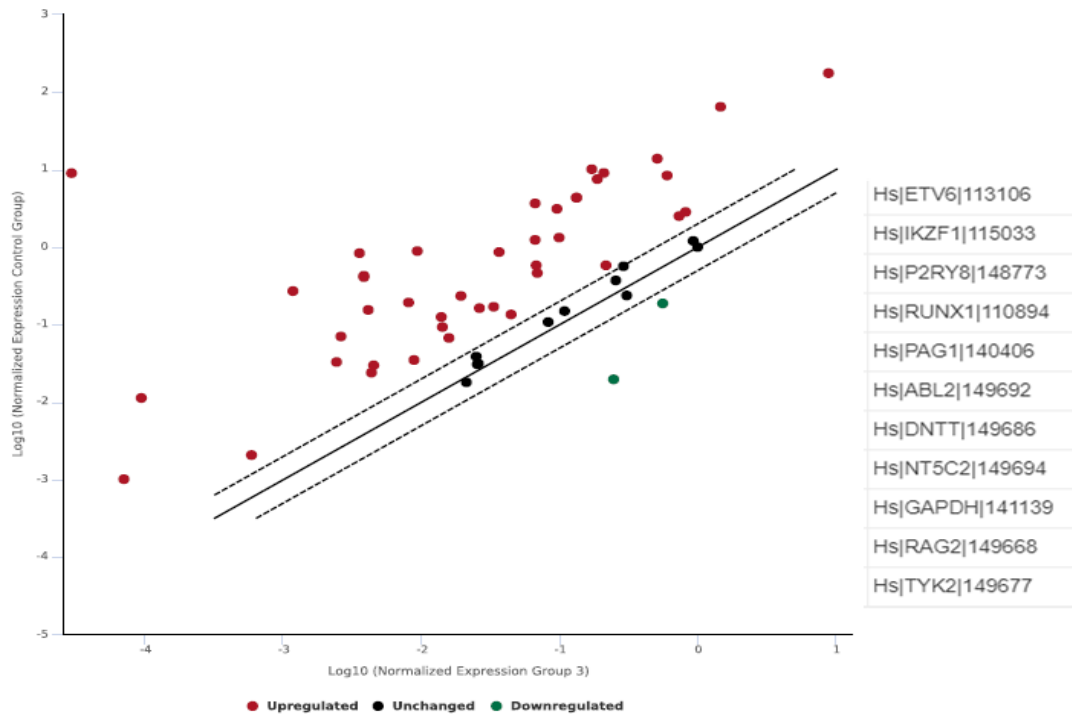
Hasta grubu, web tabanlı ‘Data Analysis Center–QIAGEN’ platformu kullanılarak kontrol örneği ile karşılaştırıldı ve her hastanın kontrol örneğine göre mRNA ekspresyon düzeyleri; yüksek (upregulated), benzer (unchange) ve düşük (downregulated) olarak saçılım grafiği (scatter plot) üzerinde gösterildi (Şekil 28-49). Saçılım grafiğinde belirtilen noktalar genlerin kontrol örneği ve hasta grupları arasındaki ilişkiyi ifade etmektedir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, Ph negatif içerisinde Ph benzeri olarak tanımlanabilecek hasta grupları arasında benzer genlerin sayısı bakımından benzerliği en yüksek olan hastalar 9 ve 21’dir (Şekil 36 ve Şekil 48).



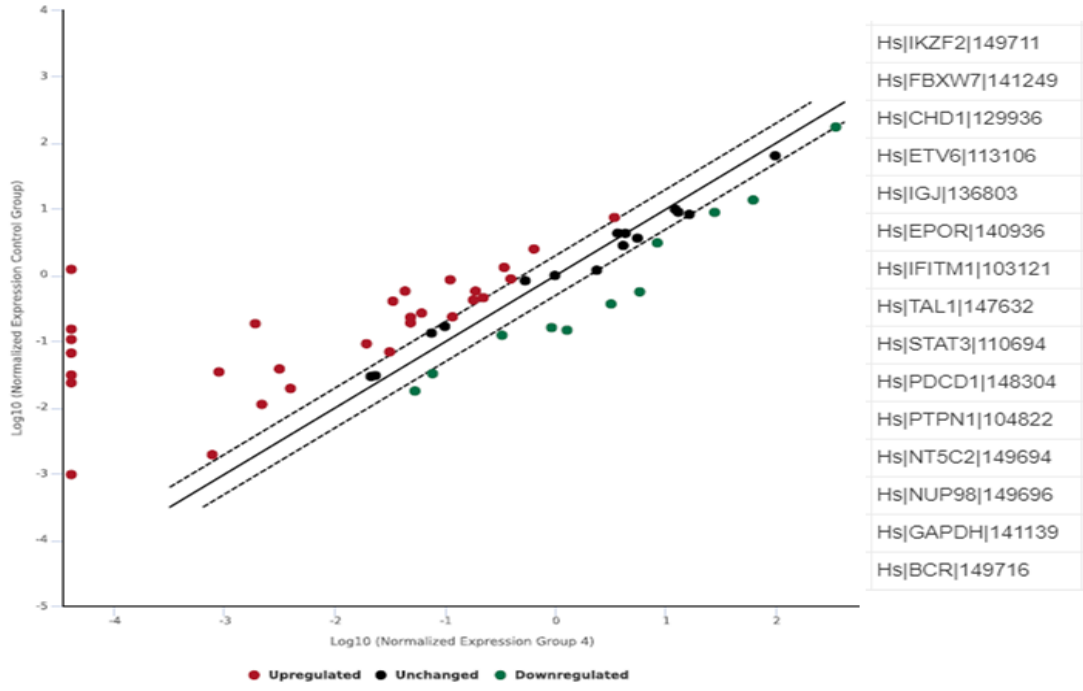
Şekil 28: Hasta 1 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “●” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek ekspresyon olan genleri, yeşil noktalar; düşük ekspresyon olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



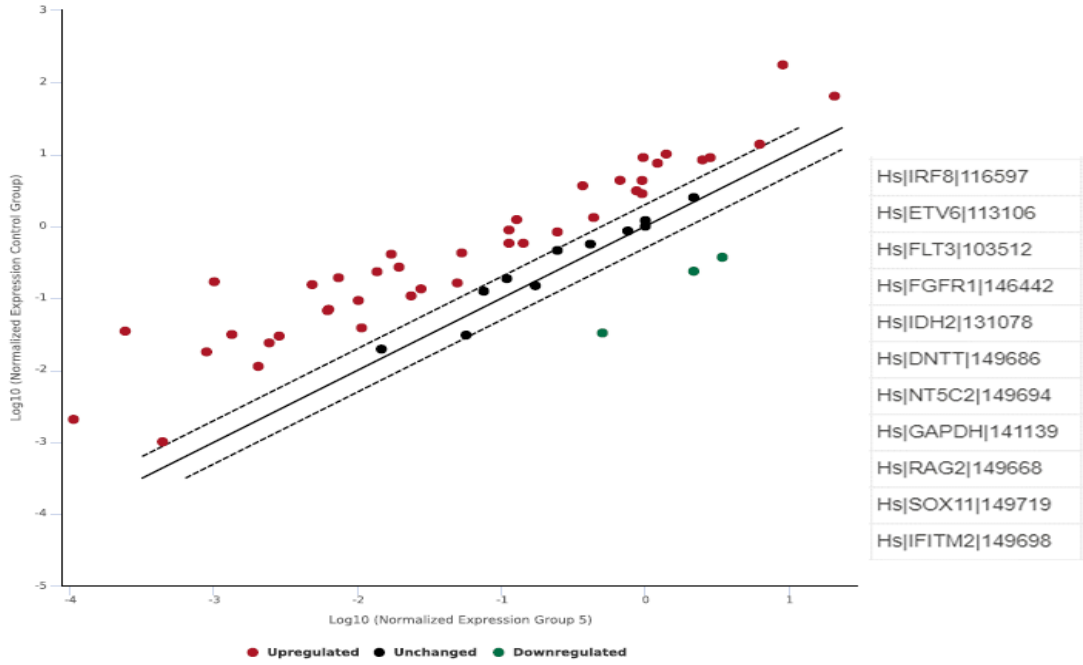
Şekil 29: Hasta 2 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



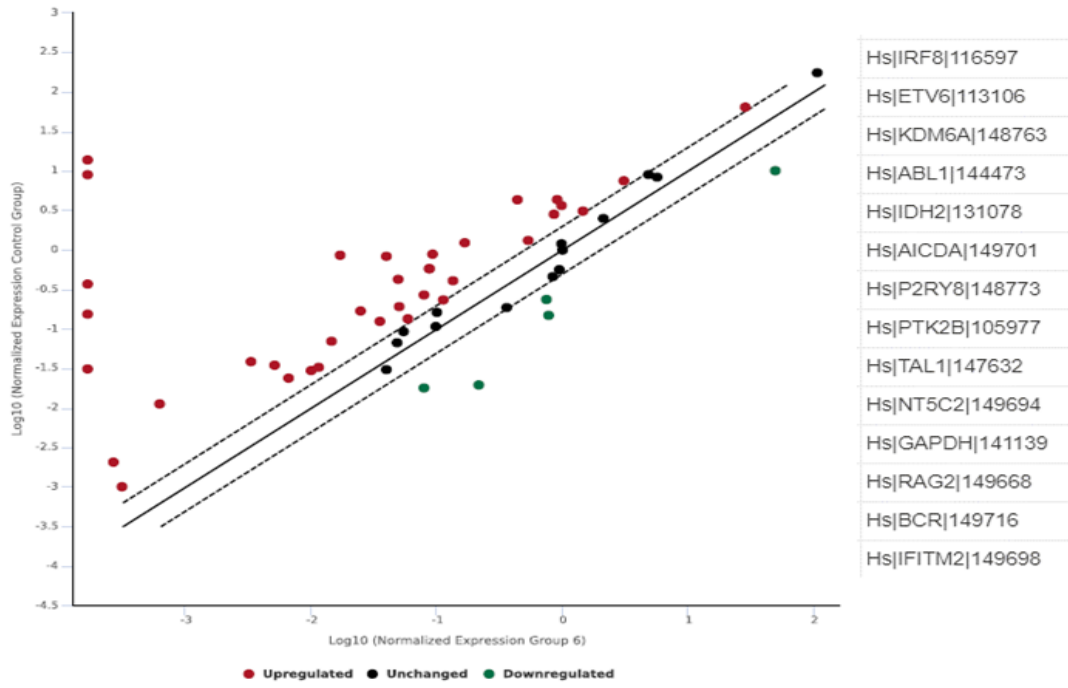
Şekil 30: Hasta 3 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



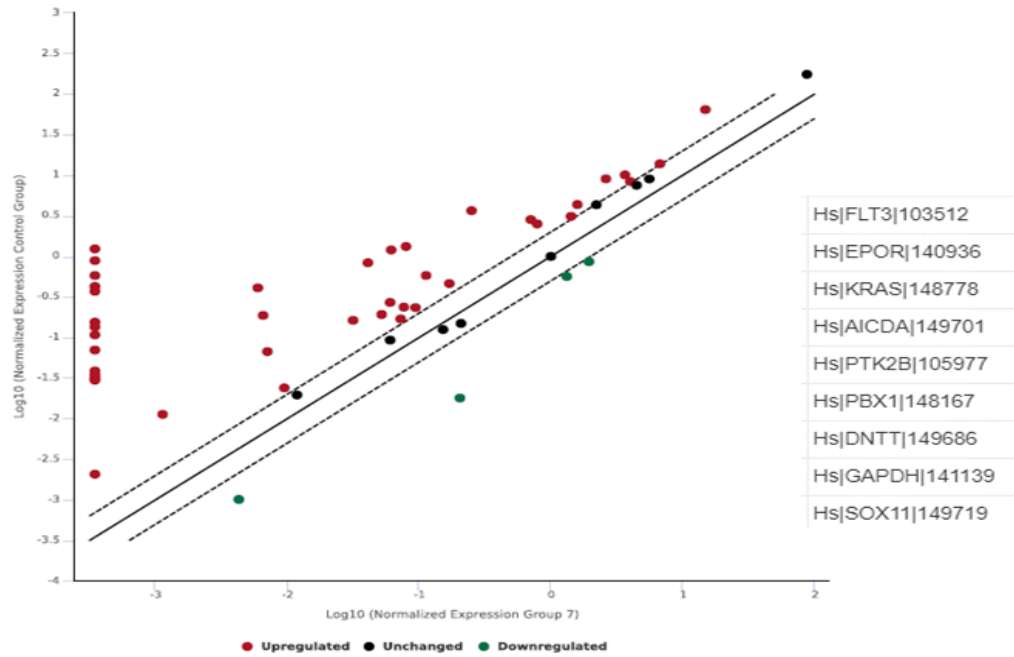
Şekil 31: Hasta 4 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



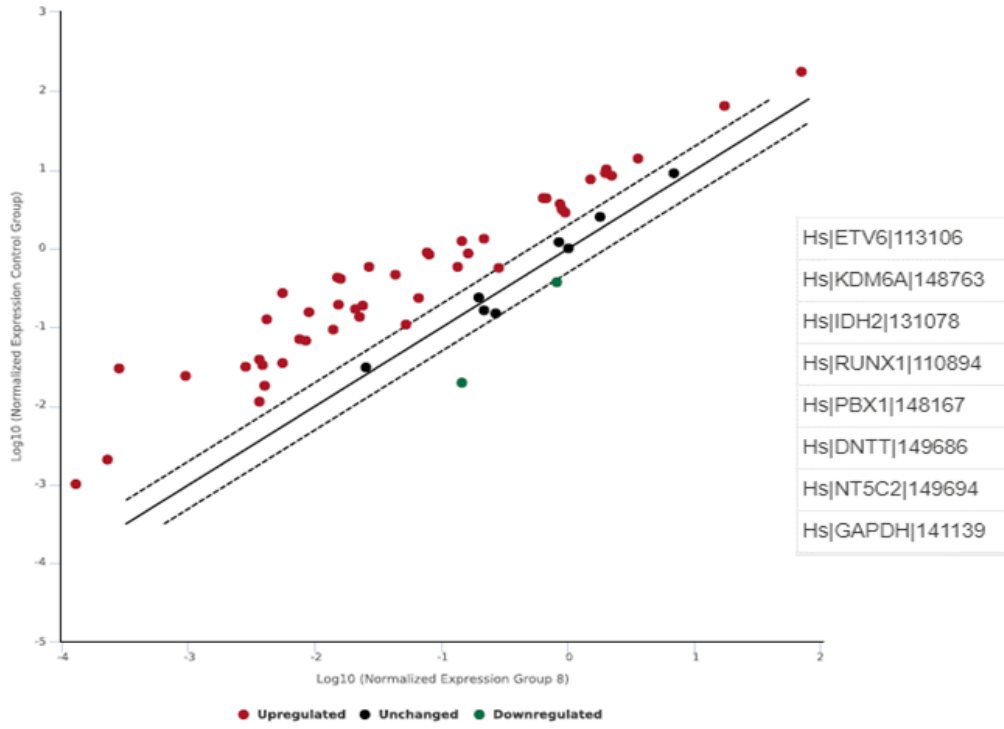
Şekil 32: Hasta 5 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



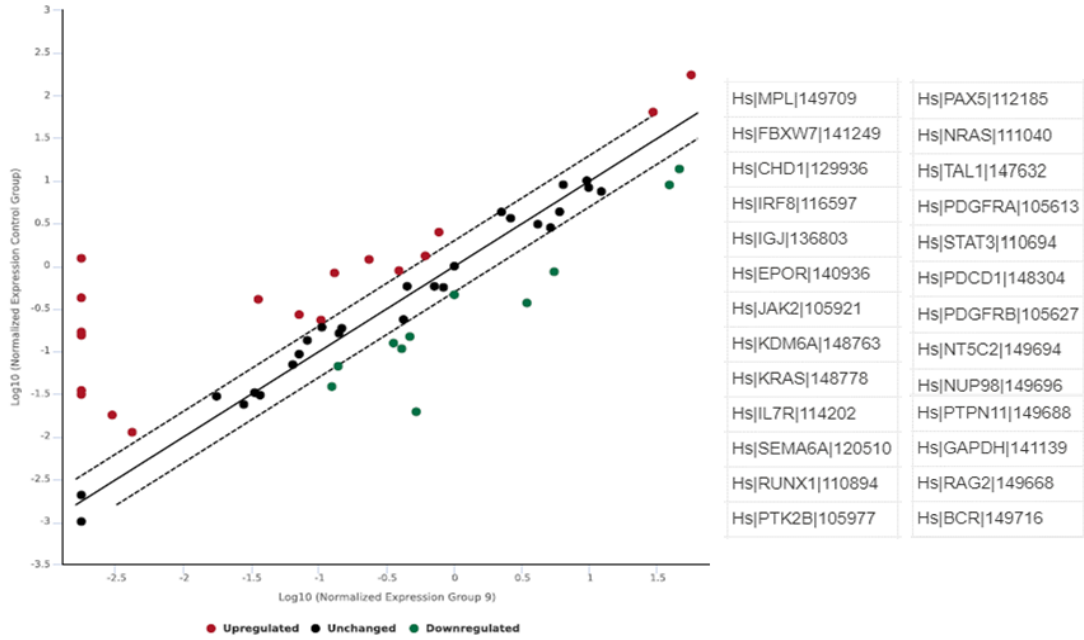
Şekil 33: Hasta 6 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



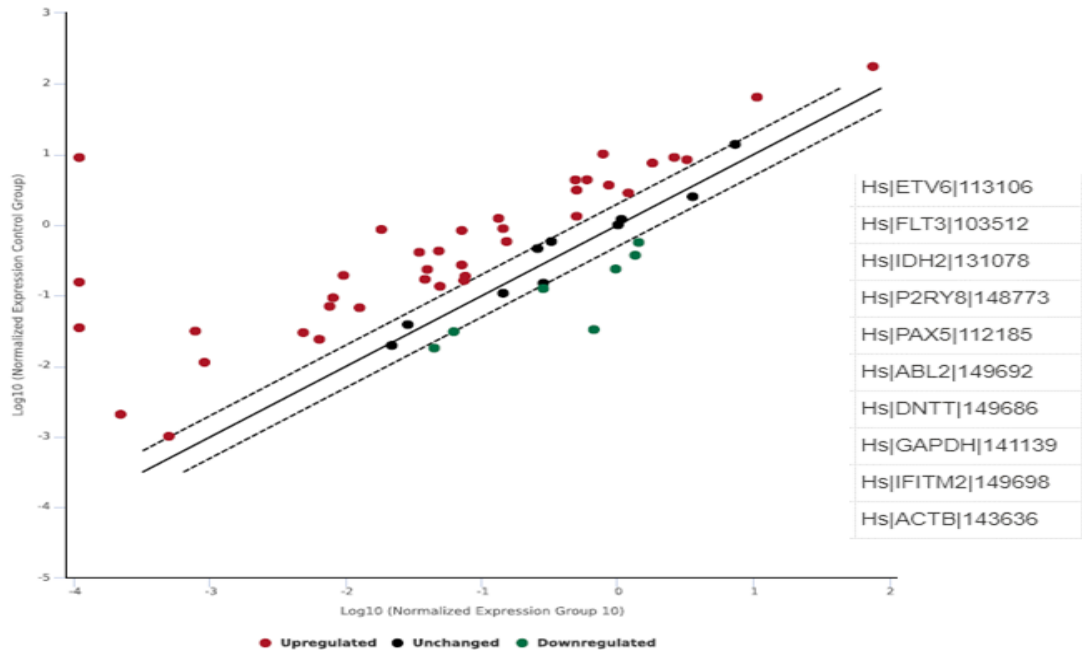
Şekil 34: Hasta 7 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



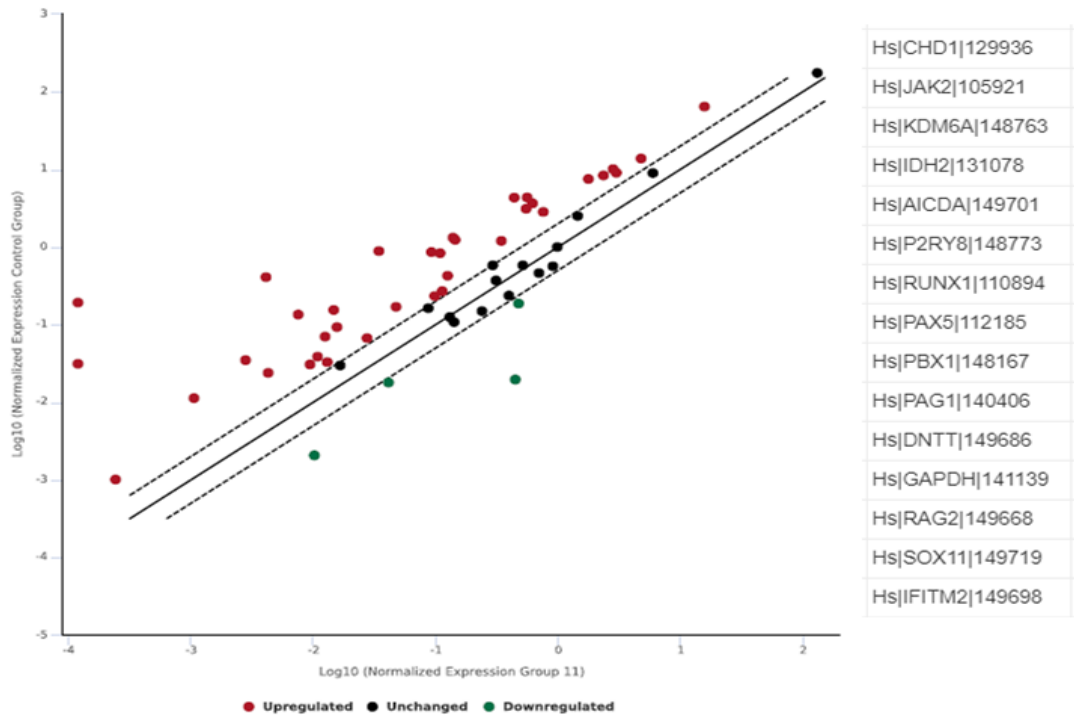
Şekil 35: Hasta 8 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



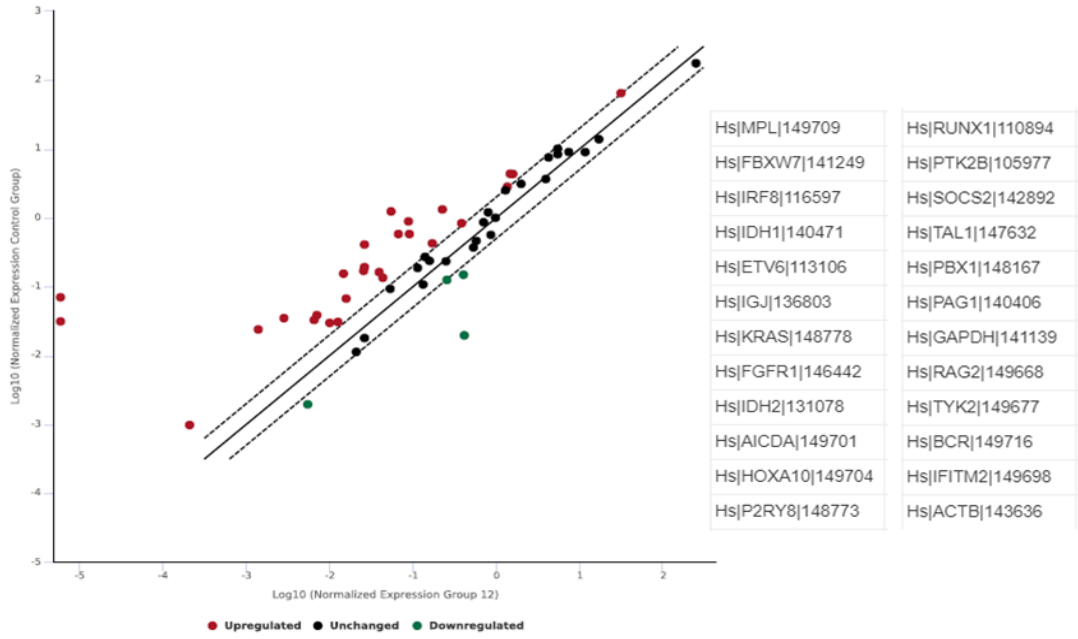
Şekil 36: Hasta 9 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



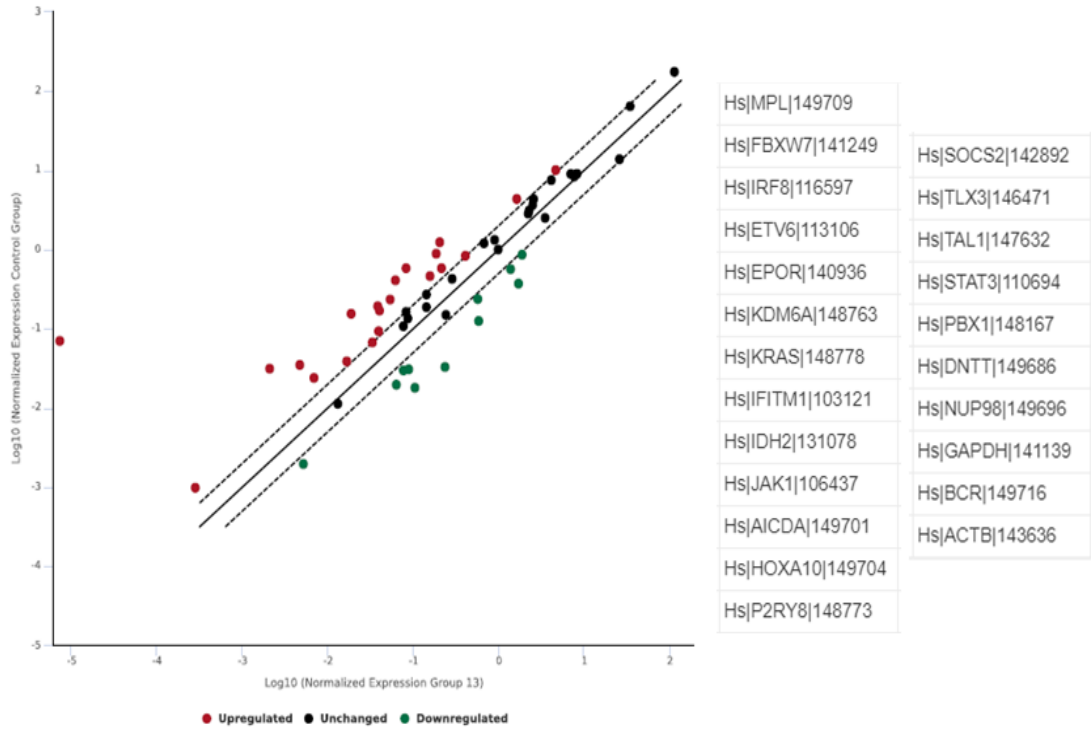
Şekil 37: Hasta 10 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



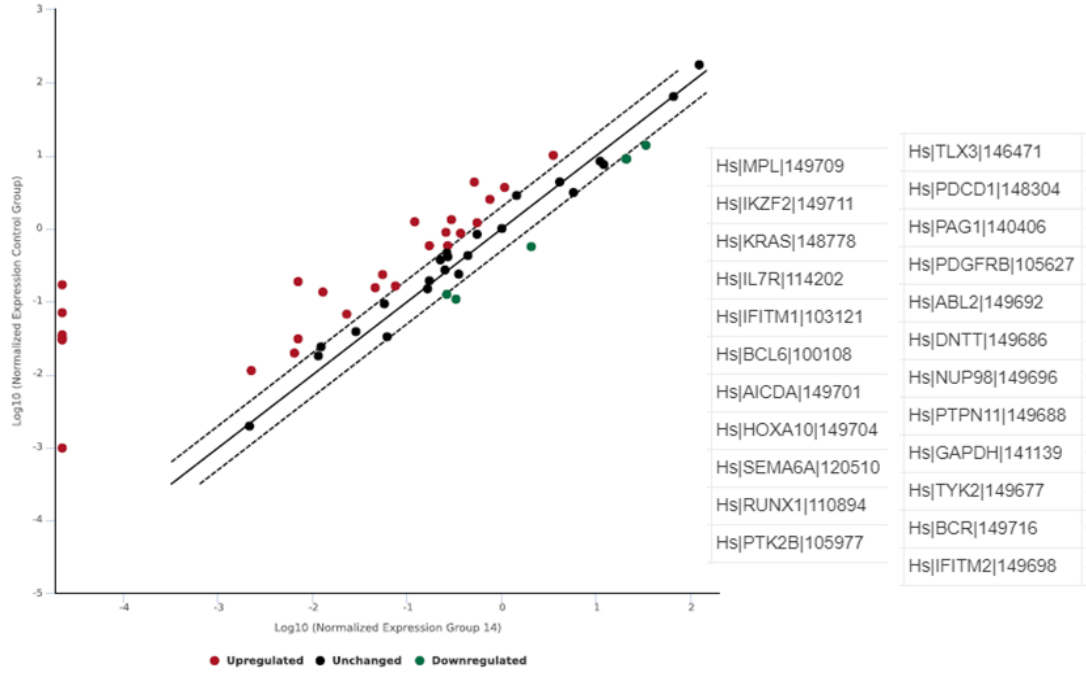
Şekil 38: Hasta 11 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



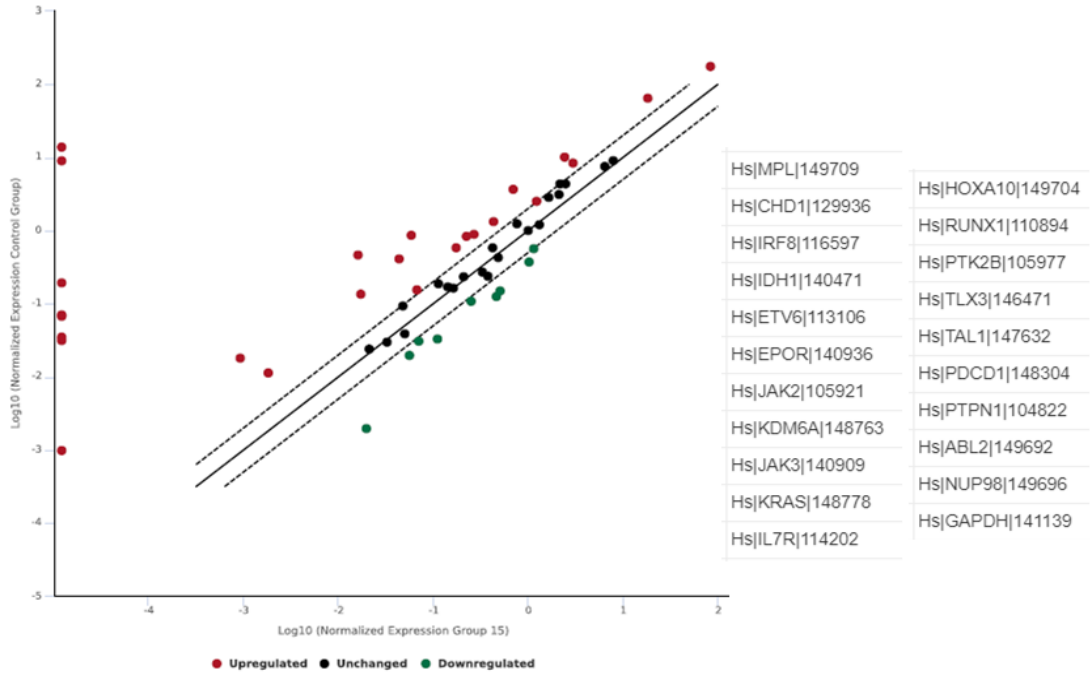
Şekil 39: Hasta 12 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



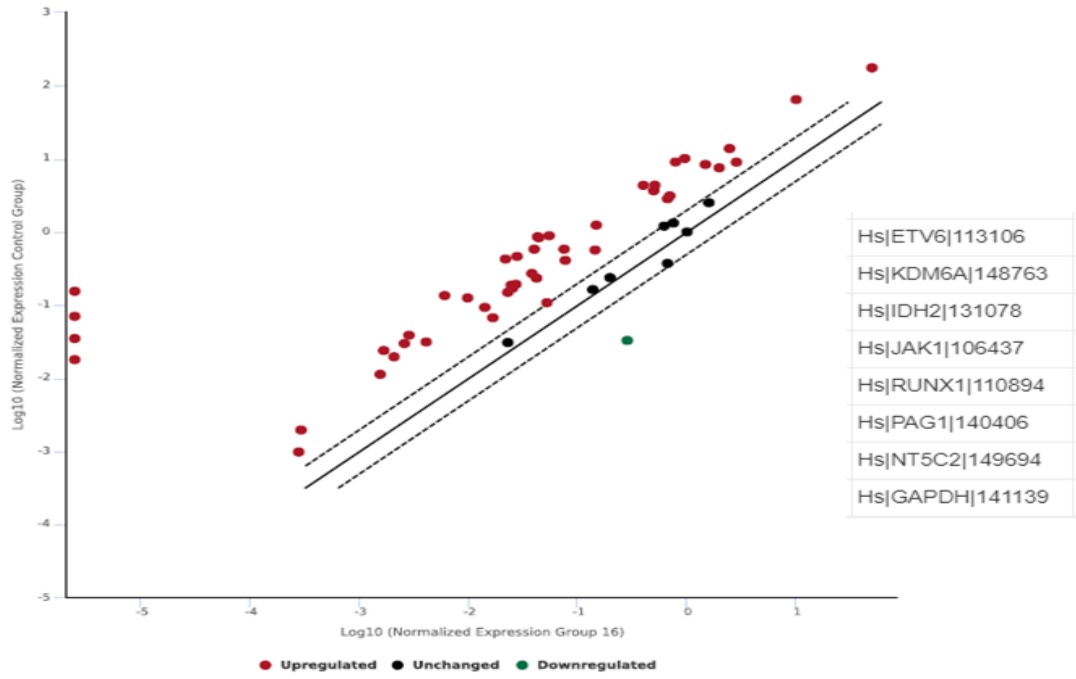
Şekil 40: Hasta 13 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



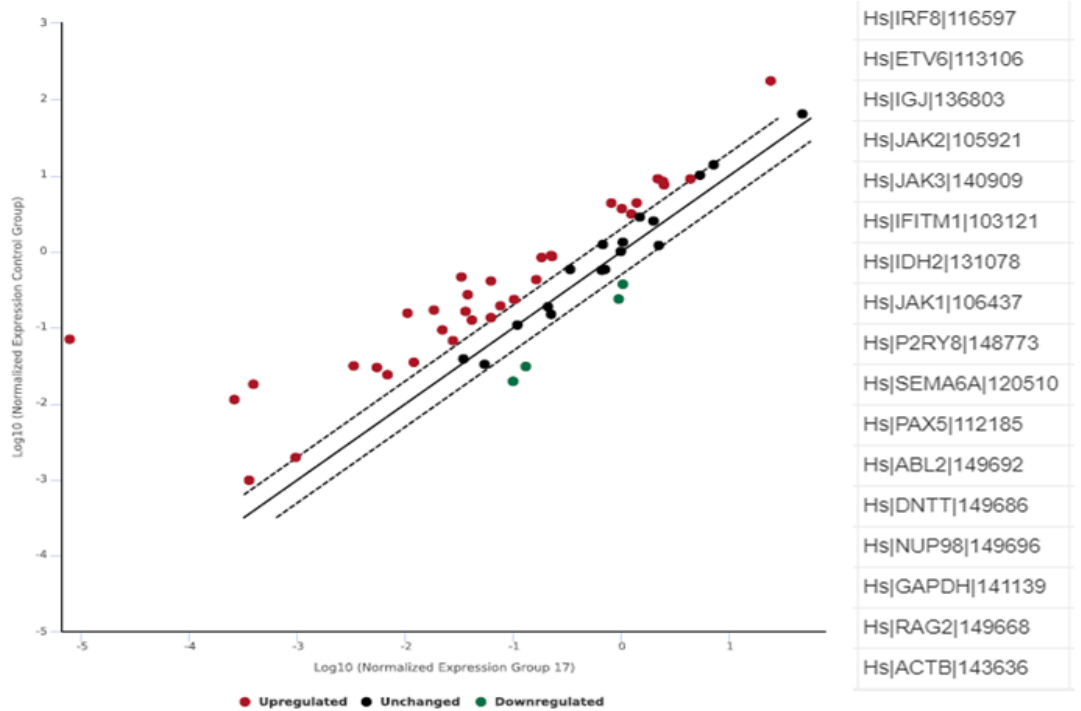
Şekil 41: Hasta 14 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



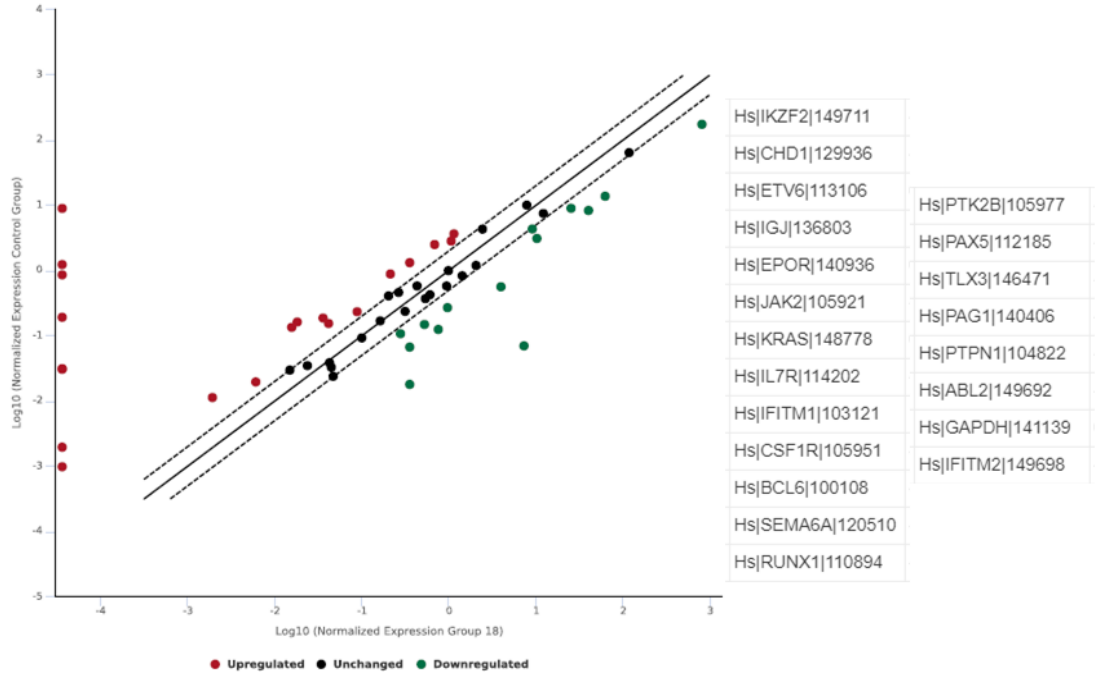
Şekil 42: Hasta 15 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



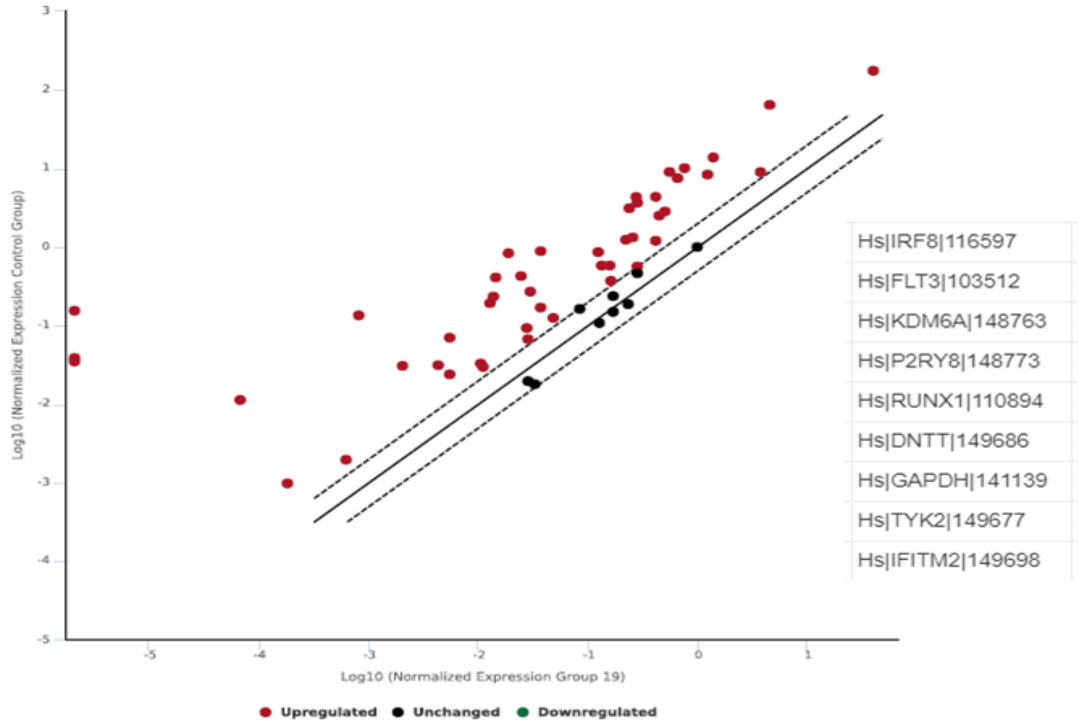
Şekil 43: Hasta 16 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



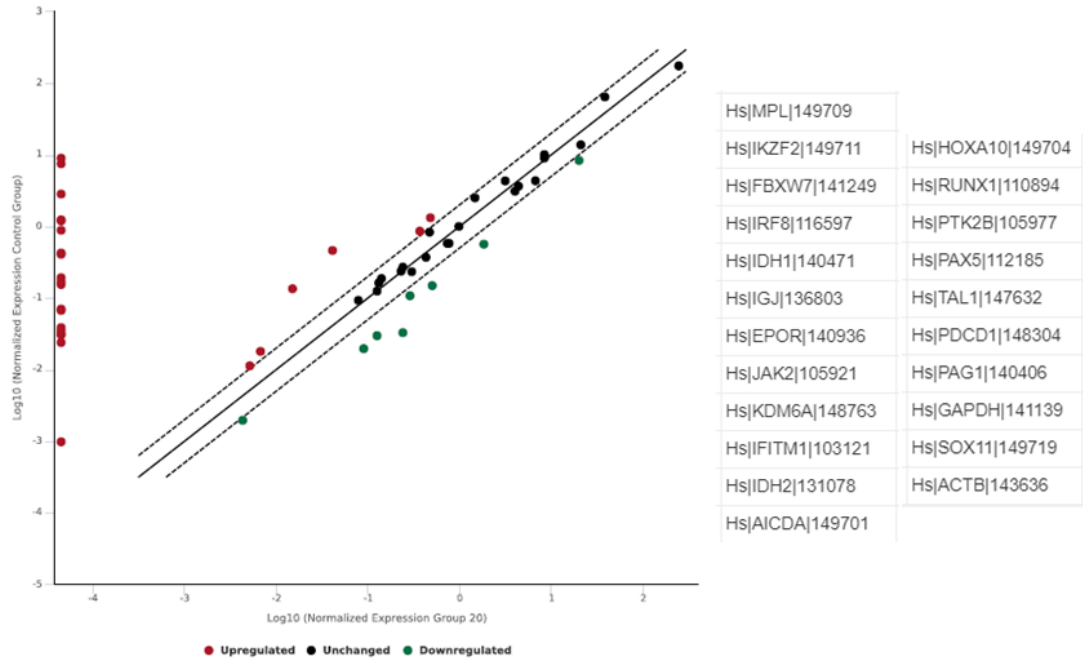
Şekil 44: Hasta 17 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



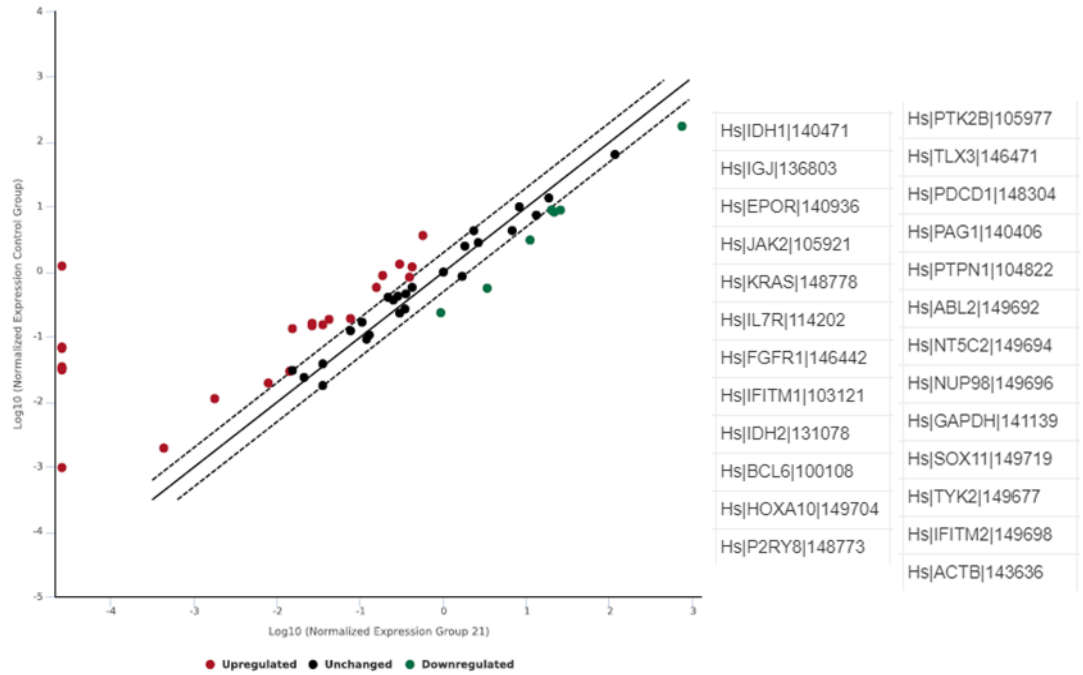
Şekil 45: Hasta 18 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



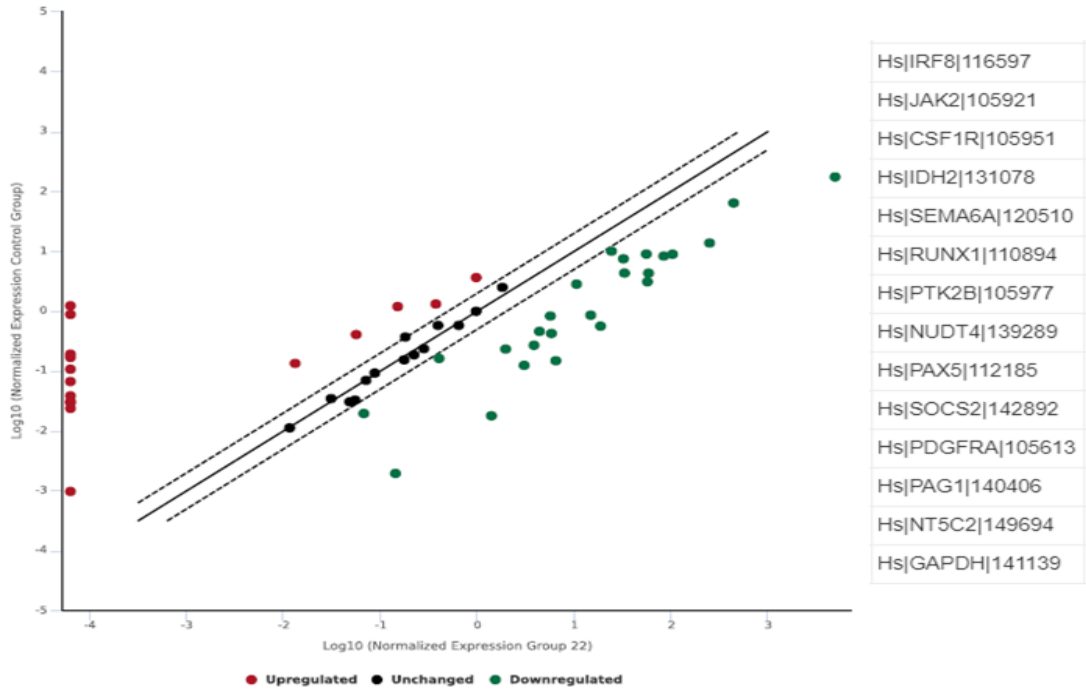
Şekil 46: Hasta 19 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



Şekil 47: Hasta 20 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)



Şekil 48: Hasta 21 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “•” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)

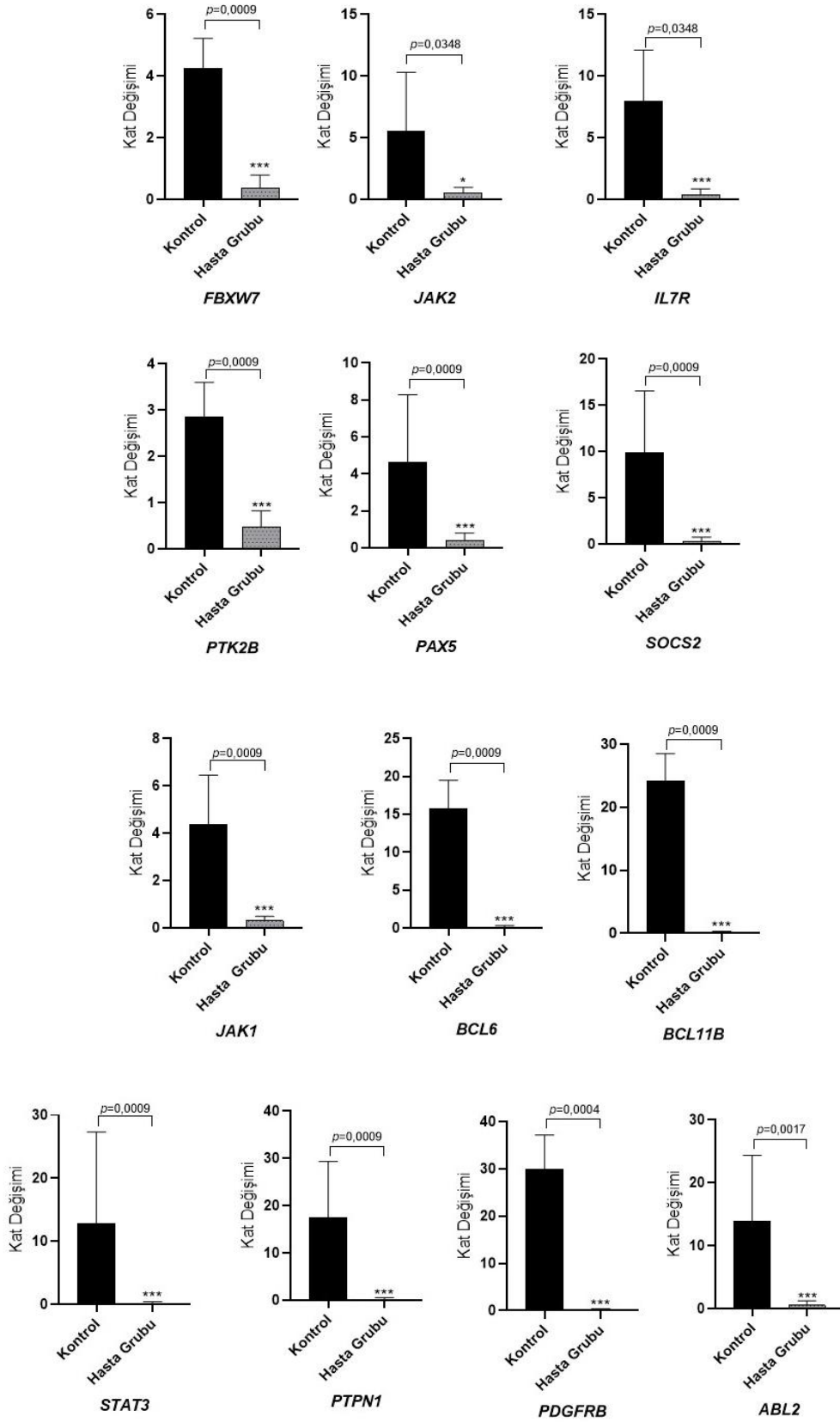


Şekil 49: Hasta 22 ve Kontrol Örneği Saçılım Grafiği (Benzerlik belirlenen genler grafikte “●” olarak gösterildi.) (Kırmızı noktalar; yüksek eksprese olan genleri, yeşil noktalar; düşük eksprese olan genleri ifade etmektedir. X eksen: Hasta grubu; Y eksen: Kontrol örneği)

Kontrolün ve hasta gruplarının karşılaştırıldığı mRNA ekspresyon profillerinden elde edilen veriler ile 17 genin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlendi ($p < 0,05$). mRNA’ların anlamlılık değerleri Tablo 15’de verildi. Anlamlı bir fark elde edilen 17 genin kontrol örneğine göre kat değişim değerleri web tabanlı ‘Data Analysis Center–QIAGEN’ platformu ve GraphPad Prism programı kullanılarak analiz edildi. Students’s T Testi ile elde edilen veriler Şekil 50’de gösterildi. İki grup arasında anlamlılık elde edilen 4 genin (*CSFRI*, *IKZF1*, *NUDT4*, *JAK3*) kat değişim farklarının çok yüksek olması nedeniyle uygun grafik görseli sunulamadı.

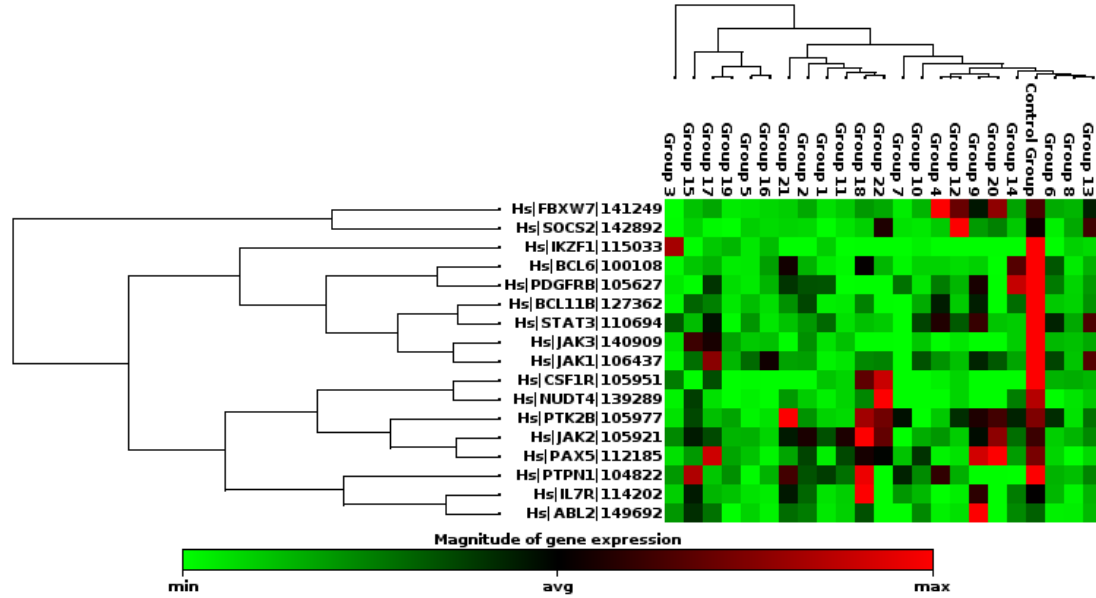
Tablo 15: Kontrol Örneğine Göre Hasta Grupları Arasında İstatiksel Olarak Anlamlı Bir Fark Bulunan Genlerin Kat Değişimleri, Güven Aralıkları (95%CI), p Değerleri ve Kat Regülasyon Değerleri (*; p<0,05)

Genler	Hasta Grubu			
	Kat Değişimi	95%CI	p Değeri	Kat Regülasyonu
<i>Hs/FBXW7/141249</i>	0,239	(0.12, 0.36)	0,015*	-4,181
<i>Hs/JAK2/105921</i>	0,285	(0.00001, 0.81)	0,006*	-3,502
<i>Hs/JAK3/140909</i>	0,009	(0.00001, 0.02)	0*	-110,858
<i>Hs/IL7R/114202</i>	0,139	(0.00001, 0.29)	0,022*	-7,15
<i>Hs/CSF1R/105951</i>	0,008	(0.00001, 0.02)	0*	-116,97
<i>Hs/IKZF1/115033</i>	0,004	(0.00001, 0.01)	0*	-210,595
<i>Hs/JAK1/106437</i>	0,247	(0.09, 0.41)	0*	-4,037
<i>Hs/BCL6/100108</i>	0,064	(0.01, 0.12)	0*	-15,411
<i>Hs/BCL11B/127362</i>	0,041	(0.00001, 0.10)	0*	-23,952
<i>Hs/PTK2B/105977</i>	0,357	(0.20, 0.51)	0,016*	-2,798
<i>Hs/NUDT4/139289</i>	0,007	(0.00001, 0.02)	0*	-128,795
<i>Hs/PAX5/112185</i>	0,265	(0.01, 0.52)	0,011*	-3,762
<i>Hs/SOCS2/142892</i>	0,131	(0.00001, 0.30)	0,004*	-7,626
<i>Hs/STAT3/110694</i>	0,122	(0.00001, 0.31)	0*	-8,178
<i>Hs/PTPN1/104822</i>	0,066	(0.00001, 0.16)	0*	-15,032
<i>Hs/PDGFRB/105627</i>	0,033	(0.00001, 0.08)	0*	-29,467
<i>Hs/ABL2/149692</i>	0,112	(0.00001, 0.34)	0,044*	-8,893



Şekil 50: Ph Negatif ve Ph Pozitif Hasta Arasında İstatistiksel Olarak Anlamlılık Belirlenen Genlerin Ekspresyon Farklılıkları (*; $p < 0,05$, ***; $p < 0,001$)

Anlamlılık tespit edilen 17 genin ekspresyon değerleri web tabanlı Data Analysis Center–QIAGEN platformu kullanılarak analiz edildi. Elde edilen Average Delta(Ct) değerleri ile oluşturulan Clustogram görüntüsü Şekil 51’de gösterildi.

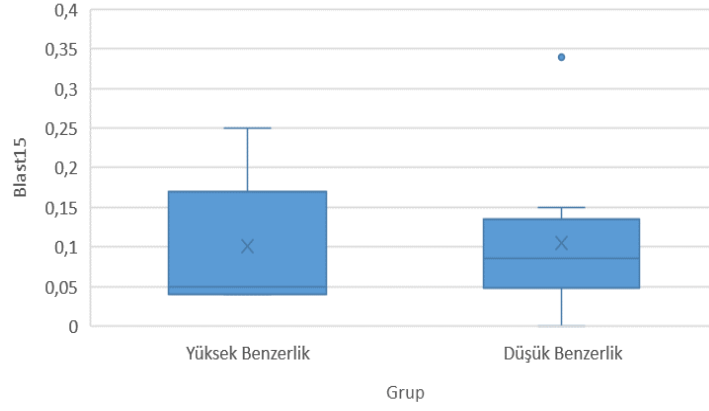


Şekil 51: Gen Ekspresyon Analizleri ile Anlamlı Fark Elde Edilen Genlere Ait Clustogram Görüntüsü

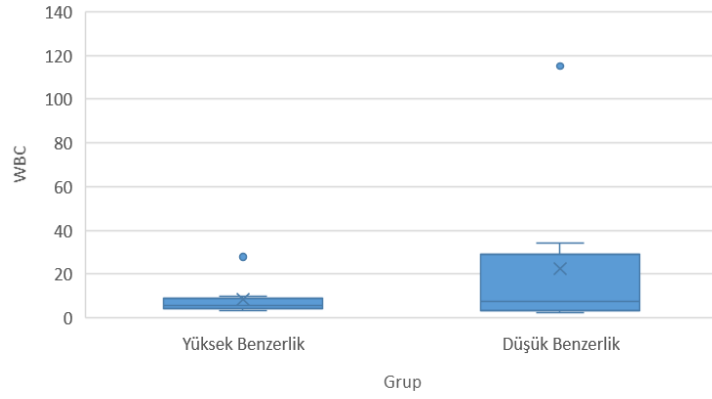
4.3. Ekspresyon Bulgularının ve Klinik Bulguların Karşılaştırılması

Hasta grupları, ekspresyon verilerine göre pozitif kontrol örneğine benzerlik gösteren ve göstermeyen olarak ikiye ayrıldı. Ph benzeri ALL grubuna benzer olduğunu öngördüğümüz grupların klinik bulguları istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ekspresyon değerlerine göre yapılan benzerlik gruplamasının doğruluğunu arttırmak için uluslararası koşullarda kabul gören ALL IC-BFM 2009 protokolünün risk sınıflamasına göre hastalar standart, orta ve yüksek risk sınıfları olarak gruplandırıldı ve genetik bulgular ile elde edilen benzerlik sınıflaması dahilinde ALL IC-BFM protokolündeki risk sınıflandırması arasında fark olup olmadığı incelendi.

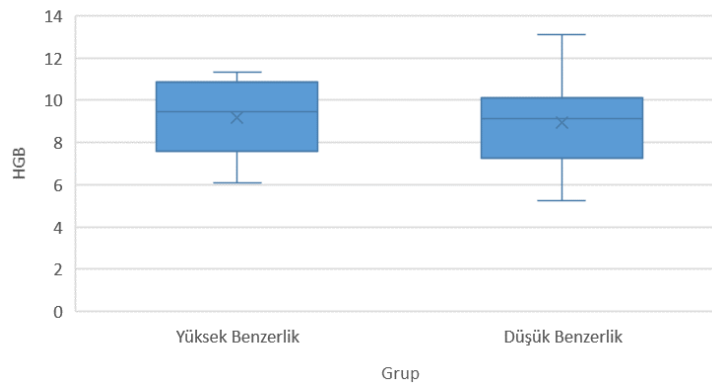
İlk olarak çalışılan mRNA custom gen paneli sonucu kontrol örneğine en yakın mRNA ekspresyon profili gösteren hastalar, benzerlik oranlarına göre yüksek ve düşük olarak sınıflandırıldı ($p>0,05$). Bu sınıflamaya göre 15. gün blast oranı, WBC, HGB, PLT ve RBC değerlerinin genel dağılım grafikleri Şekil 52-56’da gösterildi.



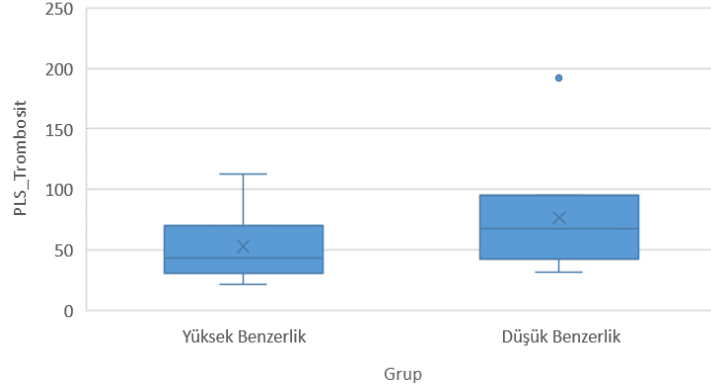
Şekil 52: Vakaların Benzerlik Sınıflandırılmasına Göre 15. Gün Blast Oranları Genel Dağılımı



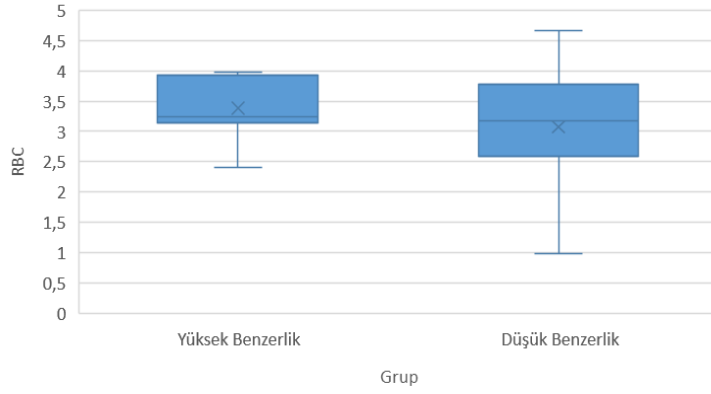
Şekil 53: Vakaların Benzerlik Sınıflandırılmasına Göre WBC Değerlerinin Genel Dağılımı.



Şekil 54: Vakaların Benzerlik Sınıflandırılmasına Göre HGB Değerlerinin Genel Dağılımı



Şekil 55: Vakaların Benzerlik Sınıflandırılmasına Göre PLT Değerlerinin Genel Dağılımı



Şekil 56: Vakaların Benzerlik Sınıflandırılmasına Göre Tanı Materyali RBC Değerlerinin Genel Dağılımı

Ph pozitif kontrol örneği ile yüksek ve düşük benzerlik gösteren gruplar arasında klinik bulgularının karşılaştırılacağı testlere karar verilebilmesi için bulgular önce normal dağılım testi ile daha sonra Mann-Whitney U ve Bağımsız T Testi ile analiz edildi (Tablo 16 A).

Tablo 16: A: Gruplar Arasında Klinik Bulguların Normal Dağılım Test Parametreleri, B: Vakaların Klinik Bulguları ile Benzerlik Durumlarının Karşılaştırılması

A					B		
Normal Dağılım Testi					Klinik Bulgular	p Değeri	
Grup	Shapiro-Wilk				Tanı Blast Oranı	0,097	
	Statistic	df	Sig.	Uygulanak test	15. gün Blast Oranı	0,65	
PLT	Yüksek Benzerlik	0,898	9	0,241	Mann-Whitney U	WBC	0,375
	Düşük Benzerlik	0,8	10	0,015		PLT	0,511
Tanı Blast	Yüksek Benzerlik		9	0	Mann-Whitney U	HGB	0,832
	Düşük Benzerlik	0,714	10	0,001		RBC	0,46
Blast 15	Yüksek Benzerlik	0,727	9	0,003	Mann-Whitney U		
	Düşük Benzerlik	0,816	10	0,022			
WBC	Yüksek Benzerlik	0,642	9	0	Mann-Whitney U		
	Düşük Benzerlik	0,633	10	0			
HGB	Yüksek Benzerlik	0,938	9	*0,563	Bağımsız T Testi		
	Düşük Benzerlik	0,986	10	*0,990			
RBC	Yüksek Benzerlik	0,901	9	*0,255	Bağımsız T Testi		
	Düşük Benzerlik	0,957	10	*0,748			

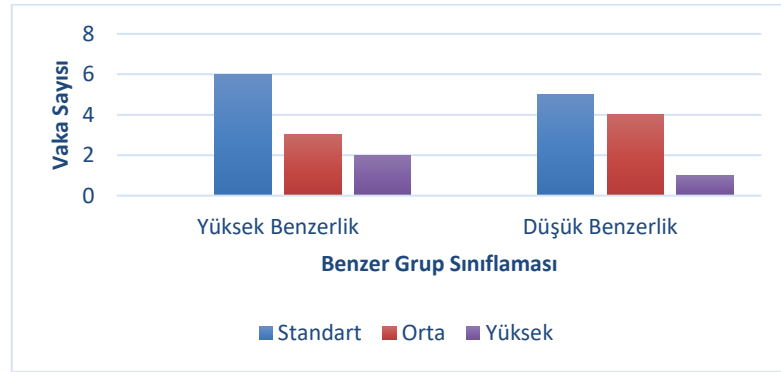
(*p>0,05)

Mann-Whitney U ve Bağımsız T Testi analiz verilerine göre anlamlılık elde edilemedi (p değerleri Tablo 16 B’de verildi.). Elde edilen bulgular doğrultusunda Ph benzeri ALL vakalarının belirlenmesinde klinik parametreler yeterli değildir. Klinik bulgular ve ekspresyon seviyelerine göre yapılan sınıflandırmada gruplar arası (düşük-yüksek benzerlik) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Mevcut tez çalışmasında elde edilen ekspresyon bulguları ve ALL IC-BFM 2009 risk sınıflandırılmasına göre oluşturulan benzerlik grupları klinik değerler açısından karşılaştırıldı. Sadece 15. gün blast oranında ALL IC-BFM 2009 risk sınıflandırılmasına göre standart ve yüksek risk grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlendi ($p=0,01$). Diğer klinik veriler ve hasta gruplarındaki yüksek-düşük benzerlik bulgularımız arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Genel örüntü incelendiğinde; klinik parametrelerin mozaik yapıda olduğu görülmektedir (Tablo 17 ve Şekil 57).

Tablo 17: Hasta Gruplarının Ekspresyon Bulguları ve ALL IC-BFM 2009 Protokolüne Göre Gerçekleştirilen Risk Sınıflaması Parametrelerinin Klinik Bulgular ile Karşılaştırılması

Klinik Bulgular	Ekspresyon Benzerik Sınıflandırması		ALL IC-BFM 2009 Risk Sınıflandırılması	
	Uygulanan Test	p Değeri	Uygulanan Test	p Değeri
FAB	Fisher's Exact Test	1*	Pearson Chi-Square	0,42
Tanı Anındaki Blast %	Mann-Whitney U	0,10	Kruskal-Wallis H	0,20
15. Gün Blast %	Mann-Whitney U	0,65	ANOVA	0,01*
Başvuru Şikayet	Pearson Chi-Square	0,97	Pearson Chi-Square	0,73
WBC	Mann-Whitney U	0,38	ANOVA	0,11
WBC Kategorik	Pearson Chi-Square	0,14	Pearson Chi-Square	0,07
HGB	Bağımsız T Testi	0,83	ANOVA	0,73
HGB Kategorik	Fisher's Exact Test	0,50	Pearson Chi-Square	0,59
PLT Miktarı	Mann-Whitney U	0,51	ANOVA	0,98
PLT Miktarı Kategorik	Fisher's Exact Test	0,50	Pearson Chi-Square	0,33
RBC	Bağımsız T Testi	0,46	ANOVA	0,21
RBC Kategorik	Fisher's Exact Test	0,50	Pearson Chi-Square	0,59



Şekil 57: Ekspresyon Verilerine Göre İki Farklı Gruplama Sistemin Dağılımlarının Karşılaştırılması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut tez çalışmasında ilk kez Türk toplumuna özgü Ph benzeri ALL vakalarının tanımlanabilmesi için gen ekspresyon profil analizinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Ph benzeri grubun tanımlanması ile vakaların tedavi protokollerine TKI'leri eklenerek etkin tedavi almaları mümkün olmaktadır. Bu vakaların erken dönemde belirlenmesi sağkalım ve prognozlarını olumlu bir şekilde etkilemektedir.

ALL'nin genetik alt tipleri ve ilaç direncinin biyolojik temelleri hakkındaki bilgiler mRNA gen ekspresyon çalışmaları ile elde edilebilmektedir. ALL vakalarında gerçekleştirilen çalışmalarda >%95 doğruluk oranı ile gen ekspresyon profillerinin analizleri kullanılarak alt sınıflamanın gerçekleştirilebileceği belirtilmektedir (Den Boer ve ark., 2009; EJ ve ark., 2002).

Monique L. Den Boer ve ark., gen ekspresyon profilleri ile gerçekleştirdikleri analizler sonucunda T-ALL, *TEL-AML1* pozitif, hiperdiploid ve *E2A* yeniden düzenlenmiş alt grupları en yüksek doğruluk ile sınıflandırabileceğinin mümkün olduğunu göstermişlerdir. İki farklı araştırma grubunun (Çocuk Onkoloji Grubu (COG) -TARGET-St Jude konsorsiyumu ve Hollanda Çocuk Onkolojisi Grubu) pre-B ALL vakalarında gerçekleştirdikleri gen ekspresyon profili çalışmalarından elde edilen bulgular doğrultusunda, 2009 yılında Ph benzeri ALL alt grubu tanımlanmıştır. Bu grup, Ph pozitif ALL vakalarına benzer gen ekspresyon profili vermektedir, ancak $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ olarak tanımlanan Ph kromozomunun füzyon proteininden yoksundur (Den Boer ve ark., 2009; Pui ve ark., 2017).

Ph benzeri ALL grubu ilk olarak pediatrik vakalarda tanımlanmıştır. ALL'nin diğer genetik alt tiplerinin aksine, Ph benzeri grup gen ekspresyon profili ile tanımlanabilmektedir ve diğer alt gruplara göre genetik olarak daha heterojen bir yapıya sahiptir (Tasian ve ark., 2017; Wells ve ark., 2017). Ph benzeri alt grubun tanımlanmasında öncü olan bu iki araştırma grubu, aynı vakaların ayrımını %100 güvenilirlikte gerçekleştirememiştir. Wells ve ark.'nın çalışmasında bu iki grubun

prob setleri değerlendirilmiş ve Ph benzeri vakalar tanımlanmıştır. Ancak vakaların sadece %18'i iki prob seti ile örtüşmektedir. Gen ekspresyon profilleri incelendiğinde ise, sadece 7 gen kümesinin (*CCND2*, *SH3BP5*, *ABL1*, *SOCS2*, *DUSP6*, *LST1*, *EGFL7*) örtüştüğü görülmektedir. COG-TARGET-St Jude araştırma grubu ilk önce Gen Seti Zenginleştirme Analizi ile Ph pozitif vakalara benzer gen ekspresyon profiline sahip yüksek risk sınıflamasındaki B-ALL vakalarının bulunduğu bir alt grup tanımlamıştır ve bu grup içerisinde Ph benzeri grubu tanımlamak için, 257 problu Affymetrix gen ekspresyon analiz yöntemi ile Ph pozitif hasta grubu ve yüksek riskli B-ALL hasta grubunun mikroarray verilerini mikroarray tahmin analizi (PAM) ile değerlendirilmiştir. Diğer araştırma grubu ise (Den Boer ve ark.), ana pediatrik ALL alt tiplerinin (T-hücresi, *ETV6-RUNX1*, yüksek hiperdiploid, *TCF3-PBX1*, *MLL*) sınıflandırılabilmesi için 110 prob seti içeren hiyerarşik küme çözümlemesi gerçekleştirilmiştir (Pui ve ark., 2017; Wells ve ark., 2017).

Ph benzeri ALL'nin prevalansı yaş, cinsiyet, ırk, etnik köken ve Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından tanımlanan risk gruplarına göre farklılık göstermektedir. Pediatrik pre B-ALL vakalarının yaklaşık %12'si Ph benzeri ALL'dir. Pediatrik Ph benzeri grubun prevalansı, Ph pozitif vakalara göre 3-4 kat daha fazladır. Ph benzeri alt grubun tanımlanmasında kullanılan gen ekspresyon panelleri ile ilgili bulgular birikmesine rağmen rutin olarak klinik uygulamalarda kullanımı yaygınlaştırılamamıştır. Bu vakalar genetik olarak heterojen yapıda oldukları için tanımlamak oldukça güçtür. Ayrıca etnik kökene göre genetik yapının değişiklik göstermesi yine hastalığın tanımlanmasında yaşanan zorluklardan biridir (Marke ve ark., 2018; Pui ve ark., 2017).

Ph benzeri ALL vakaları, klinik bulguları ile değerlendirilirken tanı yaşının yüksek olmasına ek olarak yüksek WBC değerine de sahip oldukları bildirilmektedir. Bu alt grubun tanı yaşının diğer alt gruplardan farklılık göstermemesi nedeniyle risk faktörü olarak değerlendirilmesi uygun değildir. Ancak, bu grupta WBC değerleri diğer gruplara göre 2-3 kat daha yüksek görülmektedir. St.Jude araştırma grubunun gerçekleştirdiği çalışmada, ortalama yaş ve ortalama WBC değerleri ile Ph benzeri ve Ph benzeri olmayan hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. İlâveten, NCI'nin tanımladığı risk grup dağılımlarında da anlamlılık elde edilememiştir. Mevcut

tez çalışmasında, klinik bulguları değerlendirilen tüm hastalar arasından WBC değeri 115.0 K/ μ L ve tanı yaşı olan 16 bir vaka hem NCI hem de ALL IC-BFM 2009 risk sınıflaması protokolüne göre uygundur. Çalışmada kontrol örneğine göre yüksek ve düşük benzerlik sınıflaması yapılmıştır. Bu sınıflamalar göz önüne alınarak değerlendirilen bulgular ile ($p>0,05$) anlamlılık elde edilmemiştir. Ph benzeri ALL, yüksek risk grubu olarak tanımlanmasına rağmen COALL ve DCOG çalışmalarındaki mevcut risk kriterlerine göre bu alt grup düşük ve orta risk sınıflamasında da yer almaktadır. Literatürde yer alan Ph benzeri vakaların diğer alt tiplerdeki vakalara göre relaps oranı daha fazla olup, hastaliksız sağkalım oranları da oldukça düşüktür. Geleneksel kemoterapi ile tedavi edildiğinde klinik bulgular ağırlaşarak, kötü prognoz ile ilerlemektedir (Den Boer ve ark., 2009; Maese ve ark., 2017; Pui ve ark., 2017).

B hücre gelişiminde görev alan genler Ph benzeri ALL vakalarında yüksek oranda anomaliye sahiptir. Bu grupta görülen genetik değişiklikler yaş gruplarına göre farklılık göstermektedir. Pediatrik ve genç erişkin vakalarda yetişkinlere göre kinaz füzyonları daha fazla görülürken, genç ve yetişkin vakalarda ise nokta mutasyonları ve delesyonlar, pediatrik vakalara göre daha fazla görülmektedir (Den Boer ve ark., 2009; Pui ve ark., 2017; Severson ve ark., 2017).

Mevcut çalışmada Ph benzeri vakalarda gen ekspresyon profilinde belirlenen benzer ifade olan genler; *MPL, IKZF2, CHD1, IRF8, IDH1, ETV6, IGJ, FLT3, EPOR, KDM6A, KRAS, ABL1, FGFR1, RAG2, SOX11, TYK2, BCR, IFITM2, IFITM1, IDH2, AICDA, HOXA10, P2RY8, SEMA6A, RUNX1, TLX3, NRAS, TAL1, PDGFRA, PBX1, PAG1, PDCD1, DNNT, NT5C2, NUP98* ve *PTPN11*'dir. Mevcut çalışma için tasarlanan custom gen panelinde; Ph benzeri ALL için önemli görülen prob setlerindeki genler, literatürde yer alan farklı ırklarda belirlenmiş genetik değişikliklere ait genler ve ticari olarak hizmete sunulan ArcherFusion-Plex lösemi/lenfoma panelindeki genler yer almaktadır. Prob içeren LDA panelleri %93 hassasiyet, %89,7 özgüllüğe sahiptir. LDA prob setlerindeki genlerden iki grup arasında benzer ekspresyon değeri belirlenen genler; *IGJ, SEMA6A* ve *IFITM1*'dir. Ticari panelden seçilen genler arasından benzer ifadeye sahip olan genler ise; *PTPN1, SOX11, TLX3, AICDA, DNNT, FLT3, HOXA10, BCL6, IRF8, TAL1*'dir.

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi ALL gelişiminde etkili epigenetik değişikliklere ilave olarak *IDH1/2* genlerinde somatik mutasyonlar da görülmektedir. Ph benzeri vakalarda da *IDH1* ve *IDH2* genlerindeki mutasyonların önemli olduğu belirlenmiştir (Montaño ve ark., 2018). Bu genlerde görülen mutasyonlar onkojenik süreçleri aktifleştirmektedir. Mevcut çalışmada bu genlerin ekspresyon analizlerinden elde edilen p değerleri sırasıyla $p=0,881$ ve $p=0,054$ 'tür. Mevcut çalışmanın vaka sayısı arttırıldığında *IDH2*'nin anlamlılığı yakalanabilir niteliktedir.

B-ALL vakalarında *IKZF2* ve *ETV6* genlerinde somatik mutasyonlar görülmektedir. *IKZF2*'de görülen mutasyonlar, düşük hiploidi B-ALL'nin belirleyicisidir (Montaño ve ark., 2018). *ETV6* geni füzyon partneri olarak da ALL patogenezinde yer almakta olup; *RUNX1* geni ile translokasyon sonucu füzyon proteini oluşturmaktadır. *ETV6-RUNX1* translokasyonu B-ALL vakalarında iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Zaliova ve ark., 2016).

Ph benzeri vakalar heterojen genetik yapıya sahip olup, diğer alt gruplarda görülen *TEL-AML1* translokasyonu, *MLL* ve *E2A* yeniden düzenlenmesi, hiperdiploidi ve *BCR-ABL1* translokasyonu bu grupta görülmemektedir. Altta yatan genetik değişikliklerin sıklığı ve genişliği, farklı yaş aralıklarında ve popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Ph benzeri ALL vakalarının %80-90'ında tanımlanmış olan sitokin reseptörleri ve tirozin kinaz sinyal yolaklarına dahil olan genlerde yeniden düzenlenmeler görülmektedir. Ph benzeri ALL vakalarında sıklıkla kromozom 9p ve 20q bölgelerinde delesyonlar görülmektedir (Den Boer ve ark., 2009; Maese ve ark., 2017).

ABL sınıfı füzyonları, Ph benzeri pediatrik vakalarda %10 ve yetişkin vakalarda ise %15 oranında görülmektedir. Bu alt grupta en sık görülen ikinci değişiklik *ABL* sınıfı füzyonlarıdır (*ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRA* ve *PDGFRB*) (Maese ve ark., 2017; Pui ve ark., 2017). Mevcut çalışmada *ABL1* ve *PDGFR α* ($p=0,662$) genlerinin ekspresyon değerleri kontrol örneğine benzer iken, *ABL2* ($p=0,044$), *CSF1R* ($p=0,000$) ve *PDGFR β* ($p=0,000$) genlerinde istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir. Mevcut çalışmada Ph negatif hasta grubunda *ABL2* geni 8 kat, *CSF1R* geni 116 kat, *PDGFR β* geni ise 29 kat düşük eksprese olduğu gösterildi.

Yapılan çalışmalarda, kötü prognoz ile ilerleyen ALL vakalarının B hücre gelişim basamaklarında etkin olan genlerde delesyonların mevcut olduğu ifade edilmektedir. Ph benzeri ALL vakalarında ise %80 oranında bu genlerde delesyonların olduğu görülmektedir. Kromozom 9 üzerindeki delesyona uğramış bölgeler incelendiğinde, 30 Ph benzeri vakanın 5'inde *PAX5* gen bölgesinde kırılmalar görülmektedir. *PAX5* geni, B hücre gelişimin normal sürecinde görev alan transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Ph benzeri vakaların %32'sinde *PAX5* mutasyonu görülmekte olup, bu mutasyonlar ilgili grupta kötü prognostik faktör olarak yorumlanmamaktadır. *PAX5*'te meydana gelen değişiklikler hem lösemnin hem de ilaç direncinin gelişimine katkı sağlamaktadır. Ph pozitif vakalarda ise, *PAX5* geninde yüksek oranda anormallikler gözlenmiştir. Mevcut çalışmada; *PAX5* istatistiksel olarak anlamlılık ($p=0,011$) elde edilen genler arasında yer almaktadır. Bu genin ilgili hasta grubunda 3 kat daha düşük ekspresyonu olduğu belirlenmiştir. B hücre gelişiminde görev alan diğer genlerin fokal delesyonları incelendiğinde, Ph benzeri vakaların %82'sinde bir veya daha fazla delesyonun gerçekleştiği belirlenmiştir. Diğer pre-B ALL alt gruplarında bu delesyonların görülme olasılığı %36'dır. Delesyon görülen genler, *IKZF1*, *E2A (TCF3)*, *EBF1* ve *VPREB1*'dir (Den Boer ve ark., 2009; Mullighan ve ark. 2009; Tasian ve ark., 2017).

IKZF1 geni, B-hücre farklılaşmasında görev alan en önemli transkripsiyon faktörü IKAROS'u kodlamaktadır. Ph benzeri vakalarda *IKZF1*'de meydana gelen fokal delesyonlar ve mutasyonlar oldukça yaygındır. Bu delesyonlar, lösemi patogenezinde ve hastalık sürecinin ilerlemesinde önemli görülmektedir. Pediatrik B ALL vakalarının %15'inde, Ph pozitif alt grupta %70 ve Ph benzeri alt grupta ise %40 oranında *IKZF1* delesyonları veya mutasyonları görülmektedir. Mullighan ve ark.'larının 2009 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, *IKZF1* geninde meydana gelen değişiklikler tedavi sürecine direnç gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Ph benzeri alt grupta, yüksek relaps riski, yüksek MRD seviyeleri ve *IKZF1* değişimleri arasında bir korelasyon vardır. Ancak korelasyonun nedeni henüz açıklanamamıştır (Montaño ve ark. 2018; Mullighan ve ark. 2009; Woo ve ark., 2014;). Mevcut çalışmada, literatürdeki çalışmalardan çok daha yüksek *IKZF1* ekspresyon farklılığının belirlenmesinin nedeni, Ph pozitif hasta sayısının az olmasından kaynaklandığı

düşünülmektedir. *IKZF1* geninin anlamlılık düzeyi $p=0,000$ 'dır ve kontrol örneğine göre 210 kat düşük ekspresyon seviyesine sahiptir.

Ph benzeri ALL vakalarının yaklaşık yarısında *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri veya nokta mutasyonları görülmektedir. Gen ekspresyon profilleri ile Ph benzeri tanısı alan vakalarda ek analizler (füzyon ve mutasyon taraması) gerçekleştirilmektedir. *CRLF2* geninin yüksek ya da düşük ekspresyon seviyeleri RT-qPCR ve FISH analizleri ile incelenmektedir. Bu gende meydana gelen yeniden düzenlenmeler, *IGH-CRLF2* ve *P2RY8-CRLF2* translokasyonları ve nokta mutasyonlarıdır. *P2RY8-CRLF2* füzyonu standart riskli vakalarda, *IGH-CRLF2* füzyonu ise yüksek riskli hasta grubunda daha fazla görülmektedir. *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri hispanik etnik köken ile yakından ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, *CRLF2* yeniden düzenlenmelerin görüldüğü vakalarda *JAK1* ve *JAK2* mutasyonları mevcuttur. *CRLF2* geninin aşırı ekspresyonu, *JAK1/JAK2* mutasyonları ve diğer genomik lezyonlar blastik hücrelerin oluşumunu uyarılmaktadır. *CRLF2* yeniden düzenlenmenin görüldüğü vakaların yaklaşık %40'ında *JAK2* geninde nokta mutasyonları görülmektedir. *CRLF2*, *IL7R*, *JAK2* ve *EPOR* genlerinde görülen genetik değişimler JAK-STAT yolağının aktifleşmesine neden olmaktadır. *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri sonucu *STAT5* aktive edilir ve lösemik blastların oluşumu görülmektedir. *CRLF2* ekspresyonunun düşük olduğu vakaların %45'inde *ABL* sınıfı değişimleri görülmekte iken, yüksek ekspresyon olan vakaların sadece %5'inde *ABL* sınıfı değişiklikleri elde edilmiştir (Den Boer ve ark., 2009; Mullighan ve ark. 2009; Pui ve ark., 2017; Wells ve ark., 2017; Tasian ve ark., 2017). Mevcut tez çalışmasında gerçekleştirilen yüksek ve düşük benzerlik sınıflamaları içerisinde, *CRLF2* geninin istatistiksel anlamlılığı analiz edilmiştir. Düşük benzerlik sınıfına göre Ph benzeri alt gruba yüksek benzerlik gösteren vakalarda *CRLF2* geninin ekspresyon seviyesi 1.08 kat yüksek olarak bulunmuştur ($p=0,318$). Elde edilen veriler doğrultusunda; yüksek ekspresyon değerine sahip vakalarda ileri analizler planlanmakta olup, füzyon ve mutasyon analizlerinin gerçekleştirilmesi öngörülmektedir.

CRLF2 yeniden düzenlenmelerin görüldüğü vakaların yaklaşık %40'ında *JAK1* ve *JAK2* mutasyonları görülmektedir. *JAK2* geni, sitokin reseptör sinyal yollarında yer alan protein tirozin kinazdır. Ph benzeri ALL vakalarında, *CRLF2*

yüksek ekspresyonunun görüldüğü vakalarda *JAK2* mutasyonu veya *JAK2* füzyonu görülmektedir. *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri ve *JAK* mutasyonları, normal lenfoid gelişim için gerekli görülen *IKZF1* değişikliklerinin varlığı ile oldukça ilişkili bulunmuştur (Pui ve ark., 2017; Tasian ve ark., 2017; Woo ve ark., 2014).

Ph benzeri vakaları yaklaşık %7'sinde *JAK2*, %5'inde *EPOR* yeniden düzenlenmeleri görülmektedir. *JAK* genlerinde görülen yeniden düzenlenmeler sonucunda, B hücrelerin yüzeylerinde bulunan EPO reseptörü stabil bir şekilde eksprese olmaktadır. Reseptörün hücre içi sinyal yollarına ilettiği sinyaller sonucunda JAK/STAT sinyal yolağı aktifleşmektedir (Pui ve ark., 2017; Tasian ve ark., 2017). JAK-STAT sinyal yolağının aktifleşmesi, lösemi hücrelerinin kontrolsüz olarak çoğalmasına neden olmaktadır ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. JAK kinaz (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3*) genlerinde meydana gelen mutasyonlar, JAK-STAT yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır (Montaño ve ark., 2018). Mevcut çalışma dahilinde *JAK1* ($p=0,000$), *JAK2* ($p=0,006$), *JAK3* ($p=0,000$) genlerinde de istatistiksel anlamlılık elde edilmiştir. Karşılaştırılan gruplar içerisinde *JAK1* geni 4 kat, *JAK2* geni 3 kat, *JAK3* geni 110 kat down regüle bulunmuştur. Türk vakalarında önemi potansiyel olması nedeniyle, yakın gelecekte yapılandıracağımız kapsamlı projemiz dahilinde *JAK2* geni için mutasyon ve füzyon taramaları öngörülmektedir.

IL7R geninden kodlanan protein, interlökin 7 reseptörüdür ve bu protein lenfosit gelişim basamaklarında önemli role sahiptir. Shalini C. Reshmi ve ark.'nın 1389 B-ALL vakası ile gerçekleştirdikleri çalışmada 284 vaka Ph benzeri ALL olarak tanımlanmıştır. Ph benzeri ALL alt grubu içerisinde 173 vakada *IL7R* mutasyonu tespit etmişlerdir. *IL7R* geninde insersiyonlar veya delesyonlar görülmektedir ve görülen bu genetik değişiklikler JAK/STAT sinyal yolağı aktivasyonuna neden olmaktadır (Reshmi ve ark., 2017; Tasian ve ark., 2017). Mevcut çalışmada *IL7R* geni ($p=0,022$) 7 kat down regüle belirlenmiştir.

EPOR geni, sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olan eritropoietin reseptörünü kodlamaktadır. Eritropoietinin bağlanması ile EPO reseptörü, *JAK2* tirozin kinazı uyararak farklı hücre içi sinyal yollarını (Ras/MAPK, PI3K ve STAT transkripsiyon faktörleri) aktifleştirmektedir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda Ph benzeri ALL vakalarının yaklaşık %1'inde *EPOR* geninin yüksek eksprese olduğu belirtilmektedir.

Ancak, hasta grubumuzda *EPOR* geni ekspresyon seviyeleri normal değerler arasında belirlenmiştir. *JAK2* ve *EPOR* yeniden düzenlenmeleri ve diğer JAK-STAT sinyal yolağında etkili olan genlerde meydana gelen değişiklikler en sık 21-39 yaş arasında “genç erişkin” olarak tanımlanan sınıfta görülmektedir (Maese ve ark., 2017; Tasian ve ark., 2017). Mevcut çalışmada 18 yaş altı vakaların değerlendirilmesi nedeniyle, *EPOR* geniyle ilgili bulgu literatüre benzer niteliktedir.

Ph benzeri ALL vakalarının %3,9’unda *FLT3*’ü aktive eden değişiklikler meydana gelmektedir (Reshmi ve ark., 2017). Mevcut çalışmada, *FLT3* geninin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p=0,281$).

Mevcut tez çalışmasında elde edilen ekspresyon bulguları ve klinik parametrelere göre gerçekleştirilen risk sınıflamaları arasındaki istatistiksel fark değerleri incelenmiştir ve anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p>0,05$).

Ph benzeri ALL vakalarında görülen bu genetik değişimler 5 yıllık genel sağkalım süreçlerinde farklı prognostik öneme sahiptir. Örneğin; *JAK2* ve *EPOR* yeniden düzenlenmelerinin görüldüğü vakalarda 5 yıllık genel sağkalım oranları %26,1’dir. Ras sinyal yolağında görülen genetik değişimler ise %86’lık olumlu prognostik sonuçlar ile ilişkilendirilmiştir. Yetişkin vakalarda görülen yüksek *CRLF2* ekspresyonu, 5 yıllık genel sağkalım değerlendirilmesi yapıldığında %20’den düşük sağkalım oranları ile ilişkilendirilmiştir. Relaps ile ilişkili olarak *NT5C2* geninde görülen spesifik mutasyonlar pediatrik B-ALL vakalarında tanımlanmış olup, *NT5C2* geninin mevcut çalışma dahilinde Ph pozitif kontrol örneği ile benzer ekspresyona sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ışığında, halen pediatrik Ph benzeri ALL vakalarında %10-11 bilinmeyen değişiklikler bulunduğu belirtilmektedir (Den Boer ve ark., 2009; Woo ve ark., 2014).

Mevcut tez çalışmasında, literatür taraması ile belirlenen Ph benzeri grubun ayırtedilmesinde potansiyel önemi olan genler (96 gen) mRNA gen ekspresyon profilleri ile analiz edilmiştir. Literatürde de belirtildiği gibi, bu alt grubun tanımlanması oldukça güçtür ve tek tanı basamağından oluşmamaktadır. Gen ifade profilleri ile ayırt edilerek Ph benzeri ALL şüphesi taşıyan vakaların kesin tanısı için, ileri genetik analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. İleri analizler sonrasında Ph benzeri

ALL grubun doğruluğu ifade edilmektedir. Ph benzeri ALL vakalarının ayırtilmesine katkı sağlayabilecek gen ifade profillerine sahip benzerlik değerinin en yüksek olduğu vakalar, ileri analizlere dahil edilecek vakalar olarak tanımlanmıştır. Tez çalışmasında elde edilen veriler doğrultusunda; Türk Ph benzeri ALL alt grubu hastalarına özgü ekspresyon bulguları ve klinik parametreler değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen grup içerisinde gen ekspresyon bulgularına göre gerçekleştirilen benzerlik sınıflamasında Ph benzeri olma potansiyeli taşıyan 2 vaka belirlenmiştir. Klinik parametrelere göre değerlendirme yapıldığında; yüksek risk sınıflamasında yer alan Ph benzeri olma potansiyeli olan 1 vaka tespit edilmiştir. Mevcut tez çalışması ile ilk kez Türk hastalarında Ph benzeri ALL vakalarının tanımlanmasında önemi potansiyel 36 gen belirlenmiştir. Tez çalışması dahilinde elde edilen bulgular ışığında; belirlenen genler Ph benzeri ALL grubunun tanımlanabilmesi için ön veri niteliğinde olup, gerçekleştirilecek ileri analizler ile Türk Ph benzeri ALL alt grubu hastalarına özgü gen panellerinin oluşturulması planlanmaktadır. Böylece; Ph benzeri alt grubun tanımlanmasını takiben klasik ALL tedavi protokolünün revize edilerek hastaların hedefe yönelik yeni ilaçların ilave edildiği etkin tedavi protokollerinin yapılandırılarak tedaviden bireye özgü fayda sağlaması ve sağkalım oranlarının arttırılması mümkün olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Bailey HD, Infante-Rivard C, Metayer C et al (2015) Home pesticide exposures and risk of childhood leukemia: Findings from the childhood leukemia international consortium. *Int J Cancer* 137:2644-2663.

Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C et al (2005) Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet* 366:635-42.

Belson M, Kingsley B, Holmes A (2007) Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environ Health Perspect* 115(1): 138-145.

Benekli M, Baumann H, Wetzler M (2009) Targeting Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway in Leukemias *J Clin Oncol* 27:4422-4432.

Bernt KM, Hunger SP (2014) Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol* 25:4:54.

Boer JM, Den Boer ML (2017) BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukaemia: From bench to bedside. *Eur J Cancer* 82:203-218.

Boylu C (2012) Hematoloji'de Mikroarray Kullanımı, <http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/cemaliyeakerli.pdf> (30.07.2019)

Buka I, Koranteng S, Osornio Vargas AR (2007) Trends in childhood cancer incidence: review of environmental linkages. *Pediatr Clin North Am.* 54:177-203.

Cilloni D, Saglio G (2012) Molecular Pathways: BCR-ABL. *Molecular Pathways. Clinical Cancer Research* Volume 18, Issue 4.

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

Dalva K (2012) Hematoloji'de Akım Sitometri Kullanımı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Hematoloji Ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu.

Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H et al (2001) Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome. *NEJM* 344: 1038-1042.

Faderl S, Jeha S, Kantarjian MH (2003) The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer.* 98: 1337-54.

Feychting M, Ahlbom A (1993) Magnetic fields and cancer in children residing near Swedish high-voltage powers lines. *Am J Epidemiol* 138; 467-481.

Fielding AK (2010) How I treat Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 116:3409-3417.

Fletcher JA, Lynch EA, Kimball VM (1991) Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 77(3):435-9.

Garcia R, Bowman TL, Niu G et al (2001) Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20(20):2499-513.

Gleissner B, Gokbuget N, Bartram CR et al. (2002) Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 99:1536-1543.

Graux C 2011 Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfus Apher Sci* 44(2):183-9.

Greaves MF (1997) Aetiology of acute leukemia. *Lancet* 349:344-349.

Greaves MF (2004) Biological models for leukaemia and lymphoma. *IARC Sci Publ* (157):351-72.

Harrison DA (2012) The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(3): a011205

Hematoloji'de Mikroarray Kullanımı Dr. Cemaliye Boylu-Akyerli Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara.

Hematoloji'de Real Time PCR Dr. Müge Aydın-Sayitoğlu İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul.

Hrusák O, Porwit-MacDonald A (2002) Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 16(7):1233-58.

<https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/31096,turkcesiydijiv1pdf.pdf?0>
(30.07.2019)

<https://gco.iarc.fr/> (30.07.2019)

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABL1> (30.07.2019)

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCR> (30.07.2019)

Inaba H, Greaves M, Mullighan CG (2013) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381(9881).

Jane De Lartigue (2018) Novel Approaches Show Promise In Targeting JAK Pathway. *Oncologylive* 19/1.

Johnson A, Alberts B, Morgan D et al (2014) *Molecular Biology of the Cell*, 6th Edition, Garland Science.

Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ et al (2016) The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer* 35: 48.

Kantarjian HM, Walters RS, Keating MJ et al (1990) Results of the vincristine, doxorubicin, and dexamethasone regimen in adults with standard- and high-risk acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 8:994-1004.

Klipp E, Liembermeister W (2006) Mathematical modeling of intracellular signaling pathways. *BMC Neuroscience* 7S10.

Kocak U, Gursel T, Kaya Z (2012) ALL-BFM 95 treatment in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia--experience of a single center. *Pediatr Hematol Oncol* 29:130-140.

Kusuyama M, Matsumoto K, Matsumoto T (1997) Childhood leukemia: epidemiological investigation and effectiveness in treatment in Nagasaki over the past 12 years. *Acta Paediatr Jpn* 39:181-187.

Lag R, Smith MA, Gurney JG et al (1999) Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1999. <https://seer.cancer.gov/archive/publications/childhood/childhood-monograph.pdf>,
(30.07.2019)

Lartigue J (2018) Novel Approaches Tackle the JAK Pathway Beyond Ruxolitinib and Myelofibrosis. *Targeted Therapies in Oncology*.

- Levy D.E, Darnell Jr JE (2002) STATs: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, pages651–662.
- Lim CP, Cao X (2006) Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol.BioSyst.* 2, 536–550.
- Linnet MS, Hatch EE, Kleinerman RA (1997) Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. *N. Engl. J. Med* 337; 1-7.
- Lopes BA, Barbosa, TC, Bruna K.S et al (2017) IKZF1 Gene in Childhood B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: Interplay between Genetic Susceptibility and Somatic Abnormalities. *Cancer Prev Res (Phila)* 10(12):738-744.
- Lydon N (2009) Attacking cancer at its foundation. *Nature Medicine* 15, 1153-1157.
- Malouf C, Ottersbach K (2018) Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Mol Life Sci* 75(3): 417–446.
- Marke R, Frank N, Leeuwen V (2018) The Many Faces Of IKZF1 In B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Haematologica* 103: 565-574.
- Montano A, Forero-Castro M, Marchena-Mendoza D et al (2018) New Challenges in Targeting Signaling Pathways in Acute Lymphoblastic Leukemia by NGS Approaches: An Update. *Cancers (Basel)* 10(4):110
- Möricke A, Reiter A, Zimmermann M (2008) Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival. *Blood*11:4477-89.
- Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC et al (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(23):9414-8.
- Okamoto T, Okabe S (2000) Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med* (6):657-9.
- Okutucu B, Pehlivan S (2003) Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Dergipark* 12:138 138
- Pieters R, Carroll WL (2008) Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin N Am* 55:1–20.
- Puckett Y, Chan O (2019) Cancer, Acute Lymphocytic Leukemia (ALL). *Pubmed Book*.
- Pui CH (1996) Genetics findings in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic and therapeutic implications. *Trends in Onco- Hematology* 4: 72-74.
- Pui CH, Evans WE (1998) Drug therapy: Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 339:605.
- Pui CH, Evans WE (2006) Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354:166-178.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR (2004) Mechanism of disease: Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350:1535-48.
- Pui CH, Roberts KG, Yang JJ et al (2017) Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leukemia* 17(8):464-470.
- Pui CH, Robison LL, Look AT (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371(9617):1030-43.
- Pui CH, Yang JJ, Hunger SP et al (2015) Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol* 2015 Sep 20;33(27):2938-48.

Reshmi SC, Harvey RC, Roberts KG et al (2017) Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group. *Blood* 129:3352-3361.

Robert S. Hillman, Kenneth A. Ault, Michel Leparrier (2010) *Hematology in Clinical Practice*, 5th Edition, LANGE Clinical Medicine, McGraw-Hill Education.

Roberts KG, Payne-Turner Y, Li, D., Harvey R.C., et al (2015) Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 11; 371(11):1005–1015.

Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D et al (2014) Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 371(11):1005-15.

Rowley JD, Michelle M, Terence LB, Rabbitts H (2015) Editors *Chromosomal Translocations and Genome Rearrangements in Cancer*. © Springer International Publishing, Switzerland, Chapter 7, pp: 109-111

Sayitoğlu MA (2012) Moleküler Hematoloji Ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu. <http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/mugeaydinsayitoglu.pdf> (30.07.2019).

Schindler C, Plumlee C (2008) Interferons and the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19(4): 311–318.

Severson EA, Gay LM, Daniel S et al (2017) Comprehensive Genomic Profiling Identifies Genomic Alterations That Define Philadelphia-like B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 130:476.

Sholikah TA (2017) Fusion Gene Bcr-Abl: From Etiopathogenesis To The Management Of Chronic Myeloid Leukemia. Volume 8, pp 29-37.

Shu XO, Linet MS, Steinbuch M, et al (1999) Breast-feeding and risk of childhood acute leukemia. *J Natl Cancer Inst* 91: 1765-1772.

Siegele BJ, Nardi V (2018) Laboratory testing in BCR-ABL1-like (Philadelphia-like) B-lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Am J Hematol* 93(7):971-977.

Tasian SK, Loh LM, Hunger SP (2017) Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 130:2064-2072.

Tosi S, Reid AG (2016) *The Genetic Basis of Haematological Cancers*. © 2016 by John Wiley & Sons Ltd, UK, pp: 236-237.

Tran TH, Loh ML (2016) Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (1):561-566.

Trujillo AM, Linares A, Sarmiento IC (2016) Intensive chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. Interim analysis in a referral center in Colombia. *Rev. Fac. Med* Vol. 64 No. 3: 417-25 417.

Tsukasaki K (2012) Adult T-cell leukemia-lymphoma. *Hematology* 17 Suppl 1:32-35.

Ünal S, Tuncer AM (2004) Lösemide epidemiyoloji, tanısal yaklaşım ve sınıflandırma. *Katkı pediatri dergisi* 338-349.

Vainchenker W, Constantinescu SN (2013) JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* Volume 32 Pages 2601–2613.

Wells J, Jain N, Konopleva M (2017) Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress in a New Cancer Subtype. *Clin Adv Hematol Oncol* 15(7):554-561.

Wen W, Shu XO, Potter JD et al (2002) Parental medication use and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 95:1786-1794.

Whitehead TP, Metayer C, Wiemels JL et al (2016) Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 46(10): 317–352.

Woo JS, Alberti MO, Tirado CA (2014) Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Exp Hematol Oncol* 13;3:16.

Yamagishi M, Watanabe T (2012) Molecular hallmarks of adult T cell leukemia. *Front Microbiol* 3:334.

Yang X, Stella XY, Davies SM et al (2003) Trends in Leukemia Incidence and Survival in the United States (1973–1998). *Cancer* 97: 2229-35.

Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S et al (2010) Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(1): 252–257.

Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA et al (2001) Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20:2499-513.

Zaliova M, Moorman AV, Cazzaniga G et al (2016) Characterization Of Leukemias With ETV6-ABL1 Fusion. *Haematologica* 101:1082-1093.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

ABL1: Proto-onkogen 1, reseptör olmayan tirozin kinaz, v-Abl Abelson Murine Lösemi Viral Onkojen Homolog 1

ABL2: Proto-onkogen 2, reseptör olmayan tirozin kinaz, v-Abl Abelson Murine Lösemi Viral Onkojen Homolog 2

ACTB: Aktin Beta

AICDA: Aktivasyon İndüklenen Sitidin Deaminaz

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi

BCL11B: Radyasyona Bağlı Tümör Baskılayıcı Gen 1 Protein, BAF chromatin remodeling complex subunit BCL11B

BCL2: Apoptoz Regülatörü

BCL6: Transkripsiyon Baskılayıcı

BCP-ALL: B Hücre Prekürsör Akut Lenfoblastik Lösemi

BCR: RhoGEF ve GTPase aktive edici Protein

BLNK: B Hücre Bağlayıcı

BRAF: B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Treonin Kinaz

CA6: Karbonik Anhidraz 6

CCG: Çocuk Kanseri Grubu

CD274: CD274 molekülü

CD99: CD99 molekülü

CHD1: Kromodomain Helikaz DNA bağlayıcı Protein 1

CNS: Santral Sinir Sistemi

CREBBP: CREB Bağlayıcı Protein

CRLF2: Sitokin Reseptör Benzeri Faktör 2, TSLP Reseptörü

CSF1R: Koloni Uyarıcı Faktör 1 Reseptörü

CTLA4: Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Protein 4

DNM2: Dynamın 2

DNTT: DNA Nükleotidileksotransferaz
EBF1: EBF Transkripsiyon Faktör 1
EPOR: Eritropoietin Reseptör
ETV6: ETS Variant 6
FAB: French-American-British Sınıflaması
FBXW7: F-Box ve WD Tekrarlayan Domain İçeren 7
FGFR1: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptör 1
FISH: Floresan In-Situ Hibridizasyon
FLT3: Reseptör Tip Tirozin Protein Kinaz
G6PD: Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GAPDH: Glisetaldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GPR110: G Protein Bağlantılı Reseptör 110
HGB: Hemoglobin
HOXA10: Homeobox A10
HOXA9: Homeobox A9
IDH1: İzositrat Dehidrojenaz (NADP (+)) 1, Sitosolik
IDH2: İzositrat Dehidrojenaz (NADP (+)) 2, Mitokondriyal
IFITM1: İnterferon Kaynaklı Transmembran Proteini 1
IFITM2: İnterferon Kaynaklı Transmembran Proteini 2
IKZF1: Çinko parmak proteini, alt ailesi 1A
IKZF2: Çinko parmak proteini, alt ailesi 2A
IKZF3: Çinko parmak proteini, alt ailesi 3A
IL7R: İnterlökin 7 Reseptör
IRF4: İnterferon Düzenleyici Faktör 4
IRF8: İnterferon Düzenleyici Faktör 8
JAK1: Tirozin-Protein Kinaz JAK1
JAK2: Tirozin-Protein Kinaz JAK2
JAK3: Tirozin-Protein Kinaz JAK3

JCHAIN: İmmünoglobulin J Polipeptid, İmmünoglobulin Alfa ve Mu Polipeptidler İçin Bağlayıcı

KDM6A: Lisin Demetilaz 6A

KİT: Kemik İliği Transplantasyonu

KLF2: Kruppel Benzeri Faktör 2

KML: Kronik Miyeloid Lösemi

KMT2A: Lisin Metiltransferaz 2A

KRAS: Proto-Onkogen, GTPase

LMO1: LIM etki alanı

LYL1: Temel Helix-Loop-Helix Aile Üyesi, Lenfoblastik Lösemi İlişkili Hematopoez Regülatörü 1

MLLT4: AFDN, Afadin, Adherens Junction Formation Factor

MPL: Proto-onkogen, Trombopoietin reseptör, Miyeloproliferatif Lösemi Virüsü Onkogen

MRD: Minimal Rezidüel Hastalık

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

MUC4: Müsin 4, Hücre Yüzeyi İlişkili

MYC: Proto-onkogen, BHLH Transkripsiyon Faktörü

NCI: Ulusal Kanser Enstitüsü

NF1: Neurofibromin 1

NGS: Yeni Nesil Dizileme

NOTCH1: Notch Receptör 1

NRAS: NRAS Proto-Onkogen, GTPase

NT5C2: 5'-Nükleotidaz, Sitosolik II

NTRK3: Nörotrofik Reseptör Tirozin Kinaz 3

NUDT4: Nudix Hidrolaz 4

NUP214: Nükleoporin 214

NUP98: Nükleoporin 98

P2RY8: P2Y Reseptör Aile Üyesi 8

PAG1: Glikosfingolipid Mikro Etki Alanları ile Fosfoprotein Membran 1
PAX5: Paired Box 5, B-Cell Lineage Spesifik Aktivatör
PBX1: PBX Homeobox 1, Pre-B-Hücreli Lösemi Transkripsiyon Faktörü 1
PDCD1: Programlanmış Hücre Ölümü 1
PDCD1LG2: Programlanmış Hücre Ölümü 1 Ligand 2
PDGFRA: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptör Alfa
PDGFRB: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptör Beta
Ph: Philadelphia Kromozomu
PICALM: Fosfatidilinositol Bağlayıcı Clathrin Birleştirici Proteini
PLT: Trombosit, Platelet
PTK2B: Protein Tirozin Kinaz 2 Beta
PTPN1: Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 1
PTPN11: Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11
RAG1: Rekombinasyon Aktive 1, V(D)J Rekombinasyon-Aktive Edici Protein 1
RAG2: Rekombinasyon Aktive 2, V(D)J Rekombinasyon-Aktive Edici Protein 2
RBC: Kırmızı Kan Hücresi, Erisrosit
RT-PCR: Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RUNX1: *RUNX* ailesi transkripsiyon faktörü 1
SEMA6A: Semaphorin 6
SETD2: SET Domain Containing 2, Histone Lysine Metiltransferaz
SH2B3: *SH2B* Adaptör Protein 3
SOCS1: Sitokin Sinyalini Baskılayıcı 1
SOCS2: Sitokin Sinyalini Baskılayıcı 2
SOX11: SRY-Box 11
STAT3: Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyonun Aktivatörü 3
STAT5B: Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyonun Aktivatörü 5B
STIL: Centriolar Birleştirme Proteini
TALI: Eritroid Farklılaşma Faktörü

T-ALL: T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

TCF3: Transkripsiyon Faktör 3, Immüoglobulin Transkripsiyon Faktör 1

TLX1: T Hücreli Lösemi Homeobox 1

TLX3: T Hücreli Lösemi Homeobox 3

TP53INP1: Tümör Proteini P53 İndüklenebilir Nükleer Protein 1

TYK2: Tirozin Kinaz 2

WBC: Beyaz Kan Hücresi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

WT1: Transkripsiyon Faktörü

ZCCHC7: Çinko Parmak CCHC Tipi İçeren 7

8. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez projemin planlanması ve yürütülmesi süreçlerinde, pozitif düşünce ve enerjisi ile karşılaştığımız tüm olumsuz durumlarda desteğini, deneyimini, saygısını ve bilimsel katkılarını esirgemeyen çok sevgili danışman hocam Sn. Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Anabilim Dalı Başkanımız, Sn. Prof. Dr. Ünal EGELİ'ye ve Sn. Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya yüksek lisans eğitim sürecim boyunca gösterdikleri ilgi, sabır, şefkat ve bilimsel katkılardan dolayı teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Biricik kızlarının bugünlere gelmesinde büyük emek harcayan, hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, benimle üzülp yine benimle sevinen ve sevgileriyle her zaman güç bulduğum canım annem Sn. Gülten EFENDİ ve canım babam Sn. Mustafa EFENDİ'ye sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Hayatım boyunca her daim yanımda olduğumu bildiğim, bu süreçteki tüm sıkıntılara ve isyanlarıma katlanıp destek olan Sn. Emre Ufuk ERDEM'e sonsuz sevgilerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden beri manevi destekleriyle yanımda olan, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Sn. Havva TEZCAN, Sn. Dilara Kamer ÇOLAK, Sn. Melis MUTLU, Sn. Ufuk ÜNAL ve Sn. Çağla TEKİN'e, anabilim dalımızdaki yardımcı personellere ve desteklerinden dolayı tüm sevdiklerime teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Son olarak, tez çalışmamı sevgili anneannem Sn.Emine OĞUZHAN ve sevgili dedem Sn.Mustafa OĞUZHAN'a ithaf ediyorum.

9. ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Bursa’da doğmuştur. İlköğrenimini Bursa Dr. Ayten Bozkaya İlköğretim Okulu’nda, ortaöğrenimini ise Bursa Ertuğrul Gazi Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. 2013 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimine başlamış ve 2017 yılının Mayıs ayında mezun olmuştur. Aynı yıl, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp-Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamış ve halen devam etmektedir. Yüksek lisans tezi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP, OUAP(T)-2019/7) tarafından “Pediatrik Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemilerin Biyolojisi” adlı proje ile desteklenmiştir.