



**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İZOLE 13q DELESYONU SAPTANAN KLL OLGULARINDA  
NOTCH1 VE SF3B1 GENLERİNDE MUTASYON ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gülçin GÜNDEN**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS**

**2020**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Gülçin Günden 'in Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “İzole 13q Delesyonu Saptanan KLL Olgularında *NOTCH1* ve *SF3B1* Genlerinde Mutasyon Analizi” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

06 / 01 / 2020

Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS (Danışman)

Doç. Dr. Onur EROĞLU

Dr. Öğr. Üy. Oğuz ÇİLİNGİR

Dr. Öğr. Üy. Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / ... tarih ve ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Özkan ALATAŞ

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### İzole 13q Delesyonu Saptanan KLL Olgularında *NOTCH1* ve *SF3B1* Genlerinde Mutasyon Analizi

Kronik lenfositik lösemi (KLL) lenfoid seriden köken alan ve karakteristik genetik değişikliklerin bulunduğu bir lösemi tipi olarak tanımlanmaktadır. Kronik lenfositik lösemide genetik değişiklikler, kromozomal aberasyonlar ve gen mutasyonlarıdır. Literatürlerde en sık gözlenen kromozomal aberasyonlar ise 13. ve 11. kromozomun uzun kol delesyonu (del13q, del11q), 17. kromozomun kısa kol delesyonu (del17p) ve 12. kromozomun trizomisi olarak bildirilmiştir. Belirtilen anomalilerden izole del13q iyi prognostik olarak kabul edilmektedir. Fakat bazı literatürlerde 13. kromozomun uzun kolundaki delesyonun büyüklüğü ile delesyona ek anomalilerin varlığının prognozu etkilediği bildirilmiştir. Kronik lenfositik lösemi belirtilen kromozomal aberasyonların yanında sıklıkla *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*, *TP53* ve *XPO1* genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Belirtilen genler içinde *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinin hücre siklusunda, apoptoz ve RNA splicing gibi hücre işlevinde önemli mekanizmalarda görevli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerindeki mutasyonların hastalığın patogenezinde önemli etkilerinin olması beklenilmektedir. Ek olarak literatürlerden elde edilen bilgiler doğrultusunda belirlediğimiz genlerin hastaların tedaviye başlama süreleri ve sağkalım süresi üzerine etkileri bulunduğu da bildirilmektedir. Biz de çalışmamızda FISH yöntemiyle belirlediğimiz izole del13q saptanan kırk üç hastada kötü prognostik etkisi olan *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinde mutasyon profilini Sanger Sekanslama yöntemiyle inceledik. Belirtilen hasta grubunda *NOTCH1* geninde en sık görülen 7541\_7542delCT mutasyonunu bir hastada (%2.4) saptarken, *SF3B1* geninde mutasyon saptayamadık.

Çalışmamızda *SF3B1* ve *NOTCH1* genlerinde hasta sayısının ve mutasyon oranlarının az olması nedeni ile del13q oranları, *RB1* gen delesyon varlığı, hastalık evreleri, tedaviye başlama süresi ve OS parametreler ile ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Ancak olgu serimizde sadece 1 hastada *NOTCH1* geninde mutasyon bulunması; ilgili mutasyon ile del13q hasta grubu arasında bir ilişkinin olmadığını düşündürmektedir. Yapılan literatür değerlendirmesinde çalışmamız Türk popülasyonunda FISH yöntemi ile izole del13q saptanan KLL hastalarında ilgili genlerin mutasyonel durumunu değerlendiren ilk çalışma olarak görülmekte ve bu yönü ile literatüre katkı sağlamaktayız.

**Anahtar Kelimeler: NOTCH1 geni, KLL, Sanger sekans, SF3B1 geni**

## SUMMARY

### Mutations Analyzing Of *NOTCH1* and *SF3B1* genes in Cases with CLL Detected Isole 13q Deletion

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is defined as a type of leukemia originating from the lymphoid series with characteristic genetic changes. Genetic changes, chromosomal aberrations and gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. The most common chromosomal aberrations in the literature have been reported as deletion of the long arm of the 13th and 11th chromosomes (del13q, del11q), deletion of the short arm of the 17th chromosome (del17p) and trisomy of the 12th chromosome. Del13q isolated from the mentioned anomalies is considered to be good prognostic. However, in some literature, it has been reported that the size of the long arm of chromosome 13 and the presence of additional anomalies affect the prognosis. In addition to chromosomal aberrations with chronic lymphocytic leukemia, mutations in the genes of *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*, *TP53* and *XPO1* are frequently detected. Among the mentioned genes, *NOTCH1* and *SF3B1* genes are known to be involved in cell cycle, apoptosis and important mechanisms in cell process such as RNA splicing. Therefore, mutations in *NOTCH1* and *SF3B1* genes are expected to have important effects on the pathogenesis of the disease. In addition, it has been reported that the genes we identified in accordance with the information obtained from the literature have effects on the duration of treatment and survival time of the patients. In our study, we investigated the mutation profile of *NOTCH1* and *SF3B1* genes with poor prognostic effect in forty-three patients with isolated del13q detected by FISH method by Sanger Sequencing method. We detected 7541\_7542delCT mutation in *NOTCH1* gene in one patient (2.4%), but we could not detect mutations in *SF3B1* gene.

In our study, due to the low number of patients and mutation rates in *SF3B1* and *NOTCH1* genes, del13q rates, presence of *RB1* deletion, disease stages, duration of treatment and OS parameters could not be evaluated statistically. However, in our case series, only 1 patient had mutations in *NOTCH1* gene; suggest that there is no relationship between the relevant mutation and the del13q patient group. In the literature review, our study is seen as the first study evaluating the mutational status of related genes in CLL patients with isolated del13q detected by FISH method in Turkish population and we contribute to the literature with this aspect.

**Key Words:** NOTCH1 gene, CLL, Sanger sequencing, SF3B1 gene

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	III
SUMMARY.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİ .....	3
2.1. Hematolojik Maligniteler .....	3
2.1.1. Kronik lenfositik lösemi ve epidemiyolojisi.....	4
2.2. Kronik Lenfositik Lösemide Genetik Değişimler.....	7
2.2.1. Kronik lenfositik lösemide kromozomal aberasyonlar ve moleküler Patolojileri .....	7
2.2.1.1. Delesyon 13q14 ve ilişkili Genler.....	8
2.2.1.2. Delesyon 17p ve TP53 geni.....	9
2.2.1.3. Trizomi 12.....	10
2.2.1.4. Delesyon 11q22-23 .....	11
2.2.2. KLL'de somatik mutasyonlar ve moleküler patolojileri .....	12
2.2.2.1. ATM geni ve moleküler patolojisi.....	12
2.2.2.1. MYD88 geni ve moleküler patolojisi .....	12
2.2.2.3. NOTCH sinyali ve moleküler mekanizması .....	14
2.2.2.4. SF3B1 geni ve moleküler mekanizması.....	17
3. GEREÇLER ve YÖNTEM .....	19
3.1. Gereçler.....	19
3.1.1. Kimyasal malzemeler.....	19

3.1.2. Sarf malzemeler ve cihazlar .....	20
3.2. Yöntem .....	20
3.2.1. DNA izolasyonu .....	20
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu .....	21
3.2.3. Jel elektroforezi .....	22
3.2.3.1. Agaroz jelin hazırlanması (%2'lik) .....	22
3.2.4. DNA dizi analizi ve basamakları.....	23
3.2.4.1. PZR ürününün temizlenmesi .....	23
3.2.4.2. DNA dizi analizi reaksiyonunun hazırlanması .....	23
3.2.4.3. Sephadex pürifikasyonu .....	23
3.2.4.3.1. Sephadex solüsyonunun hazırlanması.....	24
3.2.5. Cihaza yükleme ve değerlendirme .....	25
4. BULGULAR .....	26
4.1. İstatiksel Analiz Sonucu .....	32
5. TARTIŞMA.....	33
5.1. Genel Mutasyon Oranın Değerlendirilmesi .....	33
5.2. 5.2. NOTCH1 ve SF3B1 Genlerinin Mutasyonlarının 13q Delesyonlu Olgular ile İlişkisi .....	36
5.3. NOTCH1 ve SF3B1 Genlerinin Mutasyonlarının RAI Evreleri, OS ve TTT olan ilişkileri.....	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	46



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 3.1.</b> Sarf Malzemeler ve Cihazlar.....	20
<b>Tablo 3.2.</b> PZR Aşamasında Kullanılan Reaktifler ve Miktarları.....	21
<b>Tablo 3.3.</b> Gerçekleştirilen PZR Aşamasının Optimal Şartları.....	22
<b>Tablo 3.4.</b> DNA Dizi Analizi Reaksiyonunda Kullanılan Reaktifler.....	24
<b>Tablo 3.5.</b> Dizilemede Gerçekleştirilen PZR Reaksiyonun Optimal Şartları.....	24
<b>Tablo 4.1.</b> Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Klinik Verileri İle Birlikte Moleküler Patolojileri.....	27
<b>Tablo 4.2.</b> <i>NOTCH1</i> ve <i>SF3B1</i> Genlerinde Sanger Sekanslama Yöntemi İle Değerlendirilen Hedef Mutasyonlar.....	29
<b>Tablo 5.1.</b> Literatürlerde KLL Hastalarından Elde Edinilen Verilerin Özeti.....	35
<b>Tablo 5.2.</b> Literatürlerde 13q Delesyonlu KLL Olgularında Elde Edinilen Verileri Özeti.....	39

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Lösemnin Ana Tiplerini Sistemantik Olarak Gösterimi.....	3
<b>Şekil 2.2.</b> <i>IGHV</i> Geninin Mutasyonel Durumu ve Klinik Açından Sebep Olduğu Farklılıklar.....	5
<b>Şekil 2.3.</b> KLL Hücrelerinin Hücresel Orjinleri ve <i>IGHV</i> Geninin Mutasyonel Durumu.....	6
<b>Şekil 2.4.</b> 13q14 Delesyon Bölgelerinin Şematik Gösterimi.....	8
<b>Şekil 2.5.</b> <i>TP53</i> Geninin Kromozomal Lokalizasyonu ve FISH Yöntemiyle Saptanabilen MDR Bölgesinin Şematik Gösterimi.....	9
<b>Şekil 2.6.</b> KLL'de Kromozom 12 Trizomisinin <i>MDM2</i> Geni Üzerinden Moleküler Yolaklara Olan Etkisi.....	11
<b>Şekil 2.7.</b> KLL'de <i>ATM</i> Geninin Yapısal Değişimlerinin Mekanizmaları.....	13
<b>Şekil 2.8.</b> Hücre Kaderinin Kararında <i>NOTCH</i> Yolağının Rolüne Genel.....	15
<b>Şekil 2.9.</b> KLL'de <i>NOTCH1</i> Geninin Mutasyonlarının Meydana Geldiği Bölgeler ve Hastalık Üzerine Etkileri.....	16
<b>Şekil 2.10.</b> <i>SF3B1</i> Proteinin Sistemantik Diagramını, Fonksiyonel Bölgelerini ve Somatik Mutasyonlarının Sayısını Gösterimi.....	18
<b>Şekil 4.1.</b> Hastaların Toplam Yaşam Sürelerinin Grafik Olarak Gösterimi.....	28
<b>Şekil 4.2.</b> Olgu-21'e Ait FISH Yöntemi İle Tespit Edilmiş Delesyon 13q14 Görüntüsü.....	30
<b>Şekil 4.3.</b> Olgu-21'e Ait FISH Yöntemi İle Tespit Edilmiş <i>RB1</i> Delesyon Görüntüsü.....	30

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam ediyor)

<b>Şekil 4.4.</b> Olgu-21'e Ait <i>NOTCH1</i> Geninde 7541_7542delCT Mutasyonu Forward Yönde Sekans Görüntüsü.....	.31
<b>Şekil 4.5.</b> Olgu-21'e Ait <i>NOTCH1</i> Geninde 7541_7542delCT Mutasyonu Revers Yönde Sekans Görüntüsü.....	31
<b>Şekil 5.1.</b> Delesyon 13q saptanan KLL hastalarında <i>NOTCH1</i> ve <i>SF3B1</i> genlerinin TTT ve OS Etkisi.....	42

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu$ l	:Mikro litre
ATM	:Ataksi Telenjektazi mutant geni
BCR	:B hücre reseptör
BIRC3	:Baculoviral IAP Tekrar Kapsayan 3 geni
CCND1	:Siklin D1
Del	:Delesyon
dH <sub>2</sub> O	:Distile su
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DSB	:Çift iplik kırıkları
EtBr	:Etidyum bromür
FISH	:Floresan in situ hibridizasyon
IGHV	:İmmüoglobulin ağır zincir
KLL	:Kronik lenfositik lösemi
MYD88	:Miyeloid Farklılaşma primer yanıt 88
NGS	:Yeni Nesil Sekanslama

NOTCH1	:Nörogenik lokus notch homolog protein 1
OS	:Toplam yaşam süresi
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
Rb	:Retinoblastom
RNA	:Ribonükleik asit
SF3B1	:Splisozom faktör-3B1
sIg	:Yüzey immünoglobülinleri
SNP	:Tek nükleotid polimorfizm
TBE	:Tris buffer EDTA
TLR	:Toll benzeri reseptör
TTT	:Tedaviye başlama süresi
XPO1	:Exportin
WES	:Tüm Ekzom Sekanslama
WGS	:Tüm Genom Sekanslama



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi batı ülkelerinde görülen en yaygın lösemi tipi olarak bilinmektedir. Hastalık genellikle erişkin bireylerde görülmekte olup, hastaların klinik progresyonları yüksek oranda değişkenlik göstermektedir (Hallek, 2017). *İmmüoglobülin ağır zincir* geninin mutasyonel durumu, genomik değişimler, ek hastalıklar ve yaş gibi birçok faktör hastalardaki yüksek orandaki klinik değişkenliği açıklamaktadır. Literatürde tanı için birçok çalışma yer almakta ve bu çalışmaların özellikle genomik değişimlere yönelik olduğu görülmektedir. Bu genomik değişimlerin kendi içerisinde de bir heterojenlik gösterdiği, birçok kromozomal aberasyonları ve gen mutasyonlarını içerdiği bilinmektedir. Kromozomal aberasyonlar (en sık del13q14, del17p13, trizomi 12 ve del11q22) ile birlikte gen mutasyonlarının (*NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88*, *IGHV* ve *XPO1* vb.) hastalığın patogenezinde ve prognozunda önemli rol oynadığı ve tedavi stratejisinde etkili olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda da yer alan kromozom 13'ün q14 bölgesinin delesyonunun sadece izole olduğu durumlarda iyi prognoz gösterdiği bilinmektedir. Çalışmalarda belirtilen kromozomal aberasyona ek kötü prognostik marker olarak bilinen gen mutasyonlarının (*IGHV*, *NOTCH1* ve *SF3B1* gibi) varlığının, hastalık prognozunu olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmektedir. Ayrıca izole del13q bulunan KLL hastalarının örneklerinde yapılan çalışmalarda, *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerini içeren birçok genin mutasyonel durumu incelenmiş ve del13q kromozomal aberasyonu ile *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinin mutasyonlarının ilişkisi değerlendirilmiştir. Belirtilen kromozomal aberasyonun varlığında bu genlerin mutasyonlarının prognoza (OS ve TTT) olan etkisi değerlendirilmiştir. Literatürde yukarıda bahsedilen ilişkilere yönelik elde edilen veriler arasında çelişkiler bulunduğu görülmektedir. Çalışmalarda ilgili genlerin mutasyonlarının oranları arasında değişkenlik olduğu gibi, *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinin mutasyonel durumu ile del13q kromozomal aberasyonu ilişkisiyle ilgili de farklılıklar bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, *NOTCH1* ve *SF3B1* gen mutasyonlarının ileri hastalık evreleri, kısa OS ve TTT ile de ilişkilendirilmiştir.

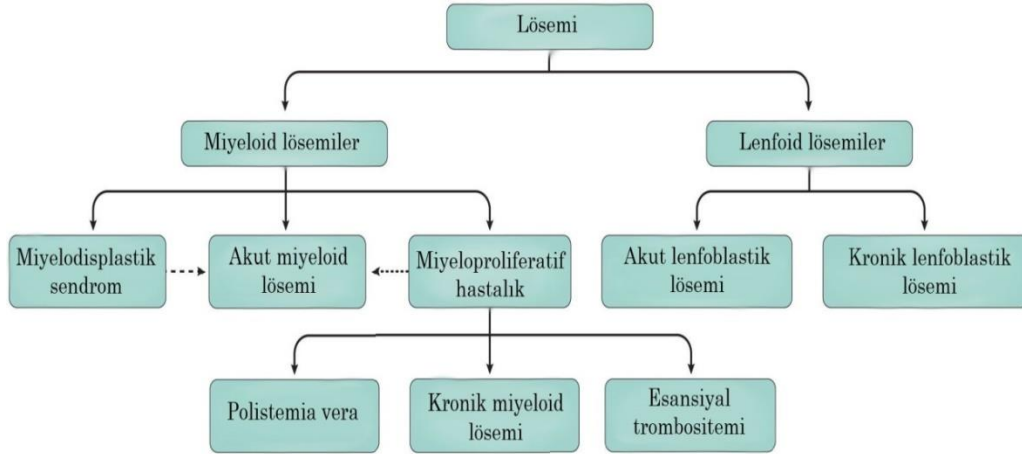
Literatürdeki bu verilere dayanarak biz de çalışmamızda FISH yöntemiyle belirlediğimiz izole del13q saptanan kırk üç KLL tanısı almış hastada kötü prognostik etkisi olan *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinde mutasyon profilini Sanger Sekanslama yöntemiyle incelemesi hedeflenmiştir. Ek olarak izole 13q KLL hastalarında ilgili genlerin mutasyonel durumunu, hastalara ait OS ve TTT parametreleri ile ilişkisini değerlendirilmesi hedeflenmiştir.



## 2.GENEL BİLGİ

### 2.1. Hematolojik Maligniteler

Periferik kan hücrelerinin büyük bir kısmının üretimi, hematopoez olarak adlandırılmaktadır. Hematopoez sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörlerinin yanı sıra transkripsiyon faktör ağları ile kontrol edilmektedir. Hematopoetik kökenin yeniden programlanmasında ise sadece transkripsiyon faktörlerinin değil mikroçevreninde rolü olduğu bilinmektedir. Bu kompleks mekanizmanın moleküler deregülasyonu (hiperproliferasyonu, büyüme faktörlerine sensivite ve farklılaşmada blokaj gibi) hematolojik malignitelere neden olmaktadır. Ek olarak sinyal yollarının deregülasyonunun da lösemik transformasyona sebep olduğu belirtilmektedir (Grech, Avellino & Schembri Wismayer, 2009).



**Şekil 2.1.** Lösemnin Ana Tiplerini Sistematiik Olarak Gösterimi (Khwaja vd., 2016)'den değiştirilerek alınmıştır.

Lösemiler klasik olarak seyirlerine göre akut ve kronik, hücre orjinlerine göre miyeloid ve lenfoid olarak sınıflandırılmaktadırlar (Khwaja vd., 2016) (Şekil 2.1).

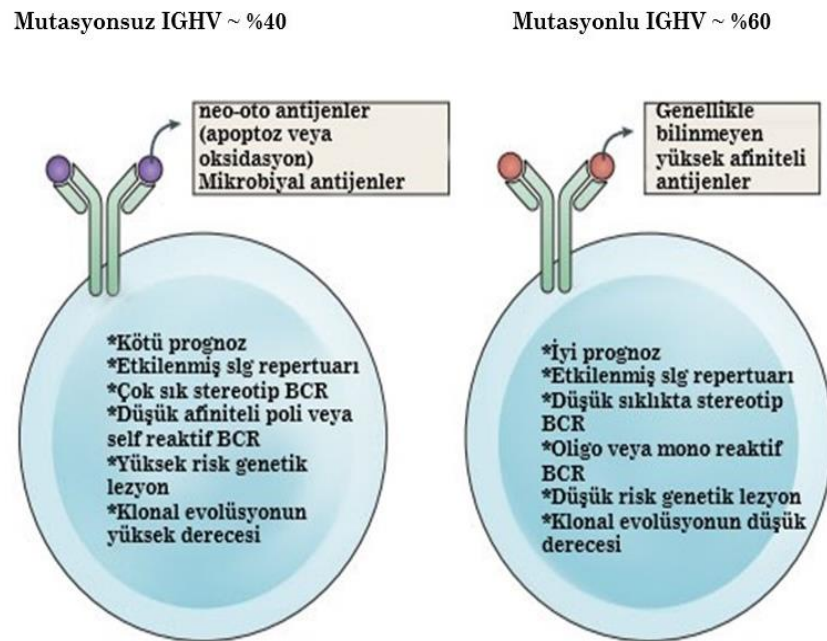
### **2.1.1. Kronik lenfositik lösemi ve epidemiyolojisi**

Kronik lenfositik lösemi (KLL) CD5+ B hücre malignitesi olarak tanımlanmaktadır. Küçük, olgun neoplastik lenfositlerin kan, kemik iliği ve ikincil lenfoid dokularda birikimi lenfodenopati, splenomegali, iliğin hücre infiltrasyonuna ve lenfositozaya sebep olmaktadır. Kronik lenfositik lösemi Avrupa ve Kuzey Amerika’da en yaygın lösemi tipi olarak bilinmektedir. Kronik lenfositik lösemi erkek bireylerde kadınlara göre ve 7. dekad itibari ile daha sık görülmektedir. Ayrıca KLL olan hastaların birinci derece akrabalarında hastalığın gelişme riskinin 8.5 kat fazla olduğu görülmektedir. Kronik lenfositik lösemi konkordansının monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlere göre daha yüksek olduğu da literatürde yer alan veriler arasındadır. Familial KLL hastalarında genom çalışmalarıyla birlikte genlerin belirli bölgelerinde otuzdan fazla tek nükleotid değişimi (SNP) saptanmıştır. Belirtilen hastalarda yapılan SNP çalışmaları ile birlikte KLL’nin gelişiminde herediter faktörlerin de etkili olduğu gösterilmiştir (Kipps vd., 2017).

Kronik lenfositik lösemnin patofizyolojisinin B-hücre reseptör yanıtı (BCR) ve *immüoglobülin ağır zincir* geninin (*IGHV*) mutasyonel durumu, genetik aberasyonlar/gen mutasyonları ve apoptoz ile proliferasyondaki defektleri içerdiği görülmektedir. Burada BCR immüoglobülinlerin (Ig) ağır ve hafif zincirleriyle birlikte CD79a ve CD79b’den oluştuğu bilinmektedir. Belirtilen komponentler (Ig, CD79a ve CD79b), intrasellüler aktivasyon molekülleri (SYK) aracılığıyla intrasellüler tirozin kinazlara sinyalleri ileterek yolak aktivasyonu sağlamaktadırlar. Aşağı yönde yolakları aktive etmek için bu tirozin kinaz aktivitesinin KLL alttipleriyle ilişkili olduğu ve ZAP70, CD38 ve *IGHV* geninin mutasyonel durumu ile korele olduğu literatürde yer alan veriler arasındadır. Kronik lenfositik lösemide yüksek tirozin kinaz aktivasyonuna sebep olan ZAP70 proteini, ilgili tanıda kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı için onkogenik kanıt olarak görülmekte ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Burger & O’Brien, 2018).

CD38'in ise ilişkili olduğu moleküllerle birlikte kanser hücresinin büyümesine ve sağkalımına neden olduğu görülmektedir. Bu nedenle kötü prognostik marker olarak belirtilmektedir (Burger & O'Brien, 2018).

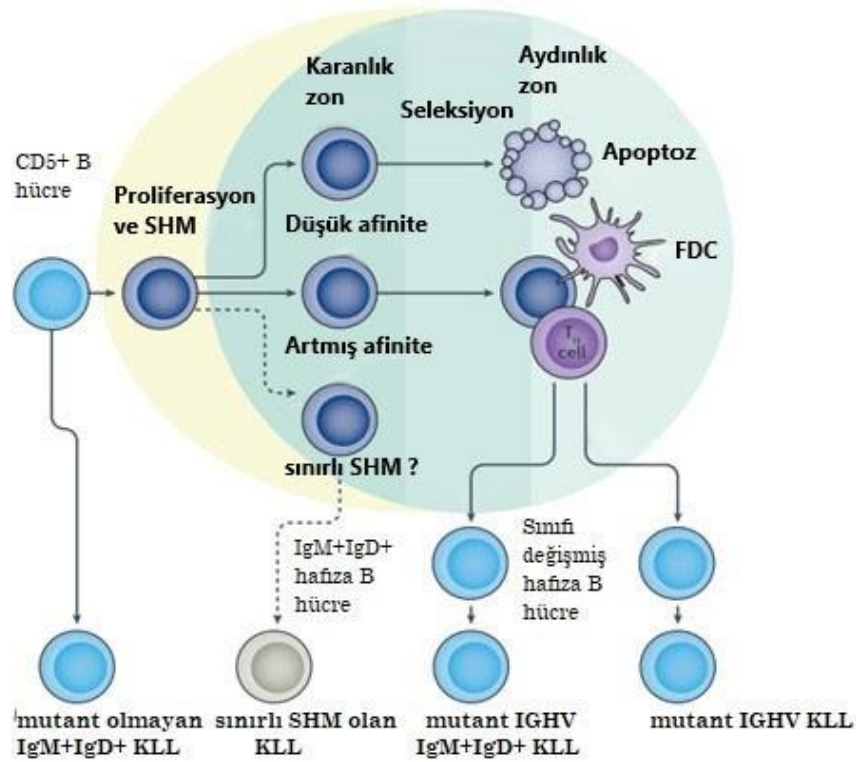
Kronik lenfositik lösemnin patofizyolojisinde diğer önemli bir faktör olan *IGHV* geninin mutasyonel durumunun ilgili tanıda biyolojik ve klinik açıdan farklılıklara sebep olduğu görülmektedir. Ayrıca KLL'nin sınıflandırılmasında *IGHV* geninin mutasyonel durumunun etkili olduğu da belirtilmektedir (Fabbri & Dalla-Favera, 2016) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *IGHV* Geninin Mutasyonel Durumu ve Klinik Açısından Sebebi Olduğu Farklılıklar (Burger & O'Brien, 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.

*İmmüoglobülin ağır zincir* geni daha öncede belirtildiği gibi KLL'nin gelişiminde ve moleküler patolojisinde önemli bir gen olarak bilinmektedir. Bu genin mutasyonel durumu naive B hücrelerinin matür B hücre haline gelmesi sürecinde meydana gelmektedir. Bu süreçte normal naive B hücresi başarılı V(D)J rekombinasyonuna maruz kalmakta ve fonksiyonel B-hücre reseptörleri eksprese etmektedirler. B-hücre reseptörleri, antijen etkileşimiyle aksesuar ve CD4+ T hücrelerine bağlanabilmektedir. Belirtilen hücreler germinal merkezler olarak görev yapan folikülleri oluşturmak için birikmektedirler (Kipps vd., 2017).

Germinal hücreler, B hücrelerin bölünmesini sağlayan karanlık zona ve helper T hücreler, makrofajlar ve foliküler dendritik hücrelerle karışmış B hücrelerini kapsayan bir light zona sahip oldukları bilinmektedir. Bu hücreler germinal merkezin karanlık zonuna girerler ve burada hücreler *IGHV* ve *IGHL* genlerinde somatik mutasyonlara ve hızlı proliferasyona maruz kalmaktadırlar. Aydınlik zonda ise antijene bağlanmak için en uygun B reseptörünü eksprese eden B hücreleri seçilmekte ve Ig sınıf değişirme rekombinasyonu meydana gelmektedir (Kipps vd., 2017) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** KLL Hücrelerinin Hücresel Orjinleri ve *IGHV* Geninin Mutasyonel Durumu (Kipps vd., 2017)'den değiştirilerek alınmıştır.

*İmmüoglobülin ağır zincir* geni mutasyonsuz (*UM-IGHV*) KLL hücreleri somatik mutasyona maruz kalan CD5+ B-hücrelerinden, *immüoglobülin ağır zincir* geni mutant (*M-IGHV*) KLL hücreleri ise germinal merkezden farklılaşmış ve geçmiş CD5+ B hücrelerinden köken almaktadırlar. Bazı KLL kanser hücreleri Ig sınıf değişirme rekombinasyona maruz kalan ve IgM ve IgD' den farklı (Örn: IgG veya IgA) Ig eksprese eden B hücrelerinde köken aldıkları bilinmektedir (Kipps vd., 2017)(Şekil 2.3).

B hücrelerinden köken aldığı bilinen *UM-IGHV* KLL hücrelerinin farklılaşması germinal merkezden değil, lenf nodlarındaki bölgelerde gerçekleşmektedir. Özellikle lenf nodlarındaki bölgelerde farklılaşan B-hücrelerin *IGH* genlerinde somatik mutasyonlar meydana gelmektedir. Ayrıca immün yanıtta seleksiyon da gerçekleşmektedir. Bu yüzden *M-IGHV* eksprese eden KLL hücreleri olan hastalar ile *UM-IGHV* eksprese eden KLL hücreleri olan hastalar karşılaştırıldığında, *UM-IGHV* ekspresyonu pozitif hasta grubunda hastalığın daha agresif olduğu görülmektedir (Kipps vd., 2017).

## **2.2. Kronik Lenfositik Lösemide Genetik Değişimler**

Hematolojik malignitelerde hastalığın gelişimi ve patogenezinde en önemli faktör olan genetiğin ilgili tanı için de etkili olduğu KLL'nin hücre orjinini belirleme çalışmalarlarıyla saptanmıştır. Bu çalışmalarda hematopoetik kök hücrelerde epigenetik ve genetik lezyonlarla birlikte antijenik stimülasyonun meydana gelmesiyle matür B hücrelerin ekspansiyon ve seleksiyon kazanmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmaların ardından *IGHV* gen mutasyonlarının eklenmesiyle birlikte KLL'nin geliştiği ve alt tiplerinin oluştuğu belirtilmiştir (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).

Kronik lenfositik lösemnin gelişiminde önemli olan genetik ve epigenetik faktörler etkisinin anlaşılmasıyla, ilgili tanı için daha detaylı genom çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda KLL'de birçok epigenetik ve genetik değişimlerin olduğu görülmüştür. Bu belirtilen değişimleri genomik aberasyonlar, epigenetik modifikasyonlar, miRNA deregülasyonu ve gen mutasyonları olarak gruplandırmışlardır (Jiang vd., 2016)

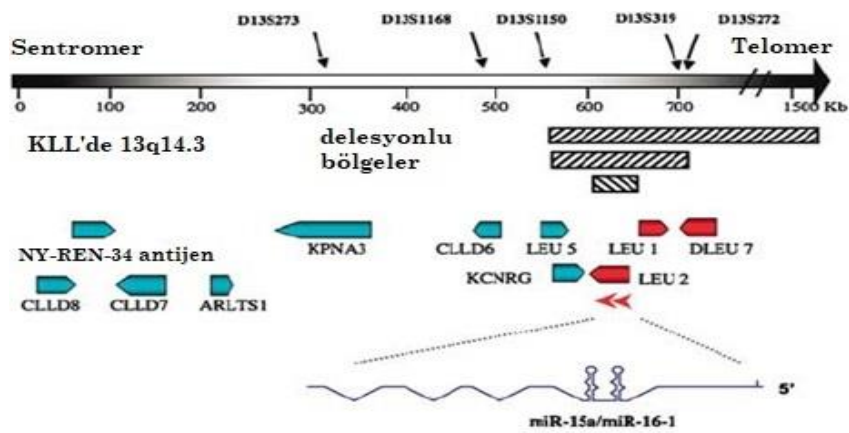
### **2.2.1. Kronik lenfositik lösemide kromozomal aberasyonlar ve moleküler patolojileri**

Kronik lenfositik lösemide genellikle tekrarlayan sitogenetik anomaliler meydana gelmektedir. Hastaların %70-80'inde ise FISH yöntemiyle tekrarlayan bu kromozomal anomaliler saptanabilmektedir (Jiang vd., 2016).

Kronik lenfositik lösemide 12. kromozomun trizomisi, 17. kromozomun kısa kol delesyonu, 13., 11. ve 6. kromozomların uzun kollarının delesyonları en yaygın kromozomal aberasyonlar olarak tanımlanmaktadır. Bu aberasyonlar ilgili tanı için prognostik olarak önemli kabul edilmektedir (Jiang vd., 2016).

### 2.2.1.1. Delesyon 13q14 ve ilişkili genler

Kromozom 13'ün, q14 bölgesindeki delesyonlar (del(13)(q14)) KLL olgularında en sık gözlenen kromozom anomalisi olarak tanımlanmaktadır. Literatürlerde 13q14 delesyonlarının genellikle hastalığın erken evrelerinde tek sitogenetik anormallik olarak görüldüğü belirtilmektedir. Ayrıca 13q14 delesyonlarının genellikle monoallel bir delesyon olduğu ve *M-IGHV* KLL'lerde meydana geldiği belirtilmektedir. Delesyona uğrayan bu bölgenin büyüklüğü de hastalarda heterojenite göstermektedir. Minimal delesyonlu olarak tanımlanan bu bölgede (MDR) *DLEU1*, *DLEU2* ve *DLEU7* RNA genleri bulunmaktadır. Belirtilen *DLEU1* ve *DLEU2* genleri uzun kodlamayan RNA'ları, *DLEU7* geninin ise NFkB'nin negatif regülatörünü kodladığı bilinmektedir. Delesyon 13q14 bulunan hastalarda *DLEU1*, *DLEU2* ve *DLEU7* genlerinde ekspresyon seviyesinin düşük olduğu da bildirilmiştir (Fabbri & Dalla-Favera, 2016) (Şekil 2.4).

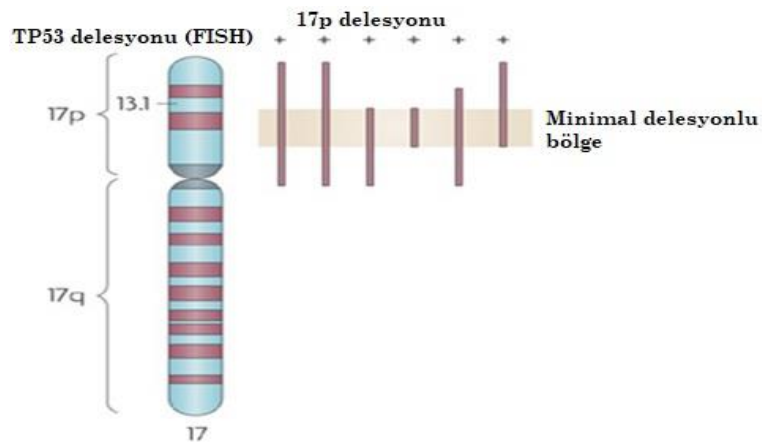


**Şekil 2.4.** 13q14 Delesyon Bölgelerinin Şematik Gösterimi (En üst panel bazı MDR bölgeleri ve miR15a/miR-16-1 kümesi, en alt panel ise delesyonlu bölgeye çok yakın veya içinde lokalize olan genleri göstermektedir.)(Calin & Croce 2006)'den değiştirilerek alınmıştır.

Ayrıca KLL, miRNA'daki değişimlerle ilişkisi bulunan ilk lösemi olarak bilinmektedir. Kronik lenfositik lösemi hastalarının yaklaşık %60'ında mir-15a ve mir-16-1'in delesyonlu veya downregüle, familial KLL'lerin birkaçında da disfonksiyonel olduğu görölmektedir. Belirtilen miRNA'lar *BCL2* ve *MCL1* genlerini hedef almaktadırlar. Bu genler *BCL2* ailesinin anti-apoptotik proteinlerini kodlamaktadırlar. Sözü edilen bu miRNA'ların kaybı ve ekspresyonlarının azalması, *BCL2* ve *MCL1* genlerinin ekspresyonlarını arttırmaktadır. Ayrıca ilgili miRNA'ların *CCND1*, *CCND2* ve *CDK6* genleri üzerinde etkili olduğu ve bu genleri downregüle ettiği de bilinmektedir. Delesyon 13q14 genellikle iyi prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir. Fakat bir grup hastada ilgili bölgedeki delesyon sonucunda *Retinoblastom* (*RBI*) gen kaybı meydana geldiği ve hastalığın prognozunu olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).

### 2.2.1.2. Delesyon 17p ve *TP53* geni

Kromozom 17p13'de lokalize olan *TP53* tümör süpresör geni bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir (Şekil 2.5). Bu gen apoptoz ve hücre siklüsü gibi birçok hücre sel prosesde görev yaptığı görölmektedir. Ayrıca ilgili genin delesyonları ve mutasyonları neoplastik klonlara sağkalım avantajı sağlamaktadır (Cordone vd., 1998).



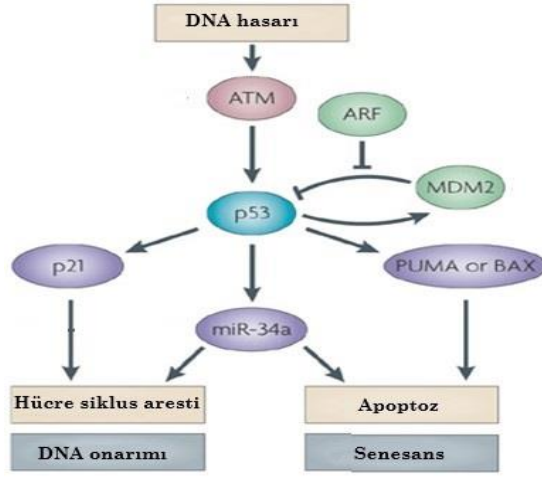
Şekil 2.5. *TP53* Geninin Kromozomal Lokalizasyonu ve FISH Yöntemiyle Saptanabilen MDR Bölgesinin Şematik Gösterimi (Vyas & Hassan, 2012)'den değiştirilerek alınmıştır.

Tüm insan tümörlerinin yaklaşık %50'sinde *TP53* geninin mutasyonlu olduğu saptanmıştır. Bu genin mutasyonları hematolojik malignitelerinde özellikle lenfoid seride (KLL, NHL, PLL) görülmektedir (Cordone vd., 1998). Kronik lenfositik lösemide birçok prognostik faktör hastalığın progresyonunu tahmin etmek ve terapötik seçimler konusunda yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Bu faktörler arasında, kromozom 17'nin kısa kol delesyonu da bulunmaktadır. Bu bölgedeki delesyon, 17p13 bölgesinde lokalize olan *TP53* geninin kaybıyla sonuçlanmaktadır. Kronik lenfositik lösemi hastalarında tümör süpresör olarak görev yapan *TP53* gen kaybı kötü prognoz ve tedaviye dirençle ilişkilendirilmektedir. Ek olarak 17p13 delesyonu saptanan hastaların %80'inde diğer alleldeki *TP53* geninin mutasyonlu olduğu ve bu durumun p53 proteinin fonksiyon kaybı ile sonuçlandığı bilinmektedir (Le Garff-Tavernier vd., 2011).

### **2.2.1.3. Trizomi 12**

Kromozom 12'nin ekstra kopyası *IGHV* geninin mutasyonel durumundan bağımsız olarak, orta-risk genetik lezyon olarak kabul edilmektedir. Kronik lenfositik lösemi olan hastaların %15'inde trizomi 12 görülmektedir. Hastalarda trizomi 12 ile *NOTCH1* geninin mutasyonlarının birlikte bulunması daha kısa sağkalıma neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda trizomi 12 saptanan KLL hastalarında sekonder tümör gelişim ve Richter Sendromuna (RS) transformasyonun daha yüksek sıklıkta olduğu belirtilmiştir. Kronik lenfositik lösemi hastalarında trizomi 12 tekrarlayan ve prognostik önemi olan bir genetik anomali olmasına rağmen KLL patogenezinin katkısı hala bilinmemektedir (Fabbri & Dalla-Favera, 2016) (Şekil 2.6).





Şekil 2.6. KLL’de Kromozom 12 Trizomisinin *MDM2* Geni Üzerinden Moleküler Yolaklara Olan Etkisi (Vyas & Hassan, 2012)’den değiştirilerek alınmıştır.

#### 2.2.1.4. Delesyon 11q22-23

Kromozom 11’in q22-23 bölgesinde meydana gelen delesyonlar KLL hastalarının yaklaşık %20’sinde görülmektedir. İlgili yapısal anomali *UM-IGHV* KLL alttipiyle ilişkilendirilmektedir. İlgili kromozom bölgesinde meydana gelen delesyonun genellikle monoallelilik ve >20 Mb büyüklüğünde olduğu bilinmektedir. Kromozom 11’de meydana gelen bu yapısal anomali, genellikle DNA hasar yanıtında önemli bir fonksiyona sahip bir protein kodlayan ve tümör süpresör olarak görev yapan *ATM* geninin delesyonuna neden olmaktadır. Belirtilen genin kaybı hastalarda kötü prognozla ilişkilendirilmektedir Fakat bazı 11q delesyonlu KLL hastalarında, *ATM* geni yerine NK-κB’nin negatif regülatörü olarak görev yapan *BIRC3* geninde delesyon saptanmaktadır (Fabbri & Dalla-Favera 2016).

Kronik ve akut lenfositik lösemi hastalarında yapılan bir çalışmada, *BIRC3* gen kaybının genellikle kemoterapi-dirençli KLL hastalarında görüldüğü bildirilmiştir. Ek olarak *BIRC3* gen kaybının, relaps riski yüksek ve fludarabine-dirençli KLL hastalarının erken tanımlanmasında yardımcı olabileceği düşünülmüş ve ilgili genin sitogenetik anormallikler paneline eklenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Alhourani vd., 2016).

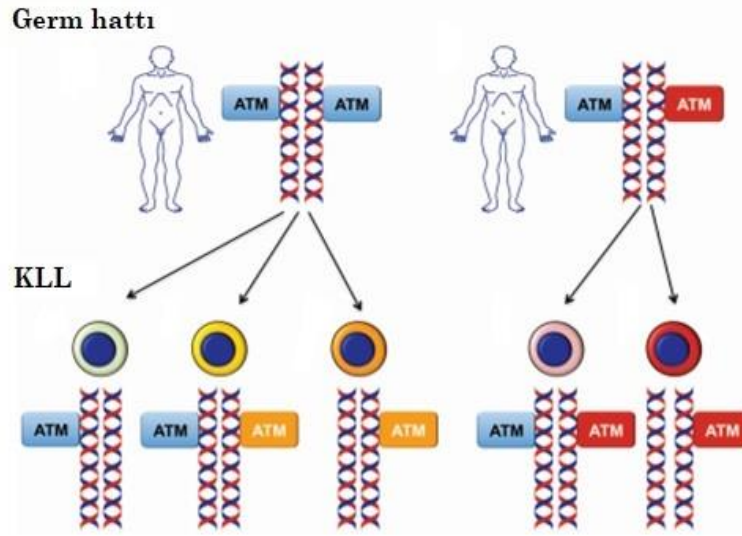
### **2.2.2. KLL'de somatik mutasyonlar ve moleküler patolojileri**

Kronik lenfositik lösemnin gelişmesinde belirtilen kromozomal aberasyonlarının yanı sıra birçok genin somatik mutasyonlarının etkili olduğu görülmüştür. Tanı için yapılan çalışmalarda, paralel sekanslama ve tüm ekzom sekanslama yöntemleri kullanılarak birçok gende tekrarlayan somatik mutasyonlar saptanmıştır. Bu çalışmalardan, tekrarlayan somatik mutasyonların DNA hasarı (*TP53* ve *ATM*), mRNA prosesi (*SF3B1* ve *XPO1*), kromatin modifikasyonu (*HIST1H1E*, *CHD2* ve *ZMYM3*), WNT yolağı, Notch yolağı (*NOTCH1*) ve inflamatuvar yolaklarında rolü olan genlerde meydana geldiğı gözlemlenmiştir. Diğer mutasyonların ise B-hücre ilişkili yolağı ve transkripsiyona etki eden *EGR2* veya *BRAF* genlerinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca birkaç kabul edilen sürücü mutasyonun fonksiyonel rolünü tanımlamak için de konfirmasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda sessizleştirilmiş mutant WNT yolak genlerinin, primer KLL hücrelerinin yaşayabilirliğini azalttığı gözlemlenmiştir. Farklı bir çalışmada *POT1* gen mutasyonları telomerik DNA'ya telomer proteinlerinin bağlanmasını engelleyerek, sayısal kromozomal anomallilerine sebep olduğu bildirilmiştir. *Splisozom faktör-3B1* (*SF3B1*) genindeki mutasyonların ise aberan RNA splicing ve değışmiş DNA-hasar yanıtıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir ( Kipps vd., 2017).

#### **2.2.2.1. ATM geni ve moleküler patolojisi**

Tümör süpresör olarak görev yapan *ATM* geni 146 kb uzunluğunda ve 66 ekzon içeren bir gen olarak tanımlanmaktadır. Bu tümör süpresör gen PI-3K ile homoloji gösteren bir nüklear fosfoprotein kodlamaktadır. Diğer PI-3K ilişkili proteinlere benzer olarak, *ATM* proteinide DNA onarımını ve rekombinasyonunun kontrol etmektedir. Ayrıca hücre siklusunun progresyonunu da regüle etmektedir. Kronik lenfositik lösemide meydana gelen *ATM* gen mutasyonları sıklıkla *ATM*'nin protein kinaz aktivitesi için önemli ve *ATM*-ilişkili proteinler arasında yüksek oranda korunmuş PI-3K domainini etkilemektedir. *ATM* geninde meydana gelen mutasyonlar KLL'de kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Rossi & Gaidano, 2012).

Kronik lenfositik lösemi hastalarında *ATM* geninde meydana gelen mutasyonlara ek *ATM* geninin delesyonu da meydana gelmektedir. İlgili genin mutasyonu ve delesyonu hastaların %25'inde saptanmıştır ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, 11q22-23 delesyonuna sahip KLL hastalarında germline *ATM* mutasyonunun sıklığının yüksek olduğu saptanmıştır. Birçok KLL hastasında *ATM* geninin germline mutasyonunun, kötü prognostik belirteçlerle ve hastalığın ilerlemiş evreleriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Rossi & Gaidano, 2012).



**Şekil 2.7.** KLL'de *ATM* Geninin Yapısal Değişimlerinin Mekanizmaları (germline *ATM* mutasyonu kırmızı, normal *ATM* geni mavi sonradan somatik mutasyon meydana gelen *ATM* geni sarı ile gösterilmektedir) (Rossi & Gaidano, 2012)'den değiştirilerek alınmıştır.

Ek olarak *ATM* geninin disrupsiyonunun multi-step bir süreç olduğu görülmüştür. Bu süreçte *ATM* germline mutasyonuna, 11q22-23 lokusundaki *ATM* gen delesyonu eklenmesiyle komplet *ATM* fonksiyon kaybı meydana gelmektedir. Sonucunda ise hastalığın daha agresif hale geldiği gözlemlenmiştir (Rossi & Gaidano, 2012) (Şekil 2.7).

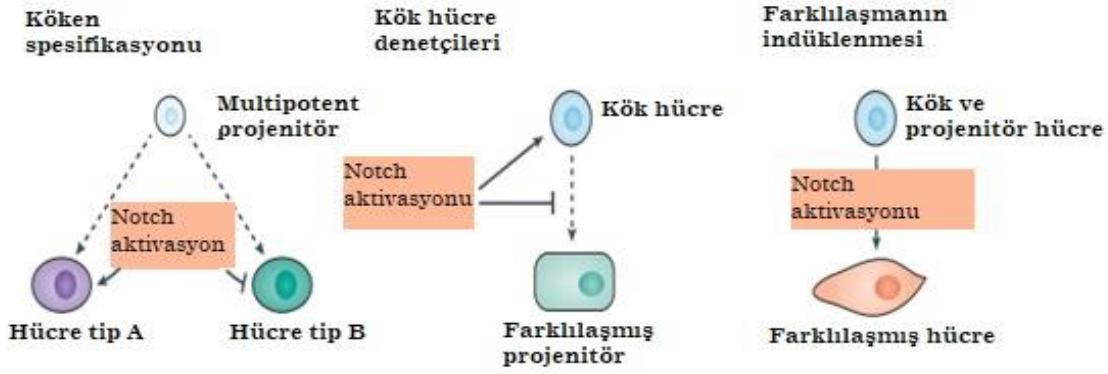
#### **2.2.2.2. MYD88 geni ve moleküler patolojisi**

Kronik lenfositik lösemi (yaklaşık %3) ve diğer lenfoproliferatif hastalarda, *MYD88* geninde tekrarlayan mutasyonlar saptanmıştır. Belirtilen *MYD88* geni interlökin-1 reseptörünün (IL-1R)/Toll-benzeri reseptörün (TLR) adaptör proteini olarak bilinmektedir (Martínez-Trillos vd., 2017).

İlgili genin immün yanıtın başlamasında ve insan B hücrelerinin homeostazisinde önemli rolü bulunmaktadır. Toll-benzeri reseptör aktive olduktan sonra, Myd88 fosforillenmektedir. Bu yolda sırayla IL-1R ilişkili kinazlara (IRAKs) ve Traf6 gibi diğer downstream proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır. İlgili downstream proteinlerin aktivasyonu ile birlikte NF- $\kappa$ B yolağı aktif hale gelmektedir. Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde de yüzey TLRs ekspresyonları, normal B hücrelerinkine benzer gerçekleşmektedir. İlgili gende meydana gelen mutasyonlar nedeniyle, KLL hücreleri NF- $\kappa$ B ve MAPK yolağı üzerinden apoptozdan korunmaktadır. Buradan yola çıkarak, *MYD88/TLRs* genlerinin mutasyonlarının KLL'nin gelişiminde ve patogeneğinde önemli bir rol üstlendiği görülmektedir. Ek olarak ilgili gendeki mutasyonların KLL hastalarının kliniklerine etkisi olduğu yapılan çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada *TLR/MYD88* gen mutasyonları saptanan hastaların toplam yaşam süreleri (OS) ilgili gen mutasyonları saptanmayan hastalara göre daha yüksek olduğu, ilgili gen mutasyonları düşük ZAP70 ve CD38 ekspresyonu ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir. Ayrıca KLL hastalarından elde edilen klinik veriler doğrultusunda ilgili gen mutasyonunun olumlu prognoz ilişkili olduğu bildirilmiştir (Martínez-Trillos vd., 2017).

### **2.2.2.3. NOTCH sinyali ve moleküler mekanizması**

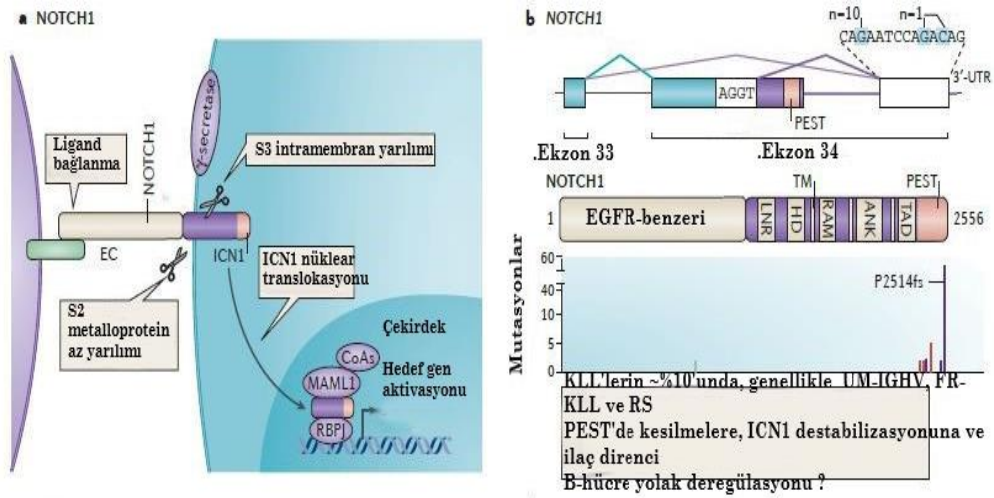
Birçok dokuda *NOTCH* sinyali hücre kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. *NOTCH* sinyali kök hücrelerin kendini yenilemesi, hücre siklus progresyonu ve farklılaşmayı kontrol eden önemli bir mekanizma olarak görev yapmaktadır. *NOTCH* sinyalinin hücre davranışları regüle etmesi, bu sinyalin birçok kanserde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle projenitör ve kök hücrelerin regülasyonunun önemli bir bölümünde etkili olmaktadır (Nowell & Radtke, 2017) (Şekil 2.8).



**Şekil 2.8.** Hücre Kaderinin Kararında NOTCH Yolağının Rolüne Genel Bakış (Nowell & Radtke, 2017)'den değiştirilerek alınmıştır.

*NOTCH* genlerinin yukarıda belirtilen proseslerdeki etkinliğe sahip olduğu ve hücreyel yolakla ilişkili olduğu bilinmektedir. Özellikle kanser mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda *NOTCH* genlerinden *NOTCH1* geninin mutasyonel durumuna odaklanılmıştır. Bu çalışmalarda mutant *NOTCH1* geninin ilişkili olduğu sinyal yolağında koaktivatörleriyle birlikte hedef genlerin transkripsiyonunu arttırdığı görülmüştür. Ek olarak hematolojik malignitelerinde dahil olduğu birçok kanser tipinde etkinliği belirtilmiştir. Kronik lenfositik lösemide ise *NOTCH1* gen mutasyonları tekrarlayan moleküler bir lezyon olarak tanımlanmaktadır. Yeni tanı KLL hastalarının %10'unda *NOTCH1* geninde mutasyonlar meydana gelmektedir. *NOTCH1* gen mutasyonları *UM-IGHV* KLL hastalarında daha yaygın olduğu görülmüştür. Ek olarak izole trizomi 12 saptanan KLL hastalarında ilgili gene ait mutasyonların sıklığının yüksek olduğu (%40-50) görülmektedir. Kronik lenfositik lösemide *NOTCH1* gen mutasyonlarının ekzon 34'de hotspot bölge içinde meydana geldiği belirtilmektedir. Ek olarak bu mutasyonların çerçeve kayması veya anlamsız mutasyonlar olduğu görülmektedir. *NOTCH1* geninde genellikle 2 baz çifti büyüklüğünde bir delesyon meydana gelmekte (c.7544\_7545delCT) ve bu tanımlanan delesyon tüm lösemilerin %80-95'inde görülmektedir. Kronik lenfositik lösemide *NOTCH1* mutasyonlarının fonksiyonel sonucu, Notch1 proteininin C-terminalindeki PEST domaininin bozulması olarak bilinmektedir (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).

Bozulan PEST domaini, aktif *NOTCH1* izoformunun degradasyonunu ve birikimini olumsuz yönde etkilemektedir. İlgili tanıda *NOTCH1* mutasyonlarının bazı hücrel sinyal yollarını deregüle ettiği belirtilmektedir (Şekil 2.9). Ayrıca *NOTCH1* gen mutasyonları apoptoza direnç mekanizmasının gelişmesine de sebep olmaktadır. Kronik lenfositik lösemide koruyucu mikroçevre nişleri ve lösemik hücreler arasında spesifik etkileşim, sürekli *NOTCH1* aktivasyonunun sebep olduğu parakrin sinyallere neden olmaktadır (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).



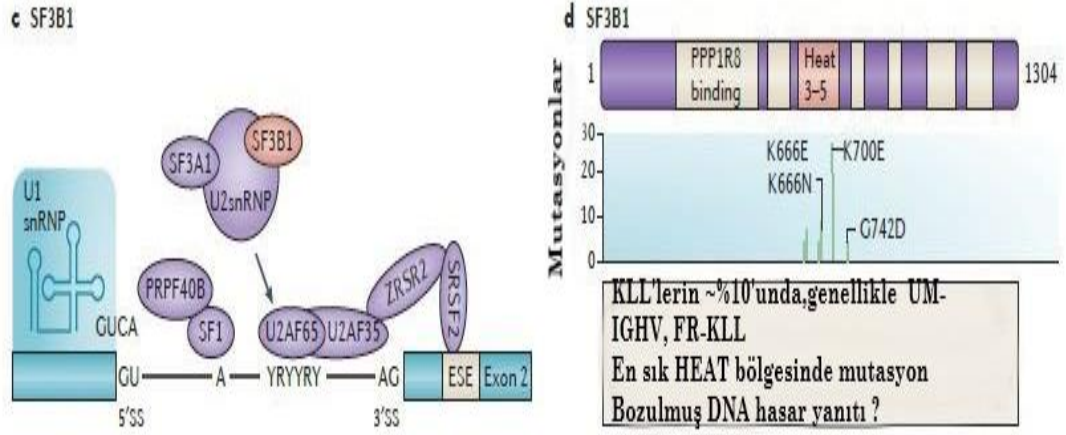
**Şekil 2.9.** KLL'de *NOTCH1* Geninin Mutasyonlarının Meydana Geldiği Bölgeler ve Hastalık Üzerine Etkileri (Fabbri & Dalla-Favera, 2016)'den değiştirilerek alınmıştır.

*NOTCH1* gen mutasyonları hastalığın agresifliğini arttırmakta ve genellikle hastalığın ilerlemiş evrelerinde karşımıza çıkmaktadır. Özellikle *NOTCH1* mutasyonu saptanan KLL hastalarında relaps riskinin yüksek olduğu ve ilaca direnç mekanizmasının geliştiği görülmektedir. Ayrıca *NOTCH1* mutasyonlarının KLL'nin Richter Sendromuna dönüşümüne de sebep olduğu bilinmektedir. Kronik lenfositik lösemide *NOTCH1* mutasyonlarının birikiminin ikinci-basamak genetik lezyonlar oluşturduğu, bu lezyonlar arasında *MYC* onkogenin aktive olduğu görülmektedir (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).

#### **2.2.2.4. *SF3B1* geni ve moleküler mekanizması**

*SF3B1* geni, splisozomun U2 küçük nüklear ribonükleoprotein kompleksinin çekirdek komponentini kodlamaktadır. Sf3b1 ekspresyonu kırılmanın erken evrelerinde görülmektedir. Sf3b1 proteini U2AF-bağlanma motifi ve bir C-terminal bölgeyi içermektedir. Bu bölge yirmi iki identik olmayan HEAT domaininden meydana gelmektedir. İlgili genin ürünü ile birlikte diğer kırılma faktörleri pre-mRNA'nın intron-ekzon bağlantılarında toplanarak kırılma mekanizmasının gerçekleşmesini sağlamaktadırlar. U1 snRNP 5' kırılma bölgesine, SF1 dal noktasına, U2AF'nin büyük alt birimi ise poliprimidin bölgesine ve küçük alt birimi 3' splice bölgesinde AG'ye bağlanmaktadır. Belirtilen süreç sonunda splisozom kompleksi oluşmakta ve pre-mRNA'nın kesip-ekleme süreci tamamlanmaktadır. Fakat kanserlerde splisozom kompleksindeki genlerin tekrarlayan mutasyonlarının tespiti, bu sürecin doğru bir şekilde tamamlanmadığını ve oluşan mRNA'nın disfonksiyonel bir hale geldiğini göstermektedir. Bu yüzden splisozom yolağında yer alan bu genlerin mutasyonlarının karsinogenezde direkt bir aktör olarak görev yaptığı gösterilmektedir (Şekil 2.10). *SF3B1* geninde kanser ile ilişkili mutasyonlar HEAT tekrarlarındaki 3 majör hotspot bölgede meydana gelmektedir. Diğer splicing faktörlerdeki mutasyonlarla birlikte *SF3B1* genindeki değişimler ilk olarak MDS ve KLL hastalarında saptanmıştır (Alsafadi vd., 2017).

Kronik lenfositik lösemi hastalarında splisozom sisteminin bileşenlerini etkileyen mutasyonlar belirlenmiştir. Özellikle bu sistemde, *SF3B1* gen mutasyonları hastaların yaklaşık %10'unda ve KLL'nin *UM-IGHV* alt tipinde olduğu saptanmıştır (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).



**Şekil 2.10.** *SF3B1* Proteininin Sistematik Diagramını, Fonksiyonel Bölgelerini ve Somatik Mutasyonlarının Sayısını Gösterimi (Fabbri & Dalla-Favera, 2016)'den değiştirilerek alınmıştır.

Kronik lenfositik lösemide saptanan *SF3B1* mutasyonları, proteinin yüksek oranda korunmuş C terminalinde meydana geldiği ve bu mutasyonların heterozigot yanlış-anlamli mutasyonlar olduğu bildirilmiştir. *SF3B1* gen mutasyonları, kırılmadaki fonksiyonel sonuçları ve diğer hücresel fonksiyonları bilinmemektedir. Mutant-*SF3B1* saptanan KLL hastalarında anormal 3' kırılma alıcı bölge taşıyan iki yüzden fazla farklı transkript olduğu görülmektedir. *SF3B1* gen mutasyonlarının RNA kırılmasında rol oynaması, KLL patogeneğinde önemli fonksiyonu olduğunu ve DNA hasar yanıtında etkili olduğu bildirilmektedir. (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız ESOĞÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda FISH yöntemi ile izole del13q saptanmış kırk üç KLL hastasına ait DNA örneklerinde yapılmıştır. ESOĞÜ Girişimsel Olmayan Etik Kurulu tarafından, 11.12.2018 tarihinde ve yirmi bir numaralı kararı doğrultusunda güç analizi ile belirlenen kırk sekiz hasta sayısı ile çalışılmanın yapılması uygun bulunmuştur. Sanger sekanslama yöntemi kullanılarak *SF3B1* geninde en sık gözlenen 2098 A>G, 1866 G>T, 1998 G>T, 2225 G>A mutasyonları, *NOTCH1* geninde ise 7541\_7542delCT ve 7544delC mutasyonları taranmıştır.

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Kimyasal malzemeler

- PZRMix
- Enhancer
- Taq DNA polimeraz
- NOTCH1 primer;

5' TTGGCGTGAGCTCAGCAGCC 3'(FORWARD)

5' AAAAAGGCTCCTCTGGTCGG 3 (REVERS)

- SF3B1 primer;

5'CGAGAGATCATTTCTAATTT 3'(FORWARD)

5'CGAATAAGGATTAACATCAC 3'(REVERS)

- Agaroz
- TBE
- EtBr
- Exosap
- Big Dye
- 5xBuffer
- Sephadex
- dH2O
- Ekstraksiyon ve Binding buffer

- Proteinaz K
- Wash buffer I ve II, Elüsyon buffer

### 3.1.2. Sarf malzemeler ve cihazlar

**Tablo 3.1.** Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Sarf Malzemeler	Cihazlar
Otomatik pipet seti	Mikrofüj
0.2 ml'lik PZR tüpleri	Vorteks
10'luk ve 100'lük pipet uçları	Termal döngü cihazı Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700
Stript	Jel elektroforez cihazı
0.5'lik ependorf	Dizileme cihazı 3130
Falkon	Nanodrop
Spin kolon	Hassas Terazı
	Santrifüj
	Su banyosu

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. DNA izolasyonu

- İlk olarak ependorfların üzerine hastanın adı soyadı ve tarih olacak şekilde etiketleme yapıldı.
- Etiketlenen Ependorflara 200 µl kan örnekleri eklendi.
- Kan örneklerine 10 µl Proteinaz-K eklenerek, pipetaj ve 10 sn vorteks yapıldı.
- Üzerine 200 µl Ekstraksiyon buffer eklenerek, pipetaj ve 10 sn vorteks yapıldı.
- Hazırlanan karışım 56 °C su banyosunda 30 dk inkübe edildi ve 15 sn vortekslenip kısa bir santrifüj yapıldı.
- Ardından 210 µl Binding buffer eklenerek, pipetaj ve 10 sn vorteks yapıldı.

- Kapaktaki damlaları uzaklaştırma amacıyla son olarak kısa bir santrifüj yapıldı. Son karışım kapak kenarına bulaştırılmadan spin kolona aktarıldı ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra tüpün altındaki sıvı döküldü ve üzerine 650 µl Wash Buffer I eklendi, 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra tüpün altındaki sıvı döküldü ve üzerine 650 µl Wash Buffer I eklendi, 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Tekrardan santrifüj sonrası tüpün altındaki sıvı döküldü ve üzerine 500 µl Wash Buffer II eklendi, 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Son olarak santrifüj sonrası tüpün altındaki sıvı döküldü ve üzerine 250 µl Wash Buffer II eklendi, 14000 rpm’de 3dk santrifüj edildi.
- Spin kolon 1,5 ml’lik yeni bir ependorfa alındı üzerine 50 µl elüsyon buffer eklendi ve spin kolonun kapağı kapatılarak 7 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Nanodrop ile ölçüm yapıldı.

### 3.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu

- Bu aşamada *NOTCH1* ve *SF3B1* belirli mutasyonlar için tasarlanmış primerler, PZRMix, Enhancer, Taq polimeraz ve hastalara ait DNA örnekleri kullanıldı.
- Aşağıdaki tabloda verilen miktarlar dikkate alınarak ependorf içinde hasta sayısına göre karışım hazırlandı.

**Tablo 3.2.** PZR Aşamasında Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Kullanılan reaktifler	Miktar (µl)
Steril dH2O	2
PZRMix	3,5
Enhancer	3
NOTCH1 forward ve reverse primer	2
SF3B1 forward ve reverse primer	2
Taq polimeraz	0,2
Toplam	13

- Hazırlanan karışım pipet yardımıyla stript içine dağıtıldı ve üzerlerine 1,5 µl hastalara ait DNA materyalleri eklendi.
- Belirtilen işlemin ardından hazırlanan stript, aşağıda belirtilen programda Termal döngü cihazına yüklendi.

**Tablo 3.3.** Gerçekleştirilen PZR Aşamasının Optimal Şartları

Termal Döngü Cihaz °C		Termal Döngü Cihaz Zaman
95 °C		10 dk
95 °C	Döngü (x45)	30 sn
56 °C (SF3B1)		45 sn
65 °C (NOTCH1)		45 sn
72 °C		80 sn
72 °C		7 dk
4 °C		∞

- Bu aşamanın sonunda hedeflenen DNA bölgeleri uygun primer yardımıyla çoğaltıldı.

### 3.2.3. Jel elektroforezi

- Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası istenilen bölgenin çoğaltılıp, çoğaltılmadığını kontrol etmek amacıyla jel elektroforez yöntemiyle yürütme işlemi yapıldı. Bu aşamada DNA ladder, PZR ürünü ve (-) kontrol kullanıldı.
- Hedeflenen DNA bölgeleri için bantlar gözlemlendiğinde Exosap aşamasına geçildi. Non-spesifik bant ve ya hiç bant görülmeyen durumlarda ilk PZR aşaması tekrar edildi.

#### 3.2.3.1. Agoroz jelin hazırlanması (%2'lik)

- Agoroz jel için, 2 g agoroz tartılıp üzerine 100 ml 1XTBE eklenerek mikrodalga fırında 300 derecede 3 dk tutularak çözünmesi sağlandı.

- Jel biraz soğutulduktan sonra üzerine 10 µl EtBr eklenerek iyice karıştırıldı ve daha önceden hazırlanmış olan jel traye kabarcık oluşturmayacak şekilde döküldü.
- Polimerizasyon için yaklaşık olarak 15-20 dk beklendikten sonra jel yatay jel elektroforez tankına alındı, üzerine jeli kapatacak kadar 1XTBE buffer ilave edildi.
- PZR sonucu oluşan ürünlerden 5 µl alınıp, 3 µl yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi.
- Birinci kuyuya moleküler 50 bç'lik ağırlık belirteci de yüklendi Jel, 120 voltta 40 dk yürütüldükten sonra ultraviyole altında görüntülenerek değerlendirildi.

### ***3.2.4. DNA dizi analizi ve basamakları***

#### ***3.2.4.1. PZR ürününün temizlenmesi***

- PZR ürünlerinden dNTP artıklarını ve primer dimerlerini uzaklaştırmak için ExoSAP ile pürifikasyon yapıldı.
- Pürifikasyon için, 2 µl ExoSAP ve 5 µl PZR ürünü yeni bir 0,2 lik mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
- Reaksiyon 45°C 30 dk (enzim aktivasyonu), 80°C 15 dk (enzim inaktivasyonu) ve 4°C ∞'lik programda gerçekleştirildi.

#### ***3.2.4.2. DNA dizi analizi reaksiyonunun hazırlanması***

- ExoSap yapılan örnekler bu basamakta kalıp olarak kullanıldı. Burada amaç dizileme reaksiyonu için gerekli olan ddNTP'leri eklemek ve okuma reaksiyonunu gerçekleştirmektir.
- Bu aşamada aşağıdaki tabloda yer alan reaktifler ve bu reaktiflerin belirtilen miktarları baz alınarak iki farklı ependorf içinde hasta sayısına göre karışım hazırlandı.

**Tablo 3.4.** DNA Dizi Analizi Reaksiyonunda Kullanılan Reaktifler

Kullanılan reaktifler	Miktar ( $\mu$ l)	Kullanılan reaktifler
Steril dH <sub>2</sub> O	2	Steril dH <sub>2</sub> O
5x buffer	2	5x buffer
BigDye	2	BigDye
Forward Primer	2	Revers Primer
Toplam	8	Toplam

- Hazırlanan karışım forward ve revers olarak etiketlenen striptlere pipet yardımıyla dağıtıldı ve üzerine 2  $\mu$ l Exosap ürünü eklendi. Son PZR reaksiyonu aşağıda belirtilen programda Termal döngü cihazına yüklendi.

**Tablo 3.5.** Dizilemede Gerçekleştirilen PZR Reaksiyonun Optimal Şartları

Termal Döngü Cihaz °C	Termal Döngü Cihaz Zaman
96 °C	1 dk
96 °C	10 sn
50 °C	5 sn (25 döngü)
60 °C	4 dk
4 °C	$\infty$

### **3.2.4.3. Sephadex pürifikasyonu**

- Dizileme için yapılan PZR sonrası fazla ddNTP'lerin uzaklaştırılması için sephadex pürifikasyonu yapıldı.

#### **3.2.4.3.1. Sephadex solüsyonunun hazırlanması**

- 1 g sephadex 14 ml distile su ile çözüldü.
- Hazırlanan bu solüsyon yaklaşık olarak 20 dk vortekslendi.
- Hazırlanan sephadex solüsyonu her örnek için özel filtreli tüplere 800  $\mu$ l olacak şekilde dağıtıldı ve 4500 rpm'de 3 dk çevrildi.
- Toplama tüplerine biriken su dökülüp yeniden filtreli tüplere takıldı. Filtreli tüplerde çevirme sonrası bir kolon oluşturuldu.

- Oluřturulan bu kolona değmeyecek şekilde, dizileme için yapılan PZR'dan elde edilen 10 µl'lik ürün otomatik pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde kolon üzerine transfer edildi ve tekrar 4500 rpm'de 3 dk çevrildi.
- Çevirme sonrası toplama tüpünde kalan rnek, DNA dizi analizi cihazına yüklenmek üzere yükleme tüplerine konuldu.
- Örnekler yükleme için hazır hale getirildi.

### ***3.2.5. Cihaza yükleme ve değerlendirme***

- Cihaza yükleme yapılmadan önce cihazın genel temizliği ve hazırlığı yapıldı.
- Cihazın uygun okuma yapabilmesi için, ayarları Applied Biosystem Genetic Analyzer with Data Collection Software v2.0'a göre yapıldı.
- Elde edilen veriler SeqScape programında analiz edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda yer alan olgu grubu, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı ve Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, Eskişehir Özel Ümit Hastanesi Hematoloji Bölümü ve Yunus Emre Devlet Hastanesi Hematoloji Bölümü tarafından KLL tanısı alan hastalardan oluşmuştur. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda belirtilen merkezlerde tanı konulan ve FISH yöntemi ile del13q14.3 saptanan kırk üç KLL hastasına ait DNA örneklerinde *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinde en sık gözlenen mutasyonlar (Tablo 4.2.) Sanger sekanslama yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca ilgili genlerin mutasyonel durumunu; hastalık evreleri, OS ve TTT ile ilişkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışma grubumuzu oluşturan KLL hastalarına ait veriler tabloda yer verilmiştir (Tablo 4.1). Olgu grubumuzu oluşturan kırk üç KLL olgusunun (18 erkek (%42) ve 25 kadın (%58)) ortalama yaşı 69.27'dir. Olgularımızın delesyon 13q oranları; %70 ve daha fazla olanlar olguların %67.4'ünü, del13q oranları %70'den az olanlar olguların %32.6'sını oluşturmaktadır. Olguların otuz dokuzuna ait *RB1* gen delesyon durumu ise; %58.1'i *RB1* geni delesyonu olmayan ve %32.6'sı *RB1* geni delesyonu mevcut olan hastalardan oluşmaktadır. Olguların otuz beşinin OS bilgilerine göre 3 hasta ex olduğu bilgisine ulaşılmıştır (Şekil 4.1). Tedavi durum bilgisine ulaşılan otuz üç olgudan %34.9'u tedavi alan ve %41.9'u tedavi almayan hastalardan oluşmuştur. Olguların otuz üçüne ait hastalık evre bilgisine göre; %27.9'u geç evre (RAI III veIV) KLL hastalarından, %48.8'i erken evre (RAI 0,I ve II) KLL hastalarından oluşmuştur.

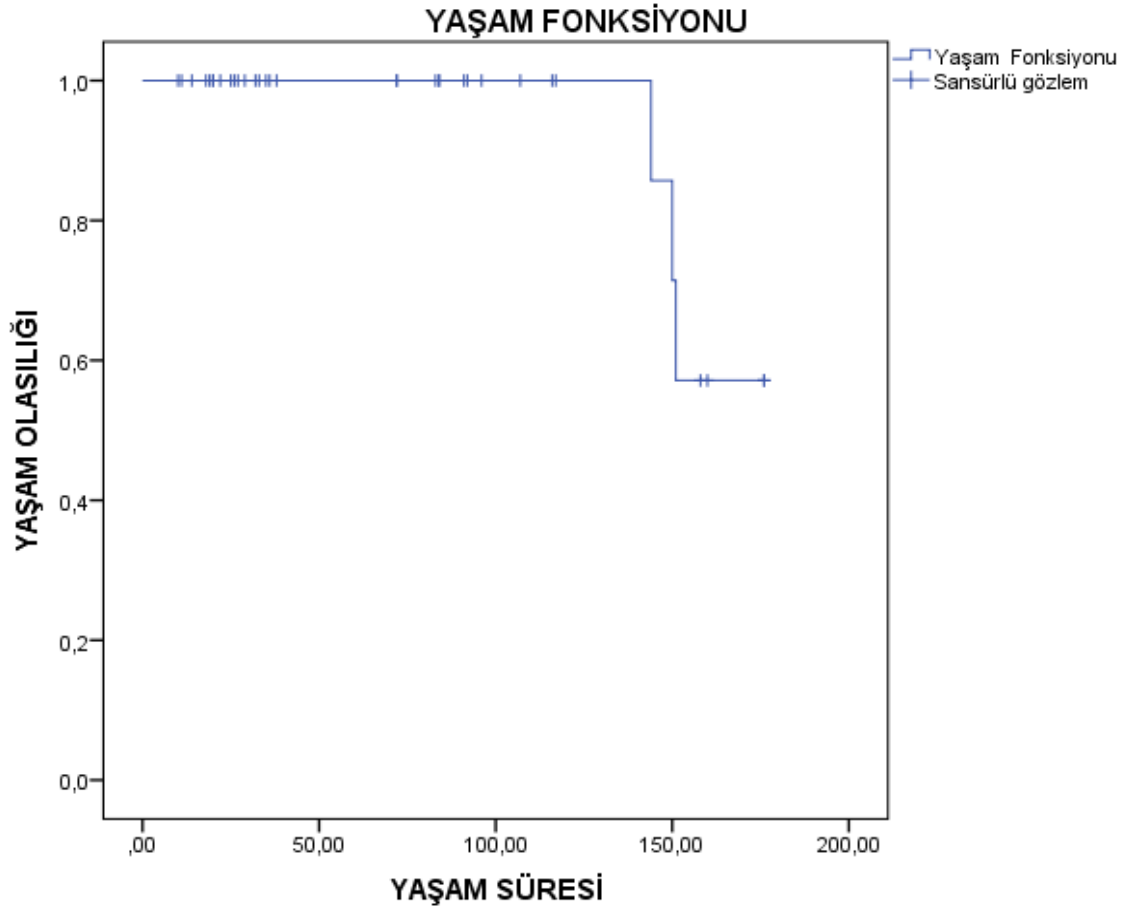


**Tablo 4.1.** Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Klinik Verileri İle Birlikte Moleküler Patolojileri

<b>Olgu Sayısı</b>	<b>Yaş</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Del13q</b>	<b>Rb</b>	<b>OS</b>	<b>TTT</b>	<b>Evre</b>
Olgu-1	70	E	%12.50	+	X	X	X
Olgu-2	71	E	%54.49	-	117	33	II
Olgu-3	61	E	%49.78	+	176	Tİ	II
Olgu-4	69	K	%23.7	-	25	Tİ	I
Olgu-5	89	K	%10.71	-	160	45	I
Olgu-6	82	E	%10.1	+	18	Tİ	0
Olgu-7	66	K	%70.1	-	72	Tİ	II
Olgu-8	58	E	%30.1	-	27	Tİ	II
Olgu-9	70	K	%91	-	36	30	0
Olgu-10	67	E	%78.71	+	20	Tİ	III
Olgu-11	63	E	%61.11	-	72	Tİ	II
Olgu-12	43	K	%72	-	38	Tİ	I
Olgu-13	59	E	%49.66	-	26	3	0
Olgu-14	74	K	%79	+	32	Tİ	II
Olgu-15	81	E	%8.83	+	X	X	0
Olgu-16	68	E	%80	-	176	0	II
Olgu-17	48	E	%32.18	X	X	X	X
Olgu-18	67	K	%9.9	-	10	X	X
Olgu-19	72	E	%21.26	+	X	X	X
Olgu-20	66	K	%87.80	-	92	Tİ	I
Olgu-21	73	E	%87.45	+	83	6	II
Olgu-22	68	E	%87.93	-	22	0	IV
Olgu-23	63	K	%26.29	-	X	X	X
Olgu-24	80	K	%45.23	+	107	Tİ	I
Olgu-25	47	E	%68	-	84	73	III
Olgu-26	83	K	%47.9	+	X	X	X
Olgu-27	64	E	%27	-	33	Tİ	0
Olgu-28	68	K	%54.18	-	35	6	III
Olgu-29	77	E	%92.4	+	144(EX)	20	II
Olgu-30	77	E	%11.03	+	19	3	III
Olgu-31	66	E	%87.1	-	29	14	II
Olgu-32	82	E	%91.82	+	91	0	III
Olgu-33	67	K	%70	-	14	0	III
Olgu-34	77	K	%9.8	-	116	Tİ	I
Olgu-35	77	K	%30.61	-	151(EX)	77	III
Olgu-36	71	E	%30.61	X	84	0	III
Olgu-37	76	E	%33.33	X	96	Tİ	IV
Olgu-38	77	K	%30.61	X	150(EX)	76	III

Olgu Sayısı	Yaş	Cinsiyet	Del13q	Rb	OS	TTT	Evre
Olgu-39	63	E	%80	+	158	0	III
Olgu-40	82	K	%89.02	-	X	X	X
Olgu-41	75	E	%30.53	-	20 gün	Tİ	X
Olgu-42	58	E	%16	-	11	Tİ	0
Olgu-43	64	K	%9.8	-	X	X	X

Tabloda cinsiyet bölümünde E: Erkek K:Kadın, Rb bölümünde (+) Rb delesyon varlığı, (-) Rb delesyon yokluğu). (Tİ: Tedavisiz izlem, RB1: Retinoblastom 1, OS: Toplam yaşam süresi, TTT: Tedaviye başlama süresi, X: ilgili bölüm için bilgisi olmayan hastalar)



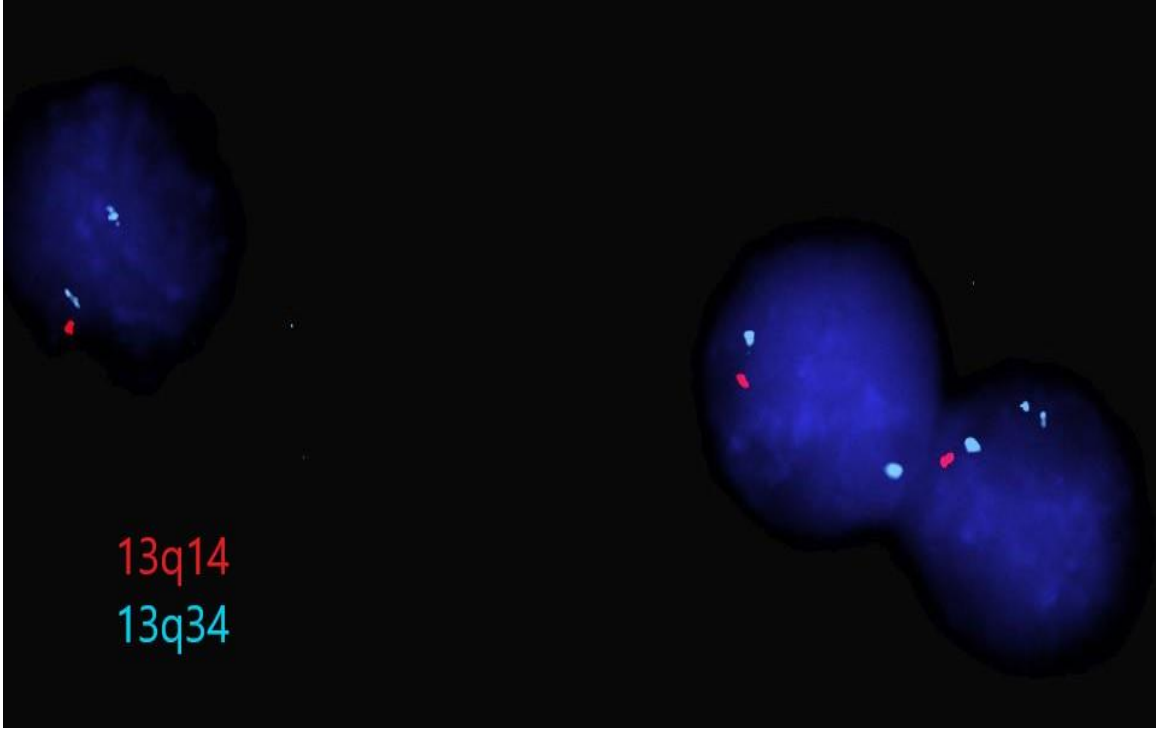
**Şekil 4.1.** Hastaların Toplam Yaşam Sürelerinin Grafik Olarak Gösterimi

Çalışma grubumuz oluşturan hastalarda, *NOTCH1* geninin 34. ekzonunda ve *SF3B1* geninin 14., 15. ve 16. ekzonlarında yer alan hotspot mutasyonlar Sanger sekanslama yöntemi ile dizilenmiştir (Tablo 4.2). *NOTCH1* genini sekanslamada hastalara ait örneklerin 1'inden, *SF3B1* sekanslamada hastaların ait örneklerin 4'ünden sonuç alınamamıştır.

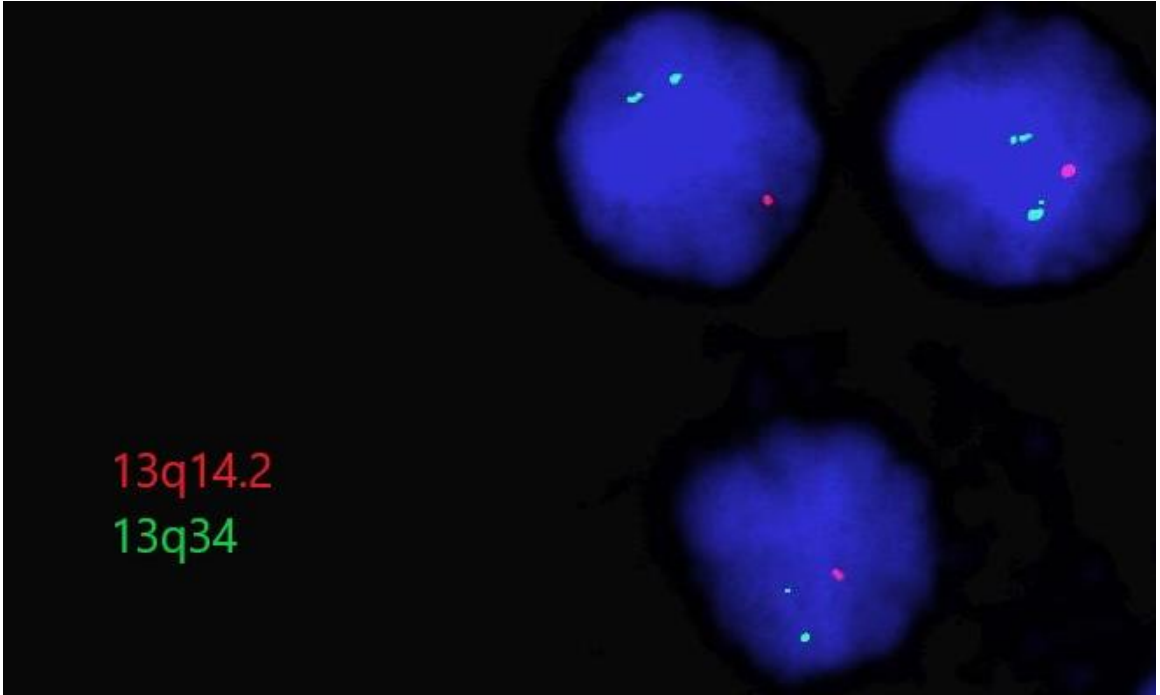
**Tablo 4.2.** *NOTCH1* ve *SF3B1* Genlerinde Sanger Sekanslama Yöntemi İle Değerlendirilen Hedef Mutasyonlar

<b><i>SF3B1</i> gen mutasyonları</b>	<b><i>NOTCH1</i> gen mutasyonları</b>
2098A>G	7541_7542delCT
1866 G>T	7444delC
1998 G>T	
2225 G>A	

Sanger sekanslama yöntemi ile değerlendirilen hasta örneklerinden sadece olgu-21'de *NOTCH1* geninde 7541\_7542delCT frame-shift mutasyonu tespit edilmiştir. Ancak belirtilen hasta grubunda, *SF3B1* geninde mutasyon saptanamamıştır.



Şekil 4.2. Olgu-21'e Ait FISH Yöntemi İle Tespit Edilmiş del13q14 Görüntüsü



Şekil 4.3. Olgu-21'e Ait FISH Yöntemi İle Tespit Edilmiş *RBI* Delesyon Görüntüsü



#### 4.1. İstatistiksel Analiz

- *NOTCH1* gen mutasyonu bir hastada saptandığı için, *RB1* gen delesyon durumu, hastalık evresi (RAI evre), del13q oranı, OS ve TTT ile *NOTCH1* geninin mutasyonel durumu ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.
- *SF3B1* geninde ise mutasyon saptanamadığı için, *RB1* gen delesyon durumu, hastalık evresi (RAI evre), del13q oranı, OS ve TTT ile *SF3B1* geninin mutasyonel durumu ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda farklı merkezlerde tanısı konan ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda FISH yöntemiyle belirlediğimiz izole del13q saptanan kırk üç hastada kötü prognostik etkisi olan *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinde mutasyon profilini Sanger Sekanslama yöntemiyle inceledik. İlgili genlerin mutasyonel durumunun hastalık evreleri, OS ve TTT ile ilişkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

### 5.1. Genel Mutasyon Oranın Değerlendirilmesi

Jeromin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bin yüz altmış tedavi edilemeyen KLL hastasında *SF3B1*, *NOTCH1*, *FBXW7*, *MYD88*, *TP53* ve *XPO1* gibi yeni genetik markerların mutasyonel durumunu incelemeyi hedeflemişlerdir. Yapılan çalışmada olguların %12.3'de *NOTCH1* geninde, %9'unda *SF3B1* geninde, %7'sinde *TP53* geninde mutasyonlar saptanmıştır. Araştırmacılar *FBXW7*, *MYD88* ve *XPO1* genlerinde saptanan mutasyon oranının *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53* genlerinde saptanan mutasyon oranına göre daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. *SF3B1*, *NOTCH1* ve *TP53* genlerindeki mutasyonları kötü prognozla ilişkilendirmişlerdir (Jeromin vd., 2014).

Rossi ve arkadaşları Fludarabine-dirençli ellidokuz KLL hastasıyla yaptıkları çalışmada *SF3B1* geninde %17 oranında mutasyon saptamışlardır. *SF3B1* geninde mutasyonların somatik olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Belirtilen genin HEAT domaininde en sık görülen 3 hotspot (kodon 662, 666 ve 700) mutasyonu incelemişlerdir. Bu noktalarda yanlış anlamlı nükleotid değişimleri meydana geldiğini ve ilgili gendeki mutasyonları kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Rossi vd., 2011).

Kwok ve arkadaşları yaptıkları çalışmada altı yüz otuz üç KLL hastasına ait periferik kan ve kemik iliği örneklerinde *TP53*, *BIRC3*, *NOTCH1*, *SF3B1*, ve *ATM* genlerinin belirli ekzonlarını yeni nesil sekanslama (NGS) yöntemiyle incelemişlerdir. Çalışmalarında NGS yöntemi ile hastaların %37'sinde belirtilen genlerde mutasyonlar saptamışlardır (Kwok vd., 2018).

Yeni nesil sekanslama yöntemi ile saptanan mutasyonların %12'sini *TP53*, %11'ini *NOTCH1*, %10'unu *SF3B1*, %7'sini *ATM* ve %3'ünü *BIRC3* genlerinde olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca hastaların örnekleri FISH yöntemi ile 11q22.3 (*ATM*), kromozom 12, 13q14.3/13q34 ve 17p13.1 (*TP53*) ait problemler kullanılarak değerlendirilmiştir. FISH analiz sonucunda kronik lenfositik lösemi hastalarının %85'inde sitogenetik anomaliler saptanmıştır. Saptanan sitogenetik anomalilerin %65'ini del13q, %19'unu trizomi 12 ve %17'sini del11q ve %10'unu del17p oluşturduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda FISH yöntemiyle düşük risk saptanan KLL hastalarının %29'unda ilgili genlerde kötü prognoza sebep olan mutasyonlar saptandığını bildirmişlerdir (Kwok vd., 2018).

Kipps ve arkadaşları KLL ile ilişkili genlerde somatik mutasyonlar ve bu mutasyonların sıklığının belirlenmesi için beş yüz hastadan fazla hasta örneğinden oluşan 2 farklı kohortta tüm ekzom ve tüm genom sekanslama yöntemleriyle analiz yapmışlardır. Bu çalışmalarda hastaların klinik ve biyolojik özellikleri incelenmiştir. İlk kohortta *SF3B1* (hastaların %21), *ATM* (hastaların %15), *TP53* (hastaların %7), *NOTCH1* (hastaların %6) ve *BIRC3* (hastaların %4) genlerinde mutasyon saptanmıştır. İkinci kohortta ise erken evre-KLL ve monoklonal B hücre lenfositozu olan hastalarda *NOTCH1* (hastaların %12.6), *ATM* (hastaların %11), *BIRC3* (hastaların %8.8) ve *SF3B1* (hastaların %8.6) genlerinde mutasyon saptanmıştır (Kipps vd., 2017).

Rasi ve arkadaşları üç yüz dört yeni tanı almış KLL hastasında genellikle küçük alt klonlarda mutant olan *NOTCH1*, *SF3B1* ve *BIRC3* genlerinin NGS yöntemiyle mutasyonel durumunu incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda KLL hastalarının %14'ünde *NOTCH1* gen mutasyonlarını, %11'inde *SF3B1* gen mutasyonlarını ve %8'inde *BIRC3* gen mutasyonlarını saptamışlardır. Belirtilen mutasyonlar Sanger sekanslama yöntemi ile doğrulanarak mutasyon analizleri tamamlanmıştır (Rasi vd., 2016).



**Tablo 5.1.** Literatürlerde KLL Hastalarından Elde Edinilen Verilerin Özeti

Araştırmacılar	Yıl	Olgu klinik bilgi	Olgu Sayısı (n)	SF3B1 mutasyon (%)	NOTCH1 mutasyon (%)	Metod
Jeromin ve ark.	2014	TD	1160	9	12.3	NGS
Rossi ve ark	2011	TD	59	17	-	NGS
Kwok ve ark.	2018	X	633	10	11	NGS
Kipps ve ark (2 kohort)	2017	X	500	21 8.6	6 12.6	WES
Rasi ve ark.	2016	X	304	11	14	NGS
Bizim çalışmamız	2019	Tİ ve TA	43	0	2.4	Sanger

(X: tedavi durumu belirtilmeyen hastalar, TA: tedavi alan, Tİ: tedavisiz izlem, TD: tedaviye dirençli - : bilgisi mevcut değil)

Yapılan çalışmalarda elde edilen veriler yukarıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 5.1). Bu veriler doğrultusunda *SF3B1* geninde mutasyon oranının %9-%21 arasında değiştiği, *NOTCH1* geninin mutasyon oranının ise %6-%14 arasında değiştiği görülmektedir. Yapılan çalışmalarda hasta gruplarına bakıldığı zaman; hasta sayısının yüksek olduğu ve tedaviye dirençli hastalardan oluştuğu görülmektedir. Aynı zamanda belirtilen hasta gruplarında olguların sahip olduğu kromozomal aberasyon durumuna ait herhangi bir veri de bulunmamaktadır. Çalıştıkları yöntemlerde ise ilgili genlerin tüm mutasyonlarını değerlendirdikleri görülmektedir. Bizim çalışmamızda ise *NOTCH1* geninde mutasyon oranımız %2.4 ve *SF3B1* geninde mutasyon oranımız %0 olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalardaki mutasyon oranının bizim çalışmamızdan daha yüksek olmasının sebepleri daha yüksek hasta sayısı ve tedaviye dirençli hastalarda çalışmalarını ile açıklanabilir. Ayrıca yapılan çalışmalarda *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinin tüm mutasyonlarına bakılmış olması, çalışmamızda ise ilgili genlerde belirli mutasyonların değerlendirilmiş olması nedeni ile araştırmacılar daha yüksek oranda mutasyon saptamış olabilirler.

Dolayısıyla yapılan çalışmalarda saptanan tüm mutasyon oranlarının, sadece del13q'ya sahip hastalara ait olmadığı, yani tüm KLL olgularına ait olduğu görülmektedir. Diğer çalışmalarda sadece del13q'ya sahip hastalar değerlendirilemediği için çalışmaların mutasyon oranları bizim çalışmamızdakinden daha yüksek saptanmış olabilir. Bu nedenle ilgili kromozomal aberasyonunun *NOTCH1* ve *SF3B1* mutasyonel durumu ile ilişkisi tartışılacaktır.

## **5.2. *NOTCH1* ve *SF3B1* Genlerinin Mutasyonlarının 13q Delesyonlu Olgular ile İlişkisi**

Villamor ve arkadaşları çalışmalarında beş yüz altmış beş KLL hastasına ait örneklerde WES ve WGS yöntemleri ile *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinde mutasyon taraması yapmışlardır. Hastaların %11'inde ilgili genlere ait herhangi bir mutasyon saptayamamışlardır. Çalışmalarında hastaların kırkyedisinde del13q14 saptamışlardır. Delesyon 13q14 saptanan KLL hastalarının on dördünde (%29 oranında) *NOTCH1* geninin mutant olduğunu belirtmişlerdir. Fakat del13q aberasyonu bulunan hastalarda mutant olmayan *NOTCH1* geninin daha yüksek sıklıkta olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak *NOTCH1* geninin trizomi 12 aberasyonu ve hastalığın ileri evresiyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *NOTCH1* gen mutasyonlarının *IGHV*'nin mutasyonel durumundan bağımsız olarak kısa sağkalımla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Villamor vd., 2013).

Xu ve arkadaşları *NOTCH1* gen mutasyonlarının KLL hastalarında kötü prognoza sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu yüzden izole 13q, trizomi 12 ve belirtilen iki kromozomal anomaliya sahip üç hastada *NOTCH1* geninin PEST domainin sekanslamışlardır. Çalışmalarının sonucunda ilgili genin mutasyonlarının 13q delesyonu ve trizomi 12 ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (Xu vd., 2015).

Schwaederle ve arkadaşları ise beş yüz kırk beş KLL hastasında yaptıkları çalışmada *SF3B1* geninin mutasyonel durumunu incelemişlerdir. Çalışmalarında belirtilen hasta sayısının dört yüz kırk sekizini tedavi alan, doksanyedisini takip edilen KLL hastalarından oluştuğunu bildirmişlerdir. Hastalarda saptanan *SF3B1* gen mutasyonlarının FISH ile saptanan kromozomal anomaliler (del11q, del13q, del17p13 ve tri12) ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda ilgili gende %6.6 oranında mutasyon saptamışlardır. Ayrıca ilgili gen mutasyonlarının belirtilen kromozomal anomaliler ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. Delesyon 13q14 olan 6 hastada *SF3B1* genin mutasyonlarını (E622D, K700E, N626Y ve K741T) saptamalarına rağmen, ilgili mutasyon ile del13q arasında bir ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir (Schwaederle vd., 2013).

Jeromin ve arkadaşları çalışmalarında bin yüz yirmi dört yeni tanı almış KLL hastasında sekanslama yöntemi ile *SF3B1* geninde %9.3 oranında mutasyon saptamışlardır. Ek olarak FISH yöntemiyle tespit ettikleri del11q, del17p, trizomi 12 ve izole del13q saptanan olgularda *SF3B1* gen mutasyonlarının belirtilen kromozomal anomalilerle olan ilişkisini değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak *SF3B1* gen mutasyonunun del11q ve izole del13q kromozom anomalilerinde, saptanan diğer kromozomal anomalilerine göre daha yüksek sıklıkta olduğunu belirtmişlerdir. *SF3B1* gen mutasyonu saptanan izole 13q delesyonlu hastalarda ise saptanan bu mutasyonların kötü prognostik etkisinin oldukça önemli olduğunu vurgulamışlardır (Jeromin vd., 2012).

Miao ve arkadaşları izole ve izole olmayan 13q delesyonuna sahip tedavi edilemeyen üç yüz yirmi üç KLL hastasında *NOTCH1*, *SF3B1*, *IGHV* genlerinin mutasyonel durumunu değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında izole 13q delesyonuna sahip KLL hastalarının izole olmayan 13q delesyonuna sahip KLL hastalarına göre daha iyi prognoz göstermesine rağmen, izole 13q delesyonuna sahip hastaların prognoz açısından (OS, TTT) heterojenite gösterdiğini bildirmişlerdir (Miao vd., 2018).

Bu yüzden çalışmalarında KLL hastalarını izole 13q'ya sahip KLL hastaları ve izole olmayan 13q KLL hastaları olarak gruplamışlardır. Ayrıca hastaların 13q delesyon oranlarını ise %80'den fazla ve %80'den az olarak gruplamışlardır. Çalışmalarında del13q oranı >%80 olan hastalarda ilgili genlerde mutasyon oranının, del13q oranı <%80 olan hastalara göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda izole olmayan 13q delesyonlu hastalarda *NOTCH1* gen mutasyon oranı %12.9, izole 13q delesyonlu hastalarda %1.6 (1/61) bulunmuştur (Miao vd., 2018). Çalışmamızda izole 13q KLL hastalarında *NOTCH1* geninde %2.4 (1 hastada) mutasyon saptanmış ve araştırmacıların sonuçları ile uyumluluk göstermiştir. Yapılan çalışmada izole olmayan 13q delesyonlu hastalarda *SF3B1* geninde saptanan mutasyon oranı %0 ve izole 13q delesyonlu hastalarda ilgili gende mutasyon oranı %4.8 olarak belirtilmiştir (Miao vd., 2018).

Baliakas ve arkadaşları üç bin dört yüz doksan KLL hastasının *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*, *MYD88* ve *BIRC3* genlerinde mutasyonları belirlemeyi ve bu mutasyonların TTT, del13q, del11q ve *IGHV*'nin ile ilişkisini incelemişlerdir. Olgu grubunu %75 yeni tanı hastalar ve %90'ın üstünde tedavi almayan hastalar oluşturmuştur. Çalışmalarının sonucunda *NOTCH1* geninde %8 oranında mutasyon saptamışlardır. İlgili gende 2 hastanın çift mutasyon taşıdığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar *NOTCH1* gen mutasyonu ile ileri evre ve trizomi 12 arasında pozitif bir ilişki, izole del13q ile negatif bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. *SF3B1* geninde ise %11.2 oranında mutasyon saptamışlardır. Ek olarak ilgili gende 6 hastanın 2 mutasyon taşıdığını bildirmişlerdir. *SF3B1* gen mutasyonlarının, ilgili proteinin HEAT domaininde meydana geldiğini belirtmişlerdir. İlgili genin mutasyonları ile del11q ve ileri evre hastalarda pozitif ilişki, trizomi 12 ve izole del13q ile negatif ilişki gösterdiğini saptamışlardır (Baliakas vd., 2015). Bizim çalışma grubumuz izole del(13q) KLL vakalarından oluşmaktadır. Baliakas ve arkadaşlarının verilerine dayanarak izole del(13q) ve *SF3B1* geni arasındaki negatif ilişki olgu grubumuzda *SF3B1* gen mutasyonu tespit edemememizin bir diğer nedeni olarak yorumlanabilir.

Perez ve arkadaşları KLL hastalarında 13q kayıplarının iyi prognostik kabul edilmesine rağmen, bu prognozun değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu yüzden del13q bulunan KLL hastalarında mutant olan genleri NGS yöntemini kullanarak belirlemeyi hedeflemişlerdir. Çalışmalarında tedaviye dirençli iki yüz on üç KLL hastasının %54.9'unda izole 13q delesyonu saptanmıştır. İzole 13q saptanan yetmiş üç KLL hastasında otuz dokuz gende yüz yetmiş iki mutasyon saptamışlardır. Bu mutasyonların %10.3'ünü *TP53*, %9.4'ünü *NOTCH1*, %8.6'sını *SF3B1*, %5.1'ini *ATM* ve %3.4'ünü *BIRC3* gen mutasyonları oluşturmaktadır. Hatta izole 13q hastalarının %63'ünün birden fazla mutasyon taşıdığını belirtmişlerdir (Perez vd., 2018) (Şekil 5.2)

**Tablo 5.2.** Literatürlerde 13q Delesyonlu KLL Olgu Gruplarında Elde Edinilen Verilerin Özeti

Araştırmacılar	Yıl	Olgu klinik bilgi	Olgu Sayısı (n)	SF3B1 mutasyon (%)	NOTCH1 mutasyon (%)	Metod
Villamor ve ark	2013	X	47	-	49	Sanger
Xu ve ark	2015	X	3/2	-	100	Sanger
Schwaederle ve ark.	2013	Tİ ve TA	545	6.6	-	-
Jeromin ve ark.	2012	X	1124	9.3	-	Sanger NGS
Miao ve ark	2018	TD	123/61	12	1.6	Sanger
Baliakas ve ark	2015	X	1490	11.2	8	-
Perez ve ark	2018	TD	213/116	8.6	9.4	NGS
Bizim Çalışmamız	2019	Tİ ve TA	43	0	2.4	Sanger

(X: tedavi durumu belirtilmeyen hastalar, TA: tedavi alan, Tİ: tedavisiz izlem, TD: tedaviye dirençli, - : bilgisi mevcut değil)

Yapılan çalışmalarda elde edilen veriler yukarıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 5.2). Çalışmalarda *SF3B1* geninde mutasyon oranı %6.6-%12 arasında değişmekte olduğuna, *NOTCH1* geninde mutasyon oranı ise %1.6-%100 arasında değişmekte olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda ise *SF3B1* gen mutasyon oranı %0 ve *NOTCH1* gen mutasyon oranı %2.4 olarak saptanmıştır. Çalışmalarda ilgili genlerde saptanan mutasyon oranının bizim çalışmamıza oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmamızda ilgili genlerde sadece hotspot mutasyonları incelememiz ve olgularımızın ~ %42'sinin iyi prognoz gösteren (tedavisiz izlem) hastalardan oluşması literatür verilerindeki mutasyon oranına ulaşamamamızın majör nedeni olarak görülmüştür.

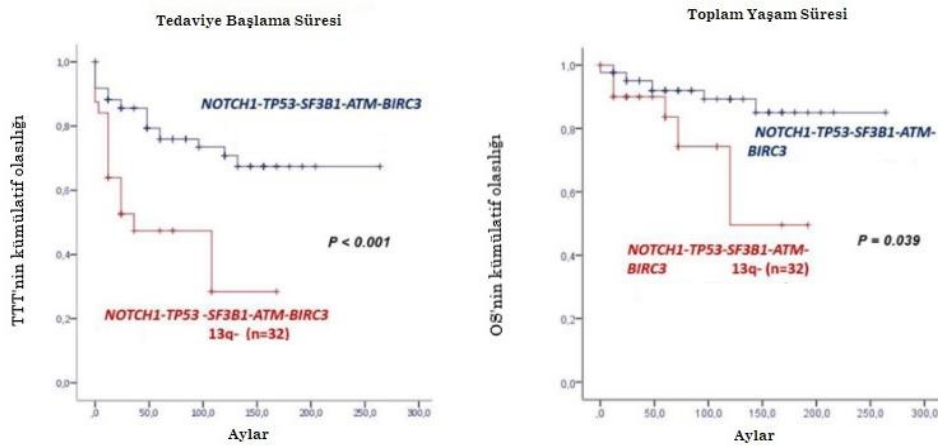
### 5.3. NOTCH1 ve SF3B1 Genlerinin Mutasyonlarının Hastalık Evreleri, OS ve TTT olan ilişkileri

Hu ve arkadaşları çalışmalarında üç yüz seksen dört tedavi almayan KLL hastasında bilinen prognostik faktörler ve somatik mutasyonlar ile TTT ilişkisini değerlendirmeyi hedeflemişlerdir. Hastaların kemik iliği ve kan örneklerinde yirmi dokuz genden oluşan panel NGS yöntemiyle çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda mutant *ATM*, *NOTCH1* ve *SF3B1* ve *UM-IGHV*, del(11q), trizomi 12 ve ileri Rai ve Binet evreleri kısa TTT ile ilişkilendirilmiştir. Fakat literatürün aksine del(17p), mutant *TP53* ve kompleks karyotip kısa TTT ile ilişkisi saptanamamıştır (Hu vd., 2019).

Oscier ve arkadaşları KLL hastalarında *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerindeki mutasyonların prognostik önemini araştırmayı amaçlamışlardır. Ayrıca ilgili genlerin mutasyonlarının tedaviye yanıt ve sağkalımla olan ilişkisini saptamayı hedeflemişlerdir. Dört yüz doksan dört hastada yaptıkları çalışmada *NOTCH1* geninde %17 ve *SF3B1* geninde %10 oranında mutasyon saptamışlardır. Kronik lenfositik lösemi hastalarında *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinin mutasyonlarının kısa sağkalımla ilişkili olduğu bildirilmiştir. (Oscier vd., 2013).

Nadeu ve arkadaşları KLL tanısı almış dört yüz altı hastada yaptıkları çalışmada *TP53* geninde %10.6, *SF3B1* geninde %13, *BIRC3* geninde %4.2, *NOTCH1* geninde %22 ve *ATM* geninde %11,1 oranlarında mutasyon saptamışlardır. *NOTCH1*, *SF3B1* ve *ATM* genlerindeki mutasyonların kısa tedaviye başlama süresi (TTT) ile ilişkili olduğu, *NOTCH1* ve *TP53* genlerinin mutasyonlarının ise kısa OS ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Nadeu vd., 2016).

Chiaretti ve arkadaşları KLL hastalarında yaptıkları çalışmada *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* ve *TP53* genlerindeki mutasyonların sıklığını ve sağkalıma olan etkilerini incelemeyi hedeflemişlerdir. Yüz altmış üç hastada *NOTCH1* geninde %15.9, *SF3B1* geninde %12.2, *BIRC3* geninde %8.6 ve *TP53* geninde %10.4 oranlarında mutasyonlar saptamışlardır. Çalışmalarının sonunda mutant *NOTCH1* genini kısa sağkalım ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. (Chiaretti vd., 2014).



**Şekil 5.1.** Delesyon 13q saptanan KLL hastalarında *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinin TTT ve OS Etkisi (Kırmızı : 13q delesyonlu hastalar, mavi: 13 delesyonu saptanmayan hastalar) (Perez vd., 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.

Maleki ve arkadaşları çalışmalarında yüz KLL hastası ve yüz beş sağlıklı bireyde *NOTCH1* c.7544-7545delCT, *SF3B1* c.2098A>G, *MDM2* 40-bp insersiyon/delesyon ve *MYD88* L265P mutasyonlarını PZR yöntemi kullanılarak tespit etmeyi hedeflemişlerdir. Saptanan *NOTCH1* ve *SF3B1* mutasyonlarını genomik DNA sekanslama yöntemiyle konfirme etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada KLL hastaları RAI evreleme sistemine göre gruplandırılmış ve RAI evrelerine göre ilgili genlerin mutasyonel durumu ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışmalarının sonucunda hastaların %10'unda *NOTCH1* mutasyonu saptamışlardır (Maleki vd., 2019).



*NOTCH1* gen mutasyonlarının ileri evre KLL hastalarında daha yüksek sıklıkta saptandığını bildirmişlerdir. *SF3B1* gen mutasyonlarını ise hastaların %12'sinde saptamışlar ve yine ileri evre KLL hastalarında yüksek sıklıkta olduğunu belirtmişlerdir (Maleki vd., 2019).

Çalışmalarda *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinin mutasyonları OS, RAI evre ve TTT değerlendirilmiştir. İlgili genlerin mutasyonlarının kötü prognostik etkileri olması nedeniyle kısa OS ve TTT ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak yapılan çalışmada *NOTCH1* ve *SF3B1* gen mutasyonları geç evre KLL'ler ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda *SF3B1* geninde mutasyon saptanamaması nedeniyle hastalık evresi, OS ve TTT parametreleriyle olan ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Rosati ve arkadaşları çalışmalarında KLL hastalarında *NOTCH1* geninde en sık görülen 7541\_7542delCT mutasyonunun PEST domaininde meydana geldiğini belirtmişlerdir. PEST domainin ise Notch1 proteinin degradasyonundan ve stabilitesinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Bu mutasyonun etkisiyle kısa PEST domaininin oluştuğunu, oluşan bu kısa PEST domainin etkisi ile ilgili proteinin degradasyonunun gerçekleşmediğini göstermişlerdir. Bu yüzden Notch1 proteinin çekirdek içinde biriktiği ve yolağın sürekli aktivasyonuna sebep olarak, KLL hücrelerinin proliferasyonunu ve sağkalımını arttırdığını bildirmişlerdir (Rosati vd., 2018). Biz de çalışmamızda *NOTCH1* geninde bir olguda 7541\_7542delCT mutasyonunu saptadık. *NOTCH1* mutasyonu saptadığımız hastanın RAI evreleme sisteminde II. evrede yer aldığı ve tedaviye başlama süresinin kısa olduğu görülmektedir. Fakat ilgili gende mutasyonu bir hastada saptamamızdan dolayı mutasyonel durum ile belirtilen parametreler istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Ek olarak hastada KLL'de prognozu olumsuz yönde etkileyen Rb gen delesyonunun mevcut olmasına rağmen, yine bu durumun istatistiksel olarak değerlendirilmemesi, ilgili genin mutasyonunun prognoz ile ilişkisini belirleyemememize neden olmuştur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda FISH yöntemiyle izole del13q saptanan kırk üç hastada kötü prognostik etkisi olan *NOTCH1* ve *SF3B1* genlerinde mutasyon profilini Sanger Sekanslama yöntemiyle incelenmiştir. Ayrıca adı geçen genlerin mutasyonel durumunun hastalık evresi, OS ve TTT ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar;

- *NOTCH1* geninde mutasyon oranı %2.4 saptanmıştır.
- *SF3B1* geninden mutasyon oranı %0 olarak saptanmıştır.
- Çalışmaya dahil edilen hastaların 1 tanesinde *NOTCH1* gen sekanslamada, 4 hastada *SF3B1* gen sekanslamada sonuç alınamamıştır.
- Çalışmada *NOTCH1* geninde 1 hastada mutasyon saptanması ve *SF3B1* geninde mutasyon saptanamamasından dolayı ilgili genlerin mutasyonel durumu ile hastalık evreleri, del13q oranları, *RB1* gen delesyon varlığı, OS ve TTT parametreleriyle ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilme yapılamamıştır.

Bu veriler doğrultusunda izole 13q delesyonlu hastaların bu iki mutasyon ile ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilememesine rağmen olgu grubunda *NOTCH1* için 1 hastada *SF3B1* için hiçbir hastada mutasyon saptanmaması, mutasyon ile olgu grubu arasında bir ilişkinin olmadığını düşündürmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda, yüksek KLL hasta sayısı ve ilgili genlerin tüm mutasyonlarının çalışılması ile daha anlamlı sonuçlar alınacağı ve ilgili genlerin mutasyonlarının prognoza olan etkisinin (OS, TTT ve hastalık evreleri) istatistiksel olarak değerlendirilebileceği öngörülmüştür.

Literatürde ulaşılabildiği kadarıyla çalışmamız Türk popülasyonunda, izole del13q KLL hastalarında *NOTCH1* ve *SF3B1* mutasyonel durumu ile hastalara ait del13q oranlarını, *RB1* gen delesyon durumunu, OS ve TTT parametrelerinin ilişkisini inceleyen ilk çalışma olarak görülmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alhourani, E., Othman, M. A., Melo, J. B., Carreira, I. M., Grygalewicz, B., Vujić, D., ... & Schlie, C. (2016). BIRC3 alterations in chronic and B-cell acute lymphocytic leukemia patients. *Oncology letters*, 11(5), 3240-3246.
- Alsafadi, S., Houy, A., Battistella, A., Popova, T., Wassef, M., Henry, E., ... & Dutertre, M. (2016). Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage. *Nature communications*, 7, 10615.
- Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Sutton, L. A., Rossi, D., Minga, E., Villamor, N., ... & Tausch, E. (2015). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 29(2), 329.
- Bommer, U., Vine, K. L. & Cancer Council Australia, O. (2014). *Cancer biology: molecular and genetic basis*. In S. Sabesan, I. Olver &
- Burger, J. A., & O'Brien, S. (2018). Evolution of CLL treatment—from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(8), 510.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*, 25(46), 6202.
- Chiaretti, S., Marinelli, M., Del Giudice, I., Bonina, S., Piciocchi, A., Messina, M., ... & Guarini, A. (2014). NOTCH1, SF3B1, BIRC3 and TP53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment. *Leukemia & lymphoma*, 55(12), 2785-2792.
- Cordone, I., Masi, S., Mauro, F. R., Soddu, S., Morsilli, O., Valentini, T., ... & Sacchi, A. (1998). p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood*, 91(11), 4342-4349.
- Fabbri, G., & Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 16(3), 145.
- Grech, G., Avellino, R., & Schembri Wismayer, P. (2009). Molecular mechanisms in haematological malignancies.
- Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American journal of hematology*, 92(9), 946-965.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Hu, B., Patel, K. P., Chen, H. C., Wang, X., Luthra, R., Routbort, M. J., ... & Ok, C. Y. (2019) Association of gene mutations with time-to-first treatment in 384 treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia patients. *British Journal of Haematology*.
- Jeromin, S., Haferlach, C., Bayer, K., Dicker, F., Weissmann, S., Grossmann, V., ... & Schnittger, S. (2012). SF3B1 mutations have adverse impact on time to treatment especially in patients with 13q deletions: a study on 1,124 chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients.
- Jeromin, S., Weissmann, S., Haferlach, C., Dicker, F., Bayer, K., Grossmann, V., ... & Kern, W. (2014). SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*, 28(1), 108.
- Jiang, Y., Chen, H. C., Su, X., Thompson, P. A., Liu, X., Do, K. A., ... & Plunkett, W. (2016). ATM function and its relationship with ATM gene mutations in chronic lymphocytic leukemia with the recurrent deletion (11q22.3-23.2). *Blood cancer journal*, 6(8), e465.
- Khwaja, A., Bjorkholm, M., Gale, R. E., Levine, R. L., Jordan, C. T., Ehninger, G., ... & Scheinberg, D. A. (2016). Acute myeloid leukaemia. *Nature reviews Disease primers*, 2, 16010.
- Kwok, B., Yung, A., Reddy, P., Xu, Y., Chan, A., & Lyle, D. (2018). Targeted Next-Generation Sequencing of TP53, BIRC3, NOTCH1, SF3B1, and ATM Identifies a Significant Proportion of Lower-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia with Unfavorable Prognostic Indicators.
- Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., ... & Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Disease primers*, 3, 16096.
- Le Garff-Tavernier, M., Blons, H., Nguyen-Khac, F., Pannetier, M., Brissard, M., Gueguen, S., ... & Merle-Beral, H. (2011). Functional assessment of p53 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood cancer journal*, 1(2), e5.
- Martínez-Trillos, A., Pinyol, M., Navarro, A., Aymerich, M., Jares, P., Juan, M., ... & González-Díaz, M. (2014). Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*, 123(24), 3790-3796.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Maleki, Y., Alahbakhshi, Z., Heidari, Z., Moradi, M. T., Rahimi, Z., Yari, K., ... & Bahremand, F. (2019). NOTCH1, SF3B1, MDM2 and MYD88 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncology letters*, 17(4), 4016-4023.
- Miao, Y., Miao, Y., Shi, K., Sun, Q., Zhao, S. S., Xia, Y., ... & Zhu, H. Y. (2018). A higher percentage of cells with 13q deletion predicts worse outcome in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia carrying isolated 13q deletion. *Annals of hematology*, 97(9), 1663-1669.
- Nadeu, F., Delgado, J., Royo, C., Baumann, T., Stankovic, T., Pinyol, M., ... & Salaverria, I. (2016). Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 127(17), 2122-2130.
- Nowell, C. S., & Radtke, F. (2017). Notch as a tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer*, 17(3), 145.
- Omabe, M., & Okoroocha, A. E. (2011). Molecular basis of cancer initiation. *The International Journal of Biotechnology & Biochemistry (IJBB)*, 7(2), 229-38.
- Oscier, D. G., Rose-Zerilli, M. J., Winkelmann, N., de Castro, D. G., Gomez, B., Forster, J., ... & Else, M. (2013). The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*, 121(3), 468-475.
- Pérez C. C., Rodríguez-Vicente E A., Hernández-Sánchez M., Quijada-Álamo M., Benito R., Hernández-Sánchez J., Martín-Izquierdo M., ... & Hernández Rivas J. (2018). Notch1, Tp53, Sf3b1, Atm And Birc3 Gene Mutations Are Associated With A Worse Outcome In Chronic Lymphocytic Leukemia Patients With 13q Losses, *European Hematology Association Library*, 15 Haziran 2018, 214803; PF328
- Rasi, S., Khiabani, H., Ciardullo, C., Terzi-di-Bergamo, L., Monti, S., Spina, V., ... & Biasi, A. (2016). Clinical impact of small subclones harboring NOTCH1, SF3B1 or BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 101(4), e135.
- Rosati, E., Baldoni, S., De Falco, F., Del Papa, B., Dorillo, E., Rompietti, C., ... & Sportoletti, P. (2018). NOTCH1 aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Frontiers in oncology*, 8, 229.
- Rossi, D., & Gaidano, G. (2012). ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Rossi, D., Brusca, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., ... & Guarini, A. (2011). Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, 118(26), 6904-6908.
- Schwaederle, M., Ghia, E., Rassenti, L. Z., Obara, M., Dell'Aquila, M. L., Fecteau, J. F., & Kipps, T. J. (2013). Subclonal evolution involving SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 27(5), 1214.
- Villamor, N., Conde, L., Martínez-Trillos, A., Cazorla, M., Navarro, A., Bea, S., ... & Rozman, M. (2013). NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*, 27(5), 1100.
- Vyas, N., & Hassan, A. (2012). Recent advances in chronic lymphocytic leukemia. *Indian journal of cancer*, 49(1), 137.
- Xu, Z. S., Zhang, J. S., Zhang, J. Y., Wu, S. Q., Xiong, D. L., Chen, H. J., ... & Zhan, R. (2015). Constitutive activation of NF- $\kappa$ B signaling by NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology reports*, 33(4), 1609-1614.

# ÖZGEÇMİŞ

## Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Gülçin GÜNDEN

Doğum tarihi ve yeri : 11.07.1994 ve Konak/İZMİR

Uyruğu : T.C

Medeni durumu : Bekar

İletişim adresleri : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi

Genetik Anabilim Dalı

## Eğitim Durumu:

İlköğretim	Turan Çakın İ.Ö.O
Lise	Teğmen Ali Rıza Akıncı Anadolu Lisesi
Lisans	Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi
Y. Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Yabancı Dil: İngilizce

**Mesleki Deneyim :** ESOGÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda sağlık personeli

**Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:** Tıbbi Genetik Derneği

## Yayınlar :

- Aras, B. D., Inci, N. S., Aslan, A., Akay, O. M., Gunduz, E., Bulduk, T., Isik S., Cilingir O., Gunden G., Yavasoglu F., Karagulle, M., Seyhanli A., ARTAN S., Ozen H., Gulbas Z. (2019, July). Is RB1 gene deletion a prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. In MOLECULAR CYTOGENETICS (Vol. 12). CAMPUS, 4 CRINAN ST, LONDON N1 9XW, ENGLAND: BMC.
- Durak B. A., Cilingir O., Isik S., Arslan S., Dundar E., Ak G., Temena M. A., Erzurumluoglu E., Gunden G., Artan S. (2019, June). Evaluating the frequencies of EGFR, ALK/EML4, and ROS1 alterations in lung cancer: A single-center experience. European Human Genetics Conference Gothenburg, Sweden.
- Isik S., Gunden G., Cilingir O., Eker İ., Teke U. H., Gunduz E., Gökalp E. E., Artan S., Durak A. B. Importance of cytogenetic analysis in hematological malignancies: with two rare cases reports. 13. (2019, April) Balkan Congress of Human Genetics, Edirne-TURKEY.

- Gunden G., Isik S., Cilingir O., Davutoglu O. N., Yavasoglu F., Eker İ., Gunduz E., Gökalp E. E., Artan S., Durak A. B. - The rare abnormalities of chromosome 1 in myeloid malignancies. 13. (2019, April) Balkan Congress of Human Genetics, Edirne-TURKEY.
- EROGLU O., GÜVENİR Ç. E., KAYA H., ÇELEN M., NALBANT M. A., GÜNDEM G., USAÇ G. MDA-Mb-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Kafeik Asit Fenil Ester (Cape) Ve Zebularin (Zeb)'İN Kaspaz-9 Ve Kaspaz-7 Ekspresyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi. (October, 2016) MEDICAL GENETICS, Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics, VOL2, SUPPLEMENT 1.

### **Bilimsel Etkinlikler**

Burslar :

Ödüller :

Projeler :

Sözlü Konferans veya Seminerler :

Kurslar ve Eğitim Programları :

- CRISPR/Cas9 Gen Düzenlenme Çalıştayı
- 13. Balkan Kongresi İnsan Genetiği Principles of Pharmacogenetics kursu