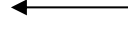


TUĞÇE SUDUTAN

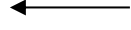
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

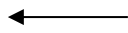


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

AKUT LÖSEMİ HASTALARINDA “ZINC FINGER
PROTEIN 384” (ZNF384) GENİ FÜZYONLARININ TESPİTİ

TUĞÇE SUDUTAN

DANIŞMAN
PROF.DR.MÜGE SAYITOĞLU

GENETİK ANABİLİMDALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2019

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS

**AKUT LÖSEMİ HASTALARINDA “ZINC FINGER
PROTEIN 384” (ZNF384) GENİ FÜZYONLARININ TESPİTİ**

TUĞÇE SUDUTAN

**İKİNCİ DANIŞMAN
DR.YÜCEL ERBİLGİN**

**GENETİK ANABİLİMDALİ
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Tuğçe SUDUTAN tarafından Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU'nun danışmanlığında hazırlanan "**Akut Lösemi Hastalarında ZINC FİNGER PROTEIN 384 (ZNF384) Geni Füzyonlarının Tespiti**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 26.06.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Prof. Dr. Serap KARAMAN
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Çocuk Sağ. ve Hast. Anabilim Dalı



Doç. Dr. Özden HATIRNAZ NG
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üni. Tıp Fak.
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



BEYAN

3

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tuğçe Sudutan

(İmza)


İTHAF



Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olduğum ilk günden itibaren zamanını, sabrını ve bilgisini esirgmeden yardımcı olan sevgili danışmanım Prof.Dr. Müge Sayitoğlu'na destekleri için sonsuz teşekkür ederim.

İkinci danışmanım olan değerli Dr.Yücel Erbilgin bütün yardım ve desteğiniz için ve ilerleyemediğim zamanlarda tez çalışmama yaptığınız katkılardan dolayı çok teşekkür ederim.

Çok değerli Doç.Dr. Özden Hatırnaz NG bilginizi, güler yüzünüzü ve desteğinizi esirgemediğiniz için ve yoğun olduğunuz zamanlarda bile her soruma ve sorunuma yardım ettiğiniz için çok teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşım Uzm.Gizem Şentürk iyi ki seninle aynı çalışma grubundaydım. Beni hiç yalnız bırakmadığın ve yardımların için sana çok teşekkür ederim. Senden çok şey öğrendim. Umarım her zaman iyi kalbinle hayatımda olursun.

Tez çalışmam boyunca her türlü yardım ve bilgilerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım doktora öğrencisi Khusan Khodzhaev, Pınar Köseoğlu, Aybike Özuynuk, Esra Kaynak, Dr. Sinem Fırtına, Dr. Didem Altındirek, Uzm.Yeşim Kesim'e çok teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Selin Demirer, Yeliz Ekici, Hilal Şentürk, Aslıhan Kaygusuz, İrem Yağmur Diker, Merve Sarıtaş, Merve Ordu, Muhammet Abdülvahid Kalkan hepinize ayrı ayrı teşekkür ederim. Sizin kadar güler yüzlü ve samimi arkadaşlara sahip olduğum için çok şanslıyım.

Son olarak bana her zaman destek olan ve inanan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30678

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	3
BEYAN.....	4
İTHAF.....	5
TEŞEKKÜR.....	6
İÇİNDEKİLER	7
TABLolar LİSTESİ	9
ŞEKİLLER LİSTESİ	10
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	12
ÖZET	14
ABSTRACT.....	15
1. GİRİŞ VE AMAÇ	16
2. GENEL BİLGİLER.....	17
2.1. Hematopoez	17
2.1.1. B Hücre Gelişimi	17
2.1.2. T Hücre Gelişimi	19
2.2. Lösemi	20
2.2.1. Akut Lösemi.....	21
2.2.1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi	25
2.2.1.2. B Hücreli Prekürsör Akut Lenfoblastik Lösemi	26
2.2.1.3. Miks Fenotip Akut Lösemi	29
2.3. ZNF384 Geninin Yapısı ve Fonksiyonu	32
2.3.1. t(12;17)(p13;q12) Translokasyonu (TAF15-ZNF384 Füzyon Geni).....	33
2.3.2. t(12;19)(p13;p13) Translokasyonu (TCF3-ZNF384 Füzyon Geni).....	33
2.3.3. t(12;22)(p13;q13) Translokasyonu (EP300-ZNF384 Füzyon Geni)	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Gereç	36
3.1.1. Hasta ve kontrol seçimi.....	36
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	37
3.1.3. Kullanılan Kitler	38
3.1.4. Kullanılan Elektronik Veritabanları.....	38

3.1.5. Kullanılan Materyaller	39
3.1.6. Kullanılan Kimyasallar	39
3.1.7. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	40
3.2. YÖNTEM.....	40
3.2.1. RNA izolasyonu ve kantitasyonu	41
3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Reaksiyonu	41
3.2.3. RT-Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
3.2.4. Kullanılan Primerler ve Plazmidler	47
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	50
3.2.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması	50
3.2.6. Sanger Dizileme.....	50
3.2.7. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. CYP A Kontrol Geni Ekspresyonu	51
4.2. ALL Hastalarında ZNF384 Füzyonları	51
4.2.1. EP300-ZNF384 füzyon geni.....	54
4.2.2. TAF15-ZNF384 füzyon geni.....	55
4.2.2.1. TAF15-ZNF384 (ekzon6-ekzon3).....	55
4.2.2.2. TAF15-ZNF384 (ekzon7-ekzon3).....	56
4.2.3. TCF3-ZNF384 füzyon geni.....	58
4.2.3.1. TCF3-ZNF384 (ekzon13-ekzon3).....	58
4.2.3.2. TCF3-ZNF384 (ekzon 17-ekzon 7).....	59
4.2.3.3. TCF3-ZNF384 (ekzon 15-ekzon 7).....	60
4.3. Klinik ilişkilendirme	61
5. TARTIŞMA	64
KAYNAKLAR	69
HAM VERİLER	74
FORMLAR.....	75
ETİK KURUL KARARI.....	76
PATENT HAKKI İZNİ.....	79
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	80
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Akut Lösemi FAB sınıflandırması (32).....	21
Tablo 2: Erişkin ve pediatrik ALL'de immünolojik EGIL sınıflandırma (34-35)	22
Tablo 3: 2016 WHO Akut Lösemi Sınıflandırması (26)	24
Tablo 4: MPAL için 1998 EGIL sınıflandırması (33).	30
Tablo 5: 2008/2016 MPAL WHO sınıflandırması (33,37).....	31
Tablo 6: Pediatrik ALL hastaların klinik özellikleri.....	36
Tablo 7: Kullanılan Cihazların Listesi	37
Tablo 8: Çalışmada Kullanılan Ticari Kitler ve Kullanım Amaçları.....	38
Tablo 9: cDNA sentez materyali.....	39
Tablo 10: PZR Materyali	39
Tablo 11: Kullanılan Kimyasallar.....	40
Tablo 12: cDNA sentezi ilk aşama içeriği	42
Tablo 13: cDNA sentezi ikinci aşama içeriği	42
Tablo 14: CYPA geni kontrol PZR İçeriği	43
Tablo 15: CYPA geni PZR koşulları	44
Tablo 16: TAF15-ZNF384 füzyon geni PZR içeriği.....	44
Tablo 17: TAF15-ZNF384 geni PZR koşulları	45
Tablo 18: EP300-ZNF384 füzyon geni PZR içeriği	45
Tablo 19: EP300-ZNF384 füzyon geni PZR koşulları	45
Tablo 20: TCF3(ekzon13)-ZNF384(ekzon3) füzyon geni PZR içeriği	46
Tablo 21: TCF3(ekzon13)-ZNF384(ekzon3) füzyon geni PZR koşulları	46
Tablo 22: TCF3(ekzon17)-ZNF384(ekzon7) füzyon geni PZR içeriği	47
Tablo 23: TCF3(ekzon17)-ZNF384(ekzon7) füzyon geni PZR koşulları	47
Tablo 24: EP300-ZNF384 genine özgü primer	47
Tablo 25: TCF3-ZNF384 genine özgü primerler.....	48
Tablo 26: TAF15-ZNF384 genine özgü primer	48
Tablo 27: ZNF384 füzyonları pozitif ve negatif hastaların klinik özellikleri.....	53
Tablo 28: Füzyon gen pozitif hastaların özellikleri	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Hematopoez Süreci (10).....	17
Şekil 2: B hücre gelişimi ve yüzey belirteçleri (19).....	19
Şekil 3: T Hücre Gelişimi (20).	20
Şekil 4: Pediatrik BCP-ALL'de sitogenetik ve moleküler genetik anormalliklerin sıklığı (47).....	27
Şekil 5: Pediatrik BCP-ALL alt tipleri (48)	28
Şekil 6: Akut lenfoblastik lösemi (ALL) alt tiplerinin yaş dağılımı (3).....	29
Şekil 7: <i>ZNF384</i> geni protein yapısı (55).....	32
Şekil 8: <i>TAF15</i> geni protein yapısı (60).	33
Şekil 9: <i>TCF3</i> geni protein yapısı (63).	34
Şekil 10: <i>EP300</i> geni protein yapısı (66)	34
Şekil 11: Hasta Sağlayan Kurumlar	36
Şekil 12: QIAGEN RNeasy mini Kit İş Akışı.....	41
Şekil 13: <i>ZNF384</i> ve ilgili füzyon genleri (<i>EP300</i> , <i>TCF3</i> , <i>TAF15</i>) içeren plazmid dizisi	49
Şekil 14: <i>ZNF384</i> ve ilgili füzyon genleri (<i>EP300</i> , <i>TCF3</i> , <i>TAF15</i>) içeren plazmid haritası.....	49
Şekil 15: <i>CYPA</i> kontrol geni PZR jel görüntüsü	51
Şekil 16: ALL hastalarında <i>ZNF384</i> füzyonlarının sıklığı ve dağılımı.....	52
Şekil 17: <i>ZNF384</i> füzyon genlerin dağılımı	52
Şekil 18: <i>EP300-ZNF384</i> füzyon gen protein yapısı (68).....	54
Şekil 19: <i>EP300-ZNF384</i> füzyon geni jel görüntüsü	55
Şekil 20: <i>EP300-ZNF384</i> füzyon geni kırık noktası	55
Şekil 21: <i>TAF15-ZNF384</i> (ek6-ek3) füzyon gen protein yapısı (6).....	56
Şekil 22: <i>TAF15-ZNF384</i> füzyon geni kırık noktası.....	56
Şekil 23: <i>TAF15-ZNF384</i> (ek7-ek3) füzyon gen protein yapısı (61).....	57
Şekil 24: <i>TAF15-ZNF384</i> füzyon geni jel görüntüsü	57
Şekil 25: <i>TAF15-ZNF384</i> (ek7-ek3) füzyon geni kırık noktası	58
Şekil 26: <i>TCF3-ZNF384</i> (ek13-ek3) füzyon gen protein yapısı (6).....	58
Şekil 27: <i>TCF3-ZNF384</i> (ek13-ek3) füzyon geni jel görüntüsü	58
Şekil 28: <i>TCF3-ZNF384</i> (ek13-ek3) füzyon geni kırık noktası	59

Şekil 29: <i>TCF3-ZNF384</i> (ek17-ek7) füzyon geni protein yapısı (6).....	60
Şekil 30: <i>TCF3-ZNF384</i> (ek17-ek7) jel görüntüsü	60
Şekil 31: <i>TCF3-ZNF384</i> (ek17-ek7) füzyon geni kırık noktası.....	60
Şekil 32: <i>TCF3-ZNF384</i> (ek15-ek7) füzyon geni protein yapısı	61
Şekil 33: <i>TCF3-ZNF384</i> (ek15-ek7) füzyon geni kırık noktası.....	61
Şekil 34: a) BCP-ALL ve MPAL hastaların genel sağ kalım analizi. b) BCP-ALL ve MPAL hastaların olaysız sağ kalım analizi. c) <i>ZNF384</i> füzyon pozitif ve negatif hastaların genel sağ kalım analizi d): <i>ZNF384</i> füzyon pozitif ve negatif hastaların olaysız sağ kalım analizi e) <i>ZNF384</i> füzyon pozitif, negatif ve t(12;21) hastaların genel sağ kalım analizi f): <i>ZNF384</i> füzyon pozitif, negatif ve t(12;21) hastaların olaysız sağ kalım analizi.....	62
Şekil 35: a) <i>ZNF384</i> füzyon pozitif ve negatif hastalarda CD10 yüzey belirteci ekspresyonu b) <i>ZNF384</i> füzyon pozitif ve negatif hastalarda CD13 yüzey belirteci ekspresyonu c) <i>ZNF384</i> füzyon pozitif ve negatif hastalarda CD33 yüzey belirteci ekspresyonu	63

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

BCP-ALL: “B cell precursor”- B hücreli prekürsör akut lenfoblastik lösemi

MPAL: “Mixed phenotype acute leukemia”- miks fenotip akut lösemi

AML: Akut miyeloid lösemi

T-ALL: T hücreli akut lösemi

dNTP: Deoksinükleosit trifosfat

RT-PZR: “Reverse transcriptase” - Ters transkriptaz Polimeraz zincir reaksiyonu

WHO: “World health organization”- Dünya sağlık örgütü

EGIL: “European Group for the Immunological Classification of Leukemias”-
Lösemilerin immünolojik sınıflandırması

FAB: “French–American–British”-Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırması

MMLV: “Moloney Murine Leukemia Virus” ters transkriptaz

NK: “Natural killer” doğal öldürücü hücreleri

HSC: “hematopoietic stem cell”- hematopoetik kök hücre

ETP: Erken timik progenitörleri

ISP: “Immature single positive”- Olgunlaşmamış tek pozitif

TCR: “T cell receptor”- T hücre reseptör

DN: “Double Negative”- Çift negatif

DP: “Double Positive”- Çift pozitif

TdT: “Terminal deoxynucleotidyl transferase”

MPO: Myeloperoksidaz

HLA-DR: İnsan lökosit antijeni

SmIg: Yüzey membran immunoglobulin

ASM: Akım sitometrisi



ÖZET

Sudutan,T. (2019). AKUT LÖSEMİ HASTALARINDA “ZINC FINGER PROTEIN 384” (*ZNF384*) GENİ FÜZYONLARININ TESPİTİ. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik A.D. Yüksek Lisans Tezi 2019

Akut lösemiler kemik iliği kaynaklı olgunlaşmamış kan yapıcı hücrelerin aşırı proliferasyonu sonucu oluşan hastalık grubudur. 2016 yılında Dünya sağlık örgütü akut lösemi sınıflandırmasına göre akut lösemiler akut lenfoblastik lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML) ve miks fenotip akut lösemi (MPAL) olarak üç sınıfa ayrılmaktadır.

ALL, B hücreli prekürsör (BCP-ALL) veya daha az yaygın olarak, T hücreli prekürsör soy (T-ALL) şeklinde sınıflandırılmaktadır. Her ikisi de, tanı veya prognoz için yararlı belirteçler olan kromozomal değişikliklerle karakterizedir. *ZNF384* geni yeniden düzenlemeleri, çocukluk çağı BCP-ALL vakalarının %1-6'sının ve yetişkin BCP-ALL vakalarının %5-15'inde görülen yeni onkojenik alt tiplerinden biridir. Ayrıca *ZNF384* yeniden düzenlemeleri bulunan vakalarda MPAL özelliği gösteren anormal miyeloid belirteç ekspresyonu bulunmaktadır. Klinik etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve *ZNF384* füzyonları taşıyan hastalar genel olarak orta risk grubuna sınıflandırılır. Bu füzyona sahip farklı fenotipte hastaların incelenmesi, yeni belirteçlerin klinik etkilerini anlamamıza yardımcı olacaktır. Bu çalışmada BCP-ALL ve MPAL hastalarında *ZNF384* ile ilgili füzyon genlerin sıklığı belirlenerek sonuçların klinik açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, ALL ön tanısı almış toplam n=127 (K:53, E:74) pediatrik hasta (medyan yaş 4 olan) dahil edilmiştir. Hastaların kan ve/veya kemik iliği örneklerinden total RNA elde edilmiştir ve RNA'lar, rastgele heksamerler ve MMLV ters transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmiştir. Dört farklı kırılma noktası içeren en yaygın füzyonlar (*ZNF384-TCF3*, *ZNF384-EP300* ve *ZNF384-TAF15*), ters transkriptaz PZR yöntemi kullanılarak varlığı/yokluğu araştırılmıştır. Saptanan translokasyonlar ile hastaların klinik bulguları ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Pediatrik ALL hastalarında *ZNF384* geninin yeniden düzenlenmesi %7,8 olarak bulunmuştur. *ZNF384* füzyonları MPAL'de %8,3 ve BCP-ALL gruplarında ise %7,7 olarak belirlenmiştir. *TCF3- ZNF384* füzyonunda beklenen kırık bölgesi dışında farklı bir noktada yeni bir kırılma noktası tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *ZNF384* Geni, Miks Fenotip Akut Lösemi, B hücreli prekürsör akut lenfoblastik lösemi, Ters Transkriptaz PZR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30678

ABSTRACT

Sudutan Tuğçe, A.B. (2019). Determination of Zinc Finger Protein 384 (*ZNF384*) Gene Fusions in Acute Leukemia Patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master thesis Istanbul.2019

Acute leukemia is a group of diseases caused by excessive proliferation of immature blood cells from bone marrow. According to the World Health Organization acute leukemia classification in 2016, acute leukemias are divided into three classes as acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid leukemia (AML) and mixed phenotype acute leukemia (MPAL).

ALL consists of B-cell precursor (BCP-ALL), or less commonly, T-cell precursor strain (T-ALL). Both have multiple subtypes, usually defined by structural chromosomal changes. *ZNF384* gene rearrangements are one of the new oncogenic subtypes of BCP-ALL. *ZNF384* gene rearrangements were reported 1-6% in childhood BCP-ALL, and 5-15% of adult BCP-ALL cases. In addition, cases with *ZNF384* rearrangements have an abnormal myeloid marker expression with MPAL. There is limited number of data about the clinical impact of *ZNF384* gene rearrangement. Patients carrying *ZNF384* fusions are classified into medium risk group need more attention and novel molecular genetic markers are very important for risk adopted treatment strategies. Examinations of different phenotypic ALL subgroups will be help us to understand the clinical impacts of novel markers.

The aim of this study was to determine the frequency of the most common *ZNF384* fusions in patients with BCP-ALL and MPAL.

One hundred twenty-seven pediatric ALL patients (53 females, 74 males) were included in this study. Median age of patients was four. Total RNA was isolated from patients' bone marrow at diagnosis and cDNA synthesis was performed by using random hexameres and MMLV reverse transcriptase. The most common fusions (*ZNF384-TCF3*, *ZNF384-EP300* and *ZNF384-TAF15*) containing five different breakpoints were examined by using RT-PCR. *ZNF384* gene rearrangement was found 7,8% in paediatric ALL patients. We identified *ZNF384* fusions 8,3% in mixed phenotypic leukemia and 7,7% in BCP-ALL groups. A novel breakpoint was also identified in *ZNF384-TCF3* fusion.

Key Words: *ZNF384* Gene, Mixed Phenotype Acute Leukemia, B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, RT-PCR

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 30678

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lösemiler, miyeloid veya lenfoid progenitör hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize edilen hastalık grubudur. Hastalığa tutulan hücre tipine göre akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut miyeloid lösemi (AML) şeklinde sınıflandırılmaktadır.

ALL, çocuklarda en sık görülen kanser olup pediatrik dönem kanserlerinin %30'unu, lösemilerin %80'ini oluşturmaktadır. ALL 2-5 yaşları arasında tepe yapmaktadır. Heterojen bir hastalık grubu olan ALL hücre yüzey belirteçlerine göre B hücreli prekürsör (BCP-ALL) veya daha az yaygın olarak T hücreli prekürsör (T-ALL) olarak adlandırılır (3,4,5). Akut lösemili hastaların bir kısmında hem lenfoid hem de miyeloid soya özgü antijenlerin ekspresyonu bulunması nedeniyle soy kökeni belirlemek zordur. 2008 ve 2016 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması, böyle hastalar için miks fenotip akut lösemi şeklinde (MPAL) yeni bir tanım getirmiştir. Yüksek riskli kabul edilen miks fenotip akut lösemili hastaların patogenezi ve optimal tedavisi büyük ölçüde tanımsız kalmaktadır (1,2).

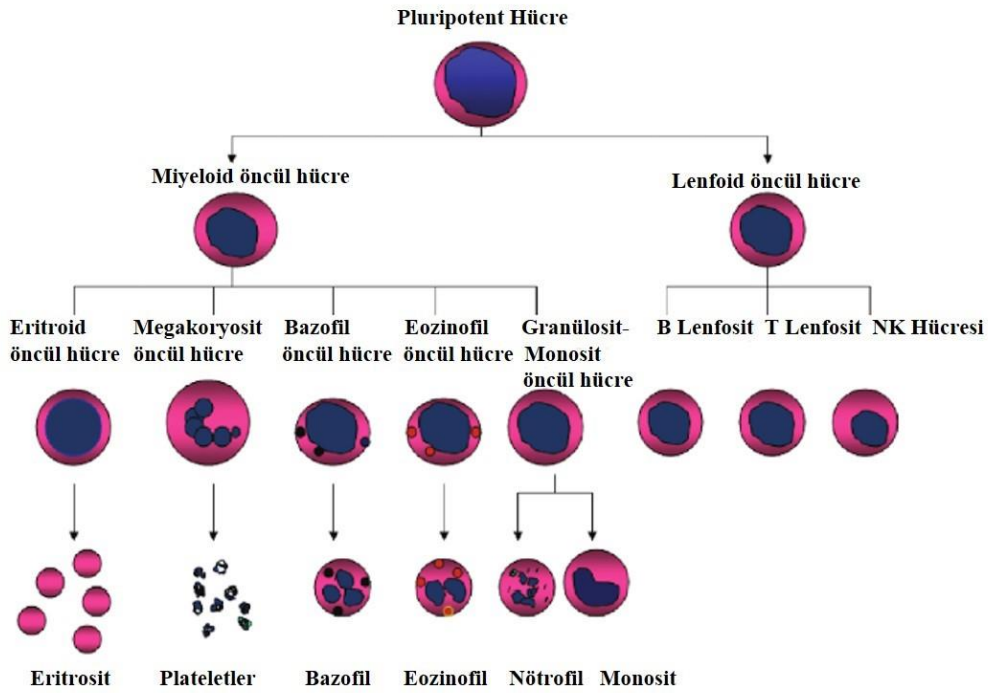
BCP-ALL en sık görülen ALL tipi olup karakteristik biyolojik ve klinik özelliklerle ilişkilendirilen genetik anormalliklere göre alt tiplere ayrılır. Bu anormalliklerin tespiti tanı, risk sınıflandırması ve hedefe yönelik tedaviyi kolaylaştırmaktadır (6). Yeni tanımlanan alt tiplerden biri olan *ZNF384* geni yeniden düzenlenmesi yaklaşık %3-4 sıklıkta pediatrik BCP-ALL ve yetişkin hastaların yaklaşık %7'sini oluşturan farklı bir alt grup olarak tanımlanmıştır (5). *ZNF384* yeniden düzenlemeleri olan BCP-ALL hastalarının ara bir prognoza sahip olduğu belirtilmektedir (6,7). Ayrıca *ZNF384* yeniden düzenlenmesi kötü prognozla ilişkilendirilen MPAL hastalarında yaklaşık %48 sıklıkta bulunmuştur (2).

Bu tez projesinde BCP ve MPAL ALL hastalarında *ZNF384* geni ile ilgili yeniden düzenlemelerin sıklığı, hastaların klinik fenotipleri ile bu yeniden düzenlemelerin varlığı/yokluğu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylelikle BCP-ALL alt tipi olarak ortaya çıkan *ZNF384* geni yeni düzenlemeleri moleküler belirteç olarak kullanılarak, prognozda bir rolü olup olmadığının araştırılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

Kan hücreleri, yaşam boyunca kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden (HSC) yapılır. Hematopoetik hücreler, lenfositler, eritrositler ve monositler dahil olmak üzere farklı olgun kan hücrelerinin soyları arasında çoğalma ve farklılaşma kabiliyetine sahiptir. Lenfoid hücrelerden doğal öldürücü (NK) hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri köken alırken, miyeloid kök hücrelerinden granülositleri, monositleri, makrofajları, mikrogial hücreleri ve dendritik hücreler farklılaşmaktadır (Şekil 1). Bu hücre türlerinin her biri, tek bir HSC'den üretilebilir ve her HSC, uzun yıllar boyunca bu hücrelerin çok sayıda üretilmesi için büyük bir kapasite oluşturmaktadır (8,9).



Şekil 1: Hematopoez Süreci (10)

2.1.1. B Hücre Gelişimi

B hücreleri humoral immünitinin temel öğeleridir ve adaptif immün sistemin bir parçası olarak patojenlere karşı savunma sağlarlar. B hücre gelişimi ve işlevindeki bozukluklar malignitelere, immün yetmezliklere ve alerjilere neden olmaktadır. B hücreleri, hematopoetik öncüllerden köken alarak kemik iliğinde gelişirler ve sıralı bir

olgunlaşma sürecinden geçerler (11). Hem B hem de T hücreleri, birincil lenfoid organlarda pozitif ve negatif seleksiyona tabi tutulur. Pozitif seçim, hücrenin hayatta kalabilmesi için antijen reseptöründen sinyalleşmeyi gerektirir. Gelişmekte olan B hücreleri, B öncesi reseptörü ligandını bağladığında pozitif olarak seçilir. Negatif seçim, reseptöre bağlanmanın hücre ölümü ile sonuçlandığı anlamına gelir. Hem olgunlaşmamış B hem de T hücreleri, kendi antijenlerini bağlarsa negatif olarak seçilir (12).

Memeli B hücresi gelişim evreleri,

- antikor genlerinin genetik modifikasyonları ve
- hücre yüzeyi moleküllerini tanıyan monoklonal antikorların kullanımı ile tanımlanmaktadır (Şekil 2).

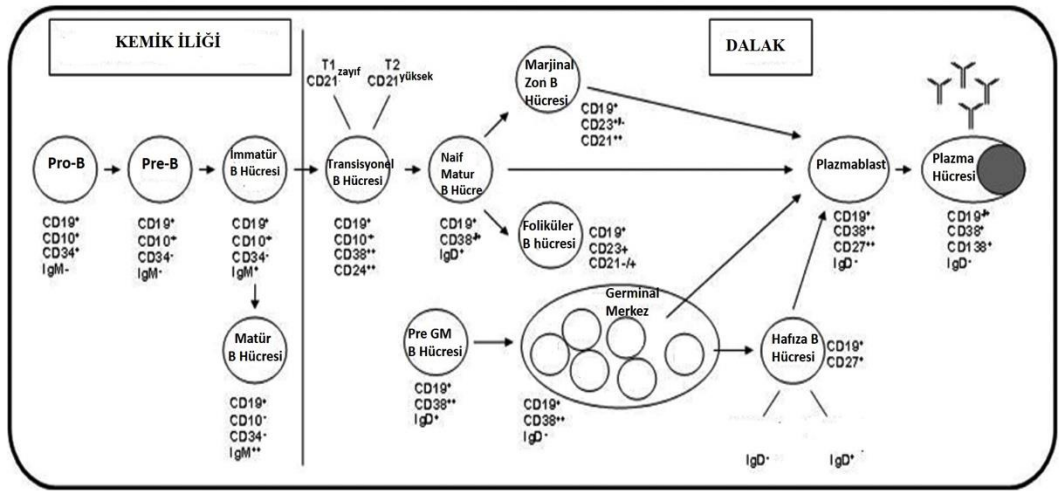
Fonksiyonel antikor genleri, kemik iliğinde ve fetal karaciğerde pro- ve B öncesi hücrelerde V, D ve J segmentlerinin rastgele rekombinasyonu ile oluşturulur (13).

Kan hücreleri üzerindeki monoklonal antikorlar tarafından tanınan hücre yüzeyi molekülleri, bir farklılaşma (CD) numarasına sahiptir. Monoklonal antikor teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, CD10, CD19, CD20, CD21, CD24, CD34 ve CD38 gibi hücre yüzey belirteçlerinin analizi, gelişimin hem erken hem de geç aşamalarının tanımlanmasını kolaylaştırmıştır. Bunlardan CD19, B-hücre gelişimi boyunca anlatıma giren, ancak olgun olmayan plazma hücre aşamasına kadar ifade edilen bir sinyal iletim molekülüdür ve B-hücre kimliği için en iyi klinik belirteç olarak nitelendirilmektedir (14).

CD34, hematopoetik kök hücreleri içeren küçük bir popülasyonda (%1-4) kemik iliği hücrelerinde anlatıma girer. CD10, erken anlatıma girmesinden dolayı, sıklıkla öncül B-ALL ve bazı lenfomalar için bir belirteç olarak kullanılır (15).

CD20, B hücrelerinin plazma hücrelerine gelişiminde ve farklılaşmasında rol oynar (16). Erken öncül B hücreleri hücre yüzey immünoglobulinini (Ig) eksprese etmezler. Sonraki aşamada sitoplazmik zincir yapılır ve pre-pro-B hücreleri, pro-B hücreleri ve pre-B hücreleri oluşur. Olgunlaşmamış pre-B hücreleri dalağa göç eder ve burada olgun B hücrelerine ve plazmositlere dönüşürler (17).

B hücreleri kemik iliğini terk ettikten sonra, CD21, CD22 ve yüzey IgD'si içeren ek hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmeye başlarlar (18).



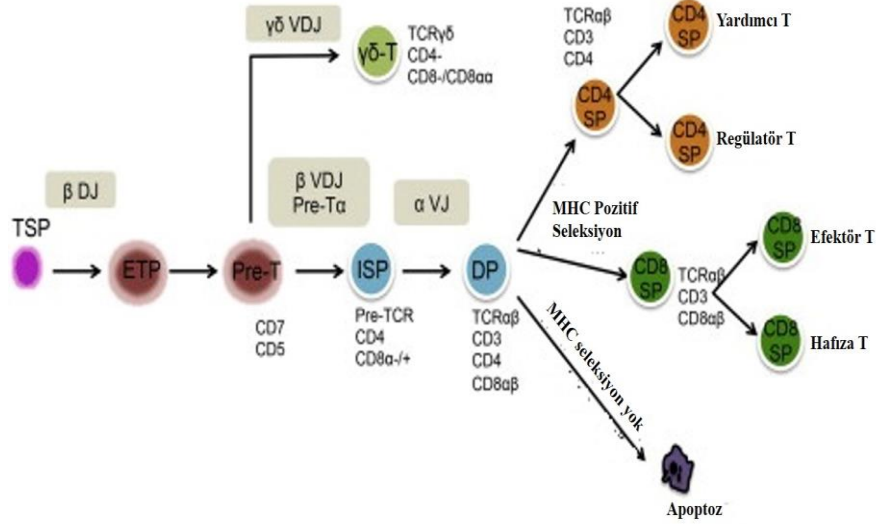
Şekil 2: B hücre gelişimi ve yüzey belirteçleri (19)

2.1.2. T Hücre Gelişimi

T hücreleri, bulaşıcı patojenlere ve kansere karşı immün korumanın temel aracıdır. T hücre yetersizliğinde, kalıtsal veya edinilmiş immün yetmezliklerde ortaya çıkan, hayati tehlike oluşturan enfeksiyonlara, kanser insidansının artmasına ve immünoregülasyonun bozulmasına neden olur (20). T hücreleri, kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerden kökenlenirler. Bu hücrelerin progenitörleri, timusa göç eder ve timusu kolonize eder. Timüs içinde, timosit olarak da bilinen progenitör hücreler, farklı hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonuna dayanarak karakterize edilen bir dizi olgunlaşma aşaması geçirirler (21).

T dizisi yönündeki ilk farklılaşma TCR (T hücre reseptör) genlerinin yeniden düzenlenmesini kapsar. Timus korteksinde yer alan immatür lenfoblastlar gen düzenlenmeleri için gerekli olan intra nükleer enzim TdT içerirler (20). En erken gelişen timositler, CD4 ve CD8 ko-reseptörlerinin ifadesinden yoksundur ve çift negatif (DN) hücreler olarak adlandırılır (21). Erken timik progenitörleri (ETP), CD1a ve CD5'i eksprese eden bir pre T hücre basamağına ilerler. TCR genlerindeki ilk düzenleme $\delta\gamma$ zincirinde olup bunu β zinciri ve sonrasında α zincir gen düzenlenmeleri izler. Başarılı bir TCR β yeniden düzenlenmesi, CD4 + olgunlaşmamış tek pozitif (ISP) T hücresinin ortaya çıkmasına neden olur. CD4 ISP hücresi daha sonra hem CD4'ü hem de CD8'i eksprese eden çift pozitif (DP) bir hücreye dönüşür ve TCR α lokusunun V ve J bölgelerini yeniden düzenlemesi başlar. DP timositlerinde başarılı bir TCR α

düzenlemesi, TCR α 'yı oluşturmak için önceden ifade edilen TCR β ile ilişkili olan bir TCR $\alpha\beta$ zincirinin ekspresyonuna olanak tanır. Oluşan T hücreleri kendi kendini sınırlar ve kendi dokularına toleranslıdır. Naif T hücreleri olarak bilinen T hücre klonları başlangıçta düşük frekansta vücutta dolaşır. Antijen ile karşılaşıldığında, T hücreleri efektör ve/veya hafıza hücrelerine dönüşürler (Şekil 3) (20).



Şekil 3: T Hücre Gelişimi (20).

2.2. Lösemi

Lösemi, kemik iliğinde hemopoetik hücrelerin malign dönüşümü ile karakterize olan hastalık grubudur. Bu süreçte normal hematopoez inhibe edildiği için lösemik hücreler periferik kana yayılır ve retikuloendotelyal dokuyu, özellikle dalak, karaciğer, lenf düğümlerini ve zaman zaman merkezi sinir sistemini istila eder (22-23). Genel olarak, bu hastalık 75 yaşın altındaki kişilerde toplam kanser vakalarının %2,5'ini ve toplam kanser ölümlerinin %3,8'ini oluşturur. Erkeklerde kadınlardan biraz daha sık görülmektedir. Löseminin patofizyolojisinin anlaşılmasındaki son gelişmelere rağmen, bu hastalığın risk faktörleri tam ve net bir şekilde teşhis edilememiştir (24-25).

Lösemi, etkilenen baskın kan hücresinin soyuna bağlı olarak miyeloid veya lenfoid, olgunlaşma durumuna göre akut ya da kronik şeklinde dört geniş gruba ayrılmıştır.

- Akut lenfoblastik lösemi (ALL)

- Kronik lenfoblastik lösemi (KLL)
- Akut miyeloid lösemi (AML)
- Kronik miyeloid lösemi (KML)

2.2.1. Akut Lösemi

Akut lösemi, olgunlaşmamış veya farklılaşmamış hücreleri etkileyen, hızlı ilerleyen bir hastalıktır. Bu olgunlaşmamış hücreler normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (22). Dünya Sağlık Örgütü, akut lösemiye morfoloji, sitokimya, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar göz önünde tutularak ALL, AML ve MPAL şeklinde sınıflandırmaktadır (26). Sitogenetik analiz ve karyotip bilgisi hastalığın prognozunu belirlemek ve optimal tedavi seçimi için gereklidir (27). İmmünofenotipleme de hücre yüzey belirteçlerine karşı yönlendirilmiş monoklonal antikorlar kullanılarak lösemi hücreleri sınıflandırılır. İmmünofenotipleme, akış sitometrisi veya immünohistokimya yöntemleri ile yapılmaktadır. Akış sitometrisi kullanılarak tek bir hücre üzerinde aynı anda birden fazla antijen tespit edilebilir (22).

Akut Lösemi Sınıflandırma;

Akut lösemi, immünofenotipleme ile desteklenmiş morfoloji ve sitokimya ile birçok şekilde sınıflandırılabilir (28).

- Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) grubu tarafından önerilen sınıflaması (29)
- Avrupa Grubu tarafından lösemilerin (EGIL) immünolojik sınıflandırması için önerildiği gibi tek başına immünofenotipleme ile sınıflandırılması (30)
- Akut Lösemi'nin Önerilen Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması (31).

i. Morfolojik Sınıflandırma

Akut lösemi, başlangıçta Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) grubu tarafından önerildiği gibi sitoloji ve sitokimya temelinde sınıflandırılmıştır (27). Miyeloid ve lenfoid akut lösemi arasında ayırım yapmak için kullanılan standart kriterler, türünün ilk örneği olarak Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) çalışma grubu tarafından 1976 yılında oluşturulmuştur. FAB sisteminde akut lösemi tanısı koymak için blast yüzdesi eşik değeri %30 olarak belirlenmiştir (Tablo 1) (32).

Tablo 1: Akut Lösemi FAB sınıflandırması (32)

Miyeloid	Alt tip	Tanımlama
----------	---------	-----------

	M ₀	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
	M ₁	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi
	M ₂	Olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
	M ₃	Promiyelositik lösemi
	M ₄	Miyelomonositik lösemi
	M ₅	Monositik lösemi
	M ₆	Eritrolösemi
	M ₇	Megakaryoblastik lösemi
Lenfoid	L ₁	Küçük homojen hücreler
	L ₂	Değişken büyüklüğe sahip büyük hücreler
	L ₃	Bazofilik vakumlu sitoplazmalı büyük hücreler ve homojen, ince kıvrımlı kromatin

FAB sınıflandırmasında AML olgunlaşmamış hücreleri ortak miyeloid öncülerinden evrimleşmelerine rağmen, 8 alt tip olgunlaşma derecesine göre farklılık göstermektedir. ALL FAB sınıflandırması ise hücre boyutu, nükleolün önemi ve sitoplazmanın miktarı ve görünümü dahil olmak üzere morfolojiye dayalı olarak ayrılan 3 alt tipi (L1, L2, L3) içerir (28).

ii. İmmunolojik Sınıflandırma

Akut lösemilerin immünolojik sınıflandırması için kriterler, yeni kurulmuş bir Avrupa grubu olan EGIL (*European Group for the Immunological Classification of Leukemias*) tarafından 1995 yılında önerilmiştir (30,33). EGIL'in temel amacı, lösemik blastların yüzey belirteçlerinin anlatımına dayanarak karakterize edilmesi ve B-ALL, T-ALL ve AML'den miks fenotipik akut lösemileri açıkça ayırt etmek amacıyla soy belirlenmesi için tek tip immünolojik kriterler oluşturmaktır (30). EGIL sınıflandırmasına göre erişkin ve pediatrik ALL'de B ve T hücre şeklinde sınıflandırması bulunma yüzdesi Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Erişkin ve pediatrik ALL'de immünolojik EGIL sınıflandırma (34-35)

	Erişkin(%)	Pediatrik(%)	Yüzey Belirteçleri
B Hücre Tipi			
Pro B ALL	11	60	CD19+, (HLA)-DR+, TdT+, CD10-
Common B ALL	50	3	CD10+
Pre B ALL	12	20-25	CD10+/-, cyIgM+

Olgun B ALL	5	2	CD10+/-, sIgM+
T Hücre Tipi			
Erken T ALL	6	1	cyCD3+, CD7+, CD5 +/-, CD2 +/-
Kortikal T ALL	10		cyCD3+, CD7+, CD1a+, sCD3+/-
Olgun T ALL	6	11	sCD3+, CD1a-

EGIL sisteminde %10 seviyesinde pozitif kabul edilen MPO, CD3, CD79a ve TdT hariç belirli bir monoklonal antikora, olgunlaşmamış hücrelerin pozitif bir reaksiyonunu tanımlamak için %20'lik bir eşik değeri kullanılmaktadır (36).

EGIL sınıflandırmasına göre B-ALL'de;

Pro-B ALL CD10 negatiftir ve spesifik B veya T hücresi farklılaşma belirteçlerinden yoksundur, ancak insan lökosit antijeni (HLA-DR), TdT ve CD19'u eksprese eder ve yeniden düzenlenmiş immünoglobulin genlerine sahiptir. Erişkin ALL'nin yaklaşık %9–11'inde görülmektedir (34). Çocukluk çağı ALL'de görülme sıklığı %60'dır (35).

Common ALL (C-ALL) CD10 pozitifliği ile karakterizedir. Common B-ALL erişkin ALL'lerin %50'den fazlasında görülmektedir. Çocukluk çağı ALL'lerin ise %3'ünde görülmektedir. PreB-ALL sitoplazmik immünoglobulin ve CD10'un ifadesi ile karakterizedir. Yetişkin vakaların yaklaşık %10'unda çocukluk çağında ise %20-25 olarak tanımlanmıştır (28,35).

Olgun B-ALL yetişkin ALL hastalarında yaklaşık %5 ve çocukluk çağı ALL hastalarında %2 sıklıkta görülmektedir. Blast hücreleri olgun B hücrelerinin yüzey antijenlerini SmIg (yüzey membran immunoglobulin) eksprese eder (34-35).

EGIL sınıflandırmasına göre T-ALL'de;

Erişkin ALL vakaların yaklaşık %22'si bir T Hücre fenotipine sahip olan blast hücrelerine sahiptir. Çocukluk çağı ALL hastalarında ise bu oran %12-15'tir. Sınıflandırmaya göre T hücre soyunda tüm olgular CD7 pozitifliğiyle karakterizedir.

Erken T ALL'nin yetişkinlerde görülme sıklığı %6'dır. cyCD3 ve CD7 pozitifliği vardır ancak başka bir farklılaşma belirteçleri yoktur.

Kortikal T ALL, T ALL'de %10 görülme sıklığına sahiptir. CD1a varlığı ile karakterizedir. Aynı zamanda yüzey CD3 ekspresyonu da mevcut olabilir.

Olgun T-ALL'nin görülme sıklığı %6'dır. Olgunlaşmamış hücreleri CD1a'yı eksprese etmez fakat yüzey CD3 için pozitifler (34-35).

iii. Dünya Sağlık Örgütü(WHO) Sınıflandırması

2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü, EGIL grubu tarafından önerilen akut lösemi sınıflandırmasını kabul etmiş, ancak 2008 ve 2016 yılında bu sınıflandırmaya yeni düzenlemeler önermiştir (33,37) (Tablo 3).

Akut lösemi tanısı için Dünya Sağlık Örgütü tarafından oluşturulan sınıflandırmada immünofenotip ve genetik özellikler artık hematopoietik neoplazmların tanımının temel bir parçası haline gelmiştir. Genetik anormalliklerin ve immünofenotipik özelliklerin belirlenmesi, sadece hastalık tanısı için değil aynı zamanda spesifik antijenlere, genlere veya yolaklara yönelik tedaviyi hedeflemeyi kolaylaştırır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından akut lösemi tanısı koymak için blast yüzdesi eşik değeri %20 olarak belirtilmiştir (32).

Tablo 3: 2016 WHO Akut Lösemi Sınıflandırması (26)

Akut Miyeloid Lösemi	
1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML	
t(8;21)(q22;q22), (AML 1/ETO) ile AML	
inv(16)(p13q22) veya t(16;16)(p13;q22), (CBF β /MYH11) ile AML	
Akut promiyelositer lösemi (t(15;17)(q22;q22), (PML/RAR α) ile AML)	
11q23 (MLL) anomalisi ile AML	
1. Çoğul Seri Displazisi ile Seyreden AML	
Önceden miyelodisplastik sendromlu	
Önceden miyelodisplastik sendrom olmadan	
3. Tedaviye İkincil AML ve MDS	
Alkilleyici ajanlarla ilişkili –	
Topoisomera II inhibitör ile ilişkili	
3. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML	
Minimal farklılaşma gösteren AML	
Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik	
Akut miyelofibrozis ile panmiyelozlölsemi	
Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi	
RAR α rearajmanı göstermeyen akut promiyelositer lösemi	
Akut miyelomonositik lösemi	
Akut monoblastik ve monositer lösemi	
Akut eritrolösemi	
Akut megakaryoblastik lösemi	
Akut bazofilik lösemi	
Myeloid sarkom	
Lenfoid	
1. B-Akut lenfoblastik lösemi (ALL)	
B lenfoblastik lösemi/lenfoma, NOS	
Tekrarlayan genetik anormalliklerle seyreden B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
t(9;22)(q34.1;q11.2), BCR-ABL1 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
t(v;11q23.3), KMT2A yeniden düzenlenmesi ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma;	
t(12;21)(p13.2;q22.1), ETV6-RUNX1 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
Hiperdiploidi pozitif B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
Hipodiploidi pozitif B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
t(5;14)(q31.1;q32.3), IL3-IGH ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
t(1;19)(q23;p13.3), TCF3-PBX1 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
BCR-ABL1-like ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
iAMP21 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma	
1. T lenfoblastik lösemi/lenfoma	
Erken T hücre öncüsü lenfoblastik lösemi	
NK hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma	
Belirsiz seri akut lösemiler	
Akut farklılaşmamış lösemi	
t(9;22)(q34.1;q11.2), BCR-ABL1 ile miks fenotip akut lösemi	
t(v;11q23.3), KMT2A yeniden düzenlenmesi ile miks fenotip akut lösemi	
Miks fenotip akut lösemi, B/miyeloid, NOS	
Miks fenotip akut lösemi, T/miyeloid, NOS	

2.2.1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi

ALL, kemik iliğinde, lenf bezlerinde, timusta veya dalakta lösemik hücrelerin klonal genişlemesi ile karakterize neoplastik bir hastalıktır (38). ALL, farklılaşmanın erken aşamalarında bloke edilen lenfoid hücrelerin malign proliferasyonu ile

karakterizedir (40). ALL tüm kanserlerin %30'unu ve lösemilerin %80'nini oluşturmaktadır (41). Çocukluk çağı ALL vakalarının yaklaşık %85'i ve yetişkin ALL vakalarının yaklaşık %75'i B-hücresi soyundan gelmektedir (42-43). T hücreli ALL yetişkin ALL vakaların yaklaşık %25'ini, pediatriklerin ise %15'ini oluşturmaktadır (3,28). Pediatrik ALL gelişiminde potansiyel patojenik mekanizmalarla ilgili çeşitli hipotezler tanımlanmış olmasına rağmen, çoğunluğunun etiyojisi belirsizliğini korumaktadır (40). ALL 5 yıllık sağkalım oranı, 1970'lerin ortalarında % 41 oranında iken, yeni tedavilerin keşfi de dahil olmak üzere tedavi protokollerinin geliştirilmesi ile tedavi başarısı gelişmiş ülkelerde %90, gelişmekte olan ülkelere ise %75'lere ulaşmıştır (24-25).

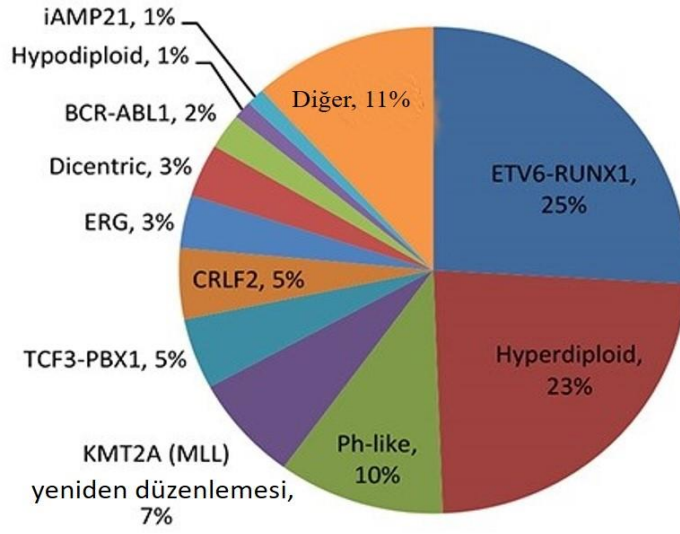
ALL olgularının büyük çoğunluğu lösemi gelişiminde merkezi bir rol oynayan yapısal kromozomal değişiklikler, DNA kopya sayısı değişiklikleri ve dizi mutasyonları ile ilişkili olarak tanımlanan çoklu alt tipler içerir (44). Kromozomal değişiklikler, onkogen deregülasyonu veya kimerik füzyon genlerinin ifadesi ile sonuçlanan anöploidi ve kromozomal yeniden düzenlemelerden oluşmaktadır (3).

ALL'ye özgü kromozomal bozuklukların bir kısmı 2008/2016 'da Dünya Sağlık Örgütü Hematopoetik ve Lenfoid Dokulardaki Tümörlerin Sınıflandırılmasına dahil edilmiştir. Moleküler değişimler morfoloji, sitokimya, immünofenotip ve klinik özelliklerle birlikte B hücreli ALL içindeki alt grupları tanımlamak için kullanılmaktadır (26,45).

2.2.1.2. B Hücreli Prekürsör Akut Lenfoblastik Lösemi

B hücreli ALL kemik iliğinde ve kanda çok sayıda B hücreli lenfoblastın (olgunlaşmamış beyaz kan hücreleri) bulunduğu hızlı ilerleyen ve çocuklarda en sık görülen akut lenfoblastik lösemi türüdür. ALL nin %80'den fazlası B hücresi progenitörlerinden kaynaklanmaktadır (46).

BCP-ALL hiperdiploidi, hipodiploidi ve translokasyonlar gibi hem sayısal hem de yapısal değişiklikleri içeren kromozomal anormalliklerle ilişkili heterojen bir hastalıktır. BCP-ALL vakalarının yaklaşık % 75'inde bulunan tekrarlayan kromozomal değişikliklerin birçoğu prognoz üzerinde etkisi olan ve bazı tedavi protokollerinde risk sınıflandırmasında kullanılan moleküler belirteçlerdir (Şekil 4) (47).



Şekil 4: Pediatrik BCP-ALL'de sitogenetik ve moleküler genetik anormalliklerin sıklığı (47).

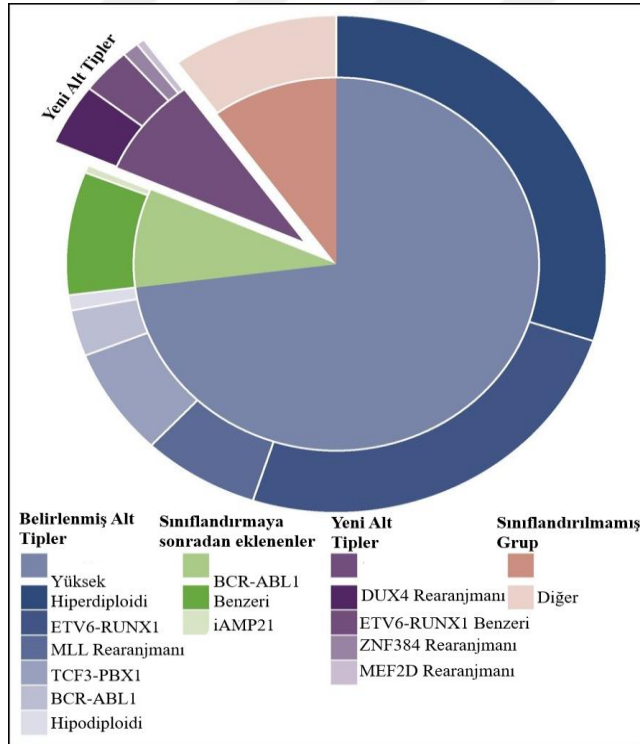
Hiperdiploidi (>50 kromozom) ve t(12;21)/*ETV6-RUNX1* translokasyonu iyi risk grubundadır ve olumlu prognozla ilişkilendirilmiştir. t(1;19)/*E2A-PBX1* translokasyonu orta risk grubundadır ve orta-olumlu prognozla ilişkilendirilmiştir. t(9;22)/*BCR-ABL1* translokasyonu, t(v;11q23)/*KMT2A (MLL)* yeniden düzenlemesi ve Hipodiploidi (<44 kromozom) yüksek risk grubundadır ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (47). Kromozom 21'in (*iAMP21*) kompleks intrakromozomal amplifikasyonu daha büyük çocuklarda sık görülür ve yoğun tedavi gerektiren kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. *KMT2A (MLL)* yeniden düzenlenmesi infant (1 yaş altı) ALL'de yaygın olup kötü prognoza sahiptir. CRLF2 yeniden düzenlenmesi down sendromu ile ilişkili ve Ph benzeri ALL'de (yaklaşık % 50) yaygındır ve kötü prognoza sahiptir.

Hem çocuklarda hem de yetişkinlerde, Ph benzeri ALL yüksek riskli klinik özellikler, indüksiyon kemoterapisine zayıf yanıt, yüksek minimal kalıntı hastalık (MKH) seviyeleri ve/veya kötü sağ kalım ile ilişkilidir (3).

Yakın zamana kadar pediatrik BCP-ALL'nin yaklaşık %20-30'u belirlenmiş moleküler alt tiplerin hiçbirinde sınıflandırılamamıştır. Yapılan moleküler çalışmalarla çeşitli ALL alt tipleri tanımlanmış, pediatrik BCP-ALL sağ kalımını büyük ölçüde iyileştirmiş olan riske uyarlanmış çok ajanlı tedavi rejimleri geliştirilmektedir.

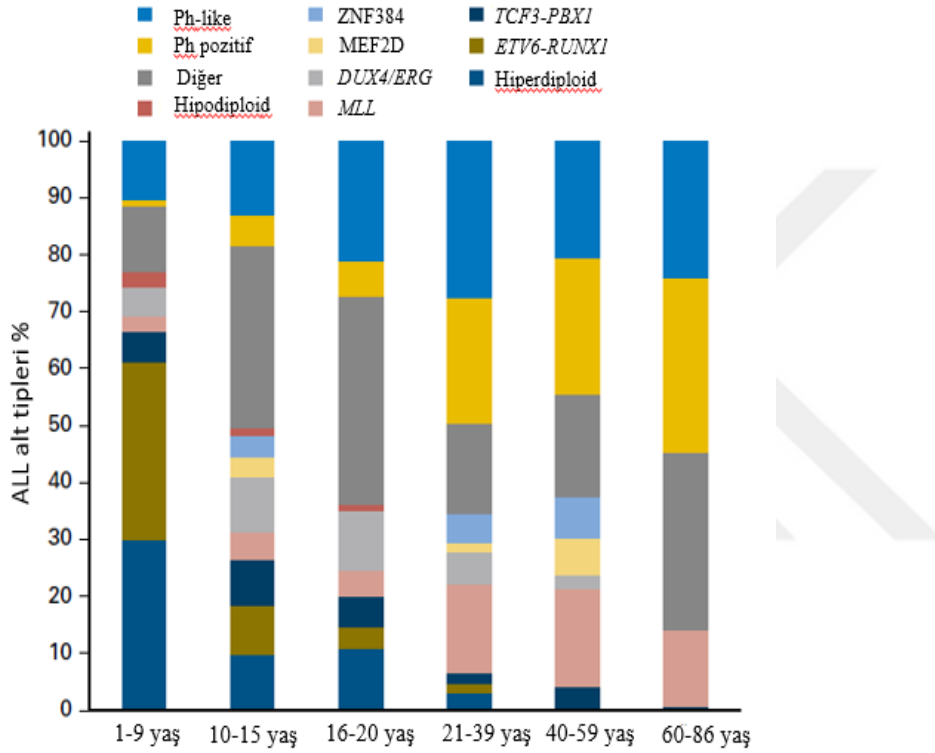
DUX4 yeniden düzenlemeleri, *ETV6-RUNX1*-benzeri gen ekspresyonu, *MEF2D* yeniden düzenlemeleri ve *ZNF384* yeniden düzenlemeleri farklı lösemik hücreli gen ekspresyon profilleri sergileyen, yeni onkogenik alt tiplerdir (Şekil 5).

- *DUX4* düzenlemeleri çocukluk çağı vakalarının %4-5'ini oluşturan yetişkin ve pediatrik BCP-ALL'nin farklı bir alt tipini tanımlamaktadır ve olumlu prognozla ilişkilendirilmiştir.
- *ETV6-RUNX1*-benzeri ALL'yi şu ana kadar tanımlayan iki çalışma, tüm çocukluk çağı BCP-ALL vakalarının %1-3'ünün bu alt tipe ait olduğunu göstermektedir ve olumlu prognozla ilişkilendirilmiştir (48).
- *MEF2D* füzyon genlerinin çocukluk çağı BCP-ALL'sinin %1-4'ünde ve yetişkin BCP-ALL'nin %7'sinde mevcut olduğu bildirilmiştir. *MEF2D* ALL, daha yaşlı başlangıç yaşı, anormal bir immünofenotip (CD10 negatif, CD38 pozitif) ve kötü sonuç ile ilişkilendirilmiştir (3,48).
- *ZNF384* yeniden düzenlenmesi pediatrik BCP-ALL vakalarının %1-6'sı ve yetişkin BCP-ALL vakalarının %5-15'inde bulunmaktadır ve olumlu prognozla ilişkilendirilmiştir (3).



Şekil 5: Pediatrik BCP-ALL alt tipleri (48)

Şekil 5’de mavi renk tonları ile gösterilen alan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından BCP-ALL’de belirlenmiş alt tipleri içermektedir. Yeşil ile gösterilen alan Dünya Sağlık Örgütü 2016 revizyonunda eklenen alt tiplerdir. Mor ile gösterilen alan BCP-ALL’de yeni alt tipleri içermektedir. Kırmızı ile gösterilen alan ise hala sınıflandırılmayan durumları göstermektedir (48). ALL’nin ayırıcı özelliklerinden olan bu değişikliklerin sıklıkları yaşa göre değişiklik göstermektedir (Şekil 6) (3).



Şekil 6: Akut lenfoblastik lösemi (ALL) alt tiplerinin yaş dağılımı (3).

Bu alt tiplerin tespiti tanı, risk sınıflandırması ve hedefe yönelik tedaviyi kolaylaştırmaktadır (6,49).

2.2.1.3. Miks Fenotip Akut Lösemi

MPAL, miyeloid ve lenfoid özellikleri, sınırlı genetik karakterizasyonu ve uygun tedaviye ilişkin fikir birliği eksikliği olan nadir görülen bir lösemi alt tipidir (2). Tüm akut lösemilerin %2-5'ini oluşturmaktadır ve çocukluk çağı akut lösemi vakalarının %2-3'ünde görülmektedir (2,50). MPAL'ın temel özelliği, hücrelerin miyeloid soya özgü belirteçlerin yanı sıra T hücre soyu ve/veya B hücre soyu

belirteçleri eksprese etmesidir (51). MPAL'li çocuk ve yetişkinler için sağ kalım oranları sırasıyla %47-75 ve %20-40'dır ve optimal (AML veya ALL'ye yönelik) tedavi ile ilgili fikir birliği bulunmamaktadır (2).

MPAL vakaları, morfolojik olarak AML veya ALL ile ayırt edilemez ve tanı immünofenotiplemeye dayanır (52). Akım sitometrisi (ASM) klinik uygulamada blast immünofenotiplemesi için kullanılan temel yöntemlerden biridir. EGIL sınıflandırmasında, B hücresi, T hücresi ve miyeloid soyları ile ilişkili geniş bir belirteç paneline sahip blast hücreleri karakterize etmek için ASM yöntemi kullanılmaktadır. 1995 yılında yapılan MPAL, EGIL sınıflandırmasında soy özelliklerine bağlı olarak belirteçlere farklı puanlar verilen bir puanlama sistemi geliştirilmiştir. Bu puanlama sisteminde MPAL tanısı için en az iki soydan gelen skor 2'den büyük olmalıdır. EGIL sınıflandırmasında yüzey belirteçleri için pozitiflik değeri en az %20, sitoplazmik belirteçler için en az %10 olarak belirlenmiştir (Tablo 4) (37).

Tablo 4: MPAL için 1998 EGIL sınıflandırması (33).

Skor	B Hücre Soyu	T Hücre Soyu	Myeloid Soyu
2	CD79a IgM CD22	CD3/sCD3 THR α/β THR γ/δ	MPO
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CDw65 CD117
0.5	TdT CD24	TdT CD7	CD14 CD15 CD64

2016 yılında yapılan WHO sınıflandırması revizyonu önceki sınıflandırmalardan bu yana ortaya çıkan yeni klinik, prognostik, morfolojik, immünofenotipik ve genetik verileri birleştirmeye yöneliktir (26).

2016 WHO hematopoetik ve lenfoid tümörlerin sınıflandırılması beş alt MPAL türünü tanımlar (52):

- t(9; 22) (q34; q11.2) ile MPAL

- MLL yeniden düzenlenmesi ile MPAL
- MPAL B/miyeloid,
- MPAL T/miyeloid ve
- MPAL nadir tipleri

MPAL, WHO sınıflandırmasında B hücre soyu, güçlü CD19 ifadesi ile birlikte CD79a, sitoplazmik CD22 (cCD22), CD10 belirteçlerinden en az birinin güçlü ifadesi veya zayıf CD19 ifadesi ile birlikte CD79a, sitoplazmik CD22(cCD22), CD10 belirteçlerinden en az ikisinin güçlü ifadesi ile karakterize edilmiştir. T hücre soyu için sitoplazmik CD3 (cCD3) veya yüzey CD3 (sCD3) belirteçlerine bakılmaktadır. Miyeloid soy için miyeloperoksidaz (MPO) veya NSE, CD11c, CD14, CD64, lizozim belirteçlerinden en az ikisinin ifadesi soy belirlemek için kullanılan temel belirteçlerdir. Ayrıca çoğu MPAL vakası, CD45 ve erken hematopoetik belirteçleri CD34, CD38, TdT ve HLA-DR'yi ifade eder. WHO sınıflandırmasında bu belirteçlerin pozitifliği için herhangi bir eşik değeri belirtilmemiştir (33,37) (Tablo 5).

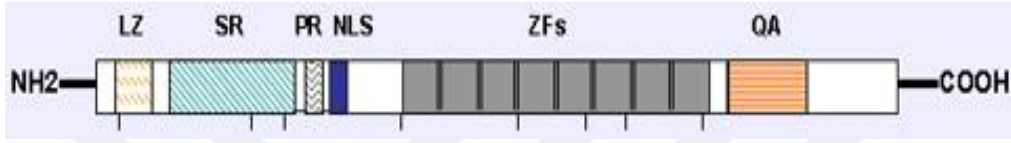
Tablo 5: 2008/2016 MPAL WHO sınıflandırması (33,37)

Hücre Soy	Belirteçler
Myeloid	Miyeloperoksidaz veya NSE, CD11c, CD14, CD64, lizozim
B hücre	CD19 ve CD79a, cCD22, CD10
T hücre	cCD3 veya sCD3

MPAL'lı hastalar sıklıkla anormal karyotipler veya kompleks kromozomal anormallikler gösterir ve yüksek riskli bir grup olarak kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (52-53). MPAL alt tipi olan *KMT2A* translokasyonları, pediatrik MPAL'de (özellikle bebeklerde) yaygındır. *BCR-ABL1* ise yetişkinlerde daha yaygındır. *RAS*, *TP53* ve özellikle yaşlı hastalarda *DNMT3A* mutasyonları MPAL'de yaygın olarak görülen diğer mutasyonlardır. Ph⁺ MPAL'de sıklıkla *IKZF1* mutasyonları bulunmaktadır. Ayrıca az sayıda vakada epigenetik düzenleyicilerde (*TET2*, *EZH2* ve *ASXL1*) mutasyon görülmektedir (37). MPAL'de görülen kromozomal anormalliklerden biri olan *ZNF384*'ün yeniden düzenlenmesi, daha çok B/Miyeloid hücre soyu içeren MPAL vakalarında %48 sıklıkta görülmektedir (2).

2.3. ZNF384 Geninin Yapısı ve Fonksiyonu

12p13.31 kromozom üzerinde bulunan *ZNF384* geni 23kb uzunlukta olup, 16 ekzon içermektedir. *ZNF384* geni 577 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlar (Şekil 7). *ZNF384* geninde bulunan alternatif kırılımlar, çoklu transkript varyantlarına yol açmaktadır. *ZNF384* geni ardışık glutamin kalıntılarını kodlayan uzun CAG trinükleotit tekrarlarını içermektedir. Nükleer matriks protein 4 (*NMP4*) veya CAS etkileşimli çinko parmak proteini (*CIZ*) geni olarak da adlandırılan *ZNF384* geni, konsensüs DNA sekansı (G/C)AAAAA(A) yoluyla promotörlere bağlanabilen, transkripsiyon ve nükleositol plazmik taşınmada rol oynayan bir C₂H₂ tipi proteini kodlar (5,7,54).



Şekil 7: *ZNF384* geni protein yapısı (55)

ZNF384 geni, matris metaloproteinazlarının MMP-1, MMP-3 ve MMP-7 ve tip I kollajeninin transkripsiyonunu düzenler. *ZNF384* geni, çekirdek ve sitoplazma arasında yer alır ve her yerde ifade edilmekle beraber testis, kalp ve beyinde en yüksek ekspresyon seviyelerine sahiptir. *ZNF384* farklı türler arasında yüksek oranda korunmuştur (56).

ZNF384 geni yeniden düzenlemeleri, çocukluk çağı BCP-ALL vakalarının %1-6'sının ve yetişkin BCP-ALL vakalarının %5-15'inde görülen yeni onkogenik alt tiplerden biridir. Ayrıca, *ZNF384*-düzenlemeleri, kötü prognozla ilişkilendirilen MPAL'da da görülmektedir (48,57).

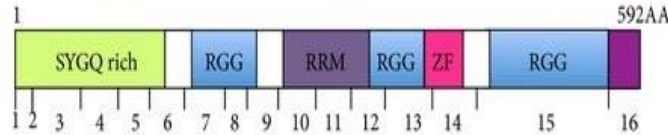
Şimdiye kadar, BCP-ALL'de *ZNF384* geninin en sık füzyon oluşturduğu genler *ARID1B*, *BMP2K*, *CREBBP*, *EP300*, *EWSR1*, *SMARCA2*, *SYNRG*, *TAF15* ve *TCF3* şeklinde belirlenmiştir. *ZNF384* yeniden düzenlemeleri olan vakalar, düşük CD10 ekspresyonu ve CD13 ve/veya CD33 miyeloid belirteç ekspresyonu şeklinde ayrı bir gen ekspresyon özelliği ve karakteristik bir immünofenotipe sahiptir (48). Ancak *ZNF384* füzyon moleküllerinin biyolojik önemi büyük ölçüde bilinmemektedir (5). *ZNF384* ve füzyon ortaklarının çoğunluğu, kendi kromozomlarının telomerlerine yakın bir yerde bulunur ve konvansiyonel G-bantlama ile *ZNF384* füzyonlarının tanımlanmasını zorlaştırır (7). Bu nedenle *ZNF384* ile ilişkili füzyon genleri, PZR veya FISH gibi daha hassas yöntemler kullanılarak bulunabilir (6).

ZNF384 gen yeniden düzenlemeleri, pediatrik ve yetişkin vakalarda olumlu bir prognoz ile ilişkili olduğu düşünülse de çocuklarda *ZNF384* düzenlemelerinin prognostik önemi ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (7).

2.3.1. t(12;17)(p13;q12) Translokasyonu (*TAF15-ZNF384* Füzyon Geni)

17q12 kromozom üzerinde bulunan *TAF15* geni 37kb uzunlukta olup, 16 ekzon içermektedir. *TAF15* geni, bir RNA bağlanma proteinini kodlar ve *TAF15* genine yapısal ve fonksiyonel benzerlikleri olan *EWSR1* ve *TLS/FUS* ile insan TET protein ailesinin bir üyesidir (58). *TAF15* gen proteini Gln, Gly, Ser ve Tyr bakımından zengin bir amino terminus içerir ve korunmuş bir RNA-bağlanma alanı (RBD), RNA bağını etkileyebilen RGG bölgeleri ve nükleik asitleri bağlayabilen Cys2-Cys2 çinko parmağı içerir (Şekil 8). Bu proteinler yetişkin insan dokularında ifade edilir (59).

Yabani tip TET proteinleri, kırılma ve mRNA taşınmasında iyi bilinen fonksiyonlara sahiptir. N-terminalleri, güçlü transkripsiyonel aktivasyon bölgelerini içerir. Bu bölgeler, *ZNF384* dahil olmak üzere çeşitli kromozomal translokasyonlar yoluyla, ETS ile ilişkili transkripsiyon faktörü proteinlerinin DNA bağlama alanına kaynaşır (58).



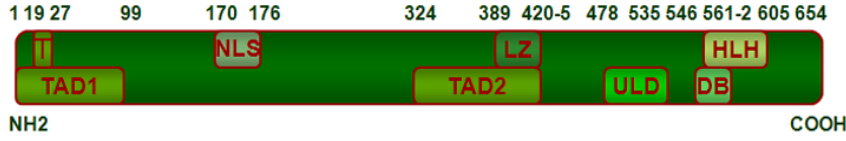
Şekil 8: *TAF15* geni protein yapısı (60).

t(12; 17) (p13; q12) *TAF15-ZNF384* yeniden düzenlenmesi çoğunlukla BCP-ALL'li hastalarda ve hem miyeloid hem de lenfoid soylara farklılaşabilen erken ortak öncül hücrelerde ortaya çıkmaktadır (58).

2.3.2. t(12;19)(p13;p13) Translokasyonu (*TCF3-ZNF384* Füzyon Geni)

TCF3 geni, çeşitli transkripsiyon faktörlerini kodlayan ve her yerde eksprese olan bir transkripsiyon regülatörüdür (62). 19p13.3 kromozom üzerinde bulunan *TCF3*

geni 43kb uzunlukta olup, 21 ekzon içermektedir. 654 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlar (Şekil 9).



Şekil 9: *TCF3* geni protein yapısı (63).

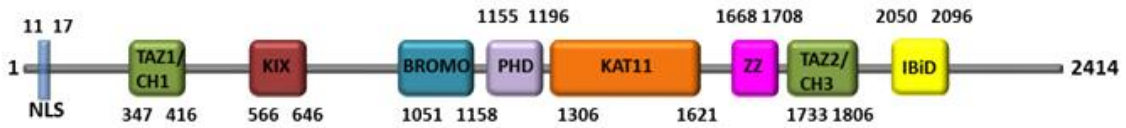
T: trans aktivasyon alanı, TAD1-TAD2: transkripsiyonel aktivasyon alanı 1-2, NLS: nükleer lokalizasyon sinyali, LZ: lösin fermuar, ULD: ubiquitin ligaz alanı, DB: DNA bağlanma alanı, HLH: sarmal döngü sarmal

TCF3 proteinleri, lenfoid gelişimi ve hematopoetik kök hücre gelişimi sırasında önemli rol oynar (64). t(12;19) B-ALL de görülen nadir bir translokasyondur (65).

ZNF384 füzyonu olan bir grup ALL'nin standart risk özellik gösterir ancak bazı çalışmalar, *TCF3-ZNF384* füzyonlu vakaların daha yüksek hücre sayıları, daha genç yaş grubunda görülmesi, önemli ölçüde daha düşük steroid yanıtı ve daha yüksek nüks sıklığı ile karakterize olabileceğini göstermektedir (57).

2.3.3. t(12;22)(p13;q13) Translokasyonu (*EP300-ZNF384* Füzyon Geni)

22q13.2 kromozom üzerinde bulunan *EP300* geni 88kb uzunluğunda olup, 31 ekzona sahiptir. 2414 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlamaktadır (Şekil 10).



Şekil 10: *EP300* geni protein yapısı (66)

LS (nükleer lokalizasyon sinyali), CH1 (aynı zamanda transkripsiyonel adaptör çinko-parmak alanı 1 veya TAZ1 olarak da bilinen sistein / histidin bakımından zengin bölge 1), KIX (CREB etkileşimli alanın kinazla indüklenebilir alanı), BROMO (bromodomain), PHD (bitki homeodomain parmağı), KAT11 (lisin asetiltransferaz alanı), ZZ (ZZ tipi çinko parmak alanı), TAZ2 (transkripsiyonel-adaptör çinko-parmak

alanı 2; ZZ ve TAZ2 birlikte bazen CH3 veya sistein / histidin bakımından zengin bölge olarak adlandırılır) ve IBiD (IRF3 bağlayıcı bölge).

EP300 geni, kromatin yeniden biçimlendirme yoluyla transkripsiyonu etkileyen ve tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olan bir histon asetiltransferazı (HAT) kodlar (7). *p300* genlerini içeren kromozomal translokasyonlar, bu genlerin hematopoetik hücre farklılaşması ve proliferasyonunun düzenlenmesindeki önemini vurgulayan belirli lösemi formlarıyla ilişkilidir (67).

EP300-ZNF384 yeniden düzenlenmesi pediatrik BCP-ALL hastalarında yaklaşık %1 oranında, adolesan ve genç erişkinlerde (AYA, Philadelphia kromozomu negatif ALL'de %8.2) veya erişkin BCP-ALL hastalarında (7.7%) görülme sıklığına sahiptir (5). *EP300-ZNF384* füzyon genine sahip hastalar yüksek riskli bir alt grup olarak değerlendirilmemektedir (7).

Bu tez projesi kapsamında MPAL ve BCP-ALL alt tiplerinde *ZNF384* yeniden düzenlenmelerinin sıklığının belirlenmesi ve füzyon gen taşıyan olgularda hastalığın prognozunu değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

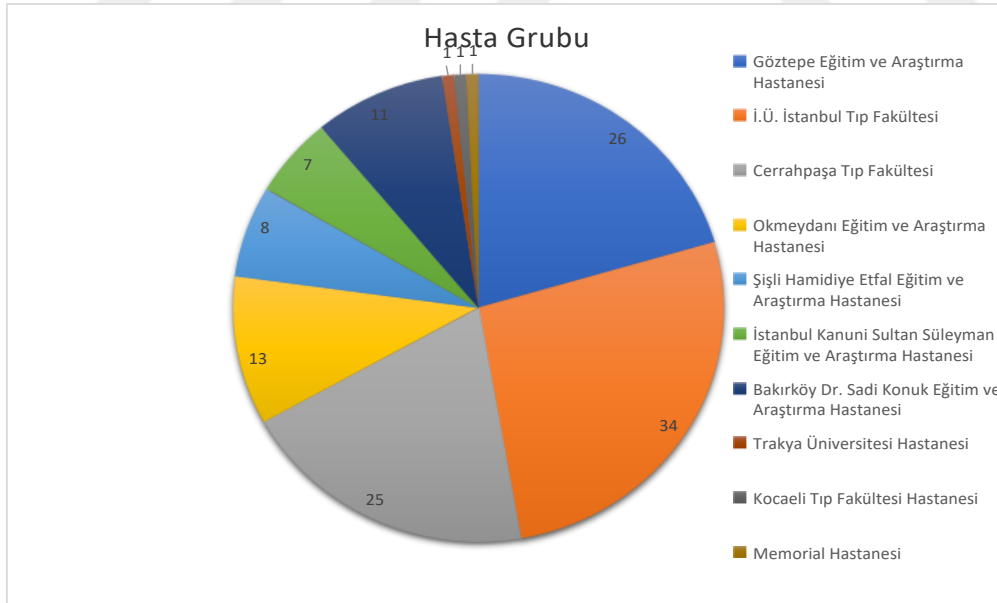
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerekli izinler alınarak yapılmıştır. Çalışma kapsamında ALL tanısı alan hastalarda konvansiyonel PZR yöntemi ile en sık görülen *ZNF384* ile ilgili füzyon genlerin varlığı/yokluğu araştırılmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta ve kontrol seçimi

Çalışma, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi (n=34), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (n=25), Kocaeli Tıp Fakültesi Hastanesi (n=1), İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=7), Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=8), Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=11), Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=13), Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=26), Trakya Üniversitesi Hastanesi (n=1), Memorial Hastanesinden (n=1) toplam (n=127) ALL ön tanısı almış hasta ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11: Hasta Sağlayan Kurumlar

Çalışmaya dahil edilen pediatrik ALL hastaların (n=127) klinik özellikleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Pediatrik ALL hastaların klinik özellikleri

	Pediyatrik ALL Hasta (n=127)
Yaş Medyan (min-max)	4 (1-18)
Cinsiyet (KADIN:ERKEK)	53:74
WBC Medyan (min-max)	12800 (2,6-702000)
Hemoglobin (dL) Medyan (min-max)	7,95 (3,40-13,40)
Platelet Medyan (min-max)	47500 (11-924000)
Son durum n(%)	
Sağ	48 (38)
EX	12 (9,4)
NA	67 (52,8)
Translokasyon	
t(9:22)	4
t(4:11)	0
t(12:21)	20
Sınıflandırma n(%)	
BCP-ALL	91 (71,7)
B/Miyeloid	22 (17,3)
T/Miyeloid	3 (2,4)
B/T	11 (8,6)
Risk grup n(%)	
Standart risk	21 (16,5)
Orta risk	21 (16,5)
Yüksek risk	9 (7)
NA	76 (60)

Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik Kurulu tarafınca onaylanmış (2018/705) ve kan/kemik iliği örnekleri alınan tüm hastalara, çalışmanın içeriğinin detayları ile anlatan gönüllü onam formu imzalatılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazların listesi Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Kullanılan Cihazların Listesi

Cihazlar	Firma
Otomatik pipetler	Eppendorf
Çeker ocak	Kermanlar
Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C)	Arçelik, Sanyo, Bosch
Masa üstü mini santrifüj	Hettich, Eppendorf
Jel görüntüleme sistemi	UVP
PZR cihazları	Techne
Vorteks	Kermanlar
Spektrofotometre	NanoDrop
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf
Otoklav	Kermanlar
Steril Kabin	Thermo Scientific

3.1.3. Kullanılan Kitler

Çalışmada kullanılan ticari kitlerin listesi ve kullanım amacı Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8: Çalışmada Kullanılan Ticari Kitler ve Kullanım Amaçları

Kit Adı	Kullanım Amacı	Firma
First-Strand cDNA Synthesis kit	cDNA sentezi	Invitrogen
RNeasy mini kit	RNA izolasyonu	QIAGEN

3.1.4. Kullanılan Elektronik Veritabanları

Kullanıcıya referans sekans ve genom bilgilerini sağlayan veri tabanlarıdır. Kullanılan elektronik veri tabanları listelenmiştir.

- NCBI (National Center for Biotechnology)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- ENSEMBL

<http://www.ensembl.org>

3.1.5. Kullanılan Materyaller

cDNA Sentezi için kullanılan materyaller Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9: cDNA sentez materyali

Kullanılan Materyaller	Firma
RNaz inhibitör (20U/μl)	Thermo Scientific
Revers transkriptaz (200U/μl)	Invitrogen
Random primer (50 ng/μl)	Invitrogen
10 mM dNTP miks	Thermo Scientific
0.1 M DTT	Invitrogen
5X First Strand Buffer	Invitrogen

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Materyaller Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10: PZR Matetryali

Kullanılan Materyaller	Firma
10X (NH ₄) ₂ SO ₄ Taq Buffer	Thermo Scientific
Taq DNA Polimeraz (5U/μl)	Thermo Scientific
25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific
Primer	Thermo Scientific
10mM dNTP miks	Thermo Scientific

3.1.6. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Firma
Etidyum Bromür	Sigma,Almanya
Bromfenol Mavisi	Sigma,Almanya
Gliserol	Sigma,Almanya
Tris Baz	Sigma,Almanya
Glasiyal Asetik Asit	Merck,Almanya
EDTA	Sigma,Almanya

3.1.7. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- **Agoroz jel yükleme tamponu (20ml)**

ddH₂O(20ml) içerisinde %0,5 Bromfenol mavisi, %60 gliserol olacak şekilde hazırlandı.

- **50X TAE(Tris-Asetik asit-EDTA)**

100 ml EDTA (0.5M)

242 g Tris baz,

57,1 g Glasiyal asetik asit

1 lt distile su ile tamamlanarak 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

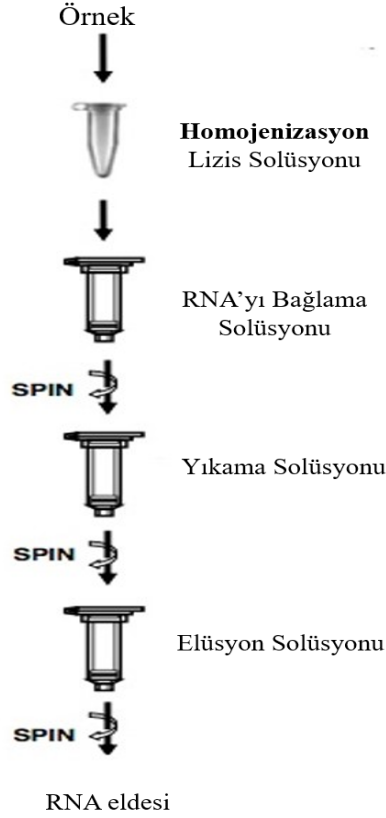
3.2. YÖNTEM

Akut lösemi hastalarından alınan kan/kemik iliği materyallerinden RNA izolasyon kiti protokolüne uygun olarak RNA izole edildi. Bu örneklerden daha sonra cDNA sentezi yapıldı. Bu cDNA'lar kullanılarak *EP300-ZNF384*, *TCF3(ekzon13)-ZNF384(ekzon3)*, *TCF3(ekzon17)-ZNF384(ekzon7)* ve *TAF15-ZNF384* füzyon gen bölgelerine ait kırık noktalara spesifik primerler ile PZR yapıldı.

Pozitif kontrol olarak, *EP300-ZNF384*, *TCF3(ekzon13)-ZNF384(ekzon3)*, *TCF3(ekzon17)-ZNF384(ekzon7)* ve *TAF15-ZNF384* füzyon gen bölgelerine ait kırık noktaları bir vektör aracılığı ile içerisine klonlanan plazmid DNA'sı kullanıldı. PZR örnekleri agaroz jelde yürütülüp amplifikasyon varlığı gösterildi. Pozitif örnekler için dizileme ve purifikasyon hizmetleri alındı.

3.2.1. RNA izolasyonu ve kantitasyonu

Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan kan/kemik iliği örnekleri kit protokolü (RNeasy mini kit, QIAGEN) uygulanarak izole edildi (Şekil 12).



Şekil 12: QIAGEN RNeasy mini Kit İş Akışı

RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayini spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ışığı soğurma (OD) ölçümü kullanılarak yapıldı. Spektrofotometre ölçümlerinde 260 nm/280 nm kesirinin 2,0 civarında olmasına dikkat edildi.

3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Reaksiyonu

Spektrofotometre kullanılarak RNA örneklerinin kalitesi ve miktarları ölçüldü. RNA örnekleri cDNA sentezi için kalıp görevi görerek ters transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrildi. cDNA sentezinde ilk aşama Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12: cDNA sentezi ilk aşama içeriği

1 örnek için;			
	600µM Random Primer		1 µl
	10 mM dNTP mix		1 µl
	RNA + distile su		10 µl
TOPLAM	(Her	Tüp	12 µl
içerisindeki hacim)			

65°C’de 5 dakika PZR cihazında işleme alındıktan sonra buza alınarak ikinci aşamaya geçildi. İkinci aşama Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13: cDNA sentezi ikinci aşama içeriği

1 örnek için;			
	5X First Strand Buffer		4 µl
	0.1 M DTT		2 µl
	40u/µl RNaz inhibitör		1 µl
Toplam (Tüplere dağıtılacak miktar)			7 µl
TOPLAM	(Her	Tüp	19 µl
içerisindeki hacim)			

19 µl Toplam Hacim üzerine 1 µl M-MLV RT enzim eklendi.

TOPLAM (Her tüp içerisindeki hacim) = 20 µl

Karışım 25 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra 37°C’de 50 dk ve 70°C’de 15 dk inkübe edildi. cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

3.2.3. RT-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

EP300-ZNF384, *TCF3(ekzon13)-ZNF384(ekzon3)*, *TCF3(ekzon17)-ZNF384(ekzon7)* ve *TAF15-ZNF384* füzyon gen bölgelerine ait kırık noktalarını amplifiye etmek için konvansiyonel PZR yöntemi kullanıldı. PZR yönteminde pozitif kontrol olarak, içerisine bir vektör aracılığı ile incelenecek kırık bölgeleri kopyalanan her bir füzyon geni için ayrı plazmid DNA kullanıldı. Plazmid DNA’lar, optimizasyon aşamasında kırık noktalarını içeren füzyon genlere özgü tasarlanan primer çiftleri kullanılarak PZR yöntemi ile amplifiye edildi. Optimizasyonun amacı, primerler için en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenmesidir. Bu amaçla, pozitif kontrol olarak plazmid DNA kullanılarak primerler için konvansiyonel PZR cihazında optimizasyon çalışması yapıldı. Liyofilize olarak alınan bu primerlerin her biri stok konsantrasyonu 100 µl olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Sulandırılan primer çiftleri -20°C’de saklanmıştır. Primerler konvansiyonel PZR için 10 µl’lik ara stoklar yapılarak kullanıldı.

Referans gen olarak *CYPB* geni kullanılarak PZR yapıldı ve cDNA’lar kontrol edildi (Tablo 14).

Tablo 14: *CYPB* geni kontrol PZR İçeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10X	2,5 µl
Distile su	-	15,4 µl
Primer	10pmol	2 µl
dNTP	2mM	2 µl
MgCl ₂	25mM	2 µl
Taq polimeraz	500 units	0,1 µl
cDNA	500-1000ng	1 µl
TOPLAM		25 µl

PZR reaksiyonunda total 25 µl olacak şekilde hazırlanan karışım PZR tüplerine dağıtıldı. Tüpler PZR cihazında işleme alındı (Tablo 15).

Tablo 15: CYP A geni PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön Denatürasyon	94 °C	3 dakika
Denatürasyon	94 °C	40 saniye
Primer Bağlanması	57 °C	45 saniye
Zincir Uzaması	72°C	45 saniye
Son Uzama	72°C	10 dakika

Çalışan cDNA örnekleriyle *TAF15-ZNF384*, *EP300-ZNF384*, *TCF3*(ekzon13)-*ZNF384*(ekzon3), *TCF3*(ekzon17)-*ZNF384*(ekzon7) füzyon gen bölgelerine ait kırık noktaları konvansiyonel PZR yöntemi ile var/yok analizi yapılarak belirlendi. *TAF15-ZNF384* füzyon geni için PZR içeriği ve PZR koşulları sırasıyla Tablo 16-17’de verilmiştir.

Tablo 16: *TAF15-ZNF384* füzyon geni PZR içeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10X	2,5 µl
Distile su	-	15,4 µl
Primer	10pmol	2 µl
dNTP	2mM	2 µl
MgCl ₂	25mM	2 µl
Taq polimeraz	500 units	0,1 µl
cDNA	500-1000ng	1 µl
TOPLAM		25 µl

Tablo 17: *TAF15-ZNF384* geni PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön Denatürasyon	94 °C	3 dakika
Denatürasyon	94 °C	40 saniye
Primer Bağlanması	60 °C	45 saniye
Zincir Uzaması	72°C	45 saniye
Son Uzama	72°C	10 dakika

EP300-ZNF384 füzyon geni için PZR içeriği ve PZR koşulları sırasıyla tablo 18-19'da verilmiştir.

Tablo 18: *EP300-ZNF384* füzyon geni PZR içeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10X	2,5 µl
Distile su	-	15,4 µl
Primer	10pmol	2 µl
dNTP	2mM	2 µl
MgCl ₂	25mM	2 µl
Taq polimeraz	500 units	0,1 µl
cDNA	500-1000ng	1 µl
TOPLAM		25 µl

Tablo 19: *EP300-ZNF384* füzyon geni PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön Denatürasyon	94 °C	3 dakika

Denatürasyon	94 °C	40 saniye	} 35 döngü
Primer Bağlanması	57 °C	45 saniye	
Zincir Uzaması	72°C	45 saniye	
Son Uzama	72°C	10 dakika	

TCF3(ekzon13)-*ZNF384*(ekzon3) füzyon geni için PZR içeriği ve PZR koşulları sırasıyla Tablo 20-21 'de verilmiştir.

Tablo 20: *TCF3*(ekzon13)-*ZNF384*(ekzon3) füzyon geni PZR içeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10X	2,5 µl
Distile su	-	15,4 µl
Primer	10pmol	2 µl
dNTP	2mM	2 µl
MgCl ₂	25mM	2 µl
Taq polimeraz	500 units	0,1 µl
cDNA	500-1000ng	1 µl
TOPLAM		25 µl

Tablo 21: *TCF3*(ekzon13)-*ZNF384*(ekzon3) füzyon geni PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön Denatürasyon	94 °C	3 dakika
Denatürasyon	94 °C	40 saniye
Primer Bağlanması	60 °C	45 saniye
Zincir Uzaması	72°C	45 saniye
Son Uzama	72°C	10 dakika

TCF3(ekzon17)-*ZNF384*(ekzon7) füzyon geni için PZR içeriği ve PZR koşulları sırasıyla Tablo 22-23’de verilmiştir.

Tablo 22: *TCF3*(ekzon17)-*ZNF384*(ekzon7) füzyon geni PZR içeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10X	2,5 µl
Distile su	-	15,4 µl
Primer	10pmol	2 µl
dNTP	2mM	2 µl
MgCl ₂	25mM	2 µl
Taq polimeraz	500 units	0,1 µl
cDNA	500-1000ng	1 µl
TOPLAM		25 µl

Tablo 23: *TCF3*(ekzon17)-*ZNF384*(ekzon7) füzyon geni PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön Denatürasyon	95 °C	2 dakika
Denatürasyon	95 °C	30 saniye
Primer Bağlanması	57 °C	30 saniye
Zincir Uzaması	72°C	1 dakika
Son Uzama	72°C	10 dakika

3.2.4. Kullanılan Primerler ve Plazmidler

EP300-ZNF384 füzyon genine özgü kullanılan primer dizisi Tablo 24’de verilmiştir.

Tablo 24: *EP300-ZNF384* genine özgü primer

<i>EP300</i> ekzon 6	İleri 5'- TCTAGGGGTGGGTCAACAGT-3'
<i>ZNF384</i> ekzon 3	Geri 5'- CCTTCTCTGGCAACAGCTG-3'
PZR ürün boyu	330 bp

Tablo 25: *TCF3-ZNF384* genine özgü primerler

<i>TCF3</i> ekzon 13	İleri 5'-CTACGTGGCAGATGGCAGCC-3'
<i>ZNF384</i> ekzon 3	Geri 5'-CCTTCTCTGGCAACAGCTG-3'
PZR ürün boyu	594 bp

<i>TCF3</i> ekzon 17	İleri 5'-CTCCCGACTCCTACAGTGG-3'
<i>ZNF384</i> ekzon 7	Geri 5'-CAGTGTGGATTCGGGTGTG-3'
PZR ürün boyu	390 bp

TCF3-ZNF384 füzyon genine özgü kullanılan primer dizisi tablo 25’de verilmiştir.

Tablo 26: *TAF15-ZNF384* genine özgü primer

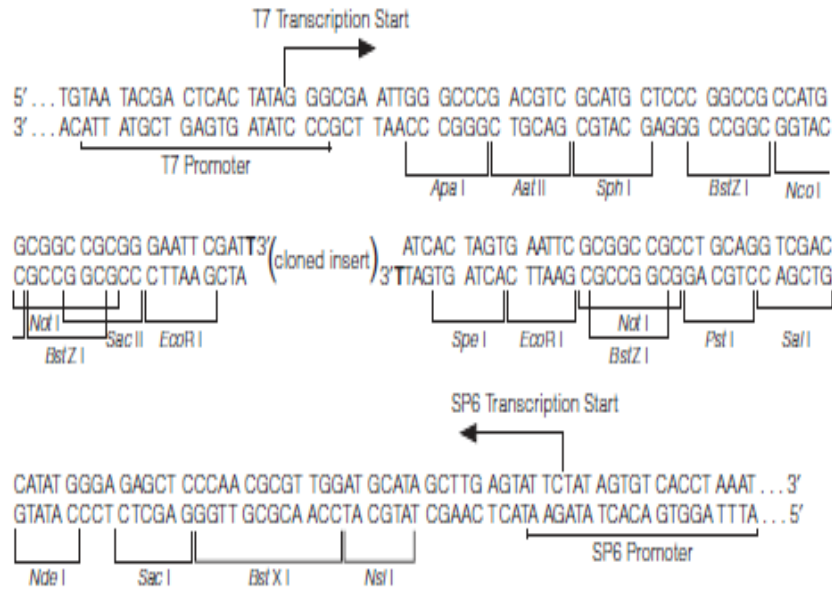
<i>TAF15</i> ekzon 6	İleri 5'-GAAGAGCACCTTCCTATGACC-3'
<i>ZNF384</i> ekzon 3	Geri 5'-CCTTCTCTGGCAACAGCTG-3'
PZR ürün boyu	312 bp

TAF15-ZNF384 füzyon genine özgü kullanılan primer dizisi tablo 26’da verilmiştir.

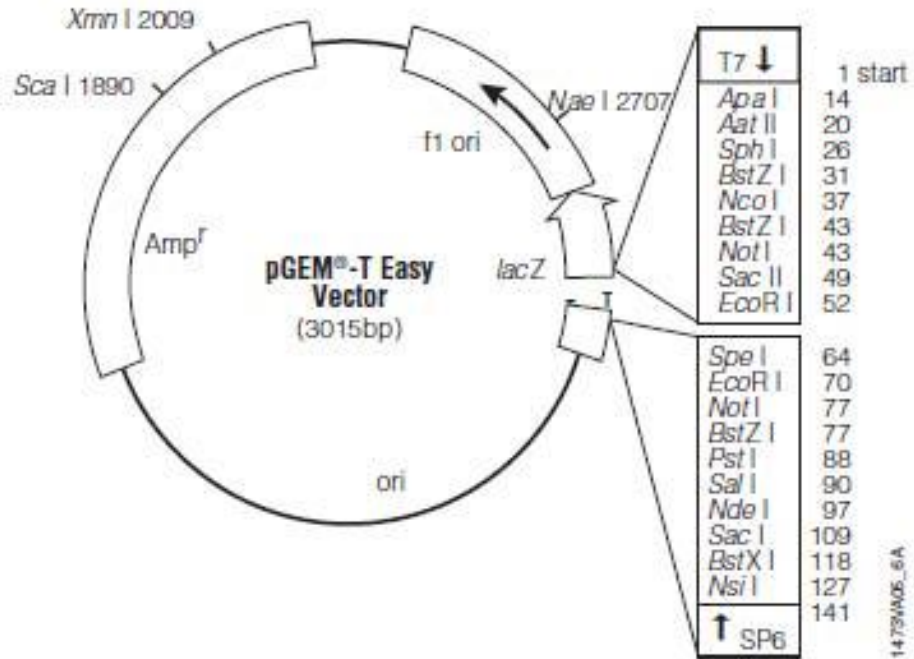
Pozitif kontrol olarak kullanılan plazmid;

pGEM T easy vektör kullanılarak *EP300-ZNF384*, *TCF3*(ekzon13)-*ZNF384*(ekzon3), *TCF3*(ekzon17)-*ZNF384*(ekzon7), *TAF15-ZNF384* gen bölgelerine ait kırık noktalarının klonlandığı plazmidler pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu plazmidler Kentaro Ohki ve ark. tarafından Japonya’da sentezlenerek gönderilmiştir. Liyofilize olarak gönderilen plazmidlerin her biri stok konsantrasyonu 100 µl olacak şekilde distile su ile sulandırıldı ve -20C’de saklandı. Kullanılan plazmidlerin dizi ve haritası sırasıyla Şekil 13 ve 14 ‘de verilmiştir.

pGEM®-T Easy Vector



Şekil 13: ZNF384 ve ilgili füzyon genleri (EP300, TCF3, TAF15) içeren plazmid dizisi



Şekil 14: ZNF384 ve ilgili füzyon genleri (EP300, TCF3, TAF15) içeren plazmid haritası

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR örnekleri 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelle 50 bp ve/veya 100 bp marker ile yüklendi ve 70-80 volt elektrik akımında 20-25 dk yürütüldü. Jelde ilerlemiş olan ürünler UV ile görüntülendi.

3.2.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

%2'lik konsantrasyonda jel hazırlamak için 1gr agaroz tartıldıktan sonra 1X'lik TAE çözeltisine eklenerek mikrodalga fırında ısıtıldı. Çeker ocak altında 2,5 µl etidyum bromür eklendi. Sıvılaşan agaroz, jel tepsisine döküldü. Taraklar yerleştirildi ve katılaşması için beklendi. Katılaşan jel, içerisinde 1X TAE solüsyonu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.

3.2.6. Sanger Dizileme

PZR yöntemiyle amplifiye edilen hasta cDNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra pozitif örnekler füzyon ihtimalini doğrulamak için hasta spesifik olarak çift yönlü dizilemeye gönderildi. Sanger dizileme için hizmet alımı yapıldı. Alınan sonuçlar CLC Main Workbench programı kullanılarak analiz edildi.

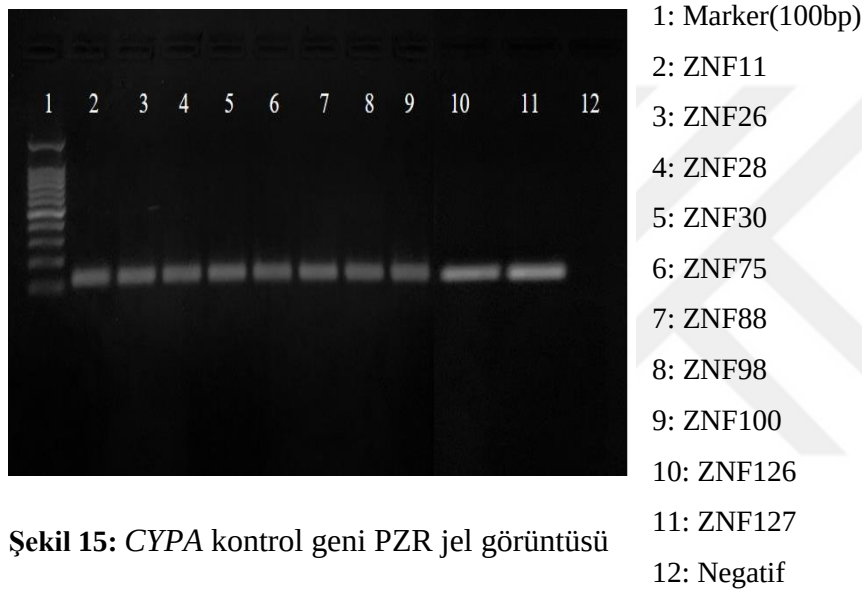
3.2.7. İstatistiksel Analiz

ZNF384 füzyon pozitif ve negatif hastaların yüzey belirteçlerin karşılaştırmalı analizi için t test kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Hastaların yaşam analizleri için Kaplan Meier yöntemi kullanılmıştır. Grafikler Graphpad Prism 8.1.1 programı yardımıyla oluşturulmuştur. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *CYPA* Kontrol Geni Ekspresyonu

cDNA örneklerinin çalıştığını göstermek amacı ile kontrol geni olarak *CYPA* geni kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen n=127 ALL hastasına ait tüm cDNA'larda *CYPA* gen ekspresyonu PZR yöntemi ile gösterilmiştir. *ZNF384* füzyon geni bulunan hastaların *CYPA* kontrol geni PZR'ı jel elektroforezi görüntüsü Şekil 15'de verilmiştir.



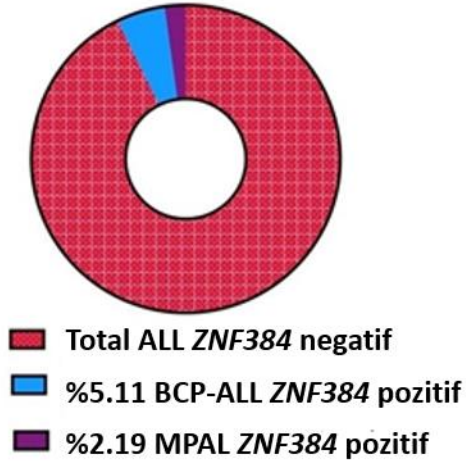
Şekil 15: *CYPA* kontrol geni PZR jel görüntüsü

4.2. ALL Hastalarında *ZNF384* Füzyonları

Bu çalışmada 53 kadın 74 erkek olmak üzere toplam 127 pediatrik ALL hastası, *ZNF384* geninin en sık füzyon oluşturduğu *TAF15-ZNF384*, *TCF3-ZNF384*, *EP300-ZNF384* translokasyonların varlığı/yokluğu açısından incelendi. 127 pediatrik ALL hastasından n=91 BCP-ALL, n=36 MPAL grubundandır. 127 pediatrik ALL hastanın 10 tanesinde (%7,8) *ZNF384* yeniden düzenlemeleri bulundu. *ZNF384* füzyonu tespit edilen hastaların n=7 BCP-ALL, n=3 MPAL hastasıdır (Şekil 16). *ZNF384* geni en sık olarak *TCF3* geniyle füzyon oluşturmaktadır (Şekil 17). *ZNF384* füzyonları pozitif ve negatif hastaların klinik özellikleri Tablo 27'da gösterilmiştir.

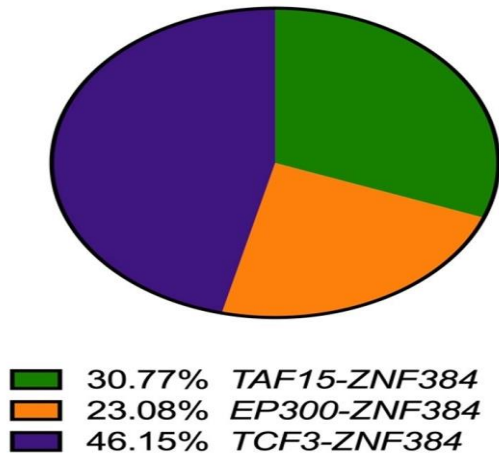
ZNF384 füzyon geni bulunan 10 hastanın özellikleri Tablo 28’de verilmiştir. 3 hastada (*ZNF28*, *ZNF126*, *ZNF127*) *ZNF384* füzyon oluşturduğu genlerden her ikisi bulunmaktadır.

**Pediyatrik ALL hastalarında
ZNF384 füzyonların dağılımı**



Şekil 16: ALL hastalarında *ZNF384* füzyonlarının sıklığı ve dağılımı

***ZNF384* füzyon genlerin dağılımı**



Şekil 17: *ZNF384* füzyon genlerin dağılımı

Tablo 27: ZNF384 füzyonları pozitif ve negatif hastaların klinik özellikleri

	Füzyon gen pozitif(n=10)	Füzyon gen negatif (n=117)
Yaş Medyan (min-max)	6 (1,33-15)	4 (1-18)
Cinsiyet (K:E)	5:5	48:69
WBC ($\times 10^9/L$) Medyan (min-max)	49250 (23900-217000)	9900 (2,6-702000)
Hemoglobin (dL) Medyan (min-max)	6 (4,1-12)	7,90 (3,40-13,40)
Platelet ($\times 10^9/L$) Medyan (min-max)	33000 (16000-284000)	47000 (11-924000)
Son durum n(%)		
Sağ	3 (30)	46 (39,3)
EX	1 (10)	9 (7,7)
NA	6 (60)	62 (53)
Translokasyon		
t(9;22)	0	4
t(4;11)	0	0
t(12;21)	1	19
Sınıflandırma n(%)		
BCP-ALL	7 (70)	84 (71,8)
B/Miyeloid	3 (30)	19 (16,2)
T/Miyeloid	0	3 (2,6)
B/T	0	11 (9,4)
Risk grup n(%)		
Standart risk	0	21 (17,9)
Orta risk	2 (20)	18 (15,3)
Yüksek risk	2 (20)	7 (6)
NA	6 (60)	71 (60,7)

K: Kız E: Erkek, min:minimum, max: maksimum, WBC: beyaz kan hücresi (p=0.0753)

Tablo 28: Füzyon gen pozitif hastaların özellikleri

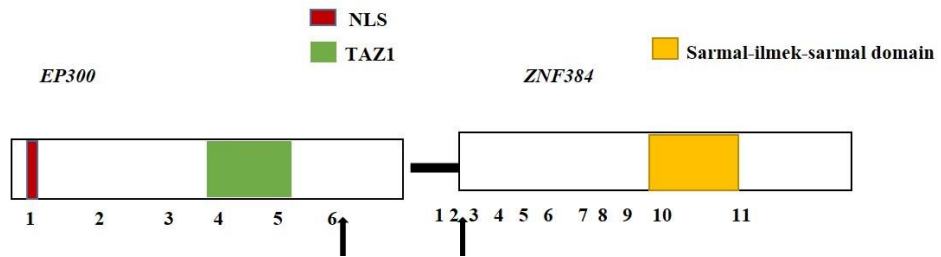
Hasta	Yaş	Cinsiyet	Fenotip	Füzyon gen	Translokasyon t(4;11),t(9;22),t(12;21)	Son durum
ZNF11	7	E	BCP-ALL	TAF15-ZNF384	Yok	Sağ

ZNF26	3	K	B/Miyeloid	<i>EP300-ZNF384</i>	Yok	-
ZNF28	12	E	BCP-ALL	<i>TCF3 -ZNF384</i> <i>EP300-ZNF384</i>	Yok	-
ZNF30	5	E	BCP-ALL	<i>TAF15-ZNF384</i>	Yok	-
ZNF75	8	K	BCP-ALL	<i>EP300-ZNF384</i>	Yok	Eks
ZNF88	15	K	BCP-ALL	<i>TCF3-ZNF384</i>	Yok	Eks
ZNF98	6	E	BCP-ALL	<i>TCF3-ZNF384</i>	Yok	Eks
ZNF100	3.5	E	BCP-ALL	<i>TCF3-ZNF384</i>	t(12;21) pozitif	-
ZNF126	2	E	B/Miyeloid	<i>TCF3-ZNF384</i> <i>TAF15-ZNF384</i>	Yok	-
ZNF127	1	K	B/Miyeloid	<i>TCF3-ZNF384</i> <i>TAF15-ZNF384</i>	Yok	Sağ

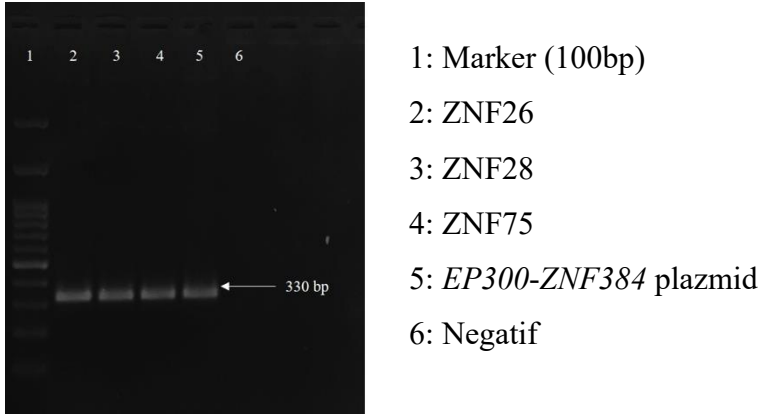
E:Erkek, K:Kız, Yaş (yıl), Eks: Ölü

4.2.1. *EP300-ZNF384* füzyon geni

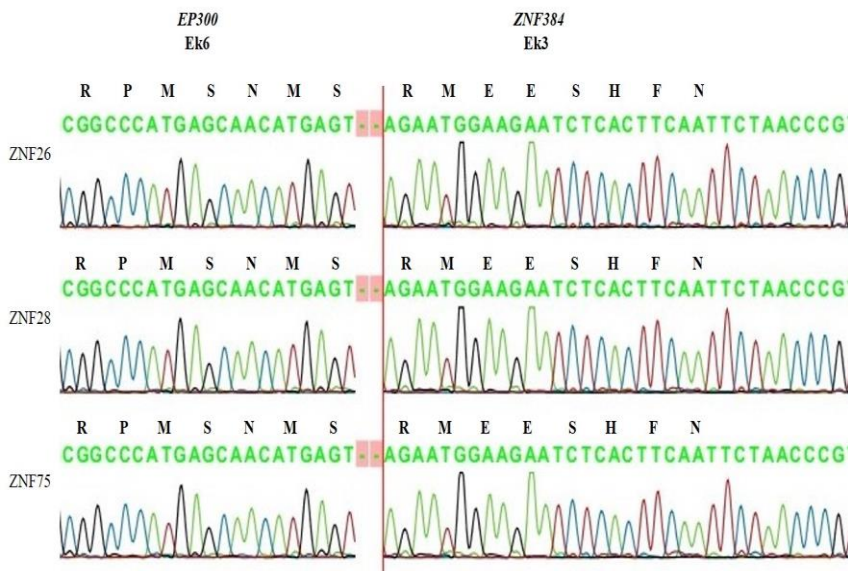
EP300 geninin ekzon 6 da kırık noktası *ZNF384* geninin ekzon 3 de füzyon oluşturmıştır (Şekil 18). Çalışmamızda toplam 127 hastanın 3 tanesinde (ZNF26, ZNF28, ZNF75 no'lu hastalarda) *EP300-ZNF384* füzyon geni tespit edildi. PZR yöntemi ile örnekler amplifiye edildikten sonra agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Pozitif kontrol olarak *EP300-ZNF384* füzyon geni kırık noktasını içeren plazmid DNA'sı kullanıldı. Bu plazmid DNA ve pozitif örneklerin bant boyu 330 bp'dir (Şekil 19). Pozitif çıkan ZNF26, ZNF28 ve ZNF75 no'lu örnekleri konfirme etmek için Sanger dizileme hizmeti alındı (Şekil 20). Füzyon geni bulunan ZNF28 ve ZNF75 no'lu örnekler BCP-ALL olarak sınıflandırdığımız, ZNF26 nolu örnek ise B/miyeloid MPAL sınıflandırmasına dahil edilen hasta örneğidir.



Şekil 18: *EP300-ZNF384* füzyon gen protein yapısı (68)



Şekil 19: *EP300-ZNF384* füzyon geni jel görüntüsü



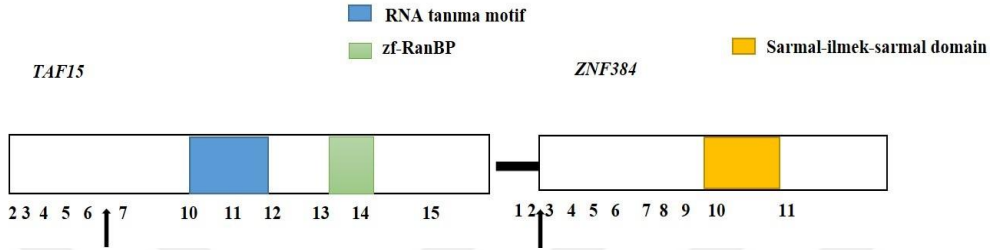
Şekil 20: *EP300-ZNF384* füzyon geni kırık noktası

4.2.2. *TAF15-ZNF384* füzyon geni

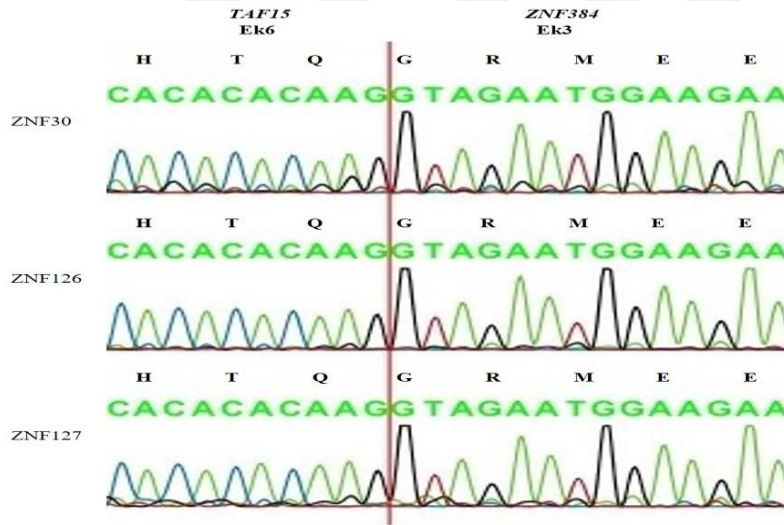
4.2.2.1. *TAF15-ZNF384* (ekzon6-ekzon3)

TAF15 geninde ekzon 6 da kırık noktası *ZNF384* geninde ekzon 3 ile füzyon oluşturmıştır (Şekil 21). Çalışmamızda toplam 127 hastanın 3 tanesinde (*ZNF30*, *ZNF126*, *ZNF127* no'lu hastalarda) *TAF15-ZNF384* füzyon geni tespit edildi. PZR yöntemi ile örnekler amplifiye edildikten sonra agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Pozitif kontrol olarak *TAF15-ZNF384* füzyon geni kırık noktasını içeren plazmid

DNA'sı kullanıldı. Bu plazmid DNA ve *TAF15-ZNF384* füzyon geni bulunan ZNF30, ZNF126 ve ZNF127 no'lu örneklerin bant boyu 310 bp dir (Şekil 24). Pozitif çıkan örnekleri konfirme etmek için Sanger dizileme hizmeti alındı (Şekil 22). Füzyon geni bulunan ZNF30 nolu örnek BCP-ALL olarak sınıflandırdığımız, ZNF126 ve ZNF127 nolu örnek ise B/miyeloid MPAL sınıflandırmasına dahil edilen hasta örnekleridir.



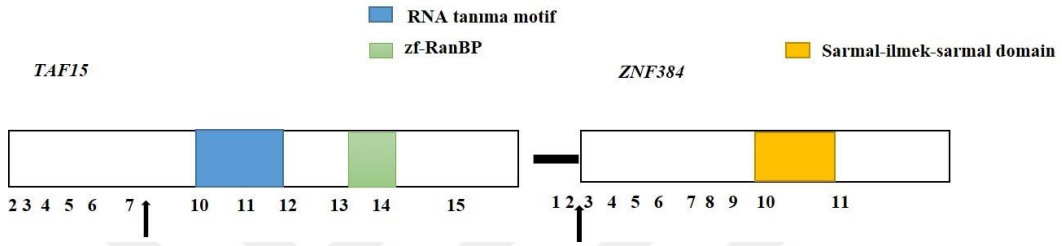
Şekil 21: *TAF15-ZNF384* (ek6-ek3) füzyon gen protein yapısı (6)



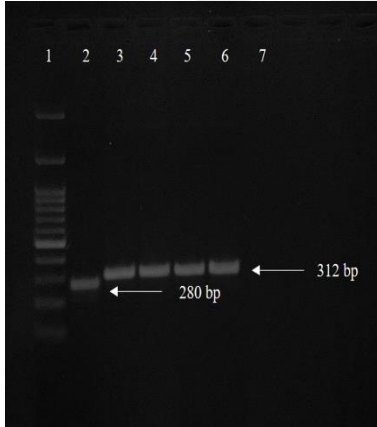
Şekil 22: *TAF15-ZNF384* füzyon geni kırık noktası

4.2.2.2. *TAF15-ZNF384* (ekzon7-ekzon3)

İncelediğimiz *TAF15-ZNF384* füzyon genine ait ekzon 6 – ekzon 3 kırık noktası dışında *TAF15* geni ekzon 7 de farklı bir kırık tespit edildi (Şekil 23). Daha önce literatürde bulunan bu kırık çalışmamızda bir hasta örneğinde (ZNF11 nolu örnek) görüldü. Beklenen ekzon 6-ekzon 3 kırık boyundan farklı olarak ZNF11 numaralı örnek boyu 280 bp dir (Şekil 24). Pozitif çıkan ZNF11 no'lu örneği konfirme etmek için Sanger dizileme hizmeti alındı (Şekil 25). ZNF11 no'lu örnek BCP-ALL sınıflandırmasına dahil ettiğimiz örnektir.

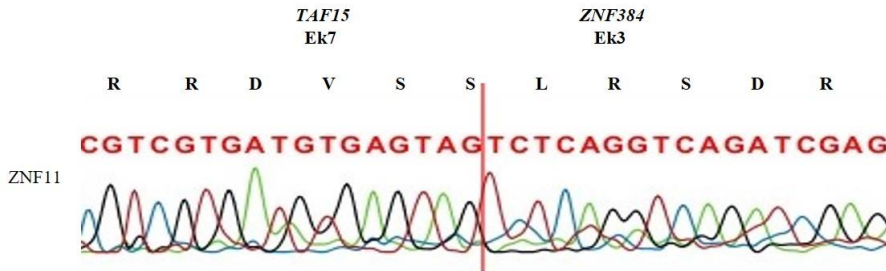


Şekil 23: *TAF15-ZNF384* (ek7-ek3) füzyon gen protein yapısı (61)



- 1: Marker(100bp)
- 2: ZNF11
- 3: ZNF30
- 4: ZNF126
- 5: ZNF127
- 6: *TAF15-ZNF384* plazmid
- 7: Negatif

Şekil 24: *TAF15-ZNF384* füzyon geni jel görüntüsü

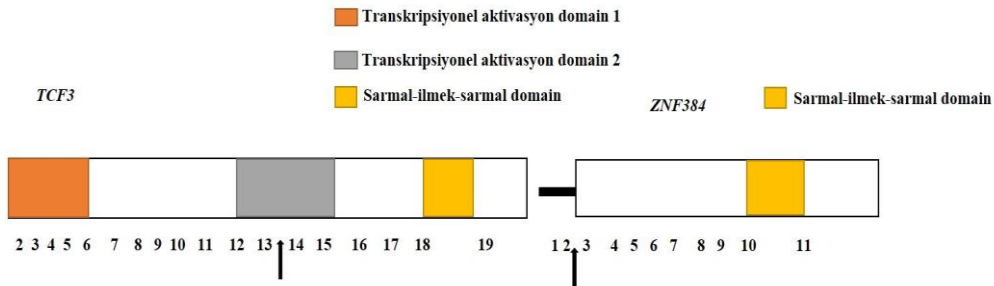


Şekil 25: *TAF15-ZNF384* (ek7-ek3) füzyon geni kırık noktası

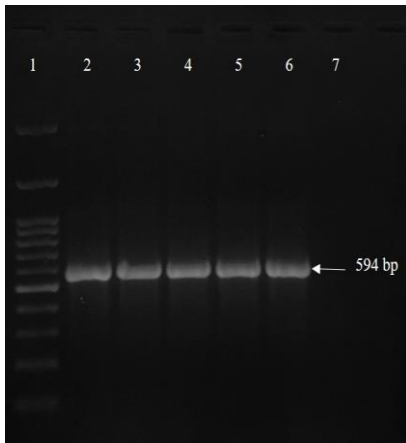
4.2.3. *TCF3-ZNF384* füzyon geni

4.2.3.1. *TCF3-ZNF384* (ekzon13-ekzon3)

TCF3 geninde ekzon 13’de oluşan kırık noktası *ZNF384* geni ekzon 3 ile füzyon oluşturmuştur (Şekil 26). Çalışmamızda toplam 4 örnekte (*ZNF28*, *ZNF88*, *ZNF126*, *ZNF127* no’lu hastalarda) *TCF3-ZNF384* füzyon geni tespit edildi. Pozitif kontrol olarak *TCF3-ZNF384* füzyon geni kırık noktasını içeren plazmid DNA’sı kullanıldı. Bu plazmid DNA’sı ve *TCF3-ZNF384* (ekzon13-ekzon3) füzyon geni bulunan örneklerin bant boyu 594 bp’dir (Şekil 27). Pozitif çıkan örnekleri konfirme etmek için Sanger dizileme hizmeti alındı (Şekil 28). Füzyon geni bulunan *ZNF28* ve *ZNF88* no’lu örnekler BCP-ALL olarak sınıflandırdığımız, *ZNF126* ve *ZNF127* nolu örnekler ise B/miyeloid MPAL sınıflandırmasına dahil edilen hasta örnekleridir.

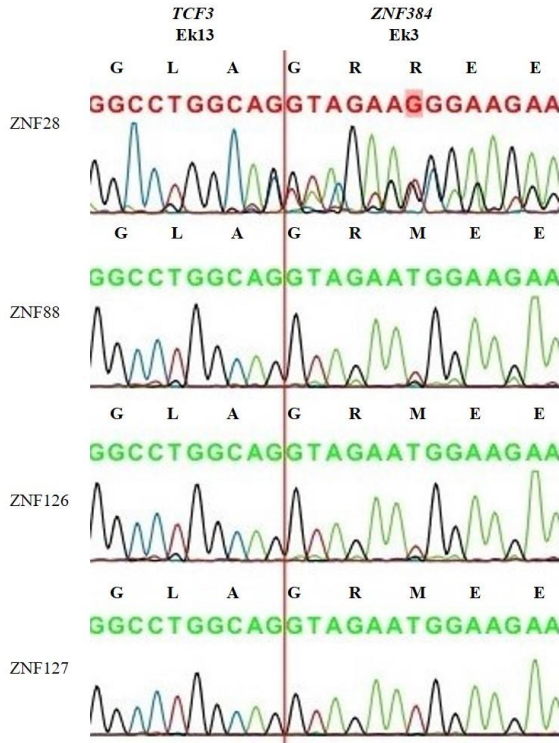


Şekil 26: *TCF3-ZNF384* (ek13-ek3) füzyon geni protein yapısı (6)



- 1: Marker (100bp)
- 2: *ZNF28*
- 3: *ZNF88*
- 4: *ZNF126*
- 5: *ZNF127*
- 6: *TCF3-ZNF384* plazmid
(ek13-ek3)
- 7: Negatif

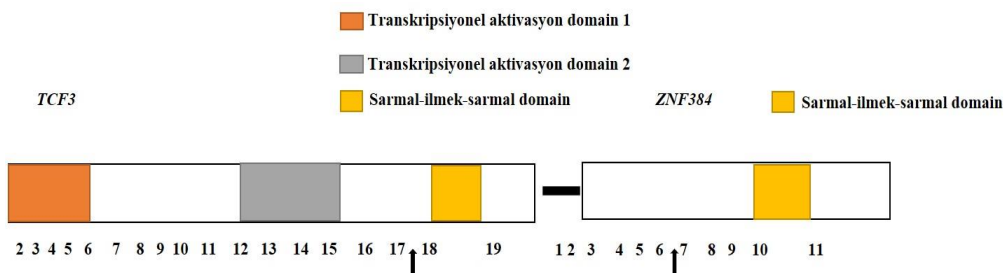
Şekil 27: *TCF3-ZNF384* (ek13-ek3) füzyon geni jel görüntüsü



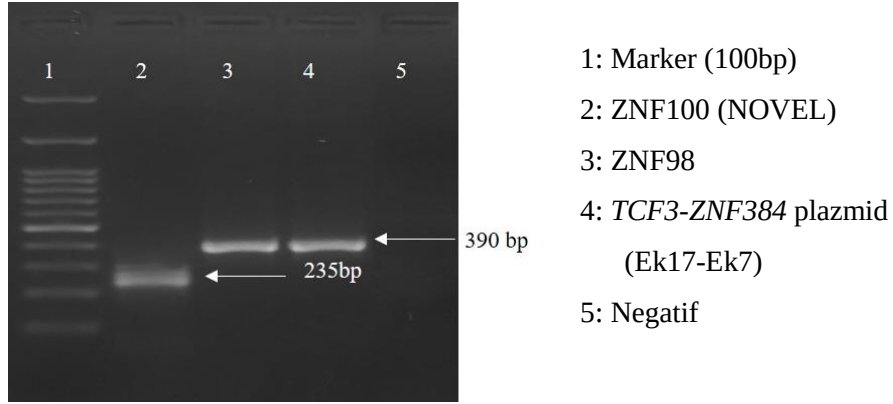
Şekil 28: *TCF3-ZNF384* (ek13-ek3) füzyon geni kırık noktası

4.2.3.2. *TCF3-ZNF384* (ekzon 17-ekzon 7)

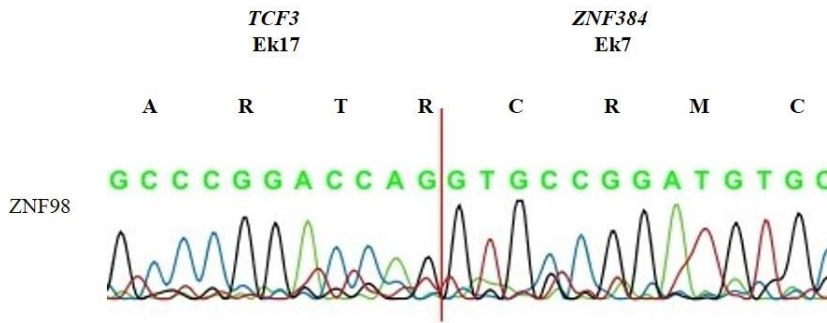
TCF3 geninde ekzon 17’de oluşan kırık noktası *ZNF384* geni ekzon 7’de füzyon oluşturmuştur (Şekil 29). Çalışmamızda bir hastada (*ZNF98* nolu örnek) *TCF3-ZNF384* füzyon geni tespit edildi. Plazmid DNA’sı ve *TCF3-ZNF384* (ek17-ek7) füzyon geni bulunan *ZNF98* no’lu örneğin bant boyu 390 bp’dir (Şekil 30). Pozitif çıkan örnekleri konfirme etmek için Sanger dizileme hizmeti alındı (Şekil 31). Füzyon geni bulunan *ZNF98* nolu örnek BCP-ALL olarak sınıflandırmaya dahil edilen örnektir.



Şekil 29: *TCF3-ZNF384* (ek17-ek7) füzyon geni protein yapısı (6)



Şekil 30: *TCF3-ZNF384* (ek17-ek7) jel görüntüsü

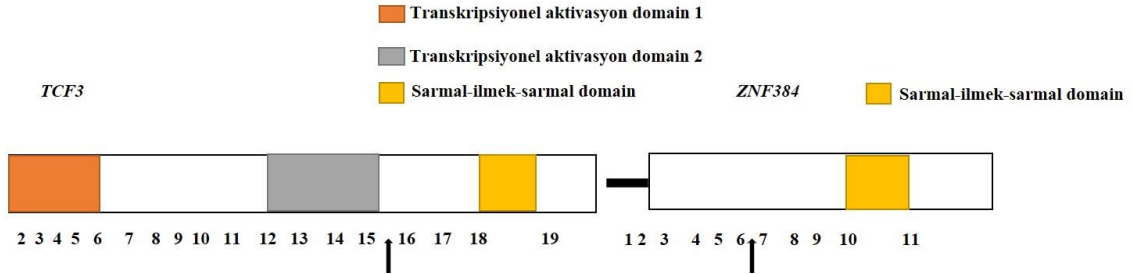


Şekil 31: *TCF3-ZNF384* (ek17-ek7) füzyon geni kırık noktası

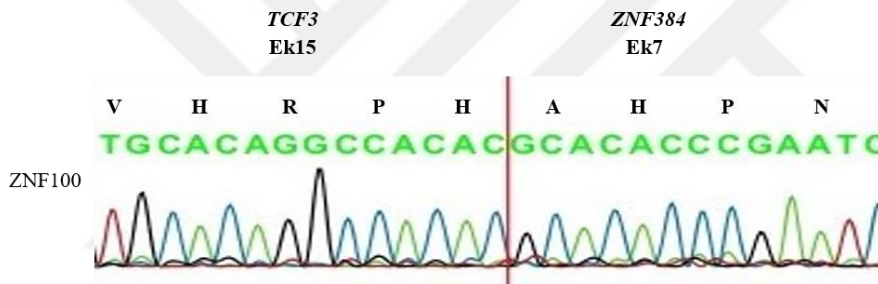
4.2.3.3. *TCF3-ZNF384* (ekzon 15-ekzon 7)

TCF3 geninde ekzon 15’de oluşan kırık noktası *ZNF384* geni ile ekzon 7’de füzyon oluşturmuştur (Şekil 32). Beklediğimiz kırık bölgesinden farklı bir yerde kırık oluşturan bu kırıkla ilgili literatürde başka bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda 1 örnekte (ZNF100 nolu örnek) *TCF3-ZNF384* (ekzon15-ekzon7) füzyon geni tespit edildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan *TCF3-ZNF384* füzyon genine ait kırık noktasını içeren plazmid DNA’sı bant boyu 390 bp’dır. Yeni kırık noktası bulunan ZNF100 no’lu örneğin bant boyu ise 235 bp’dır (Şekil 30). Pozitif çıkan örneği konfirme etmek için

Sanger dizileme yöntemi kullanıldı (Şekil 33). Füzyon geni bulunan ZNF100 nolu örnek BCP-ALL olarak sınıflandırmaya dahil edilen örnektir.



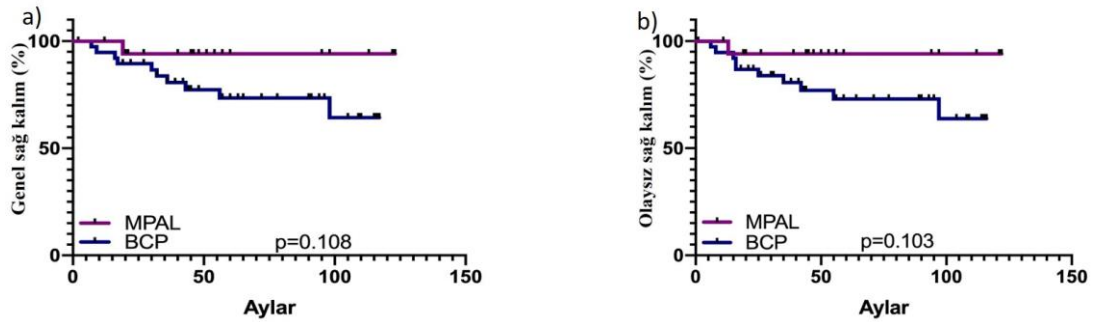
Şekil 32: *TCF3-ZNF384* (ek15-ek7) füzyon geni protein yapısı



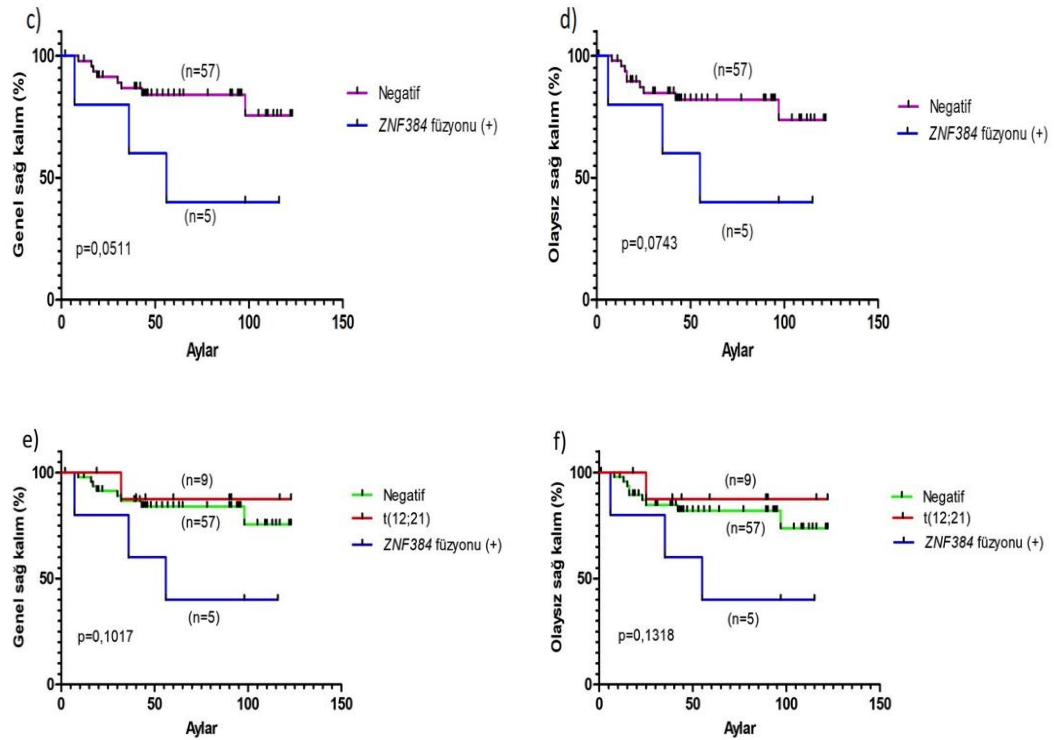
Şekil 33: *TCF3-ZNF384* (ek15-ek7) füzyon geni kırık noktası

4.3. Klinik ilişkilendirme

BCP-ALL ve MPAL hastaları genel sağ kalım ($p=0,108$) ve olaysız sağ kalım ($p=0,103$) açısından incelenmiştir ve anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 34 a-b).



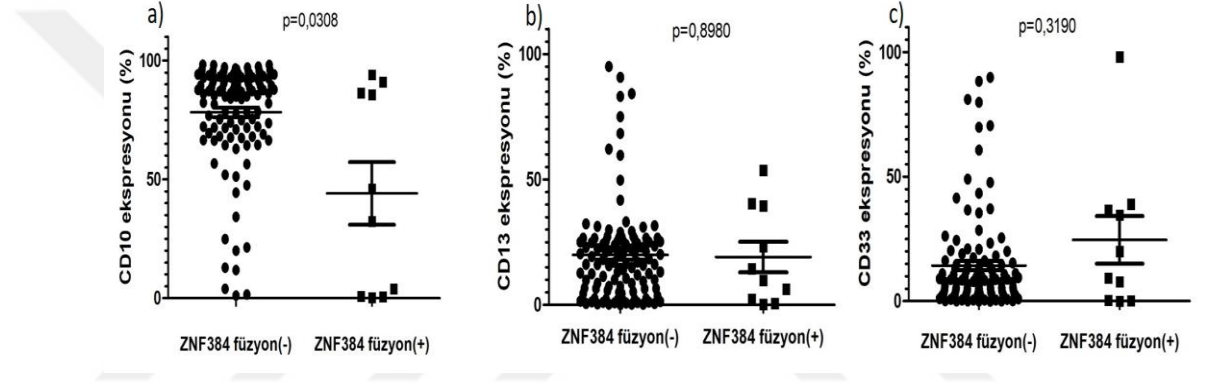
ZNF384 füzyonu bulunan (n=5), *ZNF384* füzyon bulunmayan (n=57) hastalarda genel sağ kalım ve olaysız sağ kalım analizleri (Şekil 34 c-d)'de verilmektedir. Genel sağkalım ve olaysız sağkalım açısından *ZNF384* füzyonu taşıyan hastalar ile *ZNF384* füzyonu taşımayan hastalar karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Genel sağkalım $p=0,0511$; olaysız sağkalım $p=0,075$). Bu analizlere ek olarak t(12;21) translokasyon taşıyan (n=9) hastalarda eklenerek genel sağ kalım ve olaysız sağ kalım analizleri yapılmıştır. *ZNF384* füzyonu taşıyan hastalar ile *ZNF384* füzyonu taşımayan hastalar ve t(12;21) translokasyonuna sahip *ZNF384* füzyonları negatif hastaların genel sağ kalım ($p=0,10$) ve olaysız sağ kalım ($p=0,13$) analizleri (Şekil 34 e-f)'de verilmektedir.



Şekil 34: a) BCP-ALL ve MPAL hastaların genel sağ kalım analizi. b) BCP-ALL ve MPAL hastaların olaysız sağ kalım analizi. c) *ZNF384* füzyon pozitif ve negatif hastaların genel sağ kalım analizi d): *ZNF384* füzyon pozitif ve negatif hastaların olaysız sağ kalım analizi e) *ZNF384* füzyon pozitif, negatif ve t(12;21) hastaların genel

sağ kalım analizi f): *ZNF384* füzyon pozitif, negatif ve t(12;21) hastaların olaysız sağ kalım analizi

ZNF384 füzyon pozitif ve negatif hastaların CD10, CD13 ve CD33 yüzey belirteçlerin pozitifliğine t test ile bakılmıştır. CD10 yüzey belirteci *ZNF384* füzyon pozitif ve negatif hastalarda anlamlı olarak bulunmuştur ($p=0.0308$) (Şekil 35 a). CD13 yüzey belirteci *ZNF384* füzyon pozitif ve negatif hastalarda anlamlı olarak bir fark bulunmamıştır ($p=0,8980$) (Şekil 35 b). CD33 yüzey belirteci *ZNF384* füzyon pozitif ve negatif hastalarda anlamlı olarak bir fark bulunmamıştır ($p=0.3190$) (Şekil 35 c).



Şekil 35: a) *ZNF384* füzyon pozitif ve negatif hastalarda CD10 yüzey belirteci ekspresyonu b) *ZNF384* füzyon pozitif ve negatif hastalarda CD13 yüzey belirteci ekspresyonu c) *ZNF384* füzyon pozitif ve negatif hastalarda CD33 yüzey belirteci ekspresyonu

5. TARTIŞMA

ALL gelişiminde rol oynayan tekrarlayan kromozomal yeniden düzenlenmeler ve/veya kimerik füzyon gen oluşumlarının tanımlanması hastaların tanı, risk sınıflandırması ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından önemlidir. ALL’de *ZNF384* füzyonu taşıyan hastalar ayrı bir alt grup olarak değerlendirilmekte ve orta risk sınıfına dahil edilmektedir. Moleküler risk sınıflandırmasında kullanımının yanı sıra, *ZNF384* ilişkili füzyonlar yeni tedavilerin geliştirilmesi için hedef biyobelirteçlerden olabilir (3,69). Bu tez çalışmasında amacımız, yeni tanı almış ve immünofenotip bulgularına göre BCP-ALL ve MPAL olarak gruplandırılmış olan hastalarda *ZNF384* geni ile ilgili yeniden düzenlemelerin sıklığının belirlenmesi ve hastaların klinik fenotipleri ile bu yeniden düzenlemelerin varlığı/yokluğu arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

İmmünofenotip özelliklerine göre ALL; B-ALL, T-ALL ve MPAL olmak üzere üç grupta değerlendirilmektedir. Çalışma kohortumuza B-ALL’nin özel bir grubu olarak BCP-ALL ve yüksek riskle ilişkilendirilmiş, sınırlı genetik karakterizasyonu ve uygun tedaviye ilişkin fikir birliği eksikliği olan MPAL hasta örnekleri dahil edilmiştir. BCP-ALL örnekleri Berlin, Frankfurt, Münster (BFM) protokolü kriterlerine göre seçilmiştir. BCP-ALL hastaları belirgin CD19, CD10, CD22 ve CD79a belirteçlerinden en az iki tanesinin pozitifliğiyle karakterizedir. Oldukça değişken sınıflandırma özelliği bulunan MPAL hastaları ise WHO ve EGIL kriterlerine göre seçilmiştir (33,80). WHO sınıflandırmasına göre MPAL tanısı için kullanılan immün belirteçlerin pozitifliği için eşik değer belirtilmemiş, belirteçlerin ifadesinin anlamlı olup olmadığı kararı laboratuvarlara bırakılmıştır. WHO sınıflandırması B ve T hücre soylu ALL’lerin sınıflandırılmasında başarılı olmakla birlikte, miyeloid ekspresyon gösteren hastaların sınıflandırılmasında başarısız olabilmektedir (35). Bu nedenle tez projemizde, MPAL hasta kohortu için hem WHO sınıflandırması hem de EGIL sınıflandırma kriterleri göz önünde tutulmuştur.

Çalışmamız kapsamında 91 BCP-ALL ve 36 MPAL (22 B/Miyeloid, 11 B/T, 3 T/Miyeloid) olmak üzere toplam 127 yeni tanı almış pediatrik hasta örneği *ZNF384* geninin en sık füzyon oluşturduğu genler (*TCF3*, *EP300*, *TAF15*) açısından taranmıştır. Pediatrik ALL grubumuzda *ZNF384* füzyon gen sıklığı %7,8 (10 hasta) olarak

belirlenmiştir. Literatürde ALL hasta grubunda yapılan önceki çalışmalarda *ZNF384* geni füzyonlarının sıklığı pediatrik hastalarda %1-6, yetişkinlerde ise %5-15 olarak bildirilmiştir (3,46,48). Çalışmamızda saptadığımız pediatrik ALL hastalarında *ZNF384* füzyonu sıklığı literatür ile uyumludur.

Pediatrik BCP-ALL hastalarımızın %7,7’de (7 hasta) *ZNF384* füzyonu varlığı gösterilmiştir. Hirabayashi ve ark. yaptığı çalışmada, 213 pediatrik BCP-ALL hastası RNA dizileme yaklaşımı ile *TCF3-ZNF384*, *TAF15-ZNF384*, *CREBBP-ZNF384*, *EP300-ZNF384* ve yeni *BMP2K-ZNF384* füzyon genleri açısından araştırılmış ve hastaların ~ % 11’inde *ZNF384* füzyonları tespit edilmiştir (6). Bu çalışmada görece hasta sayısının daha yüksek olması tüm transkriptom yaklaşımı kullanılması nedeni ile hastalardaki tüm *ZNF384* füzyonlarının saptanması olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte bu çalışmada incelenen füzyon genlerin sıklığına bakıldığında bulguların uyumlu olduğu görülmektedir.

MPAL hastalarında *ZNF384* yeniden düzenlemeleri hakkında yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Mullighan ve ark. yaptığı çalışma MPAL hasta grubunda *ZNF384* füzyonlarının yüksek sıklıkta görüldüğüne ilişkin ilk ve tek çalışmadır. 115 pediatrik MPAL (35 B/Miyeloid, 49 T/Miyeloid, 16 *KMT2Ar*, 2 *BCR-ABL1*) hasta kohortu kullanılarak yapılan bu çalışmada *ZNF384* geni füzyonları (*EP300*, *CREBBP*, *TAF15*, *TCF3*) araştırılmıştır. Tüm transkriptom analizi ile elde edilen bu çalışmanın bulgularına göre MPAL vakalarında *ZNF384* geni füzyonları yaklaşık olarak %13, B/Miyeloid MPAL hastalarında ise %48 olarak bildirilmiştir (2). Çalışmamızda 36 pediatrik MPAL (22 B/M, 3 T/M, 11 B/T) hastasının %8,3’ünde *ZNF384* füzyonları saptanmıştır. Mullighan ve ark.’nın çalışması ile uyumlu olarak B/M MPAL hasta grubumuzda %13,6 sıklığında *ZNF384* füzyonu bulunmuştur. Güncel literatür bilgisinde, çalışmamız MPAL hasta kohortunda *ZNF384* füzyonlarının araştırıldığı ikinci çalışmadır.

ZNF384 füzyonu taşıyan ve taşımayan hastaların immünofenotip özellikleri açısından karşılaştırıldığında, *ZNF384* füzyonu taşıyan hastalarımızda CD10 ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığını tespit ettik ($p=0.03$). Hirabayashi ve ark. yaptığı çalışmada, *ZNF384* füzyonları, artmış CD13 ve/veya CD33 ekspresyonu ve düşük CD10 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (6). CD10 ekspresyonu, hücrelerin apoptoz geçirme eğilimindeki azalmaya bağlı olarak kötü klinik sonuçlarla

ilişkilendirilmiştir (72). Çalışmamız kapsamında literatürle uyumlu olarak *ZNF384* füzyon pozitif hastalar için düşük CD10 ekspresyonu belirlenmiştir. Ancak CD13 ve CD33 ekspresyonları açısından hastalarımızda anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu bulgulara göre *ZNF384* füzyon proteini anormal işlev görmesi ile karakteristik bir immünofenotip özellik gösteriyor olabilir. Ancak bulguların daha geniş çalışma gruplarında doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

ALL kohortumuzda *TCF3-ZNF384* en sık görülen füzyondur. Diğer füzyonlar ise daha nadir olarak bulunmuştur. Bununla birlikte 4 hastamızın, aynı örnek için iki farklı *ZNF384* füzyonunu birlikte taşıdığı görülmüştür. Bu durum hastaların hücresel düzeyde heterojen özellik gösterdiğini, aynı genin farklı füzyonlarının olduğu farklı kanser klonlarının varlığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, *TCF3*(ekzon15)-*ZNF384*(ekzon7) füzyonuna sahip 3,5 yaşında, erkek BCP-ALL hastasında *TCF3*-ekzon 15 bölgesinde literatürde olmayan yeni bir kırık noktası bulunmuştur. Bu yeni kırık noktası ile bilinen varyantların aksine transkripsiyonel aktivasyon domain 2 korunmaktadır. Bu kırık bölgesi hasta için farklı klinik sonuçlar çıkmasına yol açabilir. Farklı genler ile meydana gelen füzyonlar ve farklı kırık noktaları bir transkripsiyon faktörü olan *ZNF384* geninin hedef gen repertuarının da etkilenmesine veya değişmesine yol açabilir. Diğer pozitif hastalardan farklı olarak bu hastada aynı zamanda t(12;21) translokasyonu da bulunmaktadır. t(12;21) translokasyonu BCP-ALL'de iyi prognozla ilişkilendirilmiştir. Ancak, *ZNF384* proteininin anormal işlevinin ALL gelişimine olan katkısı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu doğrultuda hem bilinen *ZNF384* füzyon protein varyantları hem de yeni varyantların hücre içerisindeki rolü konusunda fonksiyonel çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Hastanın son durumu ya da nüks durumuna ait bilgilere ulaşılamamıştır.

Yaşam analizlerinde, *ZNF384* füzyonu taşıyan ve *ZNF384* füzyonu taşımayan hastalar karşılaştırılmıştır. Genel sağ kalım ve olaysız sağ kalım analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın *ZNF384* füzyonları pozitif hastaların yaşam süreleri, negatif hastalara göre görece kısalmıştır. *ZNF384* ve t(12;21) translokasyonu taşıyan hastalarla yapılan yaşam analizlerinde de genel sağ kalım ve olaysız sağ kalım karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte *ZNF384* füzyonlarında t(12;21) taşıyan hastalara göre daha düşük sağ kalım eğrisi görülmüştür. Hastaların klinik verilerindeki eksiklikler nedeni ile analizlere daha

az sayıda hasta dahil edilebilmesi bu farklılığın nedenlerinden birisi olarak düşünülebilir. Bununla birlikte yapılan az sayıdaki çalışma da henüz *ZNF384* füzyonlarının prognostik etkilerinin net olarak ortaya koyulması için yeterli değildir ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Yapılan bir çalışmada *ZNF384* gen füzyonu taşıyan BCP-ALL fenotipe sahip hastaların tedaviye yanıtları iyi olarak değerlendirilmiş ve *ZNF384* gen düzenlemeleri iyi prognozla ilişkilendirilmiştir (70). Başka bir çalışmada tedaviye olumlu yanıt veren ve *EP300-ZNF384* füzyonu bulunan 6 hasta ara(orta) risk grubuna dahil edilmiştir (46, 71) ve gen seti zenginleştirme analizlerinde JAK-STAT yolağının belirgin bir şekilde aktive olduğu göstermiştir. Bu bulgulara göre bu hasta grubunda JAK-STAT yolağının inhibitörleri ile desteklenen olası tedavi protokollerinin kullanılması öngörülebilir (46).

TCF3-ZNF384 füzyonu bulunan hastaların, *EP300-ZNF384* füzyonu bulunan ve yabani tip *ZNF384* ile karşılaştırmalı sağ kalım analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte *TCF3-ZNF384* füzyonu bulunan hastalarda sağ kalım sürelerinin daha kısa olduğu gözlenmiştir (6). *TAF15-ZNF384* füzyonu şimdiye kadar 25 lösemili hastada tanımlanmış nadir bir yeniden düzenlemedir. Bazı raporlar *TAF15-ZNF384* füzyonu bulunan indüksiyon tedavisine iyi yanıt veren hastalar için genel olarak iyi bir prognozu desteklese de (73-74), bazı çalışmalar kötü bir klinik sonucu desteklemektedir (75-76). Bu bulgular *ZNF384* yeniden düzenlemelerinin prognostik açıdan füzyon oluşturduğu proteine göre farklılık gösterdiğini düşündürmektedir.

MPAL'li pediatrik olgular için sağ kalım oranları % 47-75 ve yetişkinler için % 20-40 olarak bildirilmektedir. MPAL'li hastalar yüksek risk grubu içerisinde yer almaktadır ve çalışmalarda optimal tedavi rejimi ile ilgili bir fikir birliği yoktur. Çalışma grubumuzda BCP-ALL ve MPAL hasta grupları arasında genel sağ kalım ve olaysız sağ kalım açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu analize göre iki hasta grubu homojen olarak dağılım göstermektedir. Yapılan bir çalışmada *ZNF384* yeniden düzenlemesi olan B/Miyeloid MPAL ve B-ALL hastaları arasındaki genomik değişikliklerde benzerlik bulunması, B/Miyeloid MPAL'si olan hastalarda ALL'ye yönelik tedavinin kullanımını desteklemektedir. Bugüne kadarki bulgular *ZNF384* düzenlemelerinin gelecekteki çalışmalarda göz önünde bulundurulması için farklı bir MPAL alt türü olarak tanımlamasını önermektedir (2). Bu sayede hastalar risk bazlı değerlendirilip ona göre tedavileri mümkün olabilecektir. Çalışmamızda MPAL hasta

kohortunda *ZNF384* füzyonların sıklıkları ve hastaların klinik açıdan değerlendirilmesi ile bu önermeye katkı sağlanılmıştır.

ZNF384 anlatımı B-hücre farklılaşması sırasında, hematopoezde görev alan alan diğer bilinen transkripsiyon faktörleriyle karşılaştırıldığında sabit kalmaktadır. Qian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *EP300-ZNF384*'ün zorunlu ekspresyonu in vivo olarak fare pro-B hücre farklılaşmasını inhibe ettiği görülmüştür. Aynı zamanda daha öncül hematopoietik kök ve progenitör hücrelerde, bu füzyon proteini miyeloid ve granülosit soyları arasındaki farklılaşmayı da bloke etmektedir. Ancak *ZNF384* yeniden düzenlenmiş ALL, sıklıkla miyeloid soyunun hücre yüzeyi belirteçlerini de (CD13 ve CD33) ifade etmektedir (68). Bu bulgulara göre *ZNF384* geni ile füzyon oluşturan partner genler birden fazla aşamada normal hematopoez ile etkileşime girebilecek yeni fonksiyonlar sağlamaktadır.

ZNF384 ve füzyon ortaklarının büyük çoğunluğu, konvansiyonel G-boyama ile *ZNF384* füzyonlarının tanımlanmasını zorlaştıran ilgili kromozomlarının telomerlerine yakın bir yerde bulunmaktadır (6). Kalitatif ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri, yüksek verimlilik ve özgüllük, kromozomal translokasyonlardan kaynaklanan spesifik füzyon transkriptlerinin belirlenmesinin yanı sıra gen amplifikasyonlarının analizine izin vermektedir (79). Çalışmamızda füzyon genleri tespit etmek için PZR ve dizileme gibi daha hassas ve verimli yöntemler kullanılmıştır. *ZNF384* füzyonlarının prognostik açıdan değerlendirilmesi risk sınıflandırması ve hastaya özgü tedavi açısından oldukça önemlidir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla;

- 1- Pediatrik ALL olgularında en sık gözlenen *ZNF384* füzyon genleri sıklıkları %7.8 olarak bulunmuştur. MPA(%8.3) ve BCP-ALL(%7.7) fenotiplerine özgü sıklıklar da belirlenmiştir.
- 2- İyi/orta prognozla ilişkilendirilen *ZNF384* füzyonlarının sağ kalım analizinde *ZNF384* füzyonu taşımayan ve t(12:21) taşıyan olgulara göre daha düşük bir sağ kalım eğrisi gösterdiği saptanmıştır.
- 3- *ZNF384* geninin en sık *TCF3* geniyle füzyon oluşturduğu belirlenmiştir ve bu füzyon için yeni bir kırık bölgesi tanımlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Ping N, Qiu H, Wang Q, Dai H, Ruan C, Ehrentraut S, ve ark. Establishment and genetic characterization of a novel mixed-phenotype acute leukemia cell line with EP300-ZNF384 fusion. *J Hematol Oncol* 2015; **8**: 100.
2. Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I, Dickerson K, Choi JK, Xu B, ve ark. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature* 2018; **562**(7727): 373-379.
3. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2017; **35**(9): 975-983.
4. Mohammadi SM, Nejad DM, Charoudeh HN. Genetic alterations in B-acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haematologica Polonica* 2017; **48**(1): 10-17.
5. Yaguchi A, Ishibashi T, Terada K, Ueno-Yokohata H, Saito Y, Fujimura J, ve ark. EP300-ZNF384 fusion gene product up-regulates GATA3 gene expression and induces hematopoietic stem cell gene expression signature in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Int J Hematol* 2017; **106**(2): 269-281.
6. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, ve ark. ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica* 2017; **102**(1): 118-129.
7. McClure BJ, Heatley SL, Kok CH, Sadras T, An J, Hughes TP, ve ark. Pre-B acute lymphoblastic leukaemia recurrent fusion, EP300-ZNF384, is associated with a distinct gene expression. *Br J Cancer* 2018; **118**(7): 1000-1004.
8. Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 2003; **10**(1): 9-16.
9. Zheng S, Papalexi E, Butler A, Stephenson W, Satija R. Molecular transitions in early progenitors during human cord blood hematopoiesis. *Mol Syst Biol* 2018; **14**(3): e8041.
10. Sun T. *Flow cytometry, immunohistochemistry, and molecular genetics for hematologic neoplasms*. Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
11. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**(4): 959-971.
12. Monroe JG, Bannish G, Fuentes-Panana EM, King LB, Sandel PC, Chung J, ve ark. Positive and negative selection during B lymphocyte development. *Immunologic research* 2003; **27**(2-3): 427-442.
13. Bemark M. Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res* 2015; **29**(4): 264-284.
14. Schroeder Jr HW, Radbruch A, Berek C. B-cell development and differentiation. *Clinical Immunology*: Elsevier; 2019:107-118. e101.
15. Vale AM, Schroeder HW, Jr. Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**(4): 778-787.

16. Naeim F. *Atlas of Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches*. Elsevier Science; 2012.
17. Yakimchuk K. *Development and specific markers of T and B lymphocytes*. Vol 62016.
18. Fast LD. B and T Cell Development. İçinde: Quesenberry PJ, Castillo JJ, editorler. *Non-Hodgkin Lymphoma: Prognostic Factors and Targets*. New York, NY: Springer New York; 2013:11-22.
19. Engel P, Gomez-Puerta JA, Ramos-Casals M, Lozano F, Bosch X. Therapeutic targeting of B cells for rheumatic autoimmune diseases. *Pharmacol Rev* 2011; **63**(1): 127-156.
20. Themeli M, Riviere I, Sadelain M. New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy. *Cell Stem Cell* 2015; **16**(4): 357-366.
21. Shah DK, Zúñiga-Pflücker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *The Journal of Immunology* 2014; **192**(9): 4017-4023.
22. Ciesla B. *Hematology in Practice*. F.A. Davis Company; 2007.
23. Zhao Y, Wang Y, Ma S. Racial Differences in Four Leukemia Subtypes: Comprehensive Descriptive Epidemiology. *Sci Rep* 2018; **8**(1): 548.
24. Wang L, Bhatia S, Gomez SL, Yasui Y. Differential inequality trends over time in survival among U.S. children with acute lymphoblastic leukemia by race/ethnicity, age at diagnosis, and sex. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015; **24**(11): 1781-1788.
25. Mohammadian M, Pakzad R, Mohammadian-Hafshejani A, Salehiniya H. A STUDY ON THE INCIDENCE AND MORTALITY OF LEUKEMIA AND THEIR ASSOCIATION WITH THE HUMAN DEVELOPMENT INDEX (HDI) WORLDWIDE IN 2012. *Leukemia (CML)* 2018; **5**: 9.
26. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, ve ark. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; **127**(20): 2391-2405.
27. Bain BJ. Diagnosis and classification of acute leukaemia. *Postgraduate Haematology* 2005: 476-491.
28. Abdul-Hamid G. Classification of Acute Leukemia. *Acute Leukemia-The Scientist's Perspective and Challenge*: IntechOpen; 2011.
29. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, ve ark. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; **33**(4): 451-458.
30. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, ve ark. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; **9**(10): 1783-1786.
31. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, ve ark. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the

- hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; **17**(12): 3835-3849.
32. Muniraj F. Classification of acute leukemias—past, present and future. *IJSS Case Reports & Reviews* 2015; **1**(12): 61-66.
 33. Pomerantz A, Rodriguez-Rodriguez S, Demichelis-Gomez R, Barrera-Lumbreras G, Barrales-Benitez O, Lopez-Karpovitch X, ve ark. Mixed-phenotype acute leukemia: suboptimal treatment when the 2008/2016 WHO classification is used. *Blood Res* 2016; **51**(4): 233-241.
 34. Hoelzer D, Gökbuget N. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Postgraduate Haematology* 2005: 525-541.
 35. Liang DC, Pui CH. Childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Postgraduate Haematology* 2005: 542-560.
 36. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; **6**(1): e2014073.
 37. Charles NJ, Boyer DF. Mixed-Phenotype Acute Leukemia: Diagnostic Criteria and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med* 2017; **141**(11): 1462-1468.
 38. Mrozek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; **23**(5): 991-1010, v.
 39. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; **12**(6): 344-357.
 40. Roganovic J. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia*: IntechOpen; 2013.
 41. Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; **50**(3): 223-261.
 42. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 2015; **62**(1): 47-60.
 43. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017; **7**(6): e577.
 44. van den Berg H, van der Lelie J. Acute lymphoblastic leukaemia in puberty and adolescence. *Ann Oncol* 2000; **11**(11): 1375-1379.
 45. Mrozek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; **23**(5): 991-1010, v.
 46. Liu YF, Wang BY, Zhang WN, Huang JY, Li BS, Zhang M, ve ark. Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *EBioMedicine* 2016; **8**: 173-183.
 47. Zhang X, Rastogi P, Shah B, Zhang L. B lymphoblastic leukemia/lymphoma: new insights into genetics, molecular aberrations, subclassification and targeted therapy. *Oncotarget* 2017; **8**(39): 66728-66741.
 48. Lilljebjorn H, Fioretos T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017; **130**(12): 1395-1401.
 49. Ma SK, Wan TSK, Chan LC. Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. *Hematological Oncology* 1999; **17**(3): 91-105.

50. Weinberg OK, Arber DA. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia* 2010; **24**(11): 1844-1851.
51. Wolach O, Stone RM. How I treat mixed-phenotype acute leukemia. *Blood* 2015; **125**(16): 2477-2485.
52. Takahashi K, Wang F, Morita K, Yan Y, Hu P, Zhao P, ve ark. Integrative genomic analysis of adult mixed phenotype acute leukemia delineates lineage associated molecular subtypes. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 2670.
53. Munker R, Labopin M, Esteve J, Schmid C, Mohty M, Nagler A. Mixed phenotype acute leukemia: outcomes with allogeneic stem cell transplantation. A retrospective study from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica* 2017; **102**(12): 2134-2140.
54. Childress P, Robling AG, Bidwell JP. Nmp4/CIZ: road block at the intersection of PTH and load. *Bone* 2010; **46**(2): 259-266.
55. Gorello P, La SR, Mecucci C. ZNF384 (zinc finger protein 384). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2008.
56. Janssen H, Marynen P. Interaction partners for human ZNF384/CIZ/NMP4--zyxin as a mediator for p130CAS signaling? *Exp Cell Res* 2006; **312**(7): 1194-1204.
57. Oberley MJ, Gaynon PS, Bhojwani D, Pulsipher MA, Gardner RA, Hiemenz MC, ve ark. Myeloid lineage switch following chimeric antigen receptor T-cell therapy in a patient with TCF3-ZNF384 fusion-positive B-lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2018; **65**(9): e27265.
58. Yamamoto K, Kawamoto S, Mizutani Y, Yakushijin K, Yamashita T, Nakamachi Y, ve ark. Mixed Phenotype Acute Leukemia with t(12;17)(p13;q21)/TAF15-ZNF384 and Other Chromosome Abnormalities. *Cytogenet Genome Res* 2016; **149**(3): 165-170.
59. Nyquist KB, Thorsen J, Zeller B, Haaland A, Troen G, Heim S, ve ark. Identification of the TAF15-ZNF384 fusion gene in two new cases of acute lymphoblastic leukemia with a t(12;17)(p13;q12). *Cancer Genet* 2011; **204**(3): 147-152.
60. Plougastel B, Zucman J, Peter M, Thomas G, Delattre O. Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumor-associated chromosome translocation. *Genomics* 1993; **18**(3): 609-615.
61. Grammatico S, Vitale A, La Starza R, Gorello P, Angelosanto N, Negulici AD, ve ark. Lineage switch from pro-B acute lymphoid leukemia to acute myeloid leukemia in a case with t(12;17)(p13;q11)/TAF15-ZNF384 rearrangement. *Leuk Lymphoma* 2013; **54**(8): 1802-1805.
62. Barber KE, Harrison CJ, Broadfield ZJ, Stewart AR, Wright SL, Martineau M, ve ark. Molecular cytogenetic characterization of TCF3 (E2A)/19p13.3 rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; **46**(5): 478-486.
63. Huret J-L. TCF3 (transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2012.
64. Patel D, Chinaranagari S, Chaudhary J. Basic helix loop helix (bHLH) transcription factor 3 (TCF3, E2A) is regulated by androgens in prostate cancer cells. *Am J Cancer Res* 2015; **5**(11): 3407-3421.
65. Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. Wiley Online Library; 2009.
66. Negri G, Gervasini C. EP300 (E1A binding protein p300). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2015.

67. Blobel GA. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood* 2000; **95**(3): 745-755.
68. Qian M, Zhang H, Kham SK, Liu S, Jiang C, Zhao X, ve ark. Whole-transcriptome sequencing identifies a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia with predominant genomic abnormalities of EP300 and CREBBP. *Genome Res* 2017; **27**(2): 185-195.
69. Stary J, Zuna J, Zaliouva M. New biological and genetic classification and therapeutically relevant categories in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *F1000Res* 2018; **7**.
70. La Starza R, Aventin A, Crescenzi B, Gorello P, Specchia G, Cuneo A, ve ark. CIZ gene rearrangements in acute leukemia: report of a diagnostic FISH assay and clinical features of nine patients. *Leukemia* 2005; **19**(9): 1696-1699.
71. Gocho Y, Kiyokawa N, Ichikawa H, Nakabayashi K, Osumi T, Ishibashi T, ve ark. A novel recurrent EP300-ZNF384 gene fusion in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2015; **29**(12): 2445-2448.
72. Georgakopoulos N, Diamantopoulos P, Micci F, Giannakopoulou N, Zervakis K, Dimitrakopoulou A, ve ark. An Adult Patient with Early Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia with t(12;17)(p13;q21)/ZNF384-TAF15. *In Vivo* 2018; **32**(5): 1241-1245.
73. Krance RA, Raimondi SC, Dubowy R, Estrada J, Borowitz M, Behm F, ve ark. t(12;17)(p13;q21) in early pre-B acute lymphoid leukemia. *Leukemia* 1992; **6**(4): 251-255.
74. Kim JE, Woo KS, Kim KE, Kim SH, Park JI, Shaffer LG, ve ark. A rare case of acute lymphoblastic leukemia with t(12;17)(p13;q21). *Korean J Lab Med* 2010; **30**(3): 239-243.
75. Liu HW, Wan SK, Ching LM, Liang R, Chan LC. Translocation (12;17)(p11-12;q11-12): a recurrent primary rearrangement in acute leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **64**(1): 27-29.
76. Asahara SI, Saigo K, Hasuike N, Tamura M, Maeda Y, Tomofuji Y, ve ark. Acute lymphoblastic leukemia accompanied by chromosomal abnormality of translocation (12;17). *Haematologia (Budap)* 2001; **31**(3): 209-213.
77. Manola KN. Cytogenetic abnormalities in acute leukaemia of ambiguous lineage: an overview. *British journal of haematology* 2013; **163**(1): 24-39.
78. Zhong CH, Prima V, Liang X, Frye C, McGavran L, Meltesen L, ve ark. E2A-ZNF384 and NOL1-E2A fusion created by a cryptic t(12;19)(p13.3; p13.3) in acute leukemia. *Leukemia* 2008; **22**(4): 723-729.
79. Cerrone M, Cantile M, Collina F, Marra L, Liguori G, Franco R, ve ark. Molecular strategies for detecting chromosomal translocations in soft tissue tumors (review). *Int J Mol Med* 2014; **33**(6): 1379-1391.
80. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, Ratei R, Hrusak O, Luria D, ve ark. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; **94**(1): 82-93.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 757
Konu: Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU hk.

Tarih : 28.05.2018

Sayın Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU
Genetik Anabilim Dalı

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 17/04/2018 gün ve 144704 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Tuğçe SUDUTAN' ın yürüteceği 2018/705 dosya numaralı "Akut Lösemi Hastalarında ZINC FINGER PROTEIN 384 (ZNF384) Geni Füzyonlarının Tespiti" başlıklı çalışma kurulumuzun 25/05/2018 tarih ve 10 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yagiz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Akut Lösemi Hastalarında ZINC FINGER PROTEIN 384 (ZNF384) Geni Füzyonlarının Tespiti”
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	16.04.2018	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☐	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BELGELERİ	Karar No:10	Tarih: 25/05/2018		
	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU ' nun sorumluluğunda ve Tuğçe SUDUTAN' ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU								
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **	İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Akut Lösemi Hastalarında ZINC FINGER PROTEIN 384 (ZNF384) Geni Füzyonlarının Tespiti”			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLAR ARASI ☐

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKUT LÖSEMİ HASTALARINDA "ZINC FINGER PROTEIN 384"
(ZNF384) GENİ FÜZYONLARININ TESPİTİ

ORJİNALLIK RAPORU

%5

BENZERLİK ENDEKSİ

%2

İNTERNET
KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%3

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%2

2

thd.org.tr

İnternet Kaynağı

<%1

3

ascopubs.org

İnternet Kaynağı

<%1

4

www.nature.com

İnternet Kaynağı

<%1

5

www.tibbigenetik2018.org

İnternet Kaynağı

<%1

6

YILDIRIM TÜREDİ, Ayşen and GÜLEN,
Hüseyin. "CD79a, CD56 ve CD5 ko-
ekspresyonu gösteren ve bifenotipik lösemi ile
karışan AML M1 li çocuk olgu", Dicle
Üniversitesi, 2015.

Yayın

<%1

7

www.losemibelirtileri.net

İnternet Kaynağı

<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğçe	Soyadı	Sudutan
Doğ.Yeri	Konya	Doğ.Tar.	
Email	tugcesudutan@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İÜ, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik A.D.	2019
Lisans	İFÜ,Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik	2015

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Yökdil) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		78,750

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72,771		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):