

FULYA KÜÇÜKCANKURT

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL2022

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**

(DOKTORA TEZİ)

**BİFENOTİPİK AKUT LÖSEMİ HASTALARININ GENETİK
KARAKTERİZASYONU**

FULYA KÜÇÜKCANKURT

**DANIŞMAN
PROF. DR. MÜGE SAYITOĞLU**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora sürecim boyunca bana yol gösteren, kendimi geliştirmem için teşvik eden, desteğini ve sabrını esirgemeyen, üzerimde emeği çok büyük olan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Müge Sayitoğlu'na,

DETAE'nin kapısından girdiğim ilk günden beri tecrübelerini paylaşan, her sorumu sabırla cevaplayan ve zaman ayırıp desteğini esirgemeyen sevgili Dr. Yücel Erbilgin'e,

Moleküler Hematoloji çalışma grubu arkadaşlarım MSc. Tuğçe Sudutan, MSc. Khusan Khodzhaev, MSc. Didem Altındirek, MSc. Eda Sun, MSc. Hilal Hekimoğlu, Bio. Merve Ordu ve Bio. Merve Sarıtaş'a,

Dostluğu ve neşesi ile günümü güzelleştiren MSc. Hazal Banu Çelebioğlu'na,

Her koşulda yanımda olan, hayat bizi iyiki karşılaştırmış dediğim Dr. Zeynep Güngördü Dalar'a, dostluklarını esirgemeyen Dr. Nazlı Ezer Özer ve Dr. Zeynep Taner'e,

Bana inanan, her başarımla gururlanan, destekleriyle beni güçlendiren, kendimi şanslı hissettiren canım aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36661

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Hematopoez	5
2.2. T Hücre Gelişimi.....	8
2.3. B Hücre Gelişimi	10
2.4. Miyeloid Hücre Gelişimi	12
2.5. Lenfoid-Miyeloid Hücre Değişimi	14
2.6. Bifenotipik Akut Lösemiler	16
2.6.1. Bifenotipik Akut Lösemilerde Genetik Değişimler	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. GEREÇ	23
3.1.1. Bifenotipik Akut Lösemi Hastalarının Belirlenmesi:	23
3.1.2. Bifenotipik Akut Lösemilerin Genetik Karakterizasyon Algoritması	23
3.1.3. Bifenotipik Akut Lösemi Hastalarının Klinik Özellikleri:	24
3.1.4. Kullanılan Kimyasallar	25
3.1.5. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	26
3.1.6. Kullanılan Kitler	27
3.1.7. Kantitatif PZR Materyali	27
3.1.8. cDNA Sentez Materyali	28
3.1.9. Kullanılan Cihazlar	28

3.1.10. Kullanılan Elektronik Veritabanları ve Analiz Programları	29
3.2. YÖNTEM	30
3.2.1. Lökosit İzolasyonu.....	30
3.2.2. DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	30
3.2.3. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu.....	30
3.2.4. cDNA Sentezi	30
3.2.4.1. Bifenotipik akut lösemi hastalarında prognostik öneme sahip olan translokasyonların belirlenmesi	31
3.2.4.2. Bifenotipik akut lösemi hastalarındaki prognostik öneme sahip yeniden düzenlenmelerin belirlenmesi	31
3.2.4.3. Bifenotipik akut lösemi hastalarındaki prognostik öneme sahip mutasyon ve delesyonların belirlenmesi	32
3.2.4.4. Bifenotipik akut lösemi hastalarındaki gen anlatımlarının belirlenmesi.....	36
4. BULGULAR.....	39
4.1. Bifenotipik akut lösemi hastalarında prognostik öneme sahip translokasyonların sıklığı.....	39
4.2. Bifenotipik akut lösemi hastalarında prognostik öneme sahip yeniden düzenlenmeler	39
4.3. Bifenotipik akut lösemi hastalarındaki prognostik öneme sahip mutasyon ve delesyonlar	41
4.4. Bifenotipik akut lösemi hastalarının prognostik öneme sahip gen anlatımları.....	47
4.4.1. <i>CRLF2</i> Gen anlatımı	47
4.4.2. Lenfoid-Miyeloid Dönüşüm İle İlişkili Gen Anlatımları.....	47
4.4.3. Gen Anlatım Verilerinin Klinik Değişkenler ile İncelenmesi	51
5. TARTIŞMA	60
5.1. Sonuç.....	68
KAYNAKLAR	71
HAM VERİLER	83
FORMLAR	84
ETİK KURUL KARARI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
PATENT HAKKI İZNİ	85
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	86
ÖZGEÇMİŞ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1:MPAL hastalarının belirlenmesinde kullanılan EGIL kriterleri	18
Tablo 2-2: MPAL hastalarının belirlenmesinde kullanılan WHO kriterleri.....	18
Tablo 3-1:Bifenotipik Akut Lösemi Hastalarının Klinik Özellikleri.....	24
Tablo 3-2: Kullanılan kimyasallar	25
Tablo 3-3: Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	26
Tablo 3-4: Kullanılan Kitler	27
Tablo 3-5: Kullanılan kantitatif PZR Materyalleri	27
Tablo 3-6: Kullanılan cDNA sentez materyalleri	28
Tablo 3-7: Kullanılan cihazlar	28
Tablo 4-1: <i>DUX4</i> yeniden düzenlenmesi olan MPAL hastaları	40
Tablo 4-2: <i>IKZF1</i> delesyonu bulunan hastalar	44
Tablo 4-3: MPAL hastalarında bulunan varyasyonların ve klinik değişkenlerin gösterimi	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: T hücre gelişiminin diferansiyel gen ekspresyon profili.....	9
Şekil 2-2: B hücre gelişimde transkripsiyonel regülasyon	11
Şekil 2-3: Miyeloid hücre gelişimde rol oynayan ana transkripsiyon faktörleri	13
Şekil 3-1: Bifenotipik akut lösemi hastalarının genetik karakterizasyon algoritması	24
Şekil 3-2: Kullanılan elektronik veritabanları	29
Şekil 3-3: <i>ERG</i> delesyonlarının belirlenmesi için primer tasarımı	31
Şekil 3-4: <i>DUX4</i> yeniden düzenlenmelerinin tanımlanması için kullanılan PZR protokolü.....	32
Şekil 3-5: <i>DUX4</i> yeniden düzenlenmelerinin tanımlanması için kullanılan PZR termal döngü sıcaklıkları.....	32
Şekil 3-6: <i>FLT3</i> -ITD mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü	33
Şekil 3-7: <i>FLT3</i> -D835 mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü	33
Şekil 3-8: <i>FLT3</i> -ITD ve <i>FLT3</i> -D835 mutasyonlarının belirlenmesi için PZR termal döngü sıcaklıkları.....	34
Şekil 3-9: <i>NPM1</i> geninin 12. ekzonundaki mutasyonların belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü.....	34
Şekil 3-10: <i>NPM1</i> geninin 12. ekzonundaki mutasyonların belirlenmesi için kullanılan PZR termal döngü sıcaklıkları	34
Şekil 3-11: <i>IKZF1</i> delesyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü.....	35
Şekil 3-12: <i>IKZF1</i> delesyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR termal döngü sıcaklıkları.....	35
Şekil 3-13: <i>PAX5</i> -P80R mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü..	36
Şekil 3-14: <i>PAX5</i> -P80R mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR termal döngü sıcaklıkları.....	36
Şekil 3-15: Gen anlatımlarının belirlenmesi için kullanılan SYBR Green PZR protokolü	36
Şekil 3-16: Gen anlatımlarının belirlenmesi için kullanılan SYBR Green PZR termal döngü sıcaklıkları.....	37
Şekil 4-1: MPAL hastalarında saptanan prognostik translokasyonlar.....	39

Şekil 4-2: MPAL hastalarında <i>DUX4</i> yeniden düzenlenmesinin belirlenmesinde kullanılan PZR jel görüntüsü	40
Şekil 4-3: A) <i>FLT3</i> -ITD mutasyon taraması örnek PZR jel görüntüsü B) <i>FLT3</i> -D385 mutasyon taraması için enzim kesimi jel görüntüsü	42
Şekil 4-4:MPAL hastalarında <i>IKZF1</i> delesyonları	43
Şekil 4-5: MPAL hastalarının alt gruplarına göre <i>CRLF2</i> gen anlatımları.....	47
Şekil 4-6: MPAL hastalarının temel bileşenler analizi (PCA)	48
Şekil 4-7: MPAL hastalarının gen anlatım ısı haritası.....	49
Şekil 4-8: MPAL alt gruplarında <i>PAX5</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>GATA1</i> ve <i>SPI1</i> gen anlatımı	50
Şekil 4-9: MPAL hastalarının yaşa bağlı gen anlatımı karşılaştırmaları	52
Şekil 4-10: MPAL hastalarının cinsiyete göre gen anlatım karşılaştırmaları	53
Şekil 4-11: MPAL hastalarının WBC sayısına göre gen anlatım karşılaştırmaları	55
Şekil 4-12: MPAL hastalarında bulunan varyantların gen anlatımına etkisi.....	56
Şekil 4-13: <i>IKZF1</i> delesyonu olan hastaların genel sağkalım ve relapssız sağkalım grafikleri.....	57
Şekil 4-14: <i>DUX4</i> -yeniden düzenlenmesini taşıyan hastaların genel sağkalım ve relapssız sağkalım grafikleri	58
Şekil 4-15: MPAL alt gruplarının genel sağkalım ve relapssız sağkalım grafikleri.....	59

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
T-ALL	T hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
B-ALL	B hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
MPAL	Bifenotipik Akut Lösemi
DUX4	Çift Homeobox 4
IKZF1	IKAROS Ailesi Çinko Parmak 1
PAX5	Eşleştirilmiş kutu proteini 5
SPI1	Spi-1 proto-onkogen 1
NOTCH1	Notch reseptörü 1
GATA1	GATA-binding factor 1
HSC	Hematopoetik Kök Hücre
NK	Doğal Öldürücü
DC	Dentritik Hücre
CLP	Ortak Lenfoid Progenitör
CMP	Ortak Miyeloid Progenitör
CD	Farklılaşma kümesi
G-CSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
M-CSF	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
M-CSFR	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör Reseptörü
ETP	Erken T hücre Prekürsör
DN	Çift Negatif

DP	Çift Pozitif
MPO	Miyeloperoksidaz
EGIL	The European Group for the Immunological Classification of Leukemias
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ETV6	ETS Varyant Transkripsiyon Faktörü 6
RUNX1	RUNX ailesi Transkripsiyon Faktörü 1
KMT2A	Lizin metiltransferaz 2A
TCF3	Transkripsiyon faktör 3
PBX1	PBX Homeobox 1
BCR	RhoGEF ve GTPase'nin BCR aktivatörü
ABL1	ABL proto-onkogen 1
ZNF384	Çinko parmak protein 384
Ph	Philadephia
MEF2D	Miyosit enhansır faktör 2D
NUTM1	NUT midline carcinoma family member 1
HLF	Karaciğer lösemi faktörü
EP300	adenovirüs E1A ile ilişkili hücresel p300 transkripsiyonel koaktivatör
CREBBP	CREB Bağlayıcı Protein
TAF15	TATA-Box Bağlayıcı Protein İlişkili Faktör 15
SYNRG	Sinerjin Gama
EWSR1	Ewing Sarkoma RNA Bağlayıcı Protein 1
ARID1B	AT-zengin etkileşim domaini 1B
JAK	Janus Kinaz
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
EBF1	Erken B hücre faktörü 1

CDKN2A	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CDKN2B	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2B
RB1	Retinoblastom1
ERG	Eritroblast transformasyonuna spesifik transkripsiyon faktörü
JAK2	Janus Kinaz 2
RAS	Rat sarkoma virüs
FLT3	FMS ile İlgili Reseptör Tirozin Kinaz 3
TLX1	T hücre lösemi homeobox 1
LYL1	LYL1 temel sarmal-döngü-sarmal aile üyesi
TAL1	T-Hücre Akut Lenfositik Lösemi Proteini 1
PML	Promyelositik lösemi proteini
RARA	Retinoik Asit Reseptörü Alfa
RUNX1T1	RUNX1 Partner Transkripsiyonel ko-Represör 1
CBF	Çekirdek Bağlayıcı Faktör Alt Birimi Beta
MYH11	Miyozin Ağır Zincir 11
İnv	İnversiyon
NPM1	Nükleofosmin 1
CRLF2	Sitokin Reseptör benzeri Faktör 2
DEK	DEK Proto-Onkogen
NUP214	Nükleoporin 214
RPN1	Ribophorin 1
MECOM	MDS1 ve EVI1 Kompleks Lokus
NUP98	Nükleoporin 98
KDM5A	Lizin Demetilaz 5A
NSD1	Nükleer Reseptör Bağlayan SET Domain Proteini 1

ITD	İnternal Tandem Duplikasyon
KAT6A	Lizin Asetiltransferaz 6A
CBFA2T3	CBFA2/RUNX1 Partner Transkripsiyonel Ko-Represör 3
IL-7	İnterlökin 7
MYB	MYB Proto-Onkogen
GATA3	GATA Bağlayıcı Protein 3
TCF12	Transkripsiyon faktör 12
GLI-2	GLI ailesi çinko parmak 2
BCL11B	BAF kromatin yeniden modelleme kompleksi alt birimi BCL11B
TCR	T Hücre reseptörü
TCF1	HNF1 homeobox A
c-kit	c-KIT Proto-Onkogen, Reseptör Tirozin Kinaz
Ptcra	Pre-T Hücresi Antijen Reseptörü Alfa
Dtx1	Deltex E3 Ubiquitin Ligase 1
Notch3	Notch reseptör 3
c-MYC	c-MYC Proto-Onkogen
TCR	T Hücre reseptörü
Ig	İmmünglobulin
BCR	B hücre reseptörü
IRF4	İnterferon Düzenleyici Faktör 4
IRF8	İnterferon Düzenleyici Faktör 8
Bach2	BTB Domain ve CNC Homolog 2
PRDM1	PR/SET Domain 1
Smarca4	SWI/SNF ilişkili, Matris ilişkili, Aktin Bağımlı Kromatin Düzenleyicisi, Alt Aile A, Üye 4

DNMT1	DNA Metiltransferaz 1
EZH2	Zeste homolog 2 enhansırı
BLNK	B hücresi bağlayıcı protein
FOXO1	Forkhead Box O1
ST-HSC	Kısa süreli hematopoetik kök hücre, progenitör hücre
LT-HSC	Uzun süreli hematopoetik kök hücre, multipotent hücre
GMP	Granülosit-monosit progenitör
CEBPA	CCAAT Enhansır Bağlayıcı Protein Alfa
STAT5	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 5A Aktivatörü
AFF1	AF4/FMR2 Aile Üyesi 1
TP53	Tümör Protein P53
ABL2	ABL Proto-Onkogen 2
CSF1R	Koloni Uyarıcı Faktör 1 Reseptörü
EPOR	Eritropoietin Reseptörü
IL2RB	İnterlökin 2 Reseptör Alt Birimi Beta
NTRK3	Nörotrofik Reseptör Tirozin Kinaz 3
PDGFR	Trombosit Derive Büyüme Faktörü Reseptörü Beta
NF1	Nörofibromin 1
NRAS	Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homolog
KRAS	Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogen Homolog
PTPN11	Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11
SETD2	SET Domaini içeren 2, Histon metil transferaz
NSD2	Nükleer Reseptör Bağlayan SET Domain Proteinini 2
TET2	Tet Metilsitozin Dioksijenaz 2
ASXL1	ASXL transkripsiyonel regülatör 1

PHF6	PHD parmak proteini 6
CUX1	Cut-benzeri homeobox 1
JAK3	Janus kinaz 3
MED12	Mediyatör Kompleks Alt Birimi 12
CTCF	CCCTC-Bağlayıcı Faktör
SF3B1	Kırılma Faktörü 3b Alt Birim 1
DNMT3A	DNA Metiltransferaz 3 Alfa
CYPA	Siklofilin

ÖZET

Küçükçankurt, F. (2022). Bifenotipik Akut Lösemi Hastalarının Genetik Karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Akut lösemi gelişiminde merkezi bir rol oynayan yapısal kromozomal değişiklikler, DNA kopya sayısı değişiklikleri ve mutasyonlar ile ilişkili olarak tanımlanan birçok alt tip bulunmaktadır. Günümüzde, genomik araştırmaların ilerlemesiyle lösemilerde yeni genetik alt gruplar belirlenmiştir. Bifenotipik akut lösemiler (MPAL), blastların hem lenfoid hem de miyeloid soy spesifik belirteçlerini birlikte ifade ettiği nadir bir lösemi türüdür. Bifenotipik akut lösemi hastalarının risk sınıflandırması, ALL ya da AML hastaları gibi, klinik ya da immünojenotipik özelliklere göre yapılmaktadır ancak hastalar hem genetik ve fenotipik olarak oldukça heterojendirler. Hastaların moleküler sınıflandırması yetersizdir ve kötü prognoz göstermektedirler. MPAL'leri sınıflandırmadaki zorluklar, terapötik sonuçlarla ilgili ileriye dönük olarak toplanan verilerin eksikliği ve nadir insidans oranı, hastalar için en iyi tedavi yaklaşımı konusunda belirsizliğe yol açmaktadır. Ayrıca son yıllarda olarak MPAL hastalarında hematopoetik hücrelerde soy değişiminden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin anlatımlarında bozulmalar bildirilmektedir.

Bu tez projesi kapsamında, MPAL hastaları özel bir genomik altyapıya sahiptir hipotezinden yola çıkarak, 46 çocukluk çağı MPAL olgusunun kemik iliği örneklerinde PZR, qPZR, Sanger dizileme yaklaşımları ve enformatik analizler kullanarak aday gen varyasyonları araştırılmıştır. Saptanan varyasyonların hastaların klinik parametreleri ile ilişkisi araştırılmıştır.

Çocukluk çağı MPAL hastaların %39'unda (18/46) *IKZF1*, *DUX4r*, *ZNF384r*, t(9;22) ve t(12;21) genlerinden en az birinde varyasyon saptanmıştır. *IKZF1* ve t(9;22) varyasyonların sağkalım üzerine kötü etkisi belirlenirken, *DUX4r*, *ZNF384r* varyasyonları orta risk/standart risk belirteçleri olarak saptanmıştır. Soy değişimi sürecinde kritik öneme sahip olan genlerin anlatımları incelendiğinde, MPAL alt fenotiplerine spesifik bir anlatım görülmemekle beraber MPAL hastalarının sahip

oldukları varyasyonların doğrudan ya da dolaylı mekanizmalar ile gen anlatımlarını etkilediği ve değiştirdiği gösterilmiştir.

MPAL hastalarında gerçekleştirilmiş çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Bu tez projesinde elde edilen verilerin büyük kısmı ilk defa ortaya çıkartılmış özgün verilerdir ve gen varyasyonlarının sıklığı ve birlikte görülmeleri bakımlarından BCP-ALL'den farklılıklar görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Bifenotipik Akut Lösemi, DUX4, IKZF, Füzyon, Gen anlatımı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:36661



ABSTRACT

Kucukcankurt F. (2022). Genetic Characterization of Biphenotypic Acute Leukemia Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics, PhD thesis. İstanbul.

There are many subtypes defined in relation to structural chromosomal changes, DNA copy number changes and mutations that play a central role in the development of acute leukemia. Today, with the advancement of genomic research, new genetic subgroups have been identified in leukemias. Biphenotypic acute leukemias (MPAL) is a rare type of leukemia in which blasts co-express both lymphoid and myeloid lineage specific markers. Risk classification is based on clinical or immunophenotypic characteristics of MPAL patients, but they are highly heterogeneous both genetically and phenotypically. The molecular classification of patients are insufficient and they show a poor prognosis. The difficulties in classifying MPALs, the lack of prospectively collected data on therapeutic outcomes and rare incidence of rate lead to uncertainty about the best treatment approach for patients. Therefore, there is a need for the existence of prognostic markers that can guide the treatment of MPAL patients.

In this thesis project, based on the hypothesis that MPAL patients have a special genomic background, candidate gene variations were investigated in bone marrow samples of 46 childhood MPAL cases using PCR, qPCR, Sanger sequencing approaches and informatics analysis. The relationship of the detected variations with the clinical parameters of the patients were investigated.

In this study, we detected variations at least one of the *IKZF1*, *DUX4r*, *ZNF384r*, t(9;22) and t(12;21) in 39% (18/46) of the MPAL patients. Ectopic expression of transcription factors responsible for lineage commitment in hematopoietic cells have begun to be reported in MPAL patients. When the expressions of genes that have critical importance in the lineage change process are examined, no specific expression is observed for MPAL subgroups but it has been shown that the variations of MPAL patients affect and change gene expressions by direct or indirect mechanisms.

The number of studies conducted in MPAL are negligible. Most of the data obtained in this thesis project are original data that have been revealed for the first time and

differences from BCP-ALL were observed in terms of the frequency and co-occurrence of gene variations.

Key Words: Biphenotypic acute leukemia, DUX4, IKZF, Fusion, Gene expression

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36661



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hematopoez, ortak bir hematopoietik kök hücre popülasyonundan (HSC'ler) başlayarak tüm kan hücrelerinin üretildiği ve yenilendiği süreçtir. HSC'ler, sınırlı farklılaşma potansiyeli olan ve spesifik yüzey belirteçlerini ifade eden soya özgü progenitörlere farklılaşır (1). Hücresel düzeyde, HSC'den soya bağlı hematopoietik hücrelere farklılaşma süreci, soy-spesifik genlerin seçici aktivasyonunu ve aynı zamanda soy-yabancı genlerin ve gelişim düzenleyicilerin tanımlanmış bir sırada susturulmasını içerir. Bu tür karmaşık soy belirleyici programların düzenlenmesi birkaç faktöre bağlıdır, ancak kapsamlı araştırmalar, gen düzenleyici ağların hücre kaderi seçimini ve soy kısıtlamasını yönlendirmedeki temel rolünü vurgulamıştır. Bu gen düzenleyici ağlar, soy-spesifik genlerin aktivasyonu ve soy-yabancı genlerin baskılanmasının yanı sıra antagonizma aracılığı ile transkripsiyonel aktivitenin karşılıklı düzenlenmesini sağlar (2). Giderek daralan soy potansiyeli, gen anlatımı imzaları ve epigenetik modifikasyonların kesin bir kombinasyonundan kaynaklanır.

Erken hematopoetik multipotent progenitör hücreler, hem belirli bir hücre soyu fenotipini destekleyen hem de alternatif programlamayı baskılayan kompleks etkileşimlere dayanan, spesifik hücre kader seçimleriyle meydana gelir. Spesifik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları hücre soyu seçiminde görevlidir. Hücre farklılaşmasını düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin düzensizliği sonucundaki anormal ifadesi, akut lösemide görülen genetik ve epigenetik değişiklikler temelinde gerçekleşir (3).

Akut lösemiler, kemik iliği progenitör hücrelerinin malign transformasyonu sonucu ortaya çıkan hastalık grubudur. Akut lösemilerin genetik karakterizasyonu genellikle sitogenetik analizler ve spesifik translokasyonların veya mutasyonların moleküler tekniklerle tespitine dayanmaktadır (4). Güncel veriler ışığında akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut miyeloid lösemi (AML) hastalarının moleküler risk sınıflaması için prognostik öneme sahip olduğu ortaya çıkan birçok yeni belirteç, yüksek risk grubundaki hastaların ayrıştırılması ve uygun tedavi protokollerine yönlendirilmesine imkan sağlamaktadır.

Çocukluk çağı B hücreli ALL'de (B-ALL) anöploidi (hiperdiploidi, hipodiploidi, near haploidi), kompleks kromozomal yeniden düzenlenmeler (iAMP21), onkogen deregülasyonu veya yeniden düzenlenmeler sonucunda, *ETV6-RUNX1*, *MLL* yeniden düzenlenmeleri, *TCF3-PBX1* ve *BCR-ABL1* gibi kimerik füzyon onkoprotein ekspresyonu ile sonuçlanır (5). Bunların yanı sıra, *ETV6-RUNX1*-benzeri ALL, *ZNF384*-yeniden düzenlenmeleri, *DUX4*-yeniden düzenlenmeleri, *MEF2D*-yeniden düzenlenmeleri, *NUTM1*-yeniden düzenlenmeleri, *TCF3-HLF*, *PAX5*-derive ALL, Ph-benzeri ALL gibi yeni alt gruplar tanımlanmıştır (6).

DUX4-yeniden düzenlemeleri çocukluk çağı prekürsör B-ALL'lerin %4-5'ini oluşturur ve iyi prognozla ilişkilendirilmiştir. *ETV6-RUNX1*-benzeri ALL %1-3 sıklıkta görülmektedir ve iyi prognozla ilişkilendirilmiştir. *ZNF384* düzenlemeleri, genellikle bir transkripsiyonel regülatör veya *EP300*, *CREBBP*, *TAF15*, *SYNRG*, *EWSR1*, *TCF3* ve *ARID1B* gibi kromatin modifiye edici genlerin *ZNF384* ile füzyonunu içerir. *ZNF384* yeniden düzenlenmeleri %1-6 sıklıkta görülmektedir, miyeloid yüzey belirteci ekspresyonu, JAK/STAT yolak aktivasyonu ile karakterizedir ve orta derece iyi prognozla ilişkilendirilmiştir (7). Yirmi birinci kromozomun kompleks intrakromozomal amplifikasyonu (iAMP21) çocukluk çağı B-ALL'lerin %2'sinde görülmektedir ve kötü prognoz ile ilişkilidir (8). İkincil DNA delesyonları, amplifikasyonlar ve mutasyonları B hücre prekürsör ALL'nin karakteristik özelliğidir. Lökomogenezden *IKZF1*, *PAX5*, *EBF1* gibi lenfoid transkripsiyon faktörleri, *CDKN2A/CDKN2B*, *RB1* gibi hücre döngüsü regülasyonu ve tümör baskılanması ile ilişkili genler, apoptoz regülasyonu, transkripsiyonel düzenleme ve koaktivasyondan sorumlu *ETV6* ve *ERG* genleri ve epigenetik varyasyonlar sorumludur. Prevalans ve varyant tipi alt gruplar arasında farklılık gösterir. *IKZF1* mutasyonları ise *BCR-ABL1*-pozitif ve Ph-benzeri ALL'nin ayırt edici özelliğidir ve kötü prognoz ile ilişkilidir. *BCR-ABL1*-benzeri ALL'nin ortak genomik özellikleri, B-lenfoid transkripsiyon faktörü genlerinin (özellikle *IKZF1* delesyonlarının), sitokin reseptörünü ve tirozin kinaz sinyalinin deregülasyonunu sağlayan genetik değişikliklerdir. Bunlar arasında *CRLF2*'nin yeniden düzenlenmesi ve mutasyonları (yaklaşık %50), *ABL* sınıfı tirozin kinaz genlerinin yeniden düzenlenmesi (%12), *JAK2*'nin yeniden düzenlenmesi (%7) ve eritropoietin reseptör geninin (*EPOR*) mutasyonları (%3-%10), JAK-STAT sinyalizasyonunu (%11) ve Ras sinyalizasyonunu (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11* ve *NF1* %6)

aktive edici mutasyonlar ve daha az yaygın kinaz değişiklikleri (*FLT3*, *NTRK3*, *BLNK*, *TYK2* ve *PTK2B*) görölmektedir (7).

T-ALL, pediatrik ve yetişkin ALL'lerin sırasıyla yaklaşık %15 ve %25'ini oluşturan agresif ve heterojen bir hastalık grubudur. T-ALL hastalarının yaklaşık %50'si *TLX1*, *TLX3*, *LYL1*, *TAL1* yeniden düzenlenmeleri (7), %15-60'ında *NOTCH1*, *FBWX7* mutasyonları ile karakterize edilmektedir (9). Ayrıca, gen ekspresyon profillemeye çalışmaları, spesifik T hücre transkripsiyon faktörlerinin anormal aktivasyonu ile karakterize edilen moleküler alt gruplara sınıflandırılmasına yardımcı olmuştur (10). *TAL1*, *LMO*, *TLX1* deregülasyonu iyi prognoz göstergesi iken *TLX3* deregülasyonu kötü prognoz belirteçidir (11). T-ALL'de mutasyonlar ve DNA kopya sayısı değişiklikleri *NOTCH1*, *FBWX7* ve *MYB* genleri; *JAK-STAT* yolağı genleri (*IL7R*, *JAK1*, *JAK3* ve *STAT5B*) ve *Ras/PI3K/AKT* yolaklarında yer alan genlerde (*NRAS/KRAS* ve *PTEN*); epigenetik regülatörlerde (*PHF6*, *SUZ12*, *EZH2*, *TET2*, *H3F3A* ve *KDM6A*); transkripsiyon regülatörlerinde (*LEF1*, *WT1*, *BCL11B*) görölmektedir (7).

AML'de, miyeloid sinyalizasyon, transkripsiyonel düzenlenme ve kromatin modifikasyonu ile ilişkili yolaklarda yer alan genlerin fonksiyonunu değiştiren kompleks mutasyon profilleri, kompleks klonal değişimler ve epigenetik değişimler bulunmaktadır (12). AML'de proliferasyonu ve/veya hücre sağ kalımını arttıran *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *K-RAS*, *PTPN11*, *WT1* mutasyonları, farklılaşmayı bozan *CEBPA* ve *NPM1* mutasyonları tanımlanmıştır (13,14). Mutasyonların yanı sıra, AML'de tekrarlayan sitogenetik anomalilerin görölme sıklıkları, *PML-RARA* t(15;17) %10, *RUNX1-RUXN1T1* t(8;21) %10-15, *CBFB-MYH11* inv(16) ise %5-10'dur ve iyi prognoz belirteçleridir. Akut megakaryoblastik lösemilerde ise %15 sıklıkta görölen *RBM15-MKL1* t(1;22) nispeten iyi prognoz belirteçidir. *MLL* yeniden düzenlenmeleri %15-20, *DEK-NUP214* t(6;9) %1, *RPN1-MECOM* inv(3) %1-2, *NUP98-KDM5A* t(11;12) %10, *NUP98-NSD1* t(5;11) %4-7 sıklıkta görölmektedir ve kötü prognoz belirteçleridir. Kromozom 7'nin kaybı %2-5, kompleks karyotipin görölme sıklığı ise %5-10'dur ve kötü prognoz belirteçleridir. Çocukluk çağı AML'de yüksek nüks riski ile ilişkili anomaliler arasında monozomi 7, *FLT3*'ün iç tandem duplikasyonu (ITD'ler) ve *NUP98-NSD1*; *DEK-NUP214*, *KAT6A-CREBBP* ve *RUNX1-CBFA2T3* füzyonları bulunmaktadır (15).

Bifenotipik akut lösemiler hem miyeloid, hem de T/B lenfoid hücre özelliği gösteren, yüksek risk sınıfında bir lösemi türü olup, tüm akut lösemilerin %2-3'ünü kapsayan nadir bir lösemi türüdür. Günümüzde, hastaların moleküler sınıflandırması lösemi spesifik yüzey belirteç ekspresyonu (immünfenotip) ve konvansiyonel olarak lösemi hastalarında bakılan ALL ve AML'ye spesifik bir grup translokasyon ile yapılmaktadır. Bifenotipik akut lösemilerin heterojen bir hastalık olması ve kullanılmakta olan tedavi protokollerinde bir fikir birliği bulunmaması nedeniyle hastalığın biyolojik ve moleküler temellerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir (16).

Bu tez çalışması kapsamında, çocukluk çağı bifenotipik akut lösemi hastaları, ALL ve AML için prognostik öneme sahip t(4;11), t(9;22), t(12;21), t(15;17), t(8;21), t(1;19) translokasyonları ve inv(16), *DUX4*-yeniden düzenlenmeleri, *FLT3*, *NPM1*, *PAX5* gen mutasyonları ve *IKZF1* delesyonları için taranarak, *CRLF2*, *PAX5*, *SPI1*, *NOTCH1*, *GATA1* gen anlatım seviyeleri belirlendi. Böylece, çocukluk çağı bifenotipik akut lösemi hastaları taşıdıkları genetik varyasyonlara göre sınıflandırılarak, hastalıkla ilişkili varyantların prognostik belirteçler ile olan ilişkisi tartışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

Hematopoez, eritrositler, trombositler, granülositler, lenfositler ve monositler gibi çok çeşitli kan ve kemik iliği hücrelerinin oluşturulması sürecidir. Bu süreç, multipotent bir progenitör hücreye bölünme veya kendini yenileme yeteneğine sahip multipotent HSC'ler ile başlar. Progenitör hücreler, beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine veya trombositlerin oluşmasını sağlayan özelleşmiş hücelere bölünebilir. Hematopoezdeki bu bölünmeler dizisi, ortak bir miyeloid progenitör veya ortak bir lenfoid progenitöre bölünen multipotent progenitör hücrelerle başlar. Ortak miyeloid progenitörlerden farklı granülosit alt kümeleri (nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller), monositler, makrofajlar, eritrositler, megakaryositler ve mast hücreleri dahil olmak üzere morfolojik, fenotipik ve işlevsel olarak farklı hücre tiplerini oluştururken, ortak lenfoid progenitörlerden doğal öldürücü (NK) hücrelerinin yanı sıra B ve T lenfositler oluşur (17). Dendritik hücreler (DC'ler) ise, miyeloid veya lenfoid yollardan aktive edilebilen bir gelişim programına sahiptir (18).

Bir hematopoietik kök hücrenin iki kritik özelliği, tüm kan hücre tiplerine farklılaşabilme ve kendini yenileme yeteneğidir. Kendini yenileme veya farklılaşma kararı, kök hücre aşamasında ve sonraki multipotent veya unipotent farklılaşma aşamalarında, bir dizi büyüme faktörleri ve stromal proteinler ile veya transkripsiyon faktörlerinden etkilenebilen stokastik bir süreçtir (19). Multipotent hücreler kendi kendini yenileme kapasitesinden yoksundur ve bunun yerine her zaman daha özel bir hücreye bölünmek zorundadır. Transkripsiyon faktörleri, hematopoietik progenitör hücrelerin gelişimi, çoğalması ve soy-sınırlı farklılaşmanın nasıl programlandığını anlamak için önemli bir rol oynar (20).

Kritik transkripsiyon faktörlerinin işlevlerine ilişkin görüşler, ağırlıklı olarak farelerdeki konvansiyonel veya koşullu gen susturma çalışmalarından elde edilen bulgulara dayanmaktadır (21-23).

Transkripsiyon faktörlerinin diferansiyel ekspresyonu HSC kaderini yönlendirir. HSC ya kendi kendini yeniler yada CLP (ortak lenfoid progenitör) veya CMP'ye (ortak miyeloid progenitör) doğru yönlendirilir. *SPI1*'in ekspresyon baskınlığı, HSC'leri soy

kararlılığına yönlendiren en erken olaylardan biri olabilir. *SPI1*, hücre yüzeyi proteinleri (CD11b, CD16, CD18 ve CD64), sitokinler (G-CSF, GM-CSF ve M-CSF ve bunların ilgili reseptörleri) dahil olmak üzere hematopoietik hücrelerde eksprese edilen en az 3000 genin ekspresyonunu modüle edebilmektedir. Bu kapsamda, miyelopoez ve hematopoietik kök hücrelerin hedeflenmesi sırasında eksprese edilen diğer birçok gen hedefi olan anahtar bir farklılaşma regülatörüdür (24).

Hematopoietik kök hücre ve progenitör hücre gelişimi sırasında hücre kaderi kararları, *SPI1* ve *GATA1* transkripsiyon faktörleri arasındaki çapraz-antagonistik ilişkiye dayanmaktadır. Bununla birlikte, multipotent progenitörler, monosit/granülosit gelişimine doğru farklılaştıklarında, *GATA1* artık eksprese edilmez ve hücre spesifikasyonu süreci *SPI1*'e ve başka bir birincil soy belirleyici olan *CEBPA*'ya bağlıdır (25). *SPI1*, hücre kaderi seçimini yalnızca *GATA1* ve *CEBPA* gibi antagonistik veya sinerjik etkileşimle veya ikincil soy belirleyicileriyle etkileşimle değil, aynı zamanda kendi konsantrasyonlarıyla da düzenleyebilir. Daha yüksek *SPI1* ekspresyon seviyeleri miyeloid gelişimini desteklerken, B-hücre gelişimi için daha düşük *SPI1* ekspresyon seviyesi gereklidir (26).

GATA1 ekspresyonu eritroid/megakaryositik/eozinofil farklılaşmasını desteklerken, *SPI1* ekspresyonu miyeloid hücre farklılaşmasını destekler. Proteinler fiziksel olarak etkileşime girer ve birbirlerinin hareketlerini antagonize eder (27,28). Hematopoietik soy seçiliminde antagonizmin kritik katkısı, *Pax5*'in işlev kaybı çalışmaları ile de gösterilmiştir. Uygun B hücresi gelişimi için *Pax5* ekspresyonu gerekmektedir (29). *Pax5* ekspresyonu yokluğunda, proB hücreleri çok potansiyelli bir fenotip haline gelerek T hücrelerine, NK hücrelerine, dendritik hücrelere, makrofajlara, nötrofillere veya eritroid öncülerine farklılaşabilir. Makrofaj-koloni uyarıcı faktör (M-CSF) reseptörü gibi kritik büyüme faktörü reseptörlerinin baskılanması, normal hematopoietik hücre gelişimi sırasında soy seçilimini kısıtlar. *Pax5* ekspresyonu, progenitör hücreleri B hücre kaderine yönlendirirken, *E2A* ve *EBP* gibi diğer B hücresi transkripsiyon faktörleri soya uygun gen aktivasyonunu sağlar (1). T-lenfoid gelişiminde Notch sinyali, *SPI1* gibi transkripsiyon faktörlerini baskılar. *GATA3*, T hücresine özgü bir transkripsiyon faktörü olarak görülmesine rağmen, T hücresi gelişimini teşvik etmek için yalnızca Notch sinyali bağlamında işlev görmektedir (30).

GATA1, CMP'lere olan kararlılığın habercisiyken, *SPI1* ekspresyonu CLP'lerde korunur ve ayrıca lenfoid gelişimi için gereklidir. *SPI1*'in soy kararlılığı üzerindeki belirgin etkileri çift yönlüdür. İlk olarak, HSC'lerin miyeloid hücrelere bağıllığını desteklemesi için daha yüksek konsantrasyonda bir gen dozajı gereklidir (DeKoter ve (31). İkinci olarak, hedef gen üzerindeki *SPI1* aktivitesi, B lenfositlerinde eksprese edilen ve B lenfosit bağlanması için kesinlikle gerekli olan lenfoid hücre transkripsiyon faktörü *Pax5* tarafından negatif olarak Ayrıca, CLP'ler T hücresi geliştirme potansiyelini korur. Pro-B hücresinin oluşumundan sonra, B hücre soy devamlılığı için *Pax5* ekspresyonuna ihtiyaç duyulur. *Pax5*, *Notch1*'i bloke ederek T hücresi gelişimini antagonize eder. Bu faktörler, bir gen ekspresyon programını aktive etmek ve alternatif olanakları susturmak için birbirini çapraz olarak düzenler. Bu nedenle, *Pax5*, B soyun gelişiminde temel ve ikili bir rol oynar, *MCSFR* veya *MPO* gibi B hücresine özgü olmayan genleri bastırırken, aynı zamanda B soyuna özgü genleri aktive eder. düzenlenebilir (32).

T hücre soy taahhüdü sırasında, *SPI1* ekspresyonunun baskılanması ile miyeloid hücre kaderlerine erişim kaybı oluşmaktadır (33). *SPI1* eksprese eden erken dönem T hücre prekürsörleri (ETP) ve DN2a hücrelerinde Notch sinyali kapatılır veya zayıflatılırsa, miyeloid ve dendritik hücreler oluşabilir. *SPI1* eksprese etmeyen ileri fazdaki hücrelere, *SPI1*'in yeniden eklenmesi bu hücrelerin miyeloid potansiyelini geri kazanmasını sağlar (34,35,36).

Hücreler belirli bir soya yönelirken, epigenetik ve transkripsiyonel özelliklerini değiştirerek bir hücrenin kimliğini yeniden tanımlama yeteneğini gösterir. Hematopoetik faktörler ve kromatin ile ilişkili proteinler arasındaki diğer bağlantılar bu temayı güçlendirmektedir. Bununla birlikte, ortak bir hücre (HSC veya olgunlaşmamış progenitör) içinde farklı soyları temsil eden transkripsiyon faktörlerinin bir arada bulunması, farklı kaderler arasında çapraz iletişim potansiyeli sunmaktadır (37).

Genel olarak, transkripsiyon faktörlerinin hiyerarşik ekspresyonunun yanı sıra epigenetik modülatörlerin de işbirliği ile hücrelerde belirli bir soy bağıllığı için geri dönüşü olmayan bir gen anlatım programının başlatılmasına neden olur (38). *TCF1*, *GATA3* ve Notch sinyali gibi T hücre özelleşmesinde rol alan düzenleyici faktörlerin ortaya çıkışını yavaşlatan iki mekanizma bulunmaktadır. Birinci mekanizma, hücrelerin timusa girerken taşıdığı epigenetik işaretleridir. histonlar üzerindeki baskılayıcı

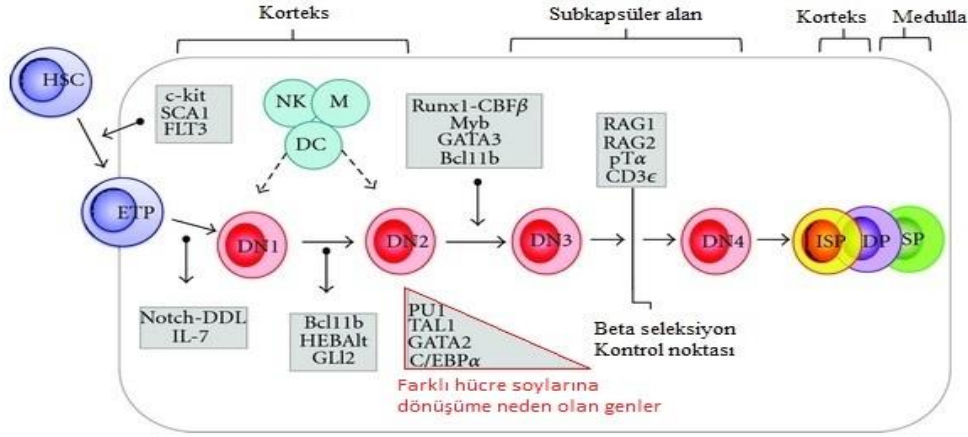
işaretler, DNA metilasyonu, kromatin kondensasyonu ve/veya intranükleer lokalizasyon nedeniyle T hücrelerine özgü genlerin etrafındaki önemli genomik bölgelere erişilemez (39,40). Diğer bir kısıtlayıcı mekanizma da, *SPI1* gibi transkripsiyon faktörlerini içeren, başlangıçta T hücreleri öncülerinde çalışan alternatif bir gen düzenleyici ağı aktivitesidir (41).

2.2. T Hücre Gelişimi

T hücre gelişimi, timus içindeki çevresel sinyaller tarafından indüklenen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon değişiklikleri ile başlatılır. T hücreleri, kemik iliği veya fetal karaciğerdeki hematopoietik kök ve öncü hücrelerden köken alırlar. Multipotent progenitör hücreler timusa göç ettiklerinde T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücre veya dentritik hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahiptirler. Bu hücreler, timik mikroçevreden Notch yolağı sinyallerini aldıklarında T hücre farklılaşmasını başlatırlar. Timus stroması, progenitör T hücrelerine kök hücre faktörü (Kit ligandı), *FLT3* ligandı, *IL7* ve *Notch* ligandları gibi hücre dışı sinyaller sağlayarak, hücrelere T hücre özelliği kazandırır (42).

Timusa giren ve HSC belirteçlerini eksprese eden lenfoid progenitörler, DN1 aşamasına kadar Notch ve *IL7* sinyalizasyonuna hazırlanır. Olgunlaşmamış timositler çift negatif 1 ve 2'ye (DN1/DN2) geçiş sırasında *SPI1*, *TAL1*, *GATA2* ve *CEBPA* gibi diğer hücresel soylara doğru farklılaşmasına neden olan genlerin aşağı regülasyonu ile çoklu soy potansiyelini kaybeder. DN2 aşamasında, *Myb*, *GATA-3*, *HEBalt*, *GLI-2* ve *Bcl11b* yukarı doğru düzenlenir. DN3 aşamasında, uygun bir TCR montajı için gerekli olan *Rag1*, *Rag2* ve *pTa* genleri eksprese olarak, β -seleksiyonuna yol açar. β -seleksiyon kontrol noktasının ardından, DN4 hücreleri tamamen TCRA β +T-hücreleri soyuna bağlıdır (Şekil 2-1)(43). Bu genlerin yanı sıra, *Tcf1*, T-soy spesifikasyonunun ana düzenleyicisidir ve doğrudan ETP aşamasında Notch sinyali ile aktive edilir. Timusa lenfoid progenitörlerin girişi üzerine *Tcf1*'nin yukarı regülasyonu, T hücre gelişiminin ilerlemesi için çok önemli olup, *Bcl11b* ve *Gata3* gibi temel T hücre genlerinin ekspresyonu için de *Tcf1* gereklidir (44,45). *Tcf1* eksikliği olan murin hücrelerinde *Gata3* ve *Bcl11b*'nin ektopik ekspresyonu, transkripsiyon faktörleri arasında iletişim olduğunu göstermektedir. T hücre gelişiminde *Gata3*'ün, erken T hücrelerinde B ve miyeloid farklılaşmasını baskımlarken, *Bcl11b*'nin de bozulmuş T hücre gelişimini

düzeltiltiği, böylece uygun şekilde düzenlenmiş bir T hücre gen ekspresyon programı sağlandığı gösterilmiştir (46).



Şekil 2-1: T hücre gelişiminin diferansiyel gen ekspresyon profili

(Romano ve ark.,2012 yayınından alınıp değiştirilerek kullanılmıştır.)

T hücresi gelişimi, DN hücreler olarak bilinen hem CD4 hem de CD8 ekspresyonundan yoksun hücrelerde başlar. İn vivo olarak, Notch'un erken T hücre gelişimini başlattığı, Notch'un soy belirleyici etkilerinden çoğunun timik mikroçevrede meydana geldiği bildirilmiştir (47). c-Kit⁺ DN1 hücreleri, üretimleri ve devamlılıkları için Notch sinyaline ihtiyaç duyarlar. Notch sinyalinin hedef genleri olan *Ptcra*, *Dtx1* ve *Notch1* ve *Notch3*'ün ekspresyonu, DN2 ve DN3 aşamaları arasında maksimum düzeyde yukarı regülasyona uğrayarak, Notch sinyali devamlılığını sağlar. DN3 timositleri, hayatta kalmak için Notch sinyaline bağımlıdır, çünkü Notch sinyali c-Myc'yi pozitif olarak düzenler (30).

T hücre olgunlaşma basamaklarında, T-hücre reseptörü (THR) yeniden düzenlemeleri oluşur ve β -seleksiyon ile hücrelerin farklılaşma, proliferasyon, survisini kontrol ederek $\alpha\beta$ THR- veya $\gamma\delta$ THR eksprese eden T hücreleri üretirler. İşlevsel $\alpha\beta$ THR ifade eden çift pozitif (DP) (CD4⁺ CD8⁺) T hücreleri, timik hücrelerin üzerindeki Majör Doku Uygunluk Kompleksi (MHC) molekülleri ile etkileşime girerek pozitif seleksiyon ve negatif seleksiyona tabi tutulur. MHC molekülleri tarafından tanınmama veya çok kuvvetli tanınma durumunda negatif seleksiyona uğrayan hücreler apoptoza uğrarken, MHC-II tarafından zayıf tanınan CD4 hücreleri ile MHC-I tarafından zayıf tanınan CD8 hücreleri ile pozitif seleksiyona uğrayarak, tek pozitif (SP) CD4⁺ yardımcı

T hücrelerine veya tek pozitif (SP) CD8⁺ sitotoksik T hücrelerine farklılaşıp periferik kana yayılırlar (48).

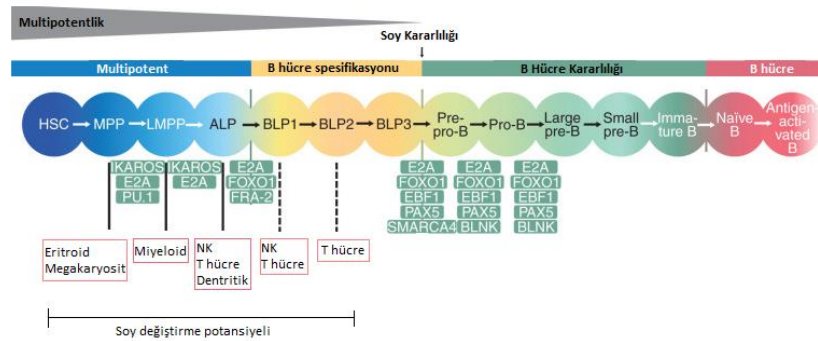
2.3. B Hücre Gelişimi

B hücre gelişimi fetal dönemde karaciğerde başlar, yetişkin dönemde hematopoietik kök hücrelerin üretimi kemik iliğinde devam eder (49). Stromal hücrelerden gelen sinyaller, HSC'lerin ortak lenfoid progenitör hücrelere farklılaşmasına izin verir. Transkripsiyon faktörlerinden *E2A* ve *EBF*'nin ekspresyonları ile ortak lenfoid progenitör hücreler pro-B hücrelere dönüşür (50).

Kemik iliğindeki B hücreleri, pro-B hücrelerinden başlayarak, immünoglobulin ağır ve hafif zincir genlerinin V(D)J rekombinasyonu ile yeniden düzenlenir ve IgM eksprese eden olgunlaşmamış B hücrelerinin üretilmesiyle sonuçlanır (51). Olgunlaşmamış B hücreleri kemik iliğinden dalağa göç ederler ve burada IgD ve IgM'yi birlikte eksprese eden olgun B hücreleri haline gelerek, antijenler tarafından aktive edilmeyi beklerler. Antikor salgılayan plazma B hücrelerine farklılaşma için periferdeki lenfoid organlardaki olgun B hücrelerinden iki sinyal gerekmektedir. İlk sinyal, antijen-bağlı B hücre reseptörleri (BCR) tarafından üretilir, ikinci sinyal ise T hücresine bağımlı (TD) veya T hücresinden bağımsız (TI) bir şekilde iletilebilir. Lipopolisakkaritler (LPS) ve glikolipidler gibi TI antijenler çoğunlukla düşük afiniteli antikorlar üreten kısa ömürlü plazma hücrelerinin gelişimine yol açar. Antijenle karşılaşma ve foliküler yardımcı T (T_{fh}) hücreleri ile etkileşimle başlatılan TD yanıtları, B hücrelerinin hızla kısa ömürlü plazma hücreleri haline gelmesine ya da plazma hücrelerine veya bellek B hücrelerine farklılaşmak için germinal merkeze (GC) girmesine izin verir. Bu hücrelerin antijenlere karşı afinitesi yüksektir (52). Antijen stimülasyonu ile veya T hücresi aracılı aktive olan B hücreleri, GC'lerin oluşmasına yardımcı olur. GM'deki B hücreleri, IgV geni somatik hipermutasyonuna (SHM) ve sınıf değiştirme rekombinasyonuna (CSR) maruz kalırlar ve son olarak bellek B veya antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşırlar. GC B hücreleri, BCR genlerinin değişken bölgelerinde SHM ve klonal genişlemenin olduğu karanlık bölgeye (dark zone) polarize edilebilir veya yüksek afiniteli BCR'lere sahip B hücre klonlarını seçmek için T_{fh} hücreleri ve foliküler dendritik hücreler (FDC'ler) ile etkileşerek light zona geçebilir (53). T_{fh} hücreleri, B hücresinin survisini sağlamak için CD40 ligandını, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını teşvik etmek için IL21'i üretir (54). GC B hücrelerinde,

immünoglobulinin sabit bölgesini bir izotipten diğerine değiştiren CSR meydana gelir. FDC'ler tarafından pozitif olarak seçilmeyen GC B hücreleri apoptoz ile elimine edilirken, seçilen B hücreleri yüksek afinite ile BCR'leri yeniden geliştirmek için karanlık bölgeye yeniden girebilir. GC reaksiyonu, yüksek afinite reseptörlerine sahip B hücrelerinin plazma hücrelerine veya hafıza B hücrelerine farklılaşmasını sağlar. GC'den türetilen plazma hücreleri, kemik iliğine geçer ve spesifik antijenlere karşı uzun süreli koruma sağlayan uzun ömürlü plazma hücreleri haline gelmek için antijene özgü antikorları salgılar (55).

B hücre farklılaşması, bir transkripsiyon düzenleme ağı tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Antikor salgılayan ve plazma hücresi ile ilgili genlerin ekspresyonunu teşvik etmek ve B hücre kimliği genlerini aşağı regüle etmek için çeşitli transkripsiyon faktörlerinin koordinasyonunu içerir. *PAX5*, B hücre soyunun korunması için çok önemlidir, erken B hücresi gelişim aşamaları boyunca ve olgun B hücrelerinde eksprese edilir. Ayrıca, *CD19*, *CD21* ve *IgH* gibi BCR genlerinin ve *IRF4*, *IRF8*, *BACH2*, *Ikaros* ailesi ve *PRDM1* gibi B hücreleri için önemli olan diğer transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu düzenler (56). B hücre gelişimi boyunca, *SPI1*, lenfoid ve miyeloid hücre gelişimi için zemin hazırlarken, *Ikaros* aracılığı ile de lenfoid progenitorların soyları belirlenir. Bunlara ek olarak, *E2A*, B hücresi gelişimi sırasında gen anlatımını teşvik etmek için kromatinleri düzenler. *SMARCA4*, *UHRF1*, *DNMT1* ve *EZH2* gibi birçok epigenetik düzenleyici de B hücre farklılaşmasının gerçekleşmesinde önemli yer alır (57). *BLNK*, B hücre farklılaşmasında (58); *EBF1* ise *FOXO1* ile işbirliği yaparak B hücre gelişiminin merkezi bir koordinatörü olarak yer alır (Şekil 2-2) (59).



Şekil 2-2: B hücre gelişimde transkripsiyonel regülasyon

(Fischer U. ve ark.,2020 yayınından alınıp değiştirilerek kullanılmıştır)

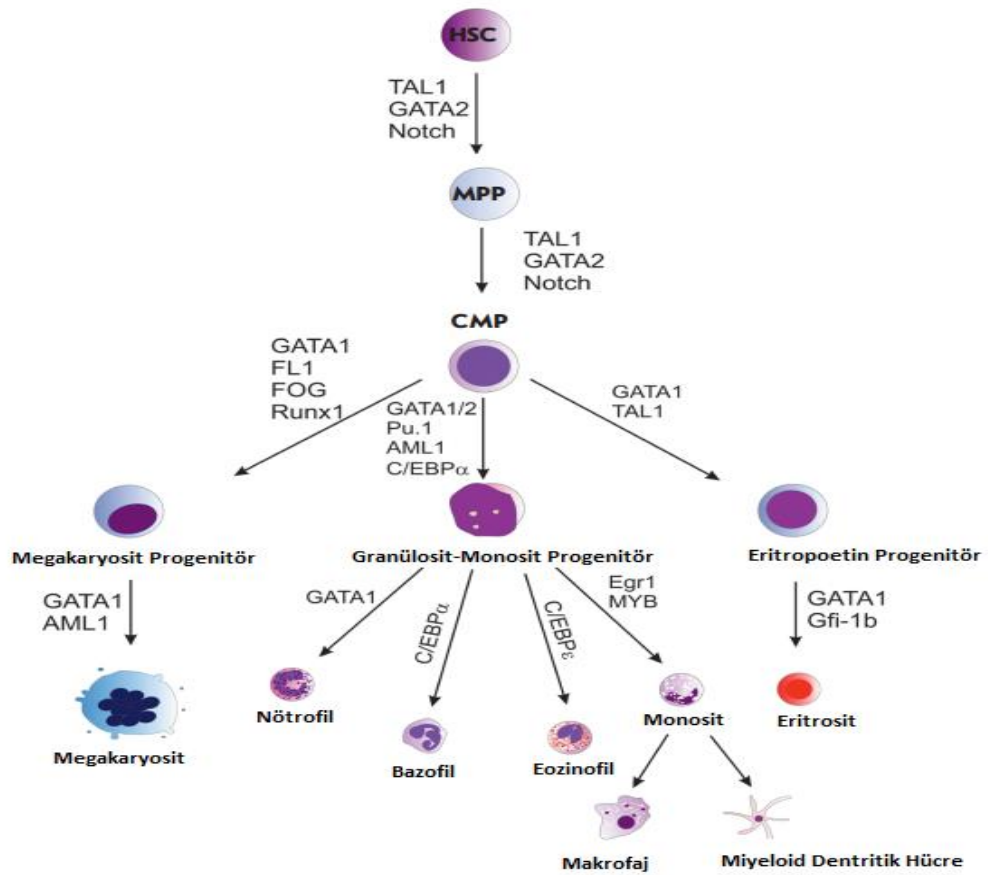
2.4. Miyeloid Hücre Gelişimi

Miyeloid soy, farklı granülosit alt kümeleri (nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller), monositler, makrofajlar, eritrositler, megakaryositler ve mast hücreleri dahil olmak üzere morfolojik, fenotipik ve işlevsel olarak farklı bir lökosit grubunu temsil eder. Kan ve lenfatik sistemde dolaşarak, çeşitli kemokin reseptörleri aracılığıyla doku hasarı ve enfeksiyon bölgelerine hızla yayılırlar. Dokular içinde fagositoz yaparlar ve inflamatuvar sitokinlerin salgılanması için aktive edilirler. Böylece koruyucu bağışıklıkta önemli roller oynarlar. Aynı zamanda, gelişmeyi, homeostazı ve doku onarımını kontrol ettikleri dokularda da bulunabilir (60).

Hematopoietik öncüllerin olgunlaşması, kendini yenileme potansiyelinde azalma ve belirli bir soy kimliğinin aşamalı olarak kazanılması olmak üzere iki temel süreçle ilişkilidir. Bu karşılıklı süreçler, rekabet eden genetik programlar tarafından kontrol edilir. Bir kök hücre farklılaşmaya başlamak için tetiklenirse, kendini yenilemeyi sağlayan genler devre dışı kalırken, farklılaşmayı tetikleyen genler açılır (61). Multipotent hücrelerin miyeloid soy kararlığı için farklılaşması bir dizi genin seçici aktivasyonunu ve susturulmasını içerir. Bu programlama, transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilen farklı gelişimsel aşamalardaki ekstrinsik sinyaller ve intrinsik sinyaller tarafından tetiklenebilir. Transkripsiyon faktörleri, ekspresyon seviyelerine ve zamanlamasına bağlı olarak soya özgü programların etkinleştirilmesinde kilit bir rol oynamaktadır (62). Hematopoietik farklılaşma sırasında gen anlatımının dinamik kalıpları, transkripsiyon faktörleri ile proksimalde promoter ve distalde enhansır gibi düzenleyici elementler arasındaki etkileşimler tarafından yönetilir (63,64)

Miyeloid hücre gelişimdeki transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları farelerde yapılan gen susturma çalışmaları ile anlaşılmıştır. *RUNX1* yokluğunda hematopoezin bozulduğu, genin kondisyonel susturulmasında ise megakaryotik maturasyonda dengesizlikler ve bozulmuş miyeloid proliferasyonu meydana geldiği gösterilmiştir (65,66). Hemanjiyoblastlar, HSC'ler, multipotent progenitörler, eritrositler, megakaryositler ve mast hücrelerinde bulunan *SCL* geninin yokluğunda vitellüs kesesinde hematopoez yokluğu ve anjiyogenez eksikliği görülürken, koşullu susturulmasında azalmış eritrositler ve megakaryositler, bozulmuş ST-HSC'ler (kısa süreli HSC) ile normal LT-HSC'ler (uzun süreli HSC) olduğu bildirilmiştir (67,68,69,70,71). HSC'ler, CMP'ler, GMPs, monositler, granulositlerde eksprese olan

SPI1 yokluğunda matur miyeloid hücre eksikliği, genin koşullu susturulmasında ise hücrelerin CMP ve CLP aşamalarından önce bloke olduğu, artan granülopoez ile kusurlu HSC'ler oluştuğu bildirilmiştir (72-75). HSC'ler, CMP'ler, GMP'ler ve granülositlerde eksprese olan *CEBPA* geninin yokluğunda GMP'lerin ve granülositlerin eksikliği, bozulmuş monositler, artan olgunlaşmamış miyeloid hücreler görülürken, genin koşullu susturulmasında bu değişimlere ilaveten kendini yenileme kapasitesinde artış olduğu bildirilmiştir (76,77). *CEBPE* geninin yokluğunda anormal geç nötrofil olgunlaşması, eozinofil gelişiminde blok ve kusurlu makrofaj işlevi bildirilmiştir (71,78). Mieloid hücre gelişiminde rol oynayan transkripsiyon faktörleri Şekil 2-3'te verilmiştir.



Şekil 2-3: Mieloid hücre gelişimde rol oynayan ana transkripsiyon faktörleri

(Vegapova ER ve ark., 2018 yayınından alınıp değiştirilerek kullanılmıştır.)

Mieloid hücre soyu kararlılığı için *SPI1* (*PU1*) anahtar rolü oynar (31). *SPI1* eksikliği olan fareler, granülosit içeren monositlerden yoksun iken, *SPI1*'in aşırı ekspresyonu, miyeloid hücrelerin gelişimini arttırır. *SPI1*, birçok transkripsiyon faktörü

ile etkileşime girer. Örneğin, monosit gelişimini desteklemek için ICSBP'nin (interferon konsensüs dizisi bağlayıcı protein) aktivitesini arttırır ve eritroid farklılaşması için gerekli olan *GATA1* aktivitesini inhibe ederek miyeloid hücre özelleşmesine katkıda bulunur (79). *GATA1* eritroid, megakaryosit ve mast hücresinde ve ayrıca eozinofil hücre soylarında eksprese edilir. MPP'de her iki transkripsiyon faktörü saptanabilir ve çalışmalar *GATA1*'in megakaryosit/eritrosit gelişimi için, miyeloid/lenfoid gelişimi için ise *SPI1*'in anahtar rolleri olduğunu göstermiştir (80,81).

HSC'lerden miyeloid progenitörlerin gelişimi, hematopoietik dokuların spesifik mikroçevresinde bağlıdır. HSC'nin kemik iliği mikroçevresindeki stroma hücreleri ile yakın etkileşimi, kök hücre faktörü/c-kit, Notch ligandları, Wnt/Frizzled gibi çeşitli sinyal yolları HSC'nin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Miyeloid hücre olgunlaşmasının sonraki aşamalarında, G-CSF ve M-CSF gibi stromal hücreler tarafından salgılanan sitokinler, homeostatik miyelopoeziyi sürdürmek için önemlidir (82).

2.5. Lenfoid-Miyeloid Hücre Değişimi

Hematopoez sırasında, HSC'lerin gelişimi aşamalı bir şekilde kısıtlanarak unipotent progenitörlerin oluşumuna yol açar. Bu soy kısıtlaması aynı zamanda hücre kaderi kararı veya soy bağlılığı olarak da adlandırılır (83).

Bir hücrenin dönüşümü, soy transkripsiyon faktörlerinin kombinasyonları ve kromatindeki epigenetik modifikasyonlar aracılığıyla belirlenmektedir. Ancak, hematopoietik hücrelerin bulunduğu mikroçevrede, erken progenitör hücrelerin plastisitesini değiştiren olaylar sonucunda hücre kaderlerinin yeniden düzenlendiği gösterilmiştir (84). Gelişmekte olan hücrelerde ektopik ekspresyon veya ana transkripsiyon faktörlerinin kaybı ile hücrenin mikroçevresel olaylara yanıtı, hücre kaderini değiştirebilir ve farklı hücre dönüşümlerini teşvik edebilir (85).

Hücre kaderinin belirlenmesinde transkripsiyon faktör ağı oldukça önemlidir. Bunlar arasında, *SPI1*, *Cebpa*, *Gata1*, *Pax5* ve *Ikaros* gibi soya özgü ana düzenleyici transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. Özellikle *RUNX1*, *SCL*, *Ikaros* ve *GFI1*, erken gelişim ve HSC'lerden ortak miyeloid progenitörlerinin özelleşmesi sırasında rol oynar (86). CMP fraksiyonu içindeki çeşitlendirme, megakaryosit-eritroid soyu için *GATA1*'den gelen sinyallerle bağlantılıyken, miyelomonosit hücreleri yüksek *SPI1*,

GFI1, *CEBPA* ve/veya *CEBPB* seviyeleri tarafından kontrol edilir (62). B-lenfoid ve T-lenfoid hücre kader seçiminde B-hücre gelişimi *SPI1*, *E2A*, *EBF* ve *PAX5* tarafından belirlenirken, T-hücre kaderi *Pax5*'in susturulmasına ve *GATA-3* ve *NOTCH1* ekspresyonuna bağlıdır. *SPI1* ve *CEBPA*, miyeloid hücre kaderinin ana düzenleyicileridir ve bu transkripsiyon faktörleri yalnızca progenitör hücrelerin miyeloid farklılaşmasını teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda bu transkripsiyon faktörlerinin ektopik ekspresyonu, T hücresi ve B hücresi soy hücrelerine bir miyeloid hücre kaderi verir (87).

T-hücre oluşumu için, hematopoietik progenitörler, alternatif soy potansiyelini kaybettikleri ve sonunda T-hücresi soyuna bağlandıkları bir dizi gelişimsel durumdan geçerler. T-hücre kaderi, alternatif soy potansiyelini bastırmaya ve T-soy kimliğini oluşturmaya hizmet eden *Bcl11b*'nin geri dönüşümsüz anahtar benzeri aktivasyonunu gerektirir (88,89). *Bcl11b*, gen lokusu üzerinde birden fazla yere bağlanan *Runx1*, *GATA-3*, *TCF-1* ve *Notch* dahil olmak üzere bir dizi transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenir (90).

E2A ve *EBF1*'nin kaybı, B hücre programına girişi engellerken, *PAX5*'in kaybı, B-hücrelerini diğer soylara yönlendirir (85, 91). *EBF* indüksiyonu *SPI1*, *E2A* ve *IL7R* tarafından kontrol edilir ve promotörü, JAK aktivasyonunun sonucu olarak geleneksel olarak fosforile edilen *STAT5*'e yanıt verir ve JAK ailesinin üyelerinin genetik değişiklikleri akut lösemilerde belirgindir (92).

Lenfoid progenitör hücrelerde yapılan fonksiyon kazanım ve fonksiyon kaybı çalışmalarında, *EBF*'nin, *SPI1* ve *EBP* gibi miyeloid ilişkili genlerin ekspresyonunu baskılayarak, B lenfoid hücre kaderine yönlendirdiği gösterilmiştir. Ayrıca *SPI1*'in aşırı ekspresyonunun, fare modellerinde ve yetişkinlerde miyeloid soy değişimine neden olduğu gösterilmiştir (87). *Sp11*^{-/-} farelerde, olgun makrofajların, nötrofillerin, B hücrelerinin, T hücrelerinin, mast hücrelerinin kaybı ve hafif eritropoez kusuruna yol açan azalmış HSC ve progenitör hücre havuzu görülmüştür (26,72,73,93). *SPI1*, miyeloid gen anlatımını güçlü bir şekilde düzenler (61) ve DN2-lösemisinin miyeloid ve bifenotipik fraksiyonunda eksprese edilir, ancak T-lenfoid fraksiyonunda ifade edilmez. *EBF*'nin yokluğu, erken progenitörlerin *Pax5*'ten bağımsız olarak miyeloid-soy hücrelerine farklılaşmasına izin verirken, *Pax5* eksikliği olan progenitörlerde *EBF*'nin sürekli ifadesi, miyeloid ve T-soy seçeneklerini engeller (94).

Progenitör B hücrelerindeki *CEBP*'lerin kuvvet ifadesi, spesifik miyeloid genlerin aktivasyonu ve makrofajlara hızlı bir yeniden programlama ile sonuçlanır. Transkripsiyonel düzenleyicilere ek olarak, sitokinlerden ve büyüme faktörlerinden gelen indüktif çevresel sinyaller, erken hücre kaderi kararları için kritik öneme sahiptir. Kemik iliğinde erken bipotansiyel B-makrofaj progenitörlerinin varlığı ve *MLL*-pozitif B-ALL'nin erken hematopoietik progenitörlerle uyumlu gen ekspresyon profilleri göstermesi, erken bipotansiyel veya oligopotansiyel progenitör hücrelerin lökojenik translokasyonlar için hedef olma olasılığını artırmıştır. Bununla birlikte, bu kemik iliği öncül hücreleri, miyeloid potansiyeli olan tek hücreler değildir. Miyeloid potansiyel, erken T hücre gelişimini temsil eden timik CD4/CD8 DN1 ve DN2 hücrelerinde de bulunmaktadır (33,95). Bununla birlikte, DN1 ve DN2 hücrelerinin in vivo fizyolojik miyelopoeze katkısı, soy izleme çalışmalarıyla araştırılmıştır ve DN1 hücrelerinin yaklaşık %15'inin in vitro olarak sağlam miyeloid farklılaşma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu da timik progenitörlerin miyeloid soy üretebildiğini doğrulamaktadır (95). T-hücresinden türetilen miyeloid blastlar, tanımlanmış bir dizi T-hücre transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu koruyarak, büyüme sağlayan ve miyeloid/T-lenfoid plastisitesini yayan bir lenfoid epigenetik hafıza yaratır (96).

Hu ve arkadaşlarının öne sürdüğü hipoteze göre, soy değişimlerinde ve hücre tipi belirsiz soy (ambiguous) lösemilerde yer alan lösemik klonların aslında multipotent hematopoietik hücrelerden türetilmiş olabileceğidir (87). Bu kavram daha sonra Alexander ve diğerleri tarafından gerçekleştirilen metilasyon çalışmaları ile desteklenmiştir (97). Bir başka potansiyel soy değiştirme mekanizması, transkripsiyon faktörleri tarafından lösemik hücre yeniden programlanmasını içermektedir. Transkripsiyon faktörlerinin normal hematopoez için önemli olduğu ve transkripsiyonel regülasyonun bozulması lösemi gelişimine yol açabileceği iyi bilinmektedir (97,26).

2.6. Bifenotipik Akut Lösemiler

Akut lösemiler, farklılaşmayı bloke eden malign miyeloid veya lenfoid hücrelerin kontrolsüz olarak çoğaldığı heterojen malign bir hastalık grubunu ifade eder. Erken hematopoetik multipotent progenitör hücreler, hem belirli bir hücre soyu fenotipini destekleyen hem de alternatif programlamayı baskılayan kompleks etkileşimlere dayanan, spesifik hücre kader seçimleriyle meydana gelir. Spesifik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları hücre soyu seçiminde görevlidir. Hücre

farklılaşmasını düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin anormal ifadesi, akut lösemide görülen genetik ve epigenetik değişiklikler temelinde gerçekleşir (98).

Belirsiz soy akut lösemiler, blastların çoklu gelişimsel soy potansiyeli gösterdiği kesin AML veya ALL olarak sınıflandırılmayan heterojen bir hematopoetik malignite türüdür. Tüm akut lösemilerin %2-5'ini oluşturan bu nadir lösemi türü kendi içinde üç gruba ayrılmaktadır (99).

- Bilineal Lösemi: Her biri farklı bir soyu temsil eden birden fazla blast popülasyonu bulunan lösemi türüdür.
- Bifenotipik Lösemi (MPAL): Blastların hem lenfoid hem de miyeloid soy spesifik belirteçleri birlikte ifade ettiği lösemi türüdür.
- Farklılaşmamış Lösemi: Soya özgü belirteçlerden ve genotipik değişikliklerden yoksundur.

MPAL'ler, heterojen ve nadir bir hastalık grubu olup, tüm akut lösemilerin yaklaşık %2-3'ünü kapsamaktadır ve görülme sıklığı 0,35 olgu/1,000,000 kişi/yıl olup erkekler daha sık etkilenmektedir (1:1,16) (100).

MPAL seçilimi, EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) ve WHO (World Health Organization) sınıflandırma kriterlerine bağlı olarak belirlenmektedir (97,102). EGIL sınıflandırmasında, T hücresi, B hücresi ve miyeloid hücre soyları ile ilişkili immünolojik belirteçlerin varlığına göre bir skorelama sistemi geliştirilmiştir ve MPAL tanısı için, iki farklı hücre soyundan gelen puan iki ve üzeri olmalıdır (Tablo 2-1). EGIL kriterlerine göre yüzey belirteçleri için pozitiflik değeri en az %20, sitoplazmik belirteçler için en az %10 olarak belirlenmiştir (103). MPAL hastaları EGIL kriterlerine göre B-lenfoid/Miyeloid, B-lenfoid/T-lenfoid, B-lenfoid/T-lenfoid/Miyeloid, T-lenfoid/Miyeloid olarak sınıflandırılabilirler (101).

Tablo 2-1:MPAL hastalarının belirlenmesinde kullanılan EGIL kriterleri

Skor	B hücre	T hücre	Miyeloid hücre
2	cCD79a, cIgM, cCD22	CD3, TCR- $\alpha\beta$, TCR- $\gamma\delta$	MPO
1	CD20, CD19, CD10	CD10, CD8, CD5, CD2	CD13, CD33, CD117, CD65
0,5	CD24, TdT	CD7, CD1a, TdT	CD64, CD15, CD14

Tablo 2-2: MPAL hastalarının belirlenmesinde kullanılan WHO kriterleri

B Hücre soyu	Güçlü CD19 ekspresyonu ve CD79a, cCD22 ve CD10 ekspresyonu
T hücre soyu	Sitoplazmik CD3 veya Yüzey CD3
Miyeloid hücre soyu	Miyeloperoksidaz (MPO) Monositik farklılaşma belirteçlerinden en az 2'sinin ekspresyonu: NSE, CD11c, CD14, CD64, lizozim

MPAL'ın WHO sınıflandırmasında ise morfolojik, immünofenotipik, prognostik ve genetik bulgulara göre alt sınıflara ayrılmaktadır. 2016 yılında güncellenen mevcut WHO kriterlerinde MPAL, *KMT2A* yeniden düzenlenmiş (*KMT2Ar*) vakalar veya *BCR-ABL* füzyon pozitif vakalar olmak üzere iki genomik kategoriye ayrılmıştır. Geri kalanlar, başka türlü adlandırılmayan (not otherwise specified, NOS) olarak sınıflandırılır ve T/miyeloid, B/miyeloid veya nadiren T/B/miyeloid veya T/B fenotipi ile rapor edilir (102,104) (Tablo 2-2).

MPAL hastalarının moleküler sınıflaması günümüzde lösemi spesifik yüzey belirteç ekspresyonu (immünofenotip) ve konvansiyonel olarak lösemi hastalarında bakılan ALL ve AML'ye spesifik bir grup translokasyon ile yapılmaktadır. Akut lösemilerin nadir bir alt grubu olan MPAL için konsensüs tedavi yaklaşımı bulunmamaktadır; bazı hastalar ALL bazıları ise AML protokolleri ile tedavi edilmektedir. Bu lösemi tipinin nadir görülmesi, klinik, immünofenotipik ve genetik bulguların heterojenliği ile birlikte sistematik ve prospektif verilerin azlığı, tek tip ve

doğru bir tedavi önerisi getirmeyi zorlaştırmaktadır (16,97,105). Bu sınırlamalar nedeniyle, MPAL'e uygun terapötik yaklaşımları değerlendirmek için daha fazla hastada yapılacak değerlendirmelere ihtiyaç bulunmaktadır.

2.6.1. Bifenotipik Akut Lösemilerde Genetik Değişimler

MPAL hastalarında değişken bir şekilde AML'de ve ALL'de görülen genetik varyasyonlar tanımlanmıştır. Hastaların sitogenetik değerlendirilmesi ile spesifik kromozom anomalisi taşıyan hastalarda tanının doğrulanması, hedefe yönelik tedavi seçenekleri ve prognoz bilgisi sağlaması açısından büyük önem taşımaktadır (106). MPAL alt tipi olan *KMT2A*-yeniden düzenlenmeleri pediatrik MPAL olgularında (özellikle bebeklerde) yaygın görülürken, *BCR-ABL1* translokasyonları yetişkinlerde daha yaygındır. *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri en sık *AFF1* ile olurken, diğer füzyon partnerleri de *MLLT3* ve *MLLT1*'dir. *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri düşük mutasyon yükü, kopya sayısı değişimleri, tek nükleotid varyantları veya insersiyon/delesyon ile ilişkilidir (97). MPAL'de görülen translokasyonlardan biri olan *ZNF384*-yeniden düzenlenmesi, B/Miyeloid MPAL olgularının %48'inde görülmektedir (108).

MPAL hastalarının genom boyu yaklaşımlar ile araştırılmasıyla hematopoetik sinyal ileti yollarında, epigenetik regülatörlerde, tümör baskılayıcı genlerde ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerde varyantlar belirlenmiştir (100).

Ph+ MPAL'de sıklıkla ALL-ilişkili *IKZF1* varyasyonları bulunmaktadır. Kötü prognoz ve yüksek nüks risk belirteci olan *IKZF1* varyasyonlarının yanı sıra tümör baskılama ve hücre döngüsü regülasyonunda görevli *TP53*, *RB1* ve *CDKN2A/CDKN2B* genlerinde; sitokin reseptörü ve tirozin kinazlarda (*ABL1*, *ABL2*, *CRLF2*, *CSF1R*, *EPOR*, *FLT3*, *IL2RB*, *IL7R*, *JAK1/2/3*, *NTRK3* ve *PDGFRB*), Ras sinyalizasyonunda görevli *NF1*, *KRAS*, *NRAS* ve *PTPN11* genlerinde ve epigenetik modifikasyonda görevli *EZH2*, *CREBBP*, *SETD2*, *MLL2* ve *NSD2* genleri etkileyen kromozomal yeniden düzenlemeler, delesyonlar veya amplifikasyonlar lösemi progresyonunda önemli rol oynayan yapısal varyasyonlardır (109).

B/Miyeloid MPAL'de AML-ilişkili olan *TET2*, *EZH2* ve *ASXL1* epigenetik düzenleyicilerinde mutasyon görülmektedir. *RAS*, *TP53* ve özellikle yaşlı hastalarda *DNMT3A* mutasyonları MPAL'de yaygın olarak görülen diğer mutasyonlardır (103).

T/Miyeloid MPAL'in, B/Miyeloid MPAL'e göre daha fazla mutasyon yükü taşıdığı gösterilmiştir (*EZH2*, *PHF6*, *DNMT3A* gibi epigenetik düzenleyiciler ve JAK/STAT sinyalizasyon proteinleri vb.). Özellikle genç hastalarda *PHF6* ve *DNMT3A* mutasyonlarının daha fazla olduğu gösterilmiştir (110). Bunların yanı sıra, *WT1*, *EZH2*, *ETV6* ve *FLT3* mutasyonları, Ras ve JAK/STAT yolağı mutasyonları, *CUX1* ve *CEBPA* mutasyonlarının varlığı da gösterilmiştir. Bu nedenle, T/Miyeloid MPAL'in moleküler karakterinin ETP-ALL'ye (Erken prekürsör T hücreli ALL) benzediği belirlenmiştir. Bunların yanı sıra, hem T/Miyeloid MPAL'de hem de ETP-ALL'de benzer sıklıkta *WT1*, *EZH2*, *ETV6* ve *FLT3* mutasyonları, Ras ve JAK/STAT yolağı mutasyonları olduğu gösterilmiştir (111).

T/Miyeloid ve B/Miyeloid MPAL'lerin farklı metilasyon imzaları vardır. T/Miyeloid MPAL'de daha yoğun hipermetile CpG adacığı bulunmaktadır ancak, THR (T hücre reseptörü) ilişkili genler hipometiledir. T/Miyeloid MPAL'deki CD3 ekspresyonunun da promotor hipometilasyonu nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir (105). MPAL'lerin gen anlatımı ALL ile AML arasında eşsiz bir şekilde yer almaktadır. B/Miyeloid MPAL gen ekspresyon profilinde BCR (B hücre reseptör) yolağı, NF-kB (nükleer faktör kappa B) yolağı ve *IRF4/IRF8* hedeflerinin yukarı regülasyonu görülmektedir (105). T/Miyeloid MPAL'de ise ETP-ALL'ye benzer hematopoetik kök hücre profiline uygun THR (T hücre reseptör) ekspresyon profili görülmektedir (97,105)

B/T MPAL daha nadirdir ve birkaç çalışmada mutasyonel altyapısı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda en sık *PHF6* mutasyonları görülmekle birlikte, *WT1*, *JAK3*, *MED12*, *CTCF*, *IL7R*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *PTPN11*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TP53* mutasyonlarının varlığı da gösterilmiştir (104,113,114).

MPAL'in genomik altyapısının heterojen olmasından dolayı, hedefe yönelik terapötik yaklaşımların tedavide kullanılabileceği düşünülmektedir. Günümüzde, akut lösemilerde yapılan tüm genom ve transkriptom analizleri sonucunda, varyasyonların prognostik etkisi hakkındaki bilgiler büyük ölçüde gelişmiştir. Yakın zamanda tanımlanmış bu moleküler özelliklerin keşfi, lösemi patobiyolojisinin anlaşılması için tanısal ve prognostik belirteçlerle ilgili yeni bakış açıları sağlamıştır (102). Örneğin, çocukluk çağı B prekürsör hücreli (BCP) ALL'nin genetiği hakkında bilgiler genom boyu araştırmalardaki artış nedeniyle son on yılda önemli ölçüde artmıştır. En önemli

yeni bulgulardan biri, rutin sınıflandırma kriterlerinin yokluğu ile tanımlanan heterojen bir grup tanımlanmasıdır. B-diğer ALL olarak isimlendirilen bu grup, ilaç hedefine yönelik lezyonlara ve prognostik belirteçlere spesifik genetik değişimlere sahip yeni biyolojik alt tipler olarak tanımlanmıştır.

Benzersiz genetik anomalilerin varlığına dayalı olarak B-diğer ALL içinde birkaç alt tip tanımlanmıştır :

- iAMP21 ALL
- *DUX4*-yeniden düzenlenmiş (r) ALL
- *ZNF384r* ALL
- *MEF2Dr* ALL
- Gen ekspresyon imzaları: *BCR-ABL1*-benzeri ALL ve *ETV6-RUNX1*-benzeri ALL

Bu alt tipleri tanımlayan anomalilere paralel olarak, çok çeşitli ek genetik anomaliler de tanımlanarak, yeni prognostik faktörler ve terapi hedefleri belirlenmiştir (115,98). MPAL'de var olan bu potansiyel ilaç hedeflerini tanımlamak için, karakteristik varyantların açıklanması gerekmektedir. Böylece, hastaların hedefe yönelik yaklaşımlar ile tedavi olasılıkları artmaya devam edecektir (16).

MPAL'leri sınıflandırmadaki zorluklar, terapötik sonuçlarla ilgili ileriye dönük olarak toplanan verilerin eksikliği ve nadir insidans oranı, MPAL'li hastalar için en iyi tedavi yaklaşımı konusunda belirsizliğe yol açmaktadır. Bu nedenle MPAL hastalarının tedavisini yönlendirebilecek prognostik belirteçlerin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır.

Hipotezimiz: MPAL hastaları ALL ve AML hastalarından farklı bir genetik altyapıya sahiptir.

Bu tez çalışmasının amacı,

- I. Çocukluk çağı bifenotipik akut lösemi (MPAL) hastalarındaki, ALL ve AML için prognostik önemi olan t(4;11), t(9;22), t(12;21), t(15;17), t(8;21), t(1;19) translokasyonları ve inv(16), *FLT3*, *NPM1* varyasyonlarını konvansiyonel RT-PZR ve Sanger dizi analizi ile belirlemek,

- II. *DUX4r* (*ERG* delesyonları) olan hastaları saptamak,
- III. *PAX5* gen mutasyonları ve *IKZF1* delesyon varlığını Sanger dizi analizi ve PZR ile belirlemek,
- IV. *CRLF2* overekspresyon durumunu qRT-PZR belirlemek,
- V. Lenfoid-miyeloid dönüşüm ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin *PAX5*, *SPI1*, *NOTCH1*, *GATA1* gen anlatım seviyelerini qRT-PZR ile belirlemek
- VI. İlgili genler açısından gen anlatım düzeylerinin ve ilişkili varyantların prognostik değerlerinin araştırılmasıdır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Bifenotipik Akut Lösemi Hastalarının Belirlenmesi:

Tez kapsamında, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik AD.'ye ALL ön tanısı ile başvuran, onam formu alınmış 46 akut lösemi hastasına ait kemik iliği örnekleri ile çalışılmıştır. Hastaların (n=46) beşi (n=5) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden, yedisi (n=7) Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden, 17'si (n=17) İstanbul Tıp Fakültesi'nden, biri (n=1) Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden, biri (n=1) Bakırköy Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden, 8'i (n=8) Kanuni Sultan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden, yedisi (n=7) Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden takiplidir. Tüm hastalar, BFM-Turkey-ALL 2000 (TRALL) tedavi protokolüne uygun olarak takip ve tedavi edilmişlerdir (157). Hastaların takibi süresince AML'ye dönüşüm olmamıştır.

Çalışmamız İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından, 08.01.2020 tarih ve 5756 sayısı ile onaylanmıştır.

Dahil olma kriterleri:

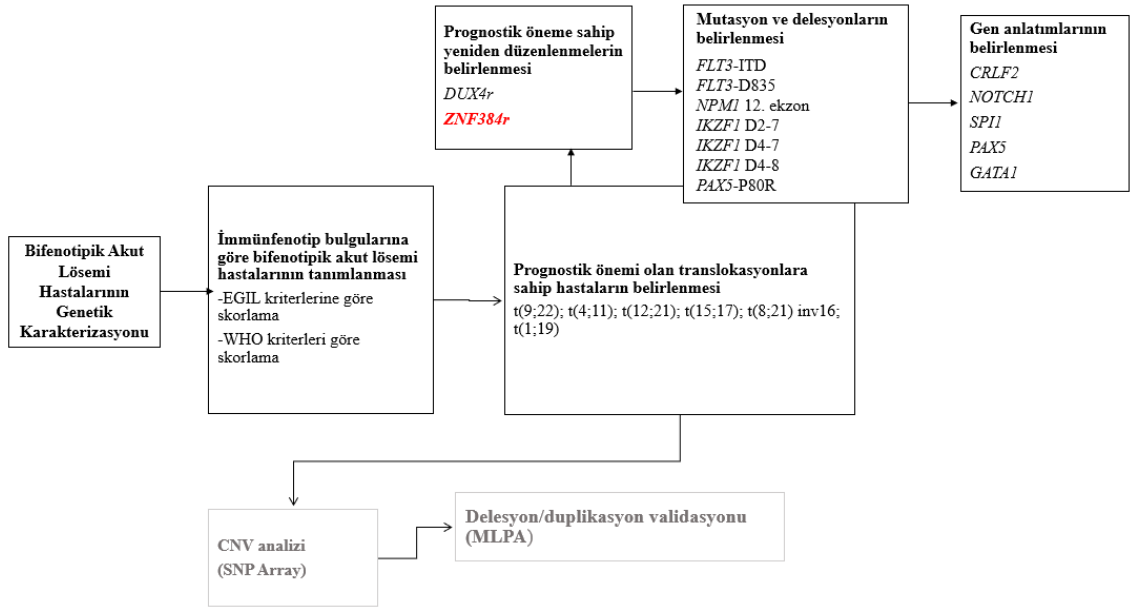
Tez çalışmasına, Hematoloji Bilim Dalları'nda "Akut Lösemi" tanısı almış, immünofenotipleme sonucu bifenotipik T/Miyeloid hücreli akut lösemi veya bifenotipik B/Miyeloid hücreli akut lösemi veya B/T hücreli akut lösemi veya B/T/Miyeloid grubuna giren çocukluk çağı hastaların tanı zamanı örnekleri retrospektif olarak dahil edilmiştir (99). Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik verileri Tablo 3-1'de verilmiştir.

Dışlanma kriterleri:

İmmünofenotip bulgularına göre sadece saf T-ALL veya B-ALL veya AML belirteçlerini eksprese eden ve immünofenotip bulgularına göre tanısı kesinleşmemiş hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.1.2. Bifenotipik Akut Lösemilerin Genetik Karakterizasyon Algoritması

Bu tez projesi kapsamında, MPAL hastalarının genetik karakterizasyonunun genel algoritması Şekil 3-1'de verilmiştir. Bu hasta kohortunda, *ZNF384* yeniden düzenlenmeleri daha önce yapılan bir çalışma ile belirlenmiştir.



Şekil 3-1: Bifenotipik akut lösemi hastalarının genetik karakterizasyon algoritması

3.1.3. Bifenotipik Akut Lösemi Hastalarının Klinik Özellikleri:

Tablo 3-1’de bifenotipik akut lösemi hastalarının klinik özellikleri verilmiştir.

Tablo 3-1:Bifenotipik Akut Lösemi Hastalarının Klinik Özellikleri

Klinik Özellikler	Çocukluk çağı MPAL (n=46)
Yaş (yıl)	
<2 yaş	%15 (n=7)
2-10 yaş	%66 (n=31)
>10yaş	%17 (n=8)
Cinsiyet	
Kız	%30,4 (n=14)
Erkek	%69,6 (n=32)
Hepatomegali	
Var	%32,6 (n=15)
Yok	%30,4 (n=14)
NA	%37 (n=17)
Splenomegali	
Var	% 17,4 (n=8)
Yok	% 41,3 (n=19)
NA	% 43,5 (n=19)
Lenfadenopati	
Var	%8,7 (n=4)
Yok	%32,6 (n=15)

NA	%60,9 (n=28)
MSS Tutulumu	
Var	%2,2 (n=1)
Yok	%32,6 (n=15)
NA	%69,6 (n=32)
WBC Sayısı (109/L)	
<10000	%39,1 (n=18)
10000-50000	%30,4 (n=14)
>50000	%15,2 (n=7)
NA	%15,2 (n=7)
İmmünfenotip	
B/M	%63 (n=29)
B/T	%23,9 (n=11)
B/T/M	%6,5 (n=3)
T/M	%2,2 (n=1)
Bifenotipik ancak sınıflandırılmadı	%4,3 (n=2)
Sitogenetik	
t(9;22)	%2,2 (n=1)
t(12;21)	%19,6 (n=9)
t(12;17)	%6,5 (n=3)
t(12;19)	%4,3 (n=2)
t(12;22)	%2,2 (n=1)
33.gün yanıtı	
Var	%50 (n=23)
Yok	(n=0)
NA	%50 (n=23)

MSS: Merkezi sinir sistemi, WBC: Beyaz kan hücresi, B/M: B hücresi/Miyeloid hücre, B/T: B hücresi/T hücresi, B/T/M: B hücresi/T hücresi/Miyeloid hücresi, T/M: T hücresi/Miyeloid hücre, NA:mevcut değil

3.1.4. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasalların listesi tablo 3-2’de verilmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma
Agaroz	Invitrogen, İsviçre

Bromfenol mavisi	Sigma, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Etanol	Merck, Almanya
İzopropanol	Merck, Almanya
PBS	Medicago, İsveç
Tris baz	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Glasial asetik asit	Sigma, Almanya

3.1.5. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Kullanılan tampon ve çözeltilerin listesi tablo 3-3’de verilmiştir.

Tablo 3-3: Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Tampon ve Çözelti Adı	Firma
Etidyum Bromür	Stok konsantrasyonu 10mg/ml olacak şekilde steril ddH ₂ O ile hazırlanır.
Agaroz jel yükleme tamponu (50X)	%0,25’lik bromfenol mavisi ve %30 gliserol eklenerek 10ml steril ddH ₂ O ile hazırlanır.
TAE (50X) tamponu	242 g Tris baz, 100ml 0,5M EDTA ve 57,1 ml glesial asetik asitin ddH ₂ O içinde karıştırılıp hacmi 1000ml olacak şekilde çözülmesiyle hazırlanır.
Solüsyon D	1ml RLT buffera 10µl beta-

	merkaptotanol eklenerek hazırlanır.
--	-------------------------------------

3.1.6. Kullanılan Kitler

Kullanılan kitlerin listesi tablo 3-4’da verilmiştir.

Tablo 3-4: Kullanılan Kitler

Kit Adı	Firma
DNA izolasyon kiti	Invitrogen, İsviçre
RNA izolasyon kiti	Invitrogen, İsviçre
LIGHTCYCLER 480 SYBR GREEN kit	Roche, Almanya

3.1.7. Kantitatif PZR Materyali

Kantitatif PZR’da kullanılan materyallerin listesi tablo 3-5’de verilmiştir.

Tablo 3-5: Kullanılan kantitatif PZR Materyalleri

Materyal Adı	Firma
SYBR Green boyası	Roche, Almanya
SYBR Primerleri (ileri ve geri primer)	ThermoFisher, ABD
96 kuyucuklu PZR plakaları	Roche, Almanya
Moleküler seviye su	Roche, Almanya

3.1.8. cDNA Sentez Materyali

cDNA sentezinde kullanılan materyaller tablo 3-6’de verilmiştir.

Tablo 3-6: Kullanılan cDNA sentez materyalleri

Materyal Adı	Firma
Random primer	Invitrogen, İsviçre
10mM dNTP miks	Invitrogen, İsviçre
5X First Strand Buffer	Invitrogen, İsviçre
0,1M DTT	Invitrogen, İsviçre
RNaseOUT Ribonükleaz İnhibitörü	Invitrogen, İsviçre
MMLV Reverse Transkriptaz	Invitrogen, İsviçre
Moleküler biyoloji sınıfı su	Invitrogen, İsviçre

3.1.9. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazların listesi tablo 3-7’de verilmiştir.

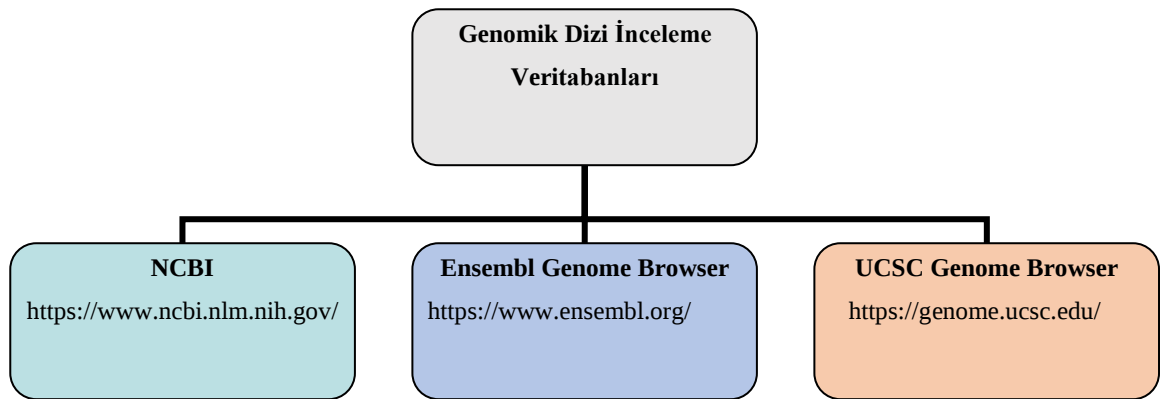
Tablo 3-7: Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka
Otomatik pipetler	Gilson, Eppendorf
Hassas terazi	Shimadzu
Distile su cihazı	Millipore
Buzdolabı +4°C	Sanyo
Derin Dondurucu (-20°C)	Uğur
Derin Dondurucu (-80°C)	Heraeus Sepatech

Masa üstü mini santrifüj	Eppendorf
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf
Elektroforez cihazı	Eppendorf
Güç kaynağı	Stratagene
Flow kabin	Thermo Scientific
Vorteks	Kermanlar
PZR cihazı	Biorad
Spektrofotometre	Nanodrop
Jel görüntüleme sistemi	UVP
LC480 Real Time PZR cihazı	Roche

3.1.10. Kullanılan Elektronik Veritabanları ve Analiz Programları

Şekil 3-2’de gösterilen referans genom ve dizi bilgilerini içeren veritabanları gösterilmiştir. DNA, RNA ve protein varyasyonlarını tanımlamak için, referans genom ile karşılaştırmalı data analiz sağlayan bir yazılım olan CLC Main Workbench v5.02 kullanıldı.



Şekil 3-2: Kullanılan elektronik veritabanları

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Lökosit İzolasyonu

Hastalardan alınan kemik iliği örneklerine, fikol-histopak yoğunluk gradiyent yöntemi kullanılarak lökosit izolasyonu yapılmıştır. Kemik iliği örnekleri PBS ile sulandırıldıktan sonra fikolün üzerine eklenerek 15dk. 2060rpm’de santrifüj yapılır. Tüpte santrifüj sonrası 3 faz gözlemlenir. En alt fazda sedimantasyona uğrayan eritrositler ve yoğunlukları nedeniyle çöken granülositler, ortadaki fazda buffy coat olarak isimlendirilen mononükleer hücreler (trombosit, lenfosit, monosit) ve en üst fazda plazma olarak ayrışır. Mononükleer hücreler toplanarak, iki defa PBS ile yıkanarak trombositlerden uzaklaştırılır. Hasta örneklerinden elde edilen lökositler 600µl solüsyon D içerisinde çözülür ve steril vidalı kapaklı tüpe konularak -80°C’de saklanır.

3.2.2. DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

Hastaların lökosit örneklerine, standart filtreli DNA izolasyon kit (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, İsviçre) protokolü kullanılarak izolasyon yapıldı. DNA miktar ölçümü Nanodrop 1100 (Thermo scientific, USA) cihazı ile yapıldı. DNA saflıkları A260/A280 ~ 1,8 olarak saptandı. DNA stabilitesi %2’lik agaroz jele yükleme yapılarak değerlendirildi.

3.2.3. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

Hastaların lökosit örneklerine, standart filtreli RNA izolasyon kit (PureLink RNA Mini Kit, Invitrogen, İsviçre) protokolü kullanılarak izolasyon yapıldı. RNA miktar ölçümü Nanodrop 1100 (Thermo scientific, ABD) cihazı ile yapıldı. RNA saflıkları A260/A280 ~ 2 olarak saptandı. RNA stabilitesi %2’lik agaroz jele yükleme yapılarak değerlendirildi.

3.2.4. cDNA Sentezi

Hastaların RNA örneklerinden (n=38) random primer ve M-MLV ters transkriptaz enzimi (Invitrogen, İsviçre) kullanılarak cDNA elde edildi. cDNA sentezi için, 500ng RNA örneği, 1µl dNTP miks (10mM) ve 1µl random hekzamer (25 mM) tüpte karıştırılarak 65°C’de 5 dk inkübe edildi ve +4°C’ye soğutuldu. Ardından, 4µl 5X First strand buffer, 2µl 0,1M DTT ve 1ul ribonükleaz inhibitörü eklenerek 37°C’de 2 dk

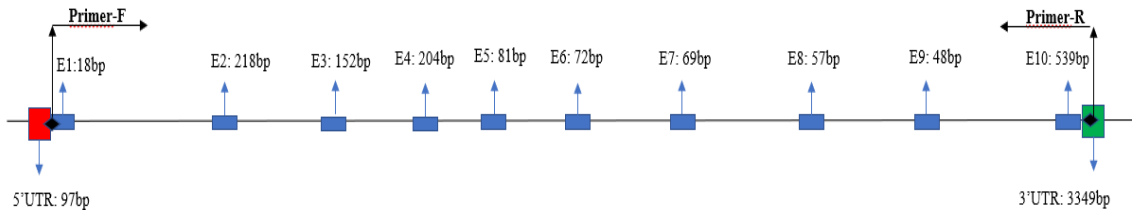
inkübe edildi ve 1µL (200 units) M-MLV ters transkriptaz enzimi eklendi. 25°C’de 10 dk, 37°C’de 50 dk, 70°C’de 10 dk inkübe edilerek +4°C’ye soğutuldu.

3.2.4.1. Bifenotipik akut lösemi hastalarında prognostik öneme sahip olan translokasyonların belirlenmesi

MPAL hastalarında, ALL ve AML ile ilişkilendirilmiş, prognostik öneme sahip translokasyonların belirlenebilmesi için, hedef genlere yönelik füzyon primerleri kullanıldı (van-Dongen ve ark.,1999). t(4;11)(q21;q23) *MLL-AF4* füzyon geni; t(9;22)(q34;q11) *BCR-ABL1* füzyon geni; t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1* füzyon geni , inv(16)(p13q22) *CBFB-MYH11* füzyon geni, t(15;17)(q24;q21) *PML-RARA* füzyon geni, t(8;21)(q22;q22) *AML1-ETO* füzyon geni qRT-PZR ile, t(1;19)(q23;p13) *TCF3-PBX1* füzyon geni RT-PZR ile pozitif kontrol plazmitleri veya pozitif hasta örnekleri kullanılarak belirlendi.

3.2.4.2. Bifenotipik akut lösemi hastalarındaki prognostik öneme sahip yeniden düzenlenmelerin belirlenmesi

Hastalarda *DUX4*-yeniden düzenlenmelerindeki *ERG* delesyonlarını tanımlamak için, *ERG* geninin B hücrelerinde en çok eksprese olan NM_182918.3 transkriptine spesifik primerlerin tasarımları yapıldı (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: *ERG* delesyonlarının belirlenmesi için primer tasarımı

ERG geninin tüm ekzonlarını kapsayacak şekilde ileri ve geri primerler tasarlandı. E:ekzon, UTR:çevrilmeyen bölge, bp:baz çifti

cDNA’sı bulunan 38 hasta (n=38) örneği ile *DUX4-IGH* füzyonu taşıyan ve *ERG* delesyonu bulunan pre-B-ALL hücre hattı NALM6 (n=1) pozitif kontrol olarak kullanılarak konvansiyonel PZR yapıldı (Şekil 3-4 ve Şekil 3-5).

		1x	38x
	dH ₂ O	14,25µl	541,5µl
10x	Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5µl	95µl
25mM	MgCl ₂	2µl	76µl
2,5mM	dNTP Mix	2µl	76µl
5µM	Primer_F	1µl	38µl
5µM	Primer_R	1µl	38µl
5U/µl	Taq Polimeraz	0,25µl	9,5µl
	cDNA	2µl	

Şekil 3-4: *DUX4* yeniden düzenlenmelerinin tanımlanması için kullanılan PZR protokolü

Denatürasyon	95°C	10dk	1 Döngü
Amplifikasyon	95°C	30sn	35 döngü
	63°C	30sn	
	72°C	40sn	
Uzama	72°C	10dk	1 Döngü

Şekil 3-5: *DUX4* yeniden düzenlenmelerinin tanımlanması için kullanılan PZR termal döngü sıcaklıkları

3.2.4.3. Bifenotipik akut lösemi hastalarındaki prognostik öneme sahip mutasyon ve delesyonların belirlenmesi

FLT3-ITD ve *FLT3*-D835 mutasyon taraması

Hastaların DNA örnekleri kullanılarak (n=38) *FLT3*-ITD ve *FLT3*-D835 mutasyonlarının taranması için hedef genlere yönelik primerler kullanılarak RT-PZR yapıldı (116) (Şekil 3-6 ve Şekil 3-8). PZR sonrası ITD mutasyonu için elde edilen ürünler %4 agaroz jel elektroforezinde yürütülerek analiz edildi. Duplikasyon taşımayan örnekler 329bp uzunluğundadır.

		1x	38x
	dH ₂ O	17,3µl	657,4µl
10x	Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5µl	95µl
25mM	MgCl ₂	1µl	38µl
2,5mM	dNTP Mix	2µl	76µl
10µM	Primer_F	0,5µl	19µl
10µM	Primer_R	0,5µl	19µl
5U/µl	Taq Polimeraz	0,1µl	3,8µl
400ng	DNA	1µl	

Şekil 3-6: FLT3-ITD mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü

D835 mutasyonu için elde edilen PZR ürünleri %2 agaroz jelde yürütülerek amplifiye olup olmadığı kontrol edilir (Şekil 3-7 ve Şekil 3-8). PZR ürünleri amplifiye olduysa enzim kesimi aşamasına geçilir. EcoRV restriksiyon enzimi DNA'nın GAT[^]ATC bölgelerini tanır. PZR sonrası amplifiye olan ürünler EcoRV enzimi ve R tampon çözeltisi ile 37°C de gece boyu bekletilerek enzim kesim protokolü uygulanır ve %2 agaroz jelde yürütülerek enzim kesiminin varlığı kontrol edilir.

		1x	38x
	dH ₂ O	34,8µl	1322,4µl
10x	Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	5µl	190µl
25mM	MgCl ₂	2µl	76µl
2,5mM	dNTP Mix	4µl	152µl
10µM	Primer_F	1µl	38µl
10µM	Primer_R	1µl	38µl
5U/µl	Taq Polimeraz	0,2µl	7,6µl
400ng	DNA	1µl	

Şekil 3-7: FLT3-D835 mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü

Denatürasyon	95°C	12dk	1 Döngü
Amplifikasyon	94°C	30sn	35 döngü
	59°C	1dk	
	72°C	2dk	
Uzama	72°C	10dk	1 Döngü

Şekil 3-8: *FLT3*-ITD ve *FLT3*-D835 mutasyonlarının belirlenmesi için PZR termal döngü sıcaklıkları

***NPM1* geninin 12. ekzonundaki mutasyonların taranması**

NPM1 geninin 12. ekzonundaki sıcak bölge mutasyonlarının taranması için spesifik primerler kullanıldı (116). *NPM1* geninin 12. ekzonu, hastaların DNA örnekleri (n=35) kullanılarak PZR yöntemi ile amplifiye edildi (Şekil 3-9 ve Şekil 3-10) ve %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Örnekler Sanger dizilemeye gönderilerek veriler, CLC Main Workbench 7.5'de analiz edildi.

		1x	38x
	dH ₂ O	11,8µl	448,4µl
10x	DreamTaq Buffer with MgCl ₂	5µl	190µl
2,5mM	dNTP Mix	4µl	152µl
5µM	Primer_F	1µl	38µl
5µM	Primer_R	1µl	38µl
5U/µl	Taq Polimeraz	0,2µl	7,6µl
75ng	DNA	2µl	

Şekil 3-9: *NPM1* geninin 12. ekzonundaki mutasyonların belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü

Denatürasyon	95°C	10dk	1 Döngü
Amplifikasyon	95°C	30sn	35 döngü
	63°C	30sn	
	72°C	40sn	
Uzama	72°C	10dk	1 Döngü

Şekil 3-10: *NPM1* geninin 12. ekzonundaki mutasyonların belirlenmesi için kullanılan PZR termal döngü sıcaklıkları

IKZF1 delesyonlarının taranması

IKZF1 delesyonları, IRON-II (Yeni Nesil Dizilemenin Laboratuvarlar Arası Sağlamlığı) çalışmasının ALL paketi tarafından tasarlanan, doğrulanan ve 96 kuyucuklu plakaya çakılı primer çiftleri ile çalışıldı (117). Hastaların DNA örnekleri (n=38) ve kontrol olarak pozitif hasta örnekleri kullanılarak *IKZF1* geni ekzon 2-7, ekzon 4-7, ekzon 4-8 delesyonları için RT-PZR ile tarandı (Şekil 3-11 ve Şekil 3-12) ve %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

		1x	38x
	dH ₂ O	15µl	494µl
10x	FastStart High Fidelity Reaction Buffer	2,5µl	95µl
25mM	MgCl ₂	4,5µl	171µl
10mM	dNTP Mix	0,5µl	19µl
	DMSO	1,25µl	47,5µl
5U/µl	FastStart High Fidelity Enzyme Blend	0,25µl	9,5µl
20ng	DNA	1µl	

Şekil 3-11: *IKZF1* delesyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü

Denatürasyon	95°C	10dk	1 Döngü
Amplifikasyon	94°C	30sn	35 döngü
	57°C	30sn	
	72°C	2dk	
Uzama	72°C	10dk	1 Döngü

Şekil 3-12: *IKZF1* delesyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR termal döngü sıcaklıkları

PAX5 P80R mutasyon taraması

PAX5 geninin üçüncü ekzon bölgesinde yer alan P80R mutasyonunun taranması için hedefe yönelik primerler kullanıldı (118). *PAX5* geninin üçüncü ekzonu, hastaların DNA örnekleri (n=20) kullanılarak PZR yöntemi ile amplifiye edildi (Şekil 3-13 ve Şekil 3-14) ve %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Hastaların üçü (n=3) *PAX5* üçüncü ekzon için amplifiye olmadı. Geriye kalan 17 örnek (n=17) Sanger dizilemeye gönderilerek, veriler CLC Main Workbench 7.5'de analiz edildi.

		1x	38x
	dH ₂ O	17,3µl	657,4µl
10x	Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5µl	95µl
25mM	MgCl ₂	1µl	38µl
2,5mM	dNTP Mix	2µl	76µl
10µM	Primer_F	0,5µl	19µl
10µM	Primer_R	0,5µl	19µl
5U/µl	Taq Polimeraz	0,1µl	3,8µl
75ng	DNA	1µl	

Şekil 3-13: PAX5-P80R mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR protokolü

Denatürasyon	95°C	10dk	1 Döngü
Amplifikasyon	94°C	30sn	35 döngü
	57°C	30sn	
	72°C	2dk	
Uzama	72°C	10dk	1 Döngü

Şekil 3-14: PAX5-P80R mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan PZR termal döngü sıcaklıkları

3.2.4.4. Bifenotipik akut lösemi hastalarındaki gen anlatımlarının belirlenmesi

Hastalardaki *CRLF2*, *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımlarının belirlenmesi için hedef genlere spesifik primerler tasarlanarak Roche Light Cycler 480 SYBR Green master miks protokolüne uygun olarak deneyler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3-15 ve Şekil 3-16).

		1x	38x
	dH ₂ O	6,8µl	258,4µl
10µM	Primer_F	0,6µl	22,8µl
10µM	Primer_R	0,6µl	22,8µl
2x	SYBR Green Master Mix	10µl	380µl
	cDNA	2µl	

Şekil 3-15: Gen anlatımlarının belirlenmesi için kullanılan SYBR Green PZR protokolü

Ön İnkübasyon	95°C	5dk	1 Döngü
Amplifikasyon	95°C	10sn	45 döngü
	58°C	20sn	
	72°C	10sn	
Soğuma	40°C	20sn	1 Döngü

Şekil 3-16: Gen anlatımlarının belirlenmesi için kullanılan SYBR Green PZR termal döngü sıcaklıkları

Gen Anlatım Analizleri ve Veri Görselleştirilmesi

Hastalardaki *CRLF2*, *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımlarının belirlenmesi için hedef genlere ve referans gen olarak kullanılan *CYPA* genine yönelik primerler tasarlandı. Roche Light Cycler 480 SYBR Green master miks kullanılarak yapılan çalışmada, hastaların cDNA örnekleri (n=38) referans gen ve hedef genler için duplike olarak çalışıldı. Hedef gen ve referans genin PZR etkinliği LightCycler (LightCycler software 4.1, Roche Life Science) yazılımı kullanılarak hesaplandı. Duplike örneklerin ortalama Ct değerleri alındı ve hedef genlerin anlatım düzeyleri, ΔCt metoduna göre normalize edilerek rölatif olarak hesaplandı (119).

Verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 8.0 yazılımı kullanılmıştır. Örneklerin gen anlatım verilerinin karşılaştırılması için MPAL hastaları B/Miyeloid, B/T/Miyeloid ve B/T alt gruplarına ayrıldı. T/Miyeloid hasta örneği 1 adet olduğu için istatistiksel analizlere dahil edilemedi. B/T fenotipinde olan P44 numaralı hastanın RNA örneği bittiği için *GATA1* gen anlatımı bakılamadı. Bu nedenle ısı haritası ile PCA analizlerine dahil edilmedi. P16 numaralı hasta ise bifenotipik olup sınıflandırılmadığı için alt grupların karşılaştırılmasında yer almadı.

B/Miyeloid, B/T/Miyeloid ve B/T grupları arasındaki gen anlatım ortalamaları arasındaki farklılığın anlamlılığını test etmek amacıyla one-way ANOVA testinin non-parametrik karşılığı olan Kruskal-Wallis test uygulandı. Gruplar arası çoklu karşılaştırma testi olarak Dunn çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Gen anlatım verileri ile klinik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise non-parametrik unpaired t-test uygulandı. İstatistiksel anlamlılık olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

MPAL hastalarının sağkalım analizleri, Graphpad Prism 8.0 yazılımı kullanılarak Kaplan-Meier sağkalım analizi ile yapıldı. Kaplan-Meier yöntemi, olaya kadar geçen süre verilerini analiz etmek için kullanılmaktadır. Hastaların genel sağ kalım süresi, hastanın tanı zamanından son kontrolüne kadar veya ölüm tarihine kadar olan süre olarak belirlendi. Relapssız sağkalım süresi olarak, relaps olan hastalarda relaps tarihine kadar geçen süre veya hasta remisyona girdikten sonra son kontrol tarihine kadar olan süre olarak belirlendi.

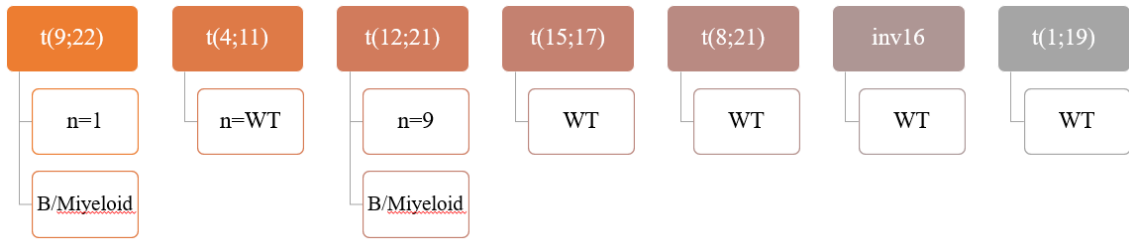
Ekspresyon verilerinin görselleştirilmesi için, Temel Bileşen Analizi (PCA) grafikleri ve ısı haritaları oluşturmayı sağlayan ClustVis web aracı kullanıldı (120).



4. BULGULAR

4.1. Bifenotipik akut lösemi hastalarında prognostik öneme sahip translokasyonların sıklığı

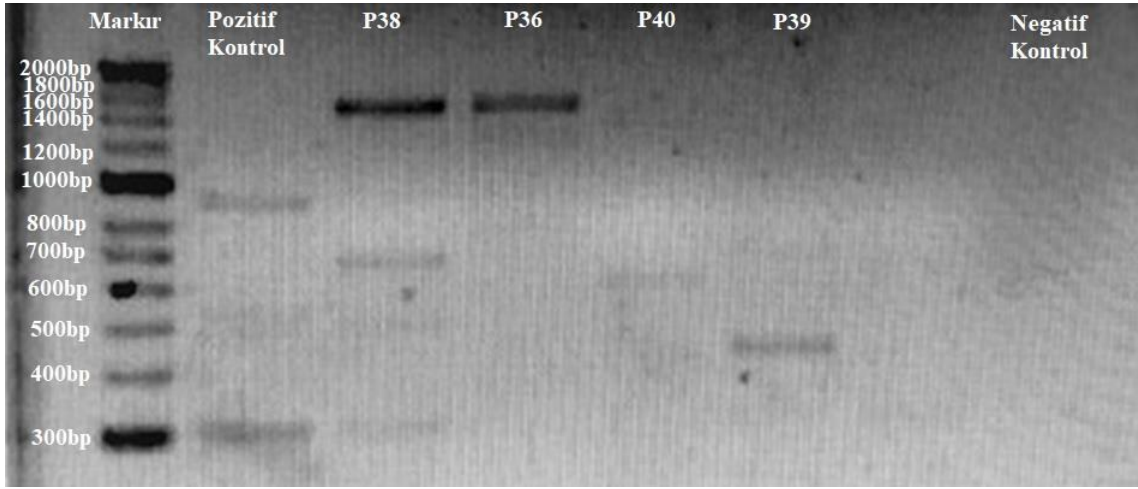
MPAL hastalarında ALL ve AML ile ilişkilendirilmiş, prognostik öneme sahip translokasyonlar tarandı. RNA'sı mevcut hastaların (n=38) %2,63'ünde (n=1) t(9;22) füzyonu, %23,68'inde (n=9) t(12;21) füzyonu saptandı. Hastaların (n=28) %73,68'i prognostik füzyonlar için yabanıl tip (wild-type, WT) olarak belirlendi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: MPAL hastalarında saptanan prognostik translokasyonlar

4.2. Bifenotipik akut lösemi hastalarında prognostik öneme sahip yeniden düzenlenmeler

MPAL hastalarında *DUX4*-yeniden düzenlenmesinin belirlenmesinde kullandığımız *ERG* delesyon taramasında belirteç olarak Hyperladder 50bp kullanıldı. cDNA örneği olan hastaların (n=38) %10,5'unda (n=4) *ERG* delesyonu saptandı (Şekil 4-2), %7,89'u (n=3) *ERG* delesyonları için yabanıl tip olarak belirlendi (Tablo 4-1), %81,5 (n=31) örneğin ise *ERG* delesyonu taşımadığı belirlendi.



Şekil 4-2: MPAL hastalarında *DUX4* yeniden düzenlenmesinin belirlenmesinde kullanılan PZR jel görüntüsü

Tablo 4-1: *DUX4* yeniden düzenlenmesi olan MPAL hastaları

Hasta Kodu	<i>ERG</i> Delesyonu	Fenotip
#P38	DEL+	B/Miyeloid
#P39	DEL+	B/T/Miyeloid
#P40	DEL+	B/Miyeloid
#P2	DEL+	B/Miyeloid
#P43	WT	B/T
#P19	WT	B/T
#P36	WT	B/Miyeloid

DUX4-yeniden düzenlenmesi tespit edilen hastaların klinik özellikleri incelendiğinde:

#P38: B/Miyeloid MPAL grubundadır. Hasta 2-10 yaş arasında, erkek, WBC<10000 hücre/μl'dir. Otuz üçüncü gün kemoterapi yanıtı vardır. Hepatomegalisi vardır, splenomegalisi ve lenfadenopatisi yoktur. MSS (merkezi sinir sistemi), BOS

(beyin omurilik sıvısı), mediasten veya testis tutulumu bulunmamaktadır. Standart risk grubundadır. Hastanın son durumu remisyonudur.

#P39: B/T/Miyeloid MPAL grubundadır. Hasta 15 aylık, kız, WBC:44700 hücre/ μ l, Hb:5,5 g/dL , Plt:77000 hücre/ μ l'dir. Sekizinci gün steroid yanıtı yoktur, 33. gün kemoterapi yanıtı vardır. Hepatomegalisi, splenomegalisi veya lenfadenopatisi yoktur. *DUX4*-yeniden düzenlenmesinin yanı sıra, *ZNF384-TCF3* ve *ZNF384-TAF15* füzyon genleri bulunmaktadır. Orta risk grubundadır. Hastanın son durumu remisyonudur.

#P40: B/Miyeloid MPAL grubundadır. Hasta 2-10 yaş arasında, kız, WBC<10000 hücre/ μ l'dir. Sekizinci gün steroid yanıtı ve 33. gün kemoterapi yanıtı vardır. Hepatomegalisi, splenomegalisi veya lenfadenopatisi yoktur. MSS, BOS veya mediasten tutulumu bulunmamaktadır. Relapsı yoktur. *DUX4*-yeniden düzenlenmesinin yanı sıra, *ZNF384-EP300* füzyon geni bulunmaktadır. Standart risk grubundadır. Hastanın son durumu remisyonudur.

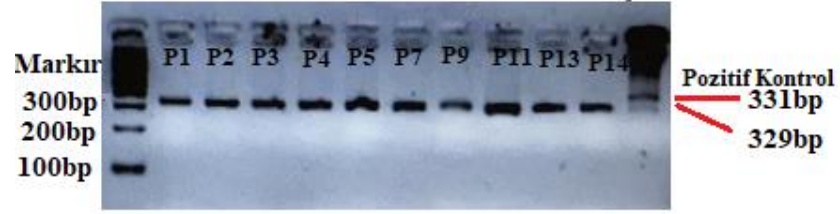
#P2: B/Miyeloid MPAL grubundadır. Hasta yedi yaşında, kız, WBC:3100 hücre/ μ l , Hb:9,1 g/dL , Plt:101000 hücre/ μ l'dir. Sekizinci gün steroid yanıtı ve 33. gün kemoterapi yanıtı vardır. MSS tutulumu yoktur. Karyotipte hipodiploidi saptanmıştır. *DUX4*-yeniden düzenlenmesinin yanı sıra, t(12;21)(p12;q22) *TEL-AML1* füzyon geni bulunmaktadır. Hastanın son durumu remisyonudur.

4.3. Bifenotipik akut lösemi hastalarındaki prognostik öneme sahip mutasyon ve delesyonlar

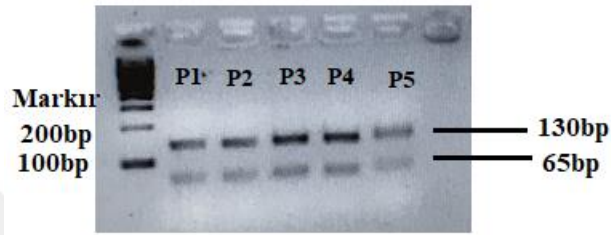
***FLT3*-ITD ve *FLT3*-D835 mutasyon taraması**

FLT3-ITD mutasyon taraması için, *FLT3* jukstamembran domainini kapsayan 14. ve 15. ekzon bölgesine hedefe yönelik primerler kullanılarak PZR ile amplifiye edildi. Markır olarak 100bp ladder kullanıldı ve %3'lük agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek, duplikasyon olmayan 329bp uzunluğunda bantlar elde edildi. Hastaların *FLT3*-ITD mutasyonu için yabanıl tip olduğu belirlendi (Şekil 4-3 A).

A)



B)



Şekil 4-3: A) *FLT3*-ITD mutasyon taraması örnek PZR jel görüntüsü B) *FLT3*-D385 mutasyon taraması için enzim kesimi jel görüntüsü

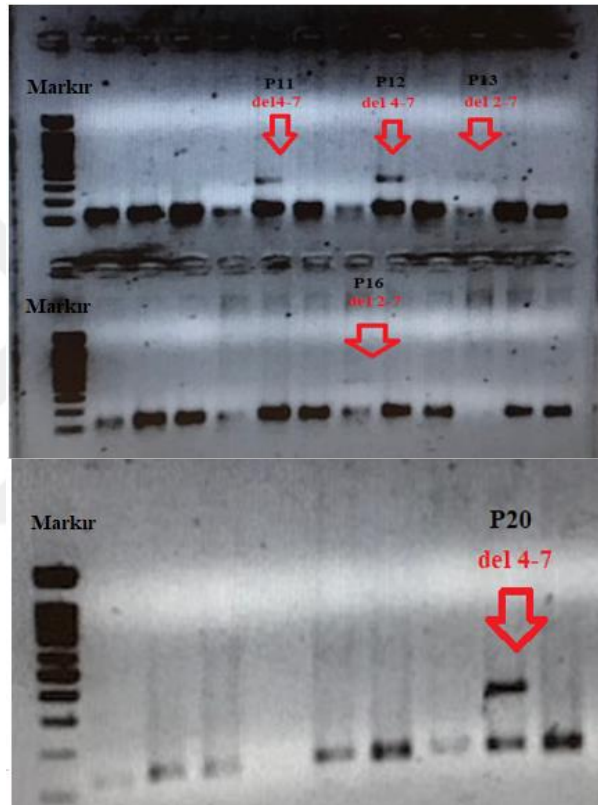
FLT3 geninin tirozin kinaz bölgesindeki D835Y nokta mutasyonu taraması için, *FLT3*'ün 20. ekzon bölgesine hedefe yönelik primerler kullanılarak PZR ile amplifiye edildi. Markır olarak 100bp ladder kullanılarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve 195 bp uzunluğunda bantlar elde edildi. Amplifiye edilen PZR ürünlerine, EcoRV restriksiyon enzim kesim protokolü uygulanarak, gece boyunca 37°C'de inkübe edildi ve %4'lük agaroz jel elektroforezine yüklenerak görüntülendi. Hastaların *FLT3*-D835Y mutasyonu için yabancı tip olduğu belirlendi (Şekil 4-3 B)(116).

***NPM1* geninin 12. ekzonundaki mutasyonların taranması**

MPAL hasta örnekleri (n=35), *NPM1* geninin 12. ekzonundaki mutasyonların taranması için örnekler Sanger dizilemeye gönderildi. Dizileme verileri, referans dizi ile karşılaştırarak varyasyonları tanımlayan bir yazılım olan CLC Main Workbench 7.5'de analiz edildi. Hastaların (n=35) *NPM1* mutasyonu için yabancı tip olarak belirlendi.

***IKZF1* delesyonlarının taraması**

MPAL hastaları (n=38) ve pozitif kontrol örnekleri *IKZF1* geni ekzon 2-7, ekzon 4-7, ekzon 4-8 delesyonları için PZR ile tarandı ve %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. İki hastada (n=2) ekzon 2-7 delesyonu, 3 hastada (n=3) ekzon 4-7 delesyonu (Tablo 4-2), hastaların tamamı (n=38) ekzon 4-8 delesyonu için wild-type olarak belirlendi (Şekil 4-4). Delesyon bant boyları yaklaşık 300bp olarak belirlendi (117).



Şekil 4-4:MPAL hastalarında *IKZF1* delesyonları

Tablo 4-2:IKZF1 delesyonu bulunan hastalar

Hasta Numarası	IKZF1 Delesyonu	Fenotip
#P11	Del4-7	B/Miyeloid
#P12	Del4-7	B/T
#P13	Del2-7	B/Miyeloid
#P16	Del2-7	NA
#P20	Del4-7	B/T

IKZF1 delesyonu tespit edilen hastaların klinik özellikleri incelendiğinde:

#P11: B/Miyeloid MPAL grubundadır. Hasta üç yaşında ve erkektir. WBC:4318 hücre/ μ l, Hb: 9,59 g/dL, Plt:177200 hücre/ μ l'dir. Splenomegalisi vardır, hepatomegalisi ve lenfadenopatisi yoktur.

#P12: B/T MPAL grubundadır. Hasta altı yaşında ve erkektir. WBC:6100 hücre/ μ l, Hb: 13,2 g/dL, Plt:47000 hücre/ μ l'dir. Otuz üçüncü gün kemoterapi yanıtı vardır. Hepatomegalisi vardır, splenomegali ve lenfadenopatisi yoktur. Relapsı yoktur. Son durumu remisyonudur.

#P13: B/Miyeloid MPAL grubundadır. Hasta beş yaşında ve erkektir. WBC:24000 hücre/ μ l, Hb:6,1 g/dL, Plt:40000 hücre/ μ l'dir. Sekizinci gün steroid yanıtı vardır. Otuz üçüncü gün kemoterapi yanıtı vardır. Orta risk grubundadır. Son durumu remisyonudur.

#P16: Bifenotipik ancak sınıflandırılmayan grupta yer almaktadır. Hasta beş yaşında ve kızdır. WBC:41500 hücre/ μ l, Hb:6 g/dL, Plt:50000 hücre/ μ l'dir. Hepatomegalisi, splenomegalisi ve lenfadenopatisi vardır. Orta risk grubundadır. Son durumu remisyonudur.

#P20: B/T MPAL grubundadır. Hasta sekiz yaşında ve erkektir. WBC:8700 hücre/ μ l, Hb:6 g/dL, Plt:50000 hücre/ μ l'dir. Otuz üçüncü gün kemoterapi yanıtı vardır. Relapsı vardır ve hasta kaybedilmiştir.

***PAX5-P80R* mutasyon taraması**

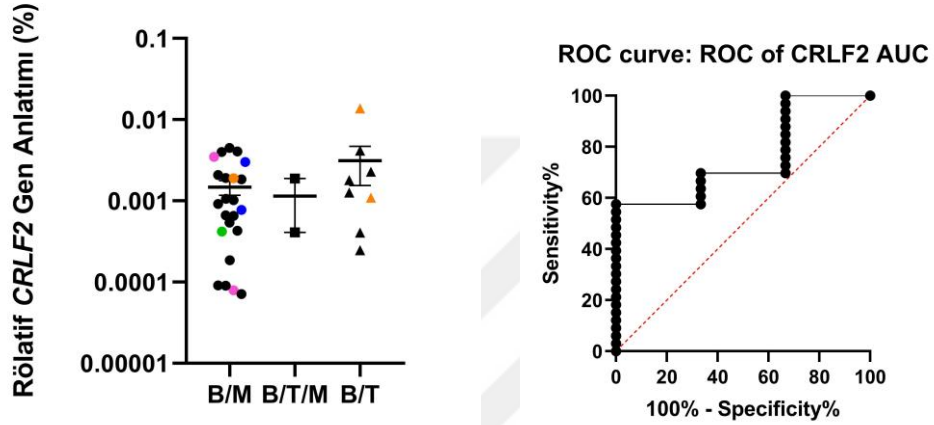
MPAL hasta örnekleri (n=17) *PAX5-P80R* mutasyon taraması için Sanger dizilemeye gönderildi. Dizileme verileri, referans dizi ile karşılaştırarak varyasyonları tanımlayan bir yazılım olan CLC Main Workbench 7.5'de analiz edildi. Hastaların (n=17) *PAX5-P80R* mutasyonu için yabancı tipte olduğu belirlendi.

MPAL hastalarının fenotiplerine göre taşıdıkları delesyonlar, yeniden düzenlenmeler, füzyonlar, mutasyonların ve klinik özellikler Tablo 4-3'de verildi.

4.4. Bifenotipik akut lösemi hastalarının prognostik öneme sahip gen anlatımları

4.4.1. *CRLF2* Gen anlatımı

MPAL hastaları (n=38), B/Miyeloid (n=25), B/T/Miyeloid (n=3) ve B/T (n=8) olarak üçe ayrılarak *CRLF2* gen anlatımları açısından karşılaştırıldı. T/Miyeloid hasta sayısı bir (n=1) olduğu için istatistiksel analize dahil edilmedi. Varyasyon taşıyan örnekler renklendirilerek işaretlendi (*IKZF1* del:turuncu, *DUX4r*:pembe, t(9;22):yeşil, *ZNF384r*:mavi).

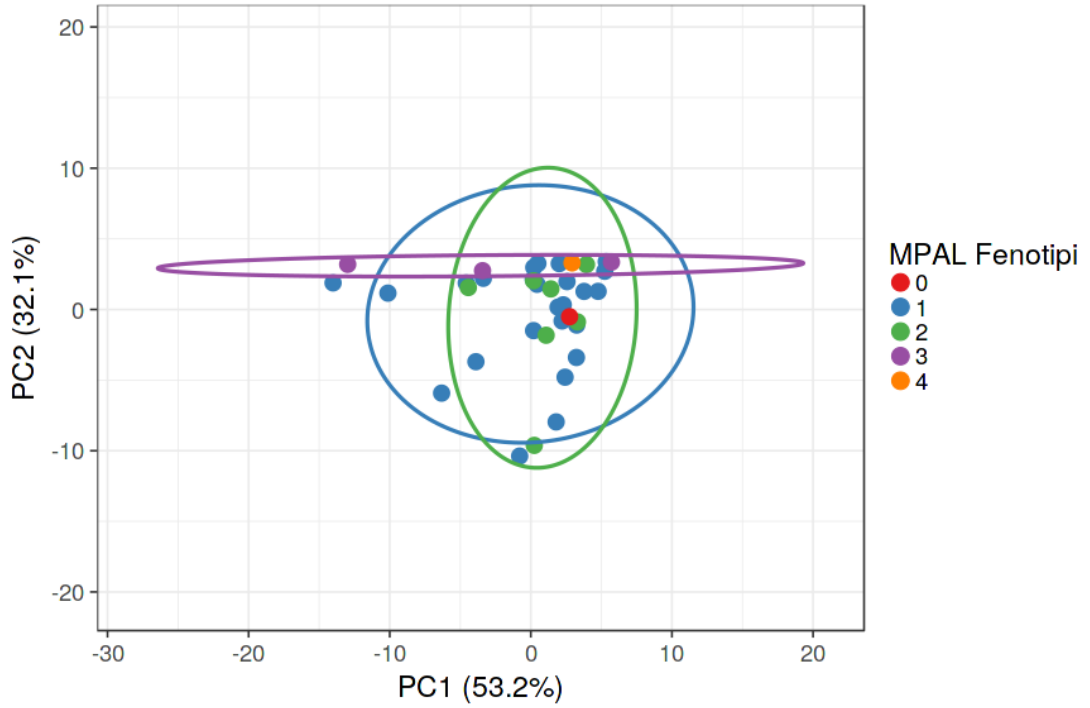


Şekil 4-5: MPAL hastalarının alt gruplarına göre *CRLF2* gen anlatımları

MPAL hasta alt grupları *CRLF2* gen anlatımı açısından karşılaştırılarak incelendi (Kruskal Wallis test $p=0,594$), (Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p>0,999$, B/M vs. B/T $p=0,988$, B/T/M vs. B/T $p>0,999$; AUC analizi $p=0,144$). Dört hasta örneği *CRLF2* geni için amplifiye olmadı (#P38, #P40, #P37, #P39). Gruplar arasında *CRLF2* gen anlatımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Şekil 4-5).

4.4.2. Lenfoid-Miyeloid Dönüşüm İle İlişkili Gen Anlatımları

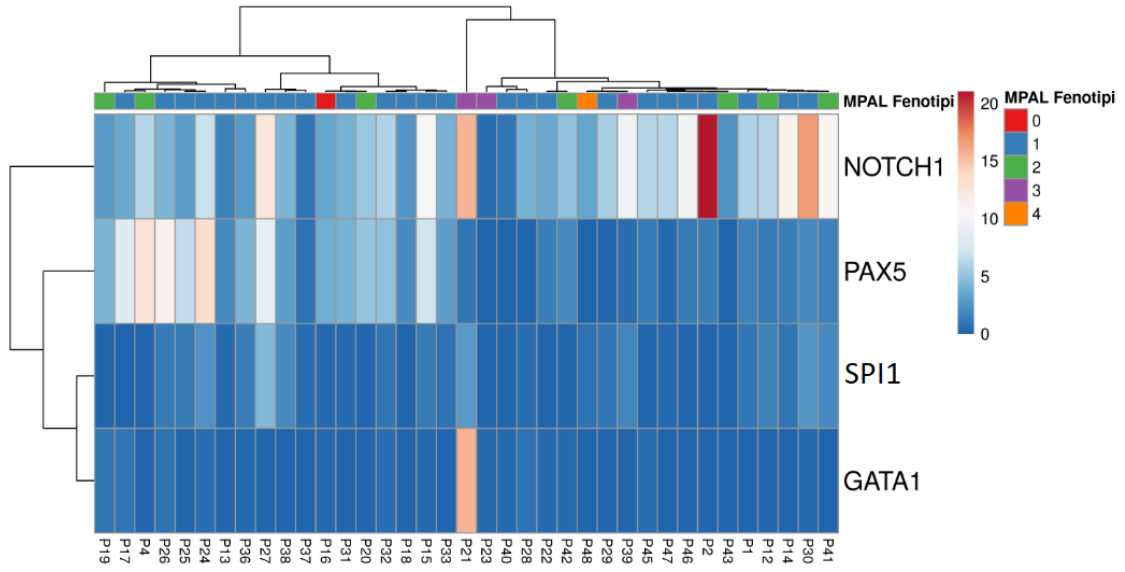
MPAL hastaları (n=37) B/Miyeloid, T/miyeloid, B/T/M ve B/T olarak dörde ayrılarak *PAX5*, *NOTCH1*, *GATA1* ve *SPI1* anlatımları için karşılaştırıldı. Bifenotipik olduğu bilinen ancak gruplandırılmayan bir hasta ve bir T/Miyeloid hastası, Kruskal Wallis ve Dunn istatistiksel testlerine dahil edilemedi, ancak PCA (Şekil 4-6) ve ısı haritası (Şekil 4-7) analizine dahil edildi.



Şekil 4-6: MPAL hastalarının temel bileşenler analizi (PCA)

PCA analizinde MPAL fenotip kodu; 0:Bifenotipik/ sınıflandırılmayan, 1: B/Miyeloid, 2: B/T, 3: B/T/Miyeloid, 4: T/Miyeloid.

Şekil 4-6’da gösterilen PCA analizinde satırlara ölçeklendirme uygulanmadı ve hesaplama için atamalı tekli değer ayrışımı kullanıldı. X ve Y eksenini, toplam varyansın sırasıyla %53,2’sini ve %32,1’ini açıklayan ana bileşen 1 ve ana bileşen 2’yi göstermektedir. Tahmin elipsleri, 0,95 olasılıkla, aynı gruptan olan örnekler elipsin içine düşecek şekildedir. PCA analizi sonucunda, *PAX5*, *NOTCH1*, *GATA1* ve *SPI1* gen anlatımları için MPAL gruplarının heterojen bir dağılım gösterdiği, gruplar arasında ilgili gen anlatımları için bir saçılım göstermediği görülmüştür.

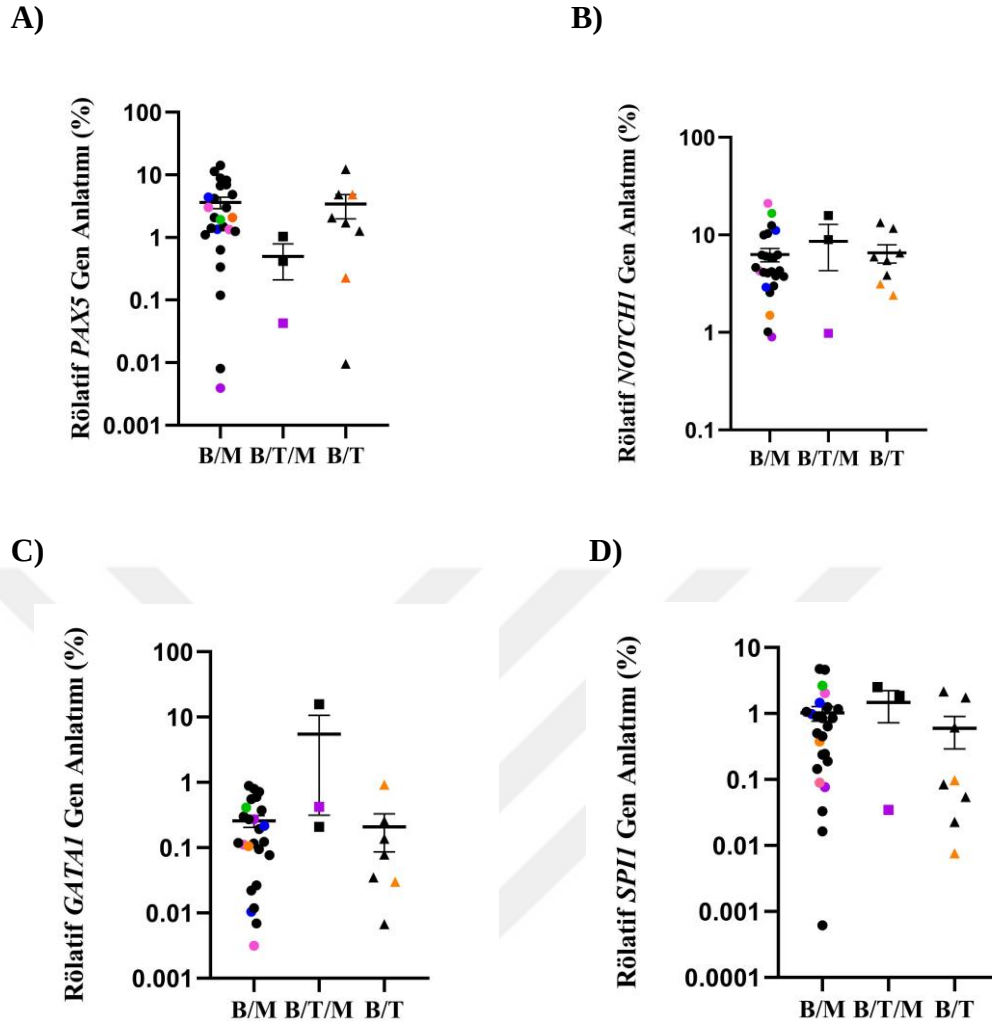


Şekil 4-7: MPAL hastalarının gen anlatım ısı haritası

Isı haritasında MPAL fenotip kodu; 0: Bifenotipik/ sınıflandırılmayan, 1: B/Miyeloid, 2: B/T, 3: B/T/Miyeloid, 4: T/Miyeloid.

Isı haritası, renk gradyanı kullanarak hücrelerdeki değerleri görselleştiren bir veri matrisidir. Bu, matristeki en büyük ve en küçük değerlere genel bakış sağlar. Matrisin satırları ve/veya sütunlar kümelenir, böylece satır veya sütun kümelerindeki örneklem gruplarının birbiriyle örtüşüp örtüşmediğini veya ayrı kümeler oluşturup oluşturmadığını görmek mümkün olmaktadır.

Şekil 4-7’de gösterilen MPAL hastalarının gen anlatım ısı haritası oluşturulurken, satırlara ölçekleme uygulanmadı. Satırlar, Manhattan mesafesi ve ortalama bağlantı kullanılarak kümelendi. Sütunlar ise, korelasyon mesafesi ve ortalama bağlantı kullanılarak kümelendi. MPAL hastalarının *PAX5* ve *NOTCH1* gen anlatımlarına göre iki gruba kümelendiği görülürken, *GATA1* ve *SPI1* gen anlatımları açısından bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. PCA analizine paralel olarak, MPAL fenotiplerine göre spesifik bir kümelenme görülmemiştir.



Şekil 4-8: MPAL alt gruplarında *PAX5*, *NOTCH1*, *GATA1* ve *SPI1* gen anlatımı

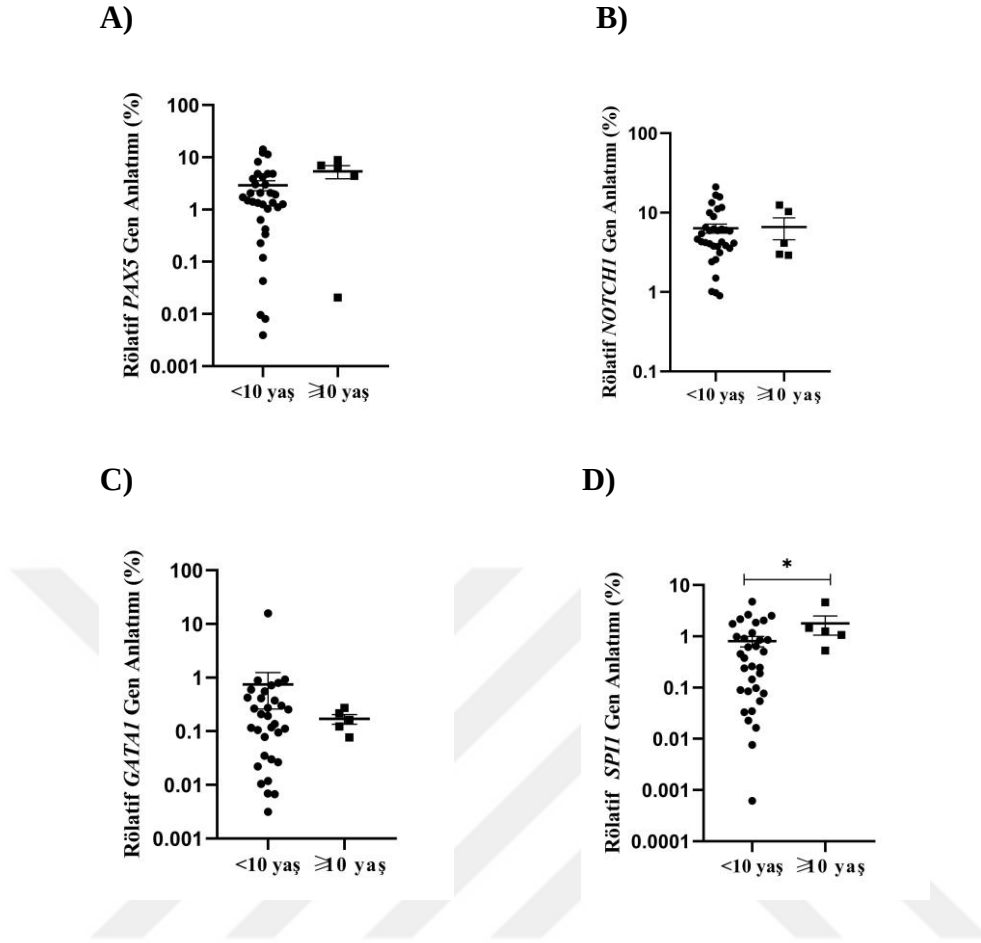
MPAL alt grupları *PAX5*, *NOTCH1*, *GATA1* ve *SPI1* gen anlatımları açısından karşılaştırılarak incelendi. A) *PAX5* (Kruskal Wallis test $p=0,156$), (Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p=0,163$, B/M vs. B/T $p>0,999$, B/T/M vs. B/T $p=0,316$). B) *NOTCH1* (Kruskal Wallis test $p=0,848$), (Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p>0,999$, B/M vs. B/T $p>0,999$, B/T/M vs. B/T $p>0,999$). C) *GATA1* (Kruskal Wallis test $p=0,187$), (Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p=0,336$, B/M vs. B/T $p>0,999$, B/T/M vs. B/T $p=0,210$). D) *SPI1* (Kruskal Wallis test $p=0,351$), (Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p>0,999$, B/M vs. B/T $p=0,663$, B/T/M vs. B/T $p=0,640$). Varyasyon taşıyan örnekler renklendirilmiştir; *IKZF1del*: turuncu, *DUX4r*: pembe, *t(9;22)*: yeşil, *ZNF384r*: mavi. Hata çubukları SEM'i (Ortalamanın standart hatası) temsil etmektedir.

Şekil 4-8’de MPAL hastaları B/Miyeloid, B/T ve B/T/Miyeloid olarak 3 gruba ayrılarak *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatım seviyeleri karşılaştırıldı. Hasta alt gruplarında, *PAX5*, *NOTCH1*, *GATA1* ve *SPI1* gen anlatımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. (*PAX5* (Kruskal Wallis test $p=0,156$ ve Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p=0,163$, B/M vs. B/T $p>0,999$, B/T/M vs. B/T $p=0,316$), *NOTCH1* (Kruskal Wallis test $p=0,848$), (Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p>0,999$, B/M vs. B/T $p>0,999$, B/T/M vs. B/T $p>0,999$), *GATA1* (Kruskal Wallis test $p=0,187$ ve Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p=0,336$, B/M vs. B/T $p>0,999$, B/T/M vs. B/T $p=0,210$), *SPI1* (Kruskal Wallis test $p=0,351$ ve Dunn Çoklu Karşılaştırma testi: B/M vs. B/T/M $p>0,999$, B/M vs. B/T $p=0,663$, B/T/M vs. B/T $p=0,640$)).

4.4.3. Gen Anlatım Verilerinin Klinik Değişkenler ile İncelenmesi

MPAL hasta grubumuz yaş, cinsiyet, beyaz kan hücre sayısı, organ tutulumu, MSS tutulumu, relaps durumları açısından incelendi ve hasta alt gruplarındaki (B/Miyeloid, B/T, B/T/Miyeloid) *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımlarının yaş, cinsiyet, beyaz kan hücre sayısı ile olası ilişkileri araştırıldı. Relaps, MSS tutulumu ve organ tutulumuna sahip birer hasta olduğu için istatistik analizlere dahil edilmedi.

Çocukluk çağı ALL’lerde iyileşme oranları artmasına rağmen, tanı yaşı prognostik bir faktör olarak ortaya çıkmaya devam etmektedir. Bir yaş altı çocuklar ve on yaşından büyük çocukların prognozu bir-on yaş aralığında olanlara göre daha kötü seyretmektedir (150). Bu nedenle hasta grubumuz, 1-10 yaş arası ve 10 yaş üzerinde olarak iki gruba ayrılarak *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımlarının yaşa göre karşılaştırılması yapıldı (Şekil 4-9).



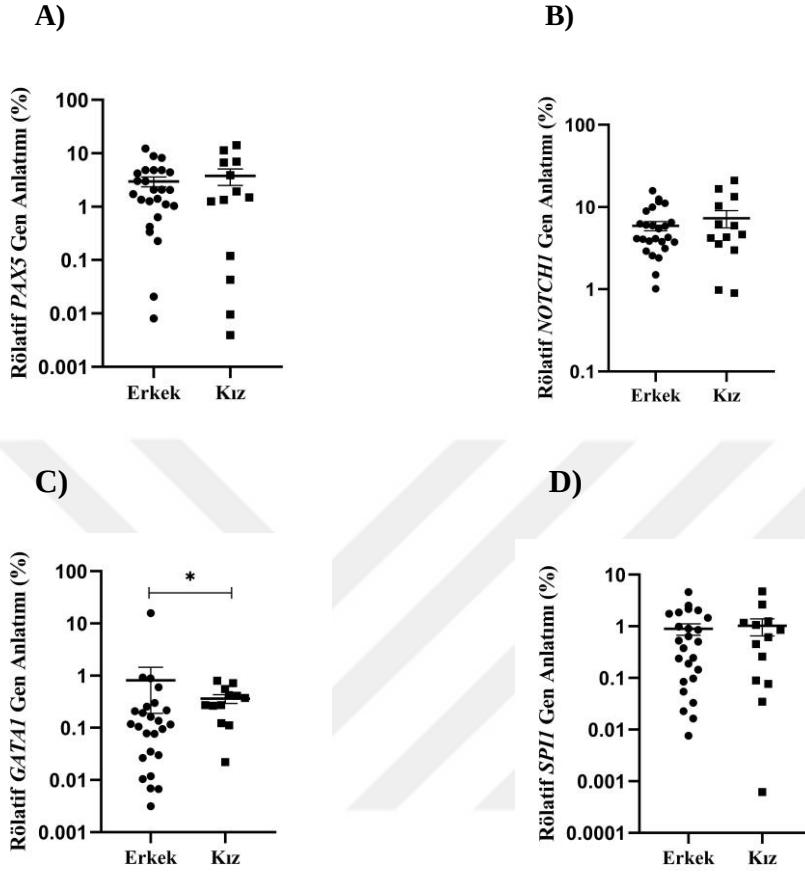
Şekil 4-9: MPAL hastalarının yaşa bağlı gen anlatımı karşılaştırmaları

MPAL hastalarında belirlenen *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımları <10 yaş ve ≥10 yaş gruplarında karşılaştırıldı. On yaş altındaki hasta sayısı n=33, ≥10 yaş hasta sayısı n=5’dir. A) *PAX5*, B) *NOTCH1* ve D) *GATA1* gen anlatımlarında istatistiksel olarak yaşa bağlı bir farklılık bulunmazken (sırasıyla p=0,146; p=0,933; p=0,952), D) *SPI1* gen anlatımının <10 yaş hastalarda ≥10 yaş grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (p=0,049).

Şekil 4-9’da MPAL hastalarında belirlenen *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımları <10 yaş ve ≥10 yaş gruplarında karşılaştırıldı. *SPI1* gen anlatımı yaşa bağlı olarak gen anlatım farklılığı gösterirken (p=0,049), *PAX5*, *NOTCH1* ve *GATA1* gen anlatımlarında yaşa bağlı bir farklılık bulunmamıştır (sırasıyla p=0,146; p=0,933; p=0,952).

Çocukluk çağı ALL’de erkeklerde kızlara kıyasla daha yüksek bir insidans oranı görülmekle birlikte relaps ve sekonder malignitelerin de daha sık görüldüğü

bildirilmiştir (121). Bu nedenle hasta grubumuzda, *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımlarının cinsiyete göre karşılaştırılması yapılmıştır (Şekil 4-10).



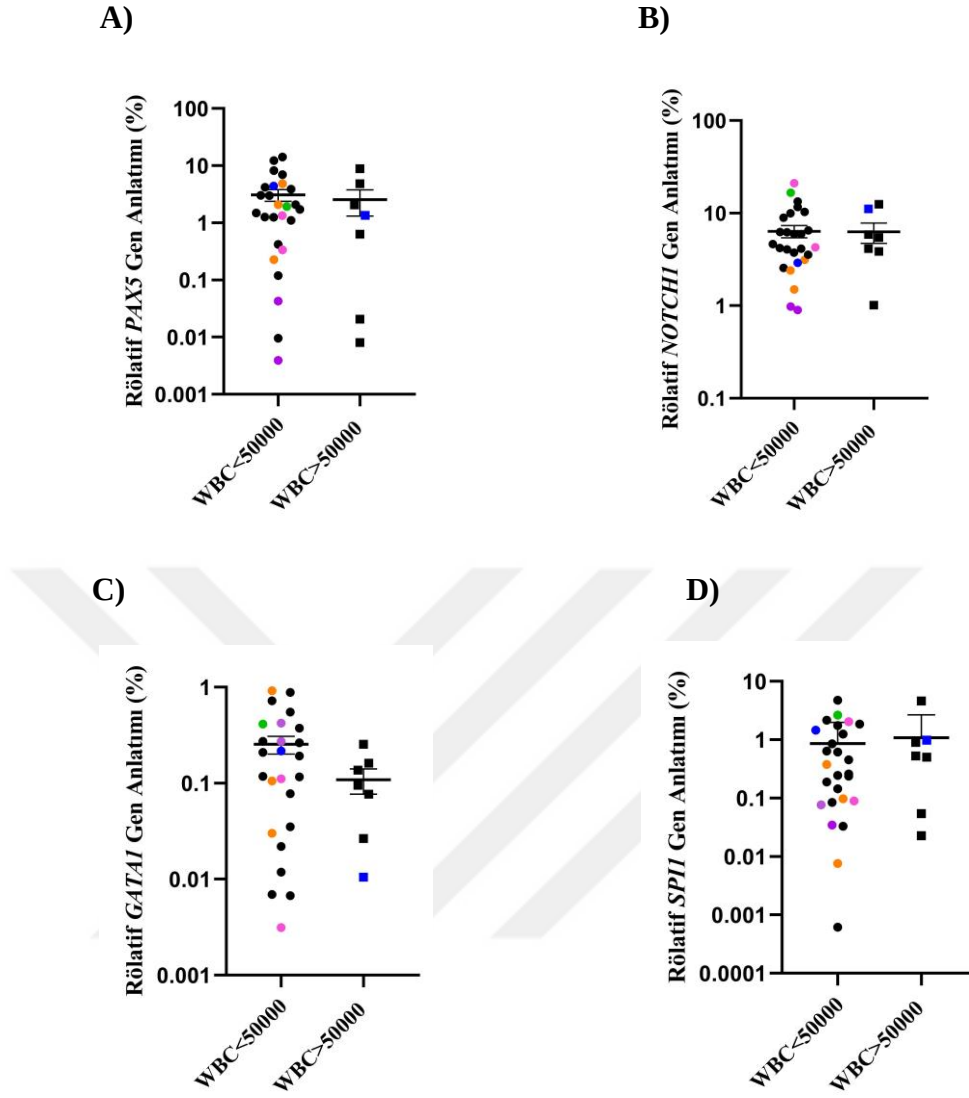
Şekil 4-10: MPAL hastalarının cinsiyete göre gen anlatım karşılaştırmaları

MPAL hastalarındaki *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımları cinsiyete göre karşılaştırılmıştır. MPAL hastalarındaki cinsiyete göre gen anlatımlarının karşılaştırma grafiklerinde hastalarda cinsiyete bağlı A)*PAX5*, B)*NOTCH1* ve D)*SPI1* gen anlatımları açısından istatistiksel anlamlı bir fark belirlenemezken (sırasıyla $p=0,831$; $p=0,670$; $p=0,808$), C) *GATA1*'de cinsiyete bağlı gen anlatım farklılığı belirlendi ($p=0,024$).

Şekil 4-10'da MPAL hastalarının *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımları cinsiyete göre karşılaştırıldı. Erkek hasta sayısı 25 ($n=25$), kız hasta sayısı 13 ($n=13$)'dür. *GATA1*'de cinsiyete bağlı gen anlatım farklılığı belirlenirken ($p=0,024$), *PAX5*, *NOTCH1* ve *SPI1* gen anlatımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla $p=0,831$; $p=0,670$; $p=0,808$).

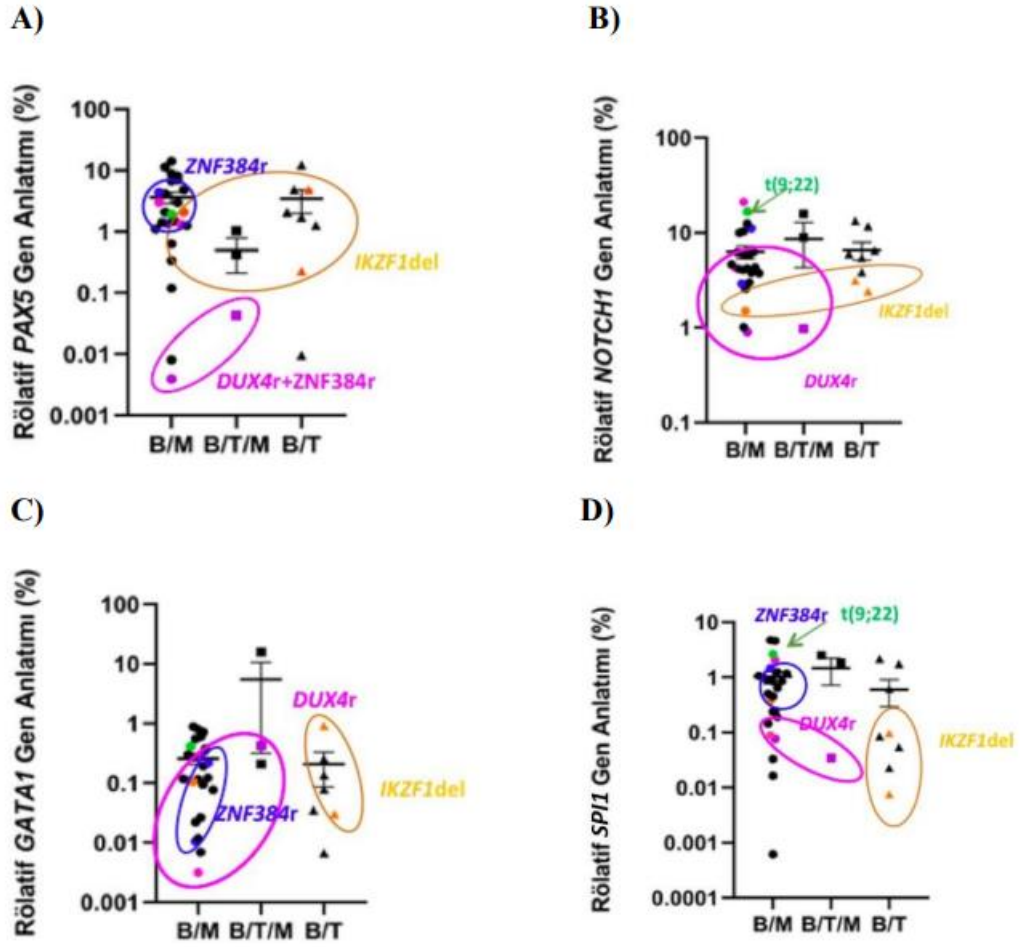
ALL’lerde tanı anındaki WBC sayısı başlıca prognostik faktörlerden biridir ve WBC sayısının 50000 hücre/ μ l’den daha az olması iyi prognostik belirteçken, 50000 hücre/ μ l üzerindeki WBC sayıları artan relaps riski ile ilişkilidir ve bu hastalara daha yoğun kemoterapi uygulanmaktadır (122). MPAL hastalarındaki WBC sayısının *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatım seviyelerine etkisini belirlemek için hastalardaki WBC sayısı 50000 hücre/ μ l’nin üstü ve altı olarak iki gruba ayrılarak incelendi.

Şekil 4-11’de MPAL hastaları WBC sayılarına göre (<50000 hücre/ μ l ve >50000 hücre/ μ l) *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımları için karşılaştırıldı. Hasta grubumuzda WBC<50000 hücre/ μ l olan 28 (n=28) hasta, WBC sayısı >50000 hücre/ μ l olan yedi (n=7) hasta bulunmaktadır. *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımlarının hastalardaki WBC sayısına bağlı bir farklılığı olmadığı belirlendi (*PAX5* p=0,682; *NOTCH1* p=0,914; *SPI1* p=0,812; *GATA1* p=0,257).



Şekil 4-11: MPAL hastalarının WBC sayısına göre gen anlatım kar ıla tırmaları

MPAL hastaları WBC sayılarına göre (<50000 hücre/ μ l ve >50000 hücre/ μ l) *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımları için kar ıla tırıldı. WBC<50000 hücre/ μ l olan 28 (n=28) hasta, WBC sayısı >50000 hücre/ μ l olan yedi (n=7) hasta vardır. Hastalarda WBC sayısına bağlı gen anlatım farklılığı olmadığı belirlendi (*PAX5* p=0,6823; *NOTCH1* p=0,9143; *SPI1* p=0,8129; *GATA1* p=0,2576). Varyantların WBC sayısına etkisini görmek için varyasyon taşıyan örnekler renklendirilerek işaretlendi; *IKZF1*del: turuncu, *DUX4*r: pembe, t(9;22): yeşil, *ZNF384*r: mavi., WBC: beyaz kan hücresi



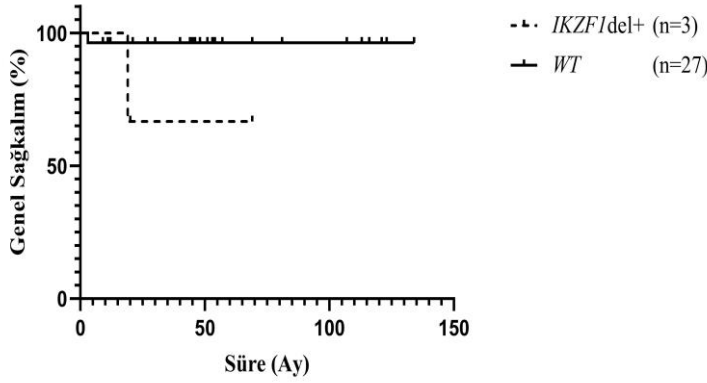
Şekil 4-12: MPAL hastalarında bulunan varyantların gen anlatımına etkisi

MPAL hastalarında bulunan *DUX4r*, *IKZF1* delesyonu, *ZNF384r* ve *t(9;22)*'nin A)PAX5, B)NOTCH1, C)GATA1, D)SPI1 gen anlatımına etkisi incelendi.

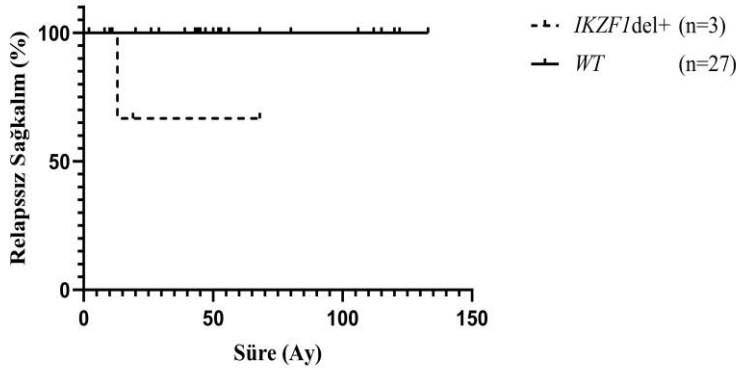
Şekil 4-12'de MPAL hastalarından bulunan varyantların gen anlatımına etkisi incelendiğinde, fenotiplere spesifik bir anlatım görülmemekle beraber MPAL hastalarının sahip oldukları varyasyonların doğrudan ya da dolaylı mekanizmalar ile gen anlatımlarını etkilediği ve değiştirdiği gösterilmiştir. *IKZF1* delesyonu ve *DUX4r*-yeniden düzenlenmesi (*DUX4r*) tespit edilen hastalarda *NOTCH1* ve *SPI1* anlatım düşüklüğü, *t(9;22)* tespit edilen hastada *NOTCH1* anlatımında artış, *DUX4r* tespit edilen hastalarda *PAX5* gen anlatım düşüklüğü, *ZNF384r* tespit edilen hastalarda *GATA1* gen anlatım düşüklüğü görülmektedir.

Şekil 4-13’de MPAL hastalarında bulunan *IKZF1* delesyonlarının genel sağkalım ve relapssız sağkalım üzerine olan etkisi incelendi. *IKZF1* delesyonlarının, hastaların genel sağkalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenirken ($p=0,0734$ Log- Rank test), *IKZF1* delesyonu taşıyan hastaların relapssız sağkalımlarının anlamlı ölçüde kısaldığı görüldü ($p=0,0056$ Log-Rank test).

A)



B)

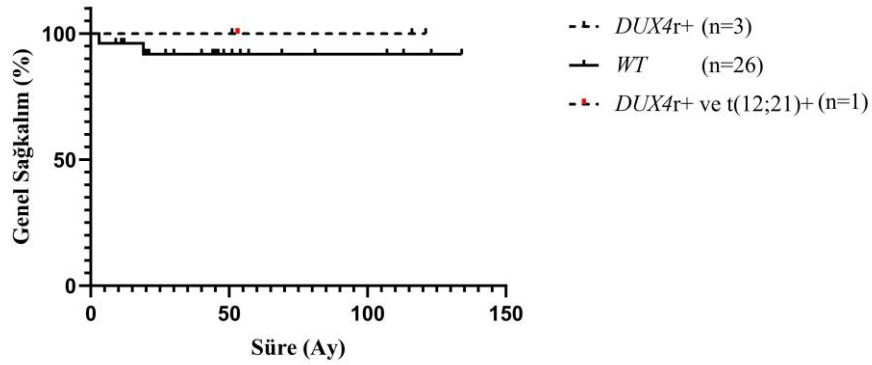


Şekil 4-13: *IKZF1* delesyonu olan hastaların genel sağkalım ve relapssız sağkalım grafikleri

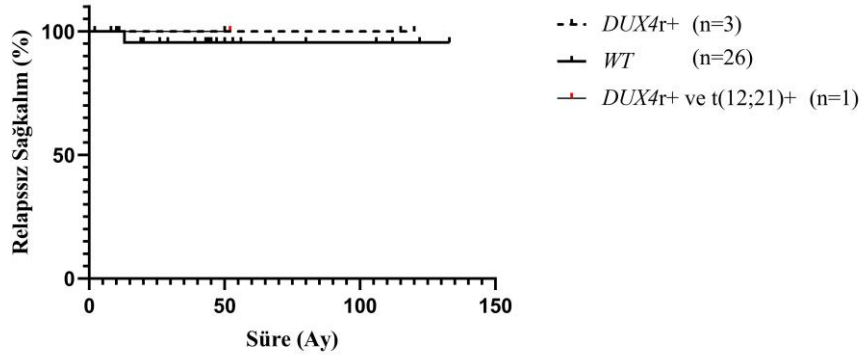
IKZF1 delesyonunun MPAL hastalarındaki A)genel sağkalım B)relapssız sağkalım üzerine olan etkisi incelendi. *IKZF1* delesyonunun, hastaların genel sağkalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenirken ($p=0,073$ Log-Rank test), *IKZF1* delesyonu taşıyan hastaların relapssız sağkalımlarının anlamlı ölçüde kısaldığı görüldü ($p=0,005$ Log-Rank test).

MPAL hastalarındaki *DUX4*-yeniden düzenlenmesinin, hastaların genel sağkalımı, relapssız sağkalımı üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 4-13). *DUX4*-yeniden düzenlenmesinin, hastaların genel sağkalımı ($p=0,845$ Log-Rank test) ve relapssız sağkalımı ($p=0,913$ Log-Rank test) üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi.

A)



B)

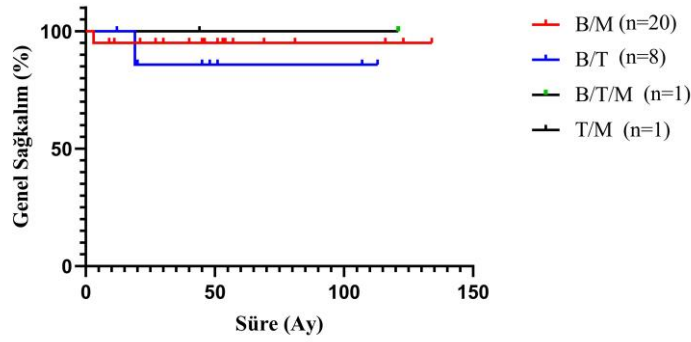


Şekil 4-14: *DUX4*-yeniden düzenlenmesini taşıyan hastaların genel sağkalım ve relapssız sağkalım grafikleri

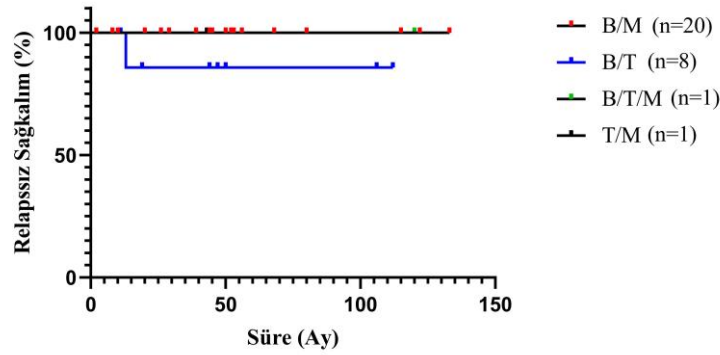
DUX4-yeniden düzenlenmesinin MPAL hastalarındaki A)genel sağkalım, B)relapssız sağkalım üzerine olan etkisi incelendi. *DUX4*-yeniden düzenlenmesinin, hastaların genel sağkalımı ($p=0,8455$ Log-Rank test) ve relapssız sağkalımı ($p=0,9131$ Log-Rank test) üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi.

Farklı MPAL fenotiplerinin hastalardaki genel sağkalım ve relapssız sağkalım üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 4-14). MPAL alt gruplarındaki farklılığın hem genel sağkalım hem de relapssız sağkalım üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi (sırasıyla $p=0,891$, $p=0,437$ Log-Rank test).

A)



B)



Şekil 4-15: MPAL alt gruplarının genel sağkalım ve relapssız sağkalım grafikleri

MPAL alt gruplarının A)genel sağkalım B) relapssız sağkalım üzerine olan etkisi incelendi. MPAL alt gruplarının hem genel sağkalım hem de relapssız sağkalım üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi (sırasıyla $p=0,891$, $p=0,437$ Log-Rank test).

5. TARTIŞMA

Hematopoez sürecinde kan hücrelerinin olgunlaşması ve farklılaşması, hücre soyunu tanımlayan spesifik belirteçlerin ifadesiyle ilerler. Bu durum, transkripsiyon faktörleri ağı tarafından yönlendirilen, sıkı bir şekilde düzenlenmiş, çok aşamalı, hiyerarşik bir süreçtir (3). Akut lösemiler, lenfoid veya miyeloid progenitör hücrelerin bir neoplazmidir. Anöploidi, kromozomal yeniden düzenlemeler, DNA kopya sayısı değişimleri ve mutasyonlara neden olan genetik ve epigenetik değişiklikler ile karakterize edilen çok sayıda farklı alt tip içerir (123). Akut lösemilerin genetik karakterizasyonu genellikle sitogenetik analizler ve spesifik translokasyonların veya varyasyonların moleküler tekniklerle tespitine dayanmaktadır. Güncel veriler ışığında ALL ve AML hastalarının moleküler risk sınıflaması için prognostik öneme sahip olduğu ortaya çıkan birçok yeni belirteç, yüksek risk grubundaki hastaların ayrıştırılması ve uygun tedavi protokolleri ile tedavi edilmesine imkan sağlamaktadır.

Bifenotipik akut lösemiler, multipotent primitif hücrelerden köken alırlar, bu nedenle geniş bir genetik çeşitliliğe sahiptir. MPAL'in çoğunluğu B-lenfoid/miyeloid olarak bulunurken (yaklaşık 2/3 vaka), T-lenfoid/miyeloid immünofenotip ikinci en yaygın görülen alt tiptir. Nadiren B-lenfoid/T-lenfoid veya B-lenfoid/T-lenfoid/Miyeloid alt tipleri olarak ortaya çıkabilir (102,16). Hasta grubumuz, 29'u B/Miyeloid, 11'i B/T, üçü (n=3) B/T/Miyeloid, biri (n=1) T/Miyeloid, ikisi (n=2) ise bifenotipik ancak sınıflandırılmayan olacak şekilde dört MPAL alt grubuna ayrılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, MPAL hastaları füzyon genler, tek gen varyasyonları, delesyonlar ve soy değişiminde rol oynayan kritik genlerdeki anlatım değişiklikleri bakımından incelenmiştir. Öncelikle akut lösemilerde (ALL ve AML) prognostik öneme sahip füzyon genlerin MPAL hasta grubundaki durumu araştırılmıştır. MPAL olgularının %64-87'sinde anormal karyotipler gözlenmektedir. En sık tekrarlayan kromozomal anomaliler t(9;22) ve t(v;11q23) olup, tipik olarak bir B/miyeloid fenotipi ile ilişkilidir. WHO 2016 MPAL sınıflandırmasına; MPAL ile t(9;22)(q34.1;q11.2) *BCR-ABL1* ve MPAL ile t(v;11q23.3); *KMT2A*-yeniden düzenlenmeleri olarak 2 yeni alt grup olarak eklenmiştir (102). Hasta grubumuzun %2,1'inde (n=1) t(9;22)(q34.1;q11.2) translokasyonu belirlenmiştir. Diğer gruptan sadece en sık görülen t(4;11) bakılmış ve buna göre *KMT2A*-yeniden düzenlenmeleri

olan hasta bulunmamaktadır şeklinde değerlendirilmiştir. Kötü prognoz belirteci olan kromozomal yeniden düzenlenmelere sahip MPAL yüksek risk grubunda karakterize edilir. Pediatrik MPAL'lerin yaklaşık %3'ünde t(9;22) pozitifliği görülmektedir. Kohortumuzdaki t(9;22) sıklığı literatür ile uyumludur. Ph+ MPAL olgularında tirozin kinaz inhibitörleri tedaviye dahil edilmektedir (16). Hasta grubumuzdaki Ph+ MPAL hastası remisyona giremeden kaybedilmiştir.

Hasta grubumuzun %19,1'inde (n=9) t(12;21)(p13;q22)(*ETV6-RUNX1*), %6,4'ünde (n=3) t(12;17)(p13;q12)(*TAF15-ZNF384*), %4,3'ünde (n=2) t(12;19)(p13;p13)(*TCF3-ZNF384*), %2,1'inde (n=1) t(12;22)(p13;q13)(*EP300-ZNF384*) saptanmıştır. Novakova ve arkadaşları, monositik soylara doğru erken geçişe sahip bir pediatrik BCP-ALL alt tipi tanımlamıştır. B-diğer ALL olarak isimlendirilen grupta *ZNF384r*, *PAX5-P80R* ve *DUX4r* varyasyonları taşıyan hastalarda monositik bir dönüşüm olduğu bildirilmiştir (124).

Tuğçe Sudutan, tez araştırmasında MPAL hasta grubundaki *ZNF384r* sıklığını %9,5 olarak bildirmektedir (125). Son çalışmalar, B/miyeloid MPAL'nin, en sık *ETV6* ve *PAX5* delesyonları ve B-ALL'ye benzer RNA ekspresyon paternleri ile B-ALL'ye benzer bir mutasyon profiline sahip olduğunu göstermiştir (97). *ZNF384* füzyonları, pediatrik B/miyeloid MPAL'nin yaklaşık olarak %40'ında bulunmaktadır. Bu da *ZNF384*'ün erken hematopoietik gelişimde ve *ZNF* füzyon partnerleri ile birleştirildiğinde malign hematopoietik öncülerde multipotent potansiyeli sürdürmede bir rolü olduğunu ima etmektedir (97). B-ALL grubunda teşhis edilen *ZNF384* yeniden düzenlenmelerinde yer alan füzyon ortakları, ikincil genomik değişiklikleri ve transkripsiyonel profilleri, B/miyeloid MPAL olarak teşhis edilen *ZNF384* yeniden düzenlenmiş lösemilerinkilerle aynıdır. Bu da, *ZNF384* yeniden düzenlenmesinin, değişken ve belirsiz soydan oluşan farklı bir lösemi alt tipini tanımladığını öne sürmektedir (126). *ZNF384* füzyonlarında prognoz füzyon partnerine göre değişmektedir. *ZNF384-EP300* füzyonu iyi prognoz ile ilişkilendirilirken, *TCF3-ZNF384* füzyonu sıklıkla geç relaps ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (97, 127). MPAL hasta grubumuzda *ZNF384-EP300* ve *ZNF384-TCF3* füzyonu taşıyan hastalar *DUX4*-yeniden düzenlenmesi de taşımaktadır. Literatürde *TCF3-ZNF384* füzyonu geç relaps ve orta düzeyde azalmış sağkalım ile ilişkili olmasına rağmen, bu hastada henüz relaps görülmemiş ve hastalıksız sağkalımı 120 aydır. *DUX4*-yeniden düzenlenmesinin

tıpkı *IKZF1* delesyonunun kötü prognostik etkisini ortadan kaldırdığı gibi, bu hastamızda da *DUX4* yeniden düzenlenmesi, *ZNF384-TCF3* füzyonunun prognostik etkisini olumlu yönde etkilemiş olabilir. Ancak böyle bir sonuca varabilmek için daha geniş kohortlarda analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. *EP300* veya *CREBBP* ile *ZNF384* yeniden düzenlemelerinin deneysel modellemesinde, K9 ve K27 rezidülerinde bozulmuş histon asetilasyonuna yol açan HDAC aktivitesinin azaldığını göstererek, HDAC inhibisyonu için başka bir potansiyel terapötik rolü de ortaya koymaktadır (128)

Lösemilerde bilinen alt grupların dışındaki bir grup hastanın, ayrı ve tek tip bir gen anlatım profili sergilediği mikrodizin tabanlı gen anlatımı çalışmaları ile saptanmıştır. Bu yeni lösemi alt grubunda *ERG* delesyonları yaygın olarak bulunmasına rağmen, bu delesyonların birincil genetik anomali olmadığı düşünülmektedir (115). *ERG* delesyonları, farklı gen anlatım profiline sahip tüm vakalarda belirlenememiş ve tanı zamanında subklonal olduğu, nüks zamanında kaybolduğu ya da tanıdan gelen genomik kırılma noktalarının korunmadığı bildirilmiştir. BCP-ALL'nin %4-5'inde *DUX4*-yeniden düzenlenmeleri olduğu bilinmektedir. *DUX4*-yeniden düzenlenmelerinde, *DUX4-IGH* füzyonunun oluşması sonucu kırılmış *DUX4 (tDUX4)* anlatımı meydana gelir. *tDUX4*; *ERG*'in 6. ve 7. ekzonları arasındaki intron bölgesine bağlanarak, *ERG*'in birinci ve beşinci ekzonları arasındaki bölgenin gen anlatımının kapanması sağlar ve alternatif transkripsiyon başlama bölgesi oluşturarak transkripsiyonun 6. ekzondan başlamasına neden olur. Ancak *ERG*'in DNA bağlanma bölgesi değişmediği için etkileşimde olduğu genlerle ilişkisi devam eder. *ERG*'in *RAG* ile etkileşimi ile *RAG* alternatif kırılma bölgeleri yaratarak *ERG*'in alternatif ekspresyonuna neden olmaktadır (129). Pediatrik BCP-ALL'lerin %4-7'ünde *ERGdel* görülürken (130), hasta grubumuzun %10,5'unda (n=4) *ERGdel* saptanmıştır, %7,9'u ise (n=3) *ERGdel* için yabancı tip olarak belirlenmiştir. Literatürde MPAL grubu ile yapılmış başka bir çalışma henüz bulunmamaktadır. ALL'de özellikle *DUX4*'ün yeniden düzenlenmiş alt tipinde, *ERG* delesyonları tekrarlar halinde ortaya çıkmaktadır. *DUX4* yeniden düzenlemesi, hem çocuklarda hem de yetişkinlerde iyi prognoz ilişkilidir. *IKZF1* delesyonlarının varlığı kötü prognoz belirteci olmasına rağmen buna ek olarak *ERG* delesyon varlığının, *IKZF1* delesyonu olan hastaların prognozunu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, *ERG* delesyonunun neredeyse yalnızca *DUX4* B-ALL'de gerçekleştiği bildirilmiştir. *DUX4*-yeniden düzenlenmelerinde oluşan *ERG* delesyonları, ikincil bir olayı temsil etmesine rağmen,

DUX4 alt tipindeki *ERG* delesyonunun yalnızca tesadüfen meydana gelen bir yolcu olayı olmadığını ve tedavi yanıtını etkilediği gösterilmiştir (115,131). Hasta grubumuzdaki *DUX4*-yeniden düzenlenmesi taşıyan hastaların survi analizleri sonucunda, *DUX4*-yeniden düzenlenmesi taşıyan ve taşımayan hastalar arasında hastalıksız ve genel sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

IKZF1 delesyonlarından tüm geni etkileyenler, ikinci ekzon ve/veya 8. ekzon dahil olmak üzere intragenik delesyonları, birinci ekzon ve 5' kopyalanmamış düzenleyici bölgelerin delesyonu haployetersizlik ile sonuçlanır. En yaygın olarak ekzon 4-7 delesyonları görülmektedir ve DNA-bağlama bölgesinin kaybına ve dominant-negatif izoformların oluşumuna yol açmaktadır. Bu durum IKAROS'un tümör baskılayıcı işlevini kaybetmesine neden olur (132). Hasta grubumuz *IKZF1* delesyonları için tarandığında, hastaların %13,2'sinde (n=5) *IKZF1* delesyonları saptanmıştır. Bu delesyonların %5,3'ünün (n=2) ekzon 2-7 delesyonu, %7,9'unun da (n=3) ekzon 4-7 delesyonu oluşturmaktadır. Yan ve arkadaşlarının, 31 erişkin MPAL hastasında yapmış olduğu array CGH çalışmasında, 31 hastanın 4'ünde (%13) *IKZF1* delesyonu saptanmıştır ve hastaların 4'ünün de Ph⁺ B/Miyeloid MPAL olduğunu bildirmiştir (133). Eckstein ve arkadaşları, 23 MPAL hastasının (pediatrik ve erişkin) tüm ekzom dizileme yöntemi ile taramıştır ve sadece bir pediatrik hastada *IKZF1* yanlış anlamlı mutasyonu saptamıştır (113). Takahashi ve arkadaşlarının 31 erişkin MPAL hastasını kopya sayısı değişimleri için taramış ve kopya sayısı değişimlerinin analizleri sonucunda, hastaların %3'ünde *IKZF1* geninde kopya sayısı kaybını veya delesyonlarını saptamıştır (105). *IKZF1* delesyonlarının ALL'de yüksek nüks riski ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (117). Çalışma grubumuzda bulunan B/T MPAL fenotipindeki hasta *IKZF1* ekzon 4-7 delesyonunu taşımaktadır ve nüksü bulunmaktadır. Diğer *IKZF1* delesyonu taşıyan hastaların relapsı bulunmamaktadır. Bu hastaların genel sağkalımı *IKZF1* delesyonları için yabancı tip ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ancak relapssız sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ALL tedavisine ilişkin bazı uluslararası çalışma grupları, BCP ALL hastaları için yüksek riskli tedavi stratejilerine *IKZF1* delesyonunu erkenden dahil ederken, diğerleri bu stratejiyi izlememiştir çünkü tek başına *IKZF1* delesyonlarının çok yüksek riskli tedavinin toksik yan etkilerine maruz kalacak kadar güçlü bir prognostik etkisinin olmadığını düşünmektedirler (134).

MPAL’lerde yapılan genomik çalışmalar, hastaların %12-30’unda *FLT3* geninin mutasyona uğradığını ortaya çıkarmıştır (135). *FLT3*, olgunlaşmamış hematopoietik hücreler tarafından eksprese edilen bir reseptör tirozin kinazdır. *FLT3* mutasyonu taşıyan hastalar kötü prognoza sahip olma eğilimindedir. Akut lösemilerde, çoğunlukla *FLT3*’ün jukstamembran domaini içindeki amino asitlerin küçük tandem kopyalarını içerir (*FLT3*-ITD) ve bu durum konstitütif tirozin kinaz aktivitesi ile sonuçlanır (136). *FLT3* mutasyonları, diğer sitogenetik ve genetik değişiklikler ile birlikte ortaya çıkabilir. Bunlar, tirozin kinazlardaki aktive edici mutasyonlar dahil olmak üzere hematopoietik progenitörlere proliferatif ve/veya hayatta kalma avantajı sağlayan *KIT* veya *RAS* mutasyonları ve *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* veya *NPM1* ve *DNMT3A* mutasyonları gibi hematopoietik farklılaşmayı bozanlar olarak gruplandırılırlar (137). Genomik araştırmalar ve metilasyon çalışmalarında, MPAL hastalarının ALL-benzeri ve AML-benzeri olarak ayrıldığı gösterilmiştir (97,105). Hasta grubumuzdaki örnekler, AML için prognostik önemi olan varyasyonlar açısından yabanıl tipte bulunmuştur. Bu da, hasta grubumuzun ALL-benzeri grupta kümелendiğini göstermektedir. AML olgularında sık görülen *FLT3*-ITD, *FLT3*-D835 ve *NPM1* 12. ekzon varyasyonları ile *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* füzyonlarının hasta grubumuzda saptanmaması bu MPAL olgularının fenotipik verisini de desteklemektedir.

Önceki çalışmalarda ALL hastalarında kromozomal yeniden düzenlemeye bağlı olarak *CRLF2* geninin aşırı anlatımının ALL onkogeneze ve kötü prognoza katkıda bulunduğu bildirilmiştir (138). *CRLF2* aşırı anlatımının görüldüğü ALL olgularının %43’ünde *IKZF1* delesyonları da bildirilmektedir (139). MPAL olgularının (B/Miyeloid, B/T, B/T/Miyeloid) hiçbirinde *CRLF2* aşırı anlatımı saptanmamıştır. Literatürde MPAL grubunda *CRLF2* geninin aşırı anlatımı henüz bildirilmemiştir. Ancak 22 yaşında bir B/Miyeloid MPAL hastasında *PAR1* delesyonu ile *P2RY8*–*CRLF2* füzyonu tanımlanmıştır ve bu hasta Ph-benzeri MPAL olarak literatüre alınmıştır (140).

Soy değişimi, lenfoid löseminin miyeloid lösemiye dönüştüğü bir olgudur ancak bunun tersi de bildirilmiştir. Hu ve arkadaşlarının sunduğu hipoteze göre, soy değişimlerinde ve belirsiz soy lösemilerde yer alan lösemik klonların aslında multipotent hematopoietik hücrelerden türetilebileceğidir (87). Bu konsept Alexander

ve arkadaşlarının yaptığı metilasyon çalışmaları ile de desteklenmiştir (97). Bir başka potansiyel soy değiştirme mekanizması da, transkripsiyon faktörleri tarafından lösemik hücre yeniden programlanmasını içerir. Bu tez çalışması kapsamında MPAL hasta örneklerinde (B/Miyeloid, B/T, B/T/Miyeloid) *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımları incelenmiştir. Hematopoietik progenitörlerin kader kararında çeşitli transkripsiyon faktörlerinin rol oynadığı bilinmektedir (61,62). Bunlar arasında, *SPI1*, *CEBPA*, *GATA1*, *PAX5* ve *IKAROS* gibi soy spesifik ana düzenleyici transkripsiyon faktörleri vardır. Transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolağı bileşenlerinin ektopik ifadesi, birçok farklılaşmış hücre türünde yeni gen ekspresyon programlarının oluşturulmasını sağlar fakat aynı zamanda bu transkripsiyon faktörlerinin ektopik ekspresyonu, T-hücreleri, B-hücreleri veya fibroblastlar gibi diğer soyların hücrelerine bir miyeloid hücre kaderi verir (87). Genel olarak değerlendirildiğinde çalışmamızda, üç fenotipik alt grup arasında anlamlı bir gen anlatım farklılığı saptanmamıştır. Gen anlatım verisinin görselleştirilmesi için kullanılan ısı haritasında, MPAL hastalarının *PAX5* ve *NOTCH1* anlatımları sonucunda iki kola kümelendiği, *SPI1* ve *GATA1*'in ise hastaların kümelendirilmesinde rol oynamadığı belirlenmiştir. Erken hematopoietik multipotansiyel progenitörler, hem belirli bir soy fenotipini destekleyen hem de alternatif programlamayı baskılayan karmaşık etkileşimlere dayanan spesifik kader seçimi ile çoklu soy belirteçlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (20). Yüksek düzeyde bir *PAX5* ekspresyonu, B hücresi gelişim yolu boyunca ortak lenfoid progenitörlerin gelişimi için kritiktir, düşük seviyeler ise miks bir fenotip ile sonuçlanmaktadır (141). Erken T hücre soy progenitörlerinin kaderi Notch sinyalizasyonuna bağlıdır. Notch sinyalinde bir eksiklik varsa, hücre miyeloid farklılaşmaya doğru yönlenecektir (142,143,144)

Spi1 ve *Cebpa*, miyeloid hücre kaderinin ana düzenleyicileridir ve bu transkripsiyon faktörleri, progenitör hücrelerin miyeloid farklılaşmasını desteklemekle kalmaz, aynı zamanda bu transkripsiyon faktörlerinin ektopik ekspresyonu, T-hücreleri, B-hücrelerine miyeloid hücre kaderi verdiği gösterilmiştir (34,145,146) *Gata1*, eritroid hücre kaderini vermek için gereklidir ve eritroid hücre kaderinin ana düzenleyicisidir. Farelerde *Gata1*'in delesyonu kusurlu eritropoezise neden olurken, *Gata1*'in ektopik ekspresyonu, monositik hücreler gibi diğer soyların hücrelerine megakaryosit/eritrosit kaderi verir. B hücresinin ana regülatörü olan *Pax5* ve *Ikaros*'un bozulması, B hücre transkriptomunu bozarak, B hücrelerini miyeloid hücrelerine programlar (87). Erken T

hücre soy progenitörlerinin kaderi Notch sinyalizasyonuna bağlıdır. Notch sinyalinde bir eksiklik varsa, hücre miyeloid farklılaşmaya doğru yönlenecektir. Ektopik ekspresyonla soy dönüşümü veya bu ana düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin kaybı, genellikle hücre kaderini yöneten transkripsiyon faktörleri ağındaki bir değişiklik ile ilişkilidir.

PAX5, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımları cinsiyet ve yaş grupları açısından incelendiğinde, *GATA1* ekspresyonun erkeklerde kızlara göre daha fazla eksprese olduğu bulunmuştur. *GATA1* eritroid hücre farklılaşmasının önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır, ancak günümüzde *GATA1* gen anlatımının bu sistemle sınırlı olmadığı bilinmektedir. *GATA1* proteini, germ hücre farklılaşması ve testisteki steroidojenik aktivite için önemli bir faktördür (148). Bu nedenle, *GATA1* gen anlatımının erkeklerde daha fazla olduğu düşünülmektedir. *SPI1* ekspresyonun 10 yaş üstü hastalarda, 10 yaş altındaki hastalara göre daha fazla anlatımının olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, *SPI1* ekspresyonunun dokular yaşlandıkça arttığı gösterilmiştir (149).

Gen anlatım verileri (*PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1*, *GATA1*) ile hastaların taşıdıkları varyasyonların (*DUX4r*, *IKZF1del*, *ZNF384r*) ilişkisi araştırıldığında, farelerde, T-ALL-aktif edici *Notch1* mutasyonları, *Irf1*'deki fonksiyon kaybı mutasyonları ile sıklıkla ortaya çıktığı bildirilmiştir (151). *Notch*'un inhibisyonu, BCR-ABL'nin hiperaktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (152). *IKZF1* varyasyonları, B-lenfoid transkripsiyonel düzenleyicileri *EBF1*, *PAX5* ve *BTG1*'in aktivitesini etkileyen gen delesyonlarıyla birlikte ortaya çıktığı ve bunun da, B hücresi farklılaşması bloğu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (132). Hasta grubumuzun *IKZF1* delesyonu ile hangi varyantları taşıdığı bilinmemekle birlikte, bu hastalarda *PAX5* füzyonlarının varlığını da bilmiyoruz. Bu nedenle *IKZF1* delesyonu taşıyan hastalarımızın heterojen gen anlatım seviyesi gösterdiğini düşünmekteyiz.

Erg, erken B lenfoid farklılaşması için gereklidir ve V(D)J rekombinasyonunda B hücre reseptörünün oluşumunda yer alan anahtar genlerin ekspresyonunu doğrudan destekleyen ve B hücresi soyunu tanımlayan *Ebf1* ile *Pax5*'i içeren bir transkripsiyonel ağ başlatır. *Erg* delesyonunun, yeniden düzenlenmiş bir immünoglobulin geni ile tamamlanmasının B soy gelişimini kurtardığı ve *Erg*'nin B lenfopoezi kontrol eden gen düzenleyici ağı temel ve aşamaya özgü düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (153).

GATA1, *IKZF1*'in yukarı yönünde bir bağlanma bölgesine sahiptir (154). *EP300-ZNF384* füzyonun gen ekspresyonunu nasıl etkilendiğini inceledikleri çalışmada, *ZNF384* etkileşimleri için tüm hedeflerin ve hematopoezin ana düzenleyicisi genlerin zenginleştiğini ve genlerdeki ekspresyonun azaldığını ortaya çıkarmışlardır (155). *SPI1* ve Ikarosun, potansiyel DNA hedef bölgeleri değişen farklı hücrelerde hem işbirlikçiler hem de antagonistler olarak hareket edebileceğini göstermişlerdir. Bunu da aracı enhansırlar üzerinden yaptığı bildirilmiştir (156).

Araştırılan genlerden *PAX5*, *NOTCH1*, *SPI1* ve *GATA1* gen anlatımlarının tamamında düşük ekspresyon gösteren iki hasta (#P39 ve #P40) hem *DUX4*-yeniden düzenlenmesi hem de *ZNF384*-yeniden düzenlenmesini birlikte taşıyan hastalardır. Bu hastalardan biri *ZNF384-EP300* füzyonu ve *DUX4*-yeniden düzenlenmesini taşıırken, diğer hasta *ZNF384-TAF15*, *ZNF384-TCF3* füzyonu ve *DUX4*-yeniden düzenlenmesini taşımaktadır. Bu yeniden düzenlemeler, tümör baskılayıcı genleri bozarak, gen kopya sayısını değiştirerek, onkogenik füzyon proteinleri oluşturarak veya bir geni başka bir genin düzenleyici unsurlarıyla yan yana getirerek genlerin ekspresyon profilini değiştirebilirler (147).

Soy değişimlerinde ve belirsiz lösemilerde yer alan lösemik klonların aslında multipotent hematopoietik hücrelerden türetilmiş olduğu düşünülmektedir ve metilasyon çalışmalarıyla desteklenmiştir. Transkripsiyon faktörlerinin normal hematopoez için önemli olduğu ve transkripsiyonel düzenlemenin kaybı lösemi gelişimine yol açtığı düşünülmektedir.

Klinik araştırmalar sonucunda, MPAL hastalarına uygulanan ALL benzeri tedavilerin, AML veya kombine AML ve ALL yaklaşımları ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek bir remisyon oranı elde ettiği gösterilmiştir (16). MPAL hasta grubumuza ALL tedavisi uygulanmıştır ve elimizde 33. Gün yanıtı olan hastaların tamamı kemoterapiye cevap vermiştir. Bunun yanı sıra, MPAL hastaları B/Miyeloid, B/T, B/T/Miyeloid ve T/Miyeloid olarak ayrılıp genel ve relapssız sağkalım durumları karşılaştırıldığı zaman, B/T MPAL'in diğer gruplardan daha az oranda genel ve relapssız sağkalıma sahip olduğu (%85) belirlenmiştir.

Günümüzde yüksek verimli dizileme teknolojilerindeki ilerlemeler, lösemilerin genomik portresini yeniden tanımlanarak sınıflandırmasını düzenlemektedir. Güncel veriler ışığında ALL ve AML hastalarının moleküler risk sınıflaması için prognostik

öneme sahip olduğu ortaya çıkan birçok yeni belirteç, yüksek risk grubundaki hastaların ayrıştırılması ve uygun tedavi protokolleri ile tedavi edilmesine imkan sağlamaktadır. MPAL'in moleküler çalışmalar ile alt gruplara ayrılması, özellikle kötü prognostik belirteçlere spesifik tedaviler için hedef oluşturmaktadır. MPAL'deki alt tipleri tanımlayan değişikliklerin altında yatan fonksiyonel mekanizmaları aydınlatmaya yönelik araştırmalar, kişiye özel tedavilerin önünü açmak için önemli bir rol oynayacaktır.

5.1. Sonuç

Tez çalışması kapsamında, MPAL tanı hastaları ALL ve AML için prognostik değere sahip olan belirteçler için taranmış, lenfoid-miyeloid dönüşümden sorumlu olabileceği düşünülen gen anlatımları açısından incelenmiştir. Bu doğrultuda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

MPAL hasta grubu, B/Miyeloid, B/T, T/Miyeloid ve B/T/Miyeloid olarak 4 alt gruba ayrılmıştır ve bir B/Miyeloid fenotipindeki hasta Ph+ MPAL olarak belirlenmiştir.

MPAL grupları arasında en sık varyasyona sahip fenotip B/Miyeloid MPAL olarak belirlenmiştir. B-ALL'de %12-15 sıklıkta görülen *IKZF1* delesyonları benzer oranda MPAL grubunda da (%13,5) belirlenmiştir. *IKZF1* delesyonları B-ALL'de relaps ve kötü prognoz belirteci olarak bilinmektedir. Sağ kalım analizleri MPAL hastalarında da *IKZF1* delesyonlarının kötü prognostik etkisini göstermektedir. BCP-ALL'lerde %3-5 sıklıkta görülen *DUX4r* 'nın MPAL hastalarında daha sık (%10,5) olduğu ortaya çıkmıştır. Sağkalım analizlerine göre MPAL'da iyi prognostik gösterge olarak değerlendirilmiştir. *ZNF384r* üçüncü en sık görülen varyasyondur (%9,5) ve sağkalım analizlerine göre MPAL'da iyi prognostik gösterge olarak değerlendirilmiştir. Bu varyasyonların hastalardaki lenfoid-miyeloid dönüşümüne katkı sağladığı düşünülmektedir. Ancak bu katkının tanımlanabilmesi için fonksiyonel çalışmaların gerçekleştirilmesine ihtiyaç vardır. t(9;22) kötü prognostik belirteç olarak bilinmektedir ve MPAL'de B/miyeloid fenotipi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Hastalarımızın biri (%2,1) Ph+ B/Miyeloid MPAL'dir ve remisyona girmeden kaybedilmiştir.

MPAL hasta grubumuzda, AML'ye spesifik füzyonlar veya mutasyonlar bulunmamaktadır. Çalışmaya dahil edilen tüm MPAL olgular BFM-ALL protokolüne göre tedavi edilmiş ve AML'ye dönüşüm gözlenmemiştir. Bu klinik veri bizim bulgularımızı da destekler niteliktedir.

MPAL hastalarının %39'unda (18/46) *IKZF1*, *DUX4r*, *ZNF384r*, t(9;22) ve t(12;21) genlerinden en az birinde varyasyon saptanmıştır. Üç farklı MPAL fenotipinden (B/Miyeloid, B/T, B/T/Miyeloid) birine spesifik belirgin bir mutasyon dağılımı görülmemiştir. B/Miyeloid fenotipli hastaların %48'inde (14/29) en az bir gen varyasyonu gösterilmiştir. B/T fenotipli hastalarının %18'inde (2/11) *IKZF1* delesyonu ve bir hastada t(12;21) olduğu, B/T/Miyeloid fenotipine sahip üç olgunun birinde (%33) *DUX4r* ve *ZNF384r* birlikte görülmüştür.

B/Miyeloid MPAL'nin ALL benzeri genomik yapısı ve *ZNF384r* B/M MPAL ile B-ALL arasındaki genomik değişikliklerdeki benzerlik, B/Miyeloid MPAL hastaları için ALL'ye yönelik tedavinin kullanımına yönlendirir. Hastalara uygulanan ALL-benzeri tedaviler yüksek remisyon oranı ile ilişkili olup, hastalardaki prognostik belirteçlerin varlığı da bu durumu desteklemektedir.

Hasta grubumuzda *IKZF1* delesyonu taşıyan B/T MPAL hastası relaps nedeniyle kaybedilmiştir. Bu da *IKZF1* delesyonlarının relaps ve kötü prognoz belirteci olduğunu desteklemektedir.

Kötü prognoz belirteci olan *CRLF2* geninin aşırı anlatımının MPAL hasta grubumuzda olmadığı belirlenmiştir.

MPAL hastalarında hematopoetik hücrelerde soy değişiminden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin anlatımlarında bozulmalar bildirilmeye başlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında soy değişimi sürecinde kritik öneme sahip olan genlerin anlatımlarına da bakılmıştır. Alt fenotiplere spesifik bir anlatım görülmemekle beraber MPAL hastalarının sahip oldukları varyasyonların doğrudan ya da dolaylı mekanizmalar ile gen anlatımlarını etkilediği ve değiştirdiği gösterilmiştir. *IKZF1del* ve *DUX4r* tespit edilen hastalarda *NOTCH1* ve *SPI1* anlatım düşüklüğü, t(9;22) tespit edilen hastada *NOTCH1* anlatımında artış, *DUX4r* tespit edilen hastalarda *PAX5* gen anlatım düşüklüğü *ZNF384r* tespit edilen hastalarda *GATA1* gen anlatım düşüklüğü

görülmektedir. Bu konu ile ilgili literatürde bir veri bulunmamaktadır ve destekleyici daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Akut lösemilerde yeni biyobelirteçlerin tanımlanması ve dolayısıyla moleküler temelini daha iyi anlaşılması, hastalığın seyrinin daha iyi izlenmesine olanak sağlamaktadır. Genetik anomalilerin derinlemesine tanımlanması, nüks riskini değerlendirmek ve riski azaltmak için moleküler hedefli tedavilerin geliştirilmesi ve uygulanması için önemlidir. Genomik çalışmalardaki ilerleme ve çok ölçekli biyolojik verilerin entegre analizi kromozomal yeniden düzenlemeler nedeniyle sınıflandırılmamış olan ALL'lerde yeni genetik alt grupları ve yolakları keşfetmemize izin vermiştir. MPAL'nin tanı kriterleri ve tedavi seçeneklerindeki son gelişmelere rağmen, MPAL gelişiminde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4). doi:10.1016/j.cell.2008.01.025
2. Fiedler K, Brunner C. Mechanisms Controlling Hematopoiesis. In: *Hematology - Science and Practice*. ; 2012. doi:10.5772/33749
3. Kato H, Igarashi K. To be red or white: lineage commitment and maintenance of the hematopoietic system by the “inner myeloid.” *Haematologica*. 2019. doi:10.3324/haematol.2019.216861
4. Elgarten CW, Aplenc R. Pediatric acute myeloid leukemia: Updates on biology, risk stratification, and therapy. *Curr Opin Pediatr*. 2020;32(1):57-66. doi:10.1097/MOP.0000000000000855
5. Harrison CJ, Moorman A V., Schwab C, Iacobucci I, Mullighan C. Cytogenetics and Molecular Genetics. In: *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. ; 2017. doi:10.1007/978-3-319-39708-5_4
6. Mullighan CG, Alexander TB, Gu Z, et al. PAX5-driven Subtypes of B-progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Nat Genet*. 2019;51(2).
7. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):975-983. doi:10.1200/JCO.2016.70.7836
8. Gu J, Reynolds A, Fang L, et al. Coexistence of iAMP21 and ETV6-RUNX1 fusion in an adolescent with B cell acute lymphoblastic leukemia: literature review of six additional cases. *Mol Cytogenet*. 2016. doi:10.1186/s13039-016-0294-0
9. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science (80-)*. 2004. doi:10.1126/science.1102160
10. Durinck K, Goossens S, Peirs S, et al. Novel biological insights in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*. 2015. doi:10.1016/j.exphem.2015.05.017
11. Ferrando AA, Look AT. DNA microarrays in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2004. doi:10.1532/IJH97.04137
12. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2015. doi:10.1056/NEJMra1406184
13. Shin SY, Lee ST, Kim HJ, et al. Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of DNMT3A mutations. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.10240
14. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2011. doi:10.1186/1756-8722-4-36
15. Chung-Che C, Ohgami RS. *Precision Molecular Pathology of Myeloid Neoplasms*. Vol 12.; 2018. doi:10.1007/978-3-319-62146-3

16. Wolach O, Stone RM. Optimal therapeutic strategies for mixed phenotype acute leukemia. 2020. doi:10.1097/MOH.0000000000000570
17. Zhang Y, Gao S, Xia J, Liu F. Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap. *Trends Cell Biol.* 2018;28(12). doi:10.1016/j.tcb.2018.06.001
18. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood.* 2009;113(15). doi:10.1182/blood-2008-12-180646
19. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood.* 2015;125(17). doi:10.1182/blood-2014-09-570192
20. Orkin SH. Priming the hematopoietic pump. *Immunity.* 2003. doi:10.1016/S1074-7613(03)00302-9
21. Chin DWL, Watanabe-Okochi N, Wang CQ, Tergaonkar V, Osato M. Mouse models for core binding factor leukemia. *Leukemia.* 2015;29(10). doi:10.1038/leu.2015.181
22. Rosenbauer F, Koschmieder S, Steidl U, Tenen DG. Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. *Blood.* 2005;106(5). doi:10.1182/blood-2005-02-0717
23. Correia NC, Arcangeli ML, Pflumio F, Barata JT. Stem Cell Leukemia: How a TALented actor can go awry on the hematopoietic stage. *Leukemia.* 2016;30(10). doi:10.1038/leu.2016.169
24. Gangenahalli GU, Gupta P, Saluja D, et al. Stem cell fate specification: Role of master regulatory switch transcription factor SPI1 in differential hematopoiesis. *Stem Cells Dev.* 2005;14(2). doi:10.1089/scd.2005.14.140
25. Dahl R, Walsh JC, Lancki D, et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the SPI1:C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol.* 2003;4(10). doi:10.1038/ni973
26. Burda P, Curik N, Kokavec J, et al. SPI1 activation relieves GATA1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Mol Cancer Res.* 2009;7(10). doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0031
27. Galloway JL, Wingert RA, Thisse C, Thisse B, Zon LI. Loss of Gata1 but not Gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos. *Dev Cell.* 2005;8(1). doi:10.1016/j.devcel.2004.12.001
28. Rhodes J, Hagen A, Hsu K, et al. Interplay of SPI1 and Gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell.* 2005;8(1). doi:10.1016/j.devcel.2004.11.014
29. Nutt SL, Kee BL. The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. *Immunity.* 2007;26(6). doi:10.1016/j.immuni.2007.05.010
30. Rothenberg E V. Negotiation of the T Lineage Fate Decision by Transcription-Factor Interplay and Microenvironmental Signals. *Immunity.* 2007;26(6). doi:10.1016/j.immuni.2007.06.005
31. DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage

- development by graded expression of SPI1. *Science* (80-). 2000;288(5470). doi:10.1126/science.288.5470.1439
32. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. 2002;21(21 REV. ISS. 2). doi:10.1038/sj.onc.1205318
 33. Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature*. 2008;452(7188). doi:10.1038/nature06840
 34. Laiosa C V., Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol*. 2006;24. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090742
 35. Del Real MM, Rothenberg E V. Architecture of a lymphomyeloid developmental switch controlled by SPI1, notch and Gata3. *Dev*. 2013;140(6). doi:10.1242/dev.088559
 36. Franco CB, Scripture-Adams DD, Proekt I, et al. Notch/Delta signaling constrains reengineering of pro-T cells by SPI1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(32). doi:10.1073/pnas.0601188103
 37. Brown G, Sánchez L, Sánchez-García I. Lineage decision-making within normal haematopoietic and leukemic stem cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6). doi:10.3390/ijms21062247
 38. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, et al. Toll-like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment. *Immunity*. 2006;24(6). doi:10.1016/j.immuni.2006.04.008
 39. Hu G, Cui K, Fang D, et al. Transformation of Accessible Chromatin and 3D Nucleome Underlies Lineage Commitment of Early T Cells. *Immunity*. 2018;48(2). doi:10.1016/j.immuni.2018.01.013
 40. Ji H, Ehrlich LIR, Seita J, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature*. 2010;467(7313). doi:10.1038/nature09367
 41. Zhou W, Yui MA, Williams BA, et al. Single-Cell Analysis Reveals Regulatory Gene Expression Dynamics Leading to Lineage Commitment in Early T Cell Development. *Cell Syst*. 2019;9(4). doi:10.1016/j.cels.2019.09.008
 42. Hosokawa H, Rothenberg E V. Cytokines, transcription factors, and the initiation of T-cell development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(5). doi:10.1101/cshperspect.a028621
 43. Romano R, Palamaro L, Fusco A, et al. From murine to human Nude/SCID: The thymus, T-Cell development and the missing link. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/467101
 44. Germar K, Dose M, Konstantinou T, et al. T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(50). doi:10.1073/pnas.1110230108
 45. Weber BN, Chi AWS, Chavez A, et al. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature*. 2011;476(7358).

doi:10.1038/nature10279

46. Garcia-Perez L, Famili F, Cordes M, et al. Functional definition of a transcription factor hierarchy regulating T cell lineage commitment. *Sci Adv.* 2020;6(31). doi:10.1126/sciadv.aaw7313
47. Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from. *Immunity.* 2007;26(6). doi:10.1016/j.immuni.2007.05.009
48. Hogquist KA, Jameson SC. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate “decisions” and effector function. *Nat Immunol.* 2014;15(9):815-823. doi:10.1038/ni.2938
49. Nagasawa T. The chemokine CXCL12 and regulation of HSC and B lymphocyte development in the bone marrow niche. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 602. ; 2007. doi:10.1007/978-0-387-72009-8_9
50. O’Riordan M, Grosschedl R. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity.* 1999;11(1). doi:10.1016/S1074-7613(00)80078-3
51. Krangel MS. Gene segment selection in V(D)J recombination: Accessibility and beyond. *Nat Immunol.* 2003;4(7). doi:10.1038/ni0703-624
52. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3). doi:10.1038/nri3795
53. Manser T. Textbook Germinal Centers? *J Immunol.* 2004;172(6). doi:10.4049/jimmunol.172.6.3369
54. Bishop GA, Hostager BS. Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. *Immunol Res.* 2001;24(2). doi:10.1385/IR:24:2:097
55. Phan TG, Paus D, Chan TD, et al. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med.* 2006;203(11). doi:10.1084/jem.20061254
56. Tsai DY, Hung KH, Chang CW, Lin KI. Regulatory mechanisms of B cell responses and the implication in B cell-related diseases. *J Biomed Sci.* 2019;26(1). doi:10.1186/s12929-019-0558-1
57. Fischer U, Yang JJ, Ikawa T, et al. Cell Fate Decisions: The Role of Transcription Factors in Early B-cell Development and Leukemia. *Blood Cancer Discov.* 2020;1(3). doi:10.1158/2643-3230.bcd-20-0011
58. Hendriks RW, Middendorp S. The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends Immunol.* 2004;25(5). doi:10.1016/j.it.2004.02.011
59. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang JY. B Cell Development and Maturation. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 1254. ; 2020. doi:10.1007/978-981-15-3532-1_1
60. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol.* 2014;5(AUG). doi:10.3389/fimmu.2014.00423

61. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: Balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(2). doi:10.1038/nri2024
62. Iwasaki H, Akashi K. Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell. *Immunity.* 2007;26(6). doi:10.1016/j.immuni.2007.06.004
63. Boyle AP, Davis S, Shulha HP, et al. High-Resolution Mapping and Characterization of Open Chromatin across the Genome. *Cell.* 2008;132(2). doi:10.1016/j.cell.2007.12.014
64. Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, et al. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature.* 2009;459(7243). doi:10.1038/nature07829
65. Growney JD, Shigematsu H, Li Z, et al. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood.* 2005;106(2). doi:10.1182/blood-2004-08-3280
66. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med.* 2004;10(3). doi:10.1038/nm997
67. Mikkola HKA, Klintman J, Yang H, et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature.* 2003;421(6922). doi:10.1038/nature01345
68. Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3). doi:10.1073/pnas.0237324100
69. Curtis DJ, Hall MA, Van Stekelenburg LJ, Robb L, Jane SM, Begley CG. SCL is required for normal function of short-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood.* 2004;103(9). doi:10.1182/blood-2003-09-3202
70. Erdem HB, Ceylan AC. Diagnostic Utility of Microarray Testing in Chromosome Five Associated Disorders. *Acta Oncol Turc.* 2020;53(1):145-150. doi:10.5505/aot.2020.68926
71. Verbeek W, Lekstrom-Himes J, Park DJ, et al. Myeloid Transcription Factor C/EBPε Is Involved in the Positive Regulation of Lactoferrin Gene Expression in Neutrophils. *Blood.* 1999;94(9). doi:10.1182/blood.v94.9.3141
72. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, et al. Distinctive and indispensable roles of SPI1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood.* 2005;106(5). doi:10.1182/blood-2005-03-0860
73. Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt SL. SPI1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med.* 2005;201(9). doi:10.1084/jem.20050075
74. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor SPI1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science (80-).*

- 1994;265(5178). doi:10.1126/science.8079170
75. McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, et al. Targeted disruption of the SPI1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 1996;15(20). doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00949.x
 76. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein α -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2). doi:10.1073/pnas.94.2.569
 77. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP α . *Immunity.* 2004;21(6). doi:10.1016/j.immuni.2004.11.006
 78. Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, et al. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein ϵ -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24). doi:10.1073/pnas.94.24.13187
 79. Friedman AD. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene.* 2002;21(21 REV. ISS. 2). doi:10.1038/sj.onc.1205324
 80. Houston IB, Kamath MB, Schweitzer BL, Chlon TM, DeKoter RP. Reduction in SPI1 activity results in a block to B-cell development, abnormal myeloid proliferation, and neonatal lethality. *Exp Hematol.* 2007;35(7). doi:10.1016/j.exphem.2007.04.005
 81. Meinders M, Hoogenboezem M, Scheenstra MR, et al. Repercussion of megakaryocyte-specific Gata1 Loss on megakaryopoiesis and the hematopoietic precursor compartment. *PLoS One.* 2016;11(5). doi:10.1371/journal.pone.0154342
 82. Weiskopf K, Schnorr PJ, Pang WW, et al. Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications. *Microbiol Spectr.* 2016;4(5). doi:10.1128/microbiolspec.mchd-0031-2016
 83. Rothenberg E V. T Cell Lineage Commitment: Identity and Renunciation. *J Immunol.* 2011;186(12). doi:10.4049/jimmunol.1003703
 84. Orkin SH, Hochedlinger K. Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell.* 2011;145(6). doi:10.1016/j.cell.2011.05.019
 85. Pelayo R, Dorantes-Acosta E, Vadillo E, Fuentes-P E. From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis. In: *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research.* ; 2012. doi:10.5772/32213
 86. Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol.* 2004;25(12). doi:10.1016/j.it.2004.09.010
 87. Hu T, Murdaugh R, Nakada D. Transcriptional and microenvironmental regulation of lineage ambiguity in Leukemia. *Front Oncol.* 2017;7(NOV). doi:10.3389/fonc.2017.00268

88. Ikawa T, Hirose S, Masuda K, et al. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* (80-). 2010;329(5987). doi:10.1126/science.1188995
89. Li P, Burke S, Wang J, et al. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* (80-). 2010;329(5987). doi:10.1126/science.1188063
90. Ng KKH, Yui MA, Mehta A, et al. A stochastic epigenetic switch controls the dynamics of T-cell lineage commitment. *Elife*. 2018;7. doi:10.7554/eLife.37851
91. Pérez-Vera P, Reyes-León A, Fuentes-Pananá EM. Signaling Proteins and Transcription Factors in Normal and Malignant Early B Cell Development. *Bone Marrow Res*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/502751
92. Chen E, Staudt LM, Green AR. Janus Kinase Deregulation in Leukemia and Lymphoma. *Immunity*. 2012;36(4). doi:10.1016/j.immuni.2012.03.017
93. Kim HG, De Guzman CG, Scott Swindle C, et al. The ETS family transcription factor SPI1 is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood*. 2004;104(13). doi:10.1182/blood-2002-08-2425
94. Pongubala JMR, Northrup DL, Lancki DW, et al. Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nat Immunol*. 2008;9(2). doi:10.1038/ni1555
95. Schlenner SM, Madan V, Busch K, et al. Fate Mapping Reveals Separate Origins of T Cells and Myeloid Lineages in the Thymus. *Immunity*. 2010;32(3). doi:10.1016/j.immuni.2010.03.005
96. Riemke P, Czeh M, Fischer J, et al. Myeloid leukemia with transdifferentiation plasticity developing from T-cell progenitors. *EMBO J*. 2016;35(22). doi:10.15252/embj.201693927
97. Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I, et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature*. 2018. doi:10.1038/s41586-018-0436-0
98. Xu H, Yu H, Jin R, Wu X, Chen H. Genetic and epigenetic targeting therapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cells*. 2021;10(12). doi:10.3390/cells10123349
99. Cernan M, Sztokowski T, Pikalova Z. Mixed-phenotype acute leukemia: State-of-the-art of the diagnosis, classification and treatment. *Biomed Pap*. 2017;161(3):234-241. doi:10.5507/bp.2017.013
100. Wolach O, Stone RM. Mixed-phenotype acute leukemia: Current challenges in diagnosis and therapy. *Curr Opin Hematol*. 2017;24(2):139-145. doi:10.1097/MOH.0000000000000322
101. Porwit A, Béné MC. Multiparameter flow cytometry applications in the diagnosis of mixed phenotype acute leukemia. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2019;96(3). doi:10.1002/cyto.b.21783
102. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health

- Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
103. Charles NJ, Boyer DF. Mixed-phenotype acute leukemia: Diagnostic criteria and pitfalls. In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. ; 2017. doi:10.5858/arpa.2017-0218-RA
 104. Mi X, Griffin G, Lee W, et al. Genomic and clinical characterization of B/T mixed phenotype acute leukemia reveals recurrent features and T-ALL like mutations. *Am J Hematol*. 2018. doi:10.1002/ajh.25256
 105. Takahashi K, Wang F, Morita K, et al. Integrative genomic analysis of adult mixed phenotype acute leukemia delineates lineage associated molecular subtypes. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-04924-z
 106. Manola KN. Cytogenetic abnormalities in acute leukaemia of ambiguous lineage: An overview. *Br J Haematol*. 2013;163(1):24-39. doi:10.1111/bjh.12484
 107. Vasily Ramensky, Peer Bork and SS. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(17):3894-3900. doi:10.1093/nar/gkf493
 108. Lin N, Yan X, Cai D, Wang L. Leukemia With TCF3-ZNF384 Rearrangement as a Distinct Subtype of Disease With Distinct Treatments: Perspectives From A Case Report and Literature Review. *Front Oncol*. 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.709036
 109. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. 2015;125(26):3977-3987. doi:10.1182/blood-2015-02-580043.
 110. Quesada AE, Hu Z, Routbort MJ, et al. Mixed phenotype acute leukemia contains heterogeneous genetic mutations by next-generation sequencing. *Oncotarget*. 2018. doi:10.18632/oncotarget.23878
 111. Kurzer JH, Weinberg OK. Acute Leukemias of Ambiguous Lineage. *Surg Pathol*. 2019;12(3):687-697. doi:10.1016/j.path.2019.03.008
 112. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112(9):3543-3553. doi:10.1182/blood-2008-08-078220
 113. Eckstein OS, Wang L, Punia JN, et al. Mixed-phenotype acute leukemia (MPAL) exhibits frequent mutations in DNMT3A and activated signaling genes. *Exp Hematol*. 2016;44(8). doi:10.1016/j.exphem.2016.05.003
 114. Neumann M, Heesch S, Schlee C, et al. Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. *Blood*. 2013;121(23). doi:10.1182/blood-2012-11-465138
 115. Zaliouva M, Stuchly J, Winkowska L, et al. Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia in a consecutive European cohort. *Haematologica*. 2019;104(7):1396-1406. doi:10.3324/haematol.2018.204974
 116. Ayachi OS, Rezgoun ML, Sayitoglu M, et al. Prevalence and effect evaluation of

- FLT3 and NPM1 mutations in acute myeloid leukemia patients in eastern Algeria. *UHOD - Uluslararası Hematol Derg.* 2018;28(3). doi:10.4999/uhod.182822
117. Erbilgin Y, Firtina S, Mercan S, et al. Prognostic gene alterations and clonal changes in childhood B-ALL. *Leuk Res.* 2019. doi:10.1016/j.leukres.2019.05.009
 118. Firtina S, Sayitoglu M, Hatirnaz O, et al. Evaluation of PAX5 gene in the early stages of leukemic B cells in the childhood B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2012;36(1). doi:10.1016/j.leukres.2011.07.017
 119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
 120. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1). doi:10.1093/nar/gkv468
 121. Singh SS, Yap WN, Arfuso F, et al. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in gastric carcinoma: A reality for personalized medicine? *World J Gastroenterol.* 2015;21(43):12261-12273. doi:10.3748/wjg.v21.i43.12261
 122. González Llano O. The complete blood count in the early diagnosis of acute leukemia in children. *Med Univ.* 2016;18(73). doi:10.1016/j.rmu.2016.07.006
 123. Bhojwani D, Yang JJ, Pui C-H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(1):47-60. doi:10.1016/j.pcl.2014.09.004
 124. Novakova M, Zaliova M, Fiser K, et al. DUX4r, ZNF384r and PAX5-P80R mutated B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia frequently undergo monocytic switch. *Haematologica.* 2021;106(8). doi:10.3324/haematol.2020.250423
 125. Tuğçe Sudutan, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik A.D. Yüksek Lisans Tezi, 2019
 126. Batra S, Ross AJ. Pediatric mixed-phenotype acute leukemia: What's new? *Cancers (Basel).* 2021;13(18). doi:10.3390/cancers13184658
 127. Hirabayashi S, Butler ER, Ohki K, et al. Clinical characteristics and outcomes of B-ALL with ZNF384 rearrangements: a retrospective analysis by the Ponte di Legno Childhood ALL Working Group. *Leukemia.* 2021;35(11). doi:10.1038/s41375-021-01199-0
 128. Qian M, Zhang H, Kham SKY, et al. Whole-transcriptome sequencing identifies a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia with predominant genomic abnormalities of EP300 and CREBBP. *Genome Res.* 2017;27(2). doi:10.1101/gr.209163.116
 129. Clappier E, Auclerc MF, Rapon J, et al. An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia.* 2014. doi:10.1038/leu.2013.277

130. Rehn JA, O'connor MJ, White DL, Yeung DT. DUX hunting—clinical features and diagnostic challenges associated with DUX4-rearranged leukaemia. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10). doi:10.3390/cancers12102815
131. Li Z, Lee SHR, Chin WHN, et al. Distinct clinical characteristics of DUX4- And PAX5-altered childhood B-lymphoblastic leukemia. *Blood Adv*. 2021;5. doi:10.1182/bloodadvances.2021004895
132. Marke R, Van Leeuwen FN, Scheijen B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2018;103(4). doi:10.3324/haematol.2017.185603
133. Yan L, Ping N, Zhu M, et al. Clinical, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular genetic features in 117 adult patients with mixed-phenotype acute leukemia defined by WHO-2008 classification. *Haematologica*. 2012;97(11). doi:10.3324/haematol.2012.064485
134. Stanulla M, Cavé H, Moorman A V. IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Still a poor prognostic marker? *Blood*. 2020;135(4). doi:10.1182/blood.2019000813
135. Andrews C, Lam W, Sibai H. The successful use of FLT3 inhibitors in FLT3-positive mixed phenotype acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2020;61(13). doi:10.1080/10428194.2020.1802451
136. Shafik NF, Darwish AD, Allam RM, Elsayed GM. FLT3-ITD Allele Frequency Is an Independent Prognostic Factor for Poor Outcome in FLT3-ITD–Positive AML Patients. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2021;21(10). doi:10.1016/j.clml.2021.05.005
137. Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci*. 2020;111(2). doi:10.1111/cas.14274
138. Palmi C, Savino AM, Silvestri D, et al. CRLF2 over-expression is a poor prognostic marker in children with high risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.10610
139. Ge Z, Gu Y, Zhao G, et al. High CRLF2 expression associates with IKZF1 dysfunction in adult acute lymphoblastic leukemia without CRLF2 rearrangement. *Oncotarget*. 2016;7(31). doi:10.18632/oncotarget.10437
140. Choi SM, Frederiksen JK, Ross CW, Bixby DL, Shao L. Philadelphia chromosome-like mixed-phenotype acute leukemia demonstrating P2RY8-CRLF2 fusion and JAK1 mutation. *Am J Clin Pathol*. 2017;148(6). doi:10.1093/AJCP/AQX111
141. Simmons S, Knoll M, Drewell C, et al. Biphenotypic B-lymphoid/myeloid cells expressing low levels of Pax5: Potential targets of BAL development. *Blood*. 2012;120(18). doi:10.1182/blood-2012-03-414821
142. De Obaldia ME, Bell JJ, Wang X, et al. T cell development requires constraint of the myeloid regulator C/EBP- α by the Notch target and transcriptional repressor Hes1. *Nat Immunol*. 2013;14(12). doi:10.1038/ni.2760

143. Sultana DA, Bell JJ, Zlotoff DA, De Obaldia ME, Bhandoola A. Eliciting the T cell fate with Notch. *Semin Immunol.* 2010;22(5). doi:10.1016/j.smim.2010.04.011
144. Wada H, Masuda K, Satoh R, et al. Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature.* 2008;452(7188). doi:10.1038/nature06839
145. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell.* 2004;117(5). doi:10.1016/S0092-8674(04)00419-2
146. Cirovic B, Schönheit J, Kowenz-Leutz E, et al. C/EBP-Induced Transdifferentiation Reveals Granulocyte-Macrophage Precursor-like Plasticity of B Cells. *Stem Cell Reports.* 2017;8(2). doi:10.1016/j.stemcr.2016.12.015
147. Iacobucci I, Kimura S, Mullighan CG. Biologic and therapeutic implications of genomic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Med.* 2021;10(17). doi:10.3390/jcm10173792
148. Gonçalves MFF, Lacerda SM dos SN, Lara N de L e. M, et al. GATA1 mutation alters the spermatogonial phase and steroidogenesis in adult mouse testis. *Mol Cell Endocrinol.* 2022;542. doi:10.1016/j.mce.2021.111519
149. Swindell WR, Johnston A, Xing X, et al. Robust shifts in S100a9 expression with aging: A novel mechanism for chronic inflammation. *Sci Rep.* 2013;3. doi:10.1038/srep01215
150. Testi AM, Attarbaschi A, Valsecchi MG, et al. Outcome of adolescent patients with acute lymphoblastic leukaemia aged 10–14 years as compared with those aged 15–17 years: Long-term results of 1094 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Eur J Cancer.* 2019;122. doi:10.1016/j.ejca.2019.09.004
151. Witkowski MT, Cimmino L, Hu Y, et al. Activated Notch counteracts Ikaros tumor suppression in mouse and human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2015;29(6). doi:10.1038/leu.2015.27
152. Aljedai A, Buckle AM, Hiwarkar P, Syed F. Potential role of notch signalling in CD34+ chronic myeloid leukaemia cells: Cross-talk between notch and BCR-ABL. *PLoS One.* 2015;10(4). doi:10.1371/journal.pone.0123016
153. Ng AP, Coughlan HD, Hediye-zadeh S, et al. An Erg-driven transcriptional program controls B cell lymphopoiesis. *Nat Commun.* 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-16828-y
154. Rahmani M, Fardi M, Hagh MF, Feizi AAH, Talebi M, Solali S. An investigation of methylation pattern changes in the IKZF1 promoter in patients with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Res.* 2019;54(2). doi:10.5045/br.2019.54.2.144
155. McClure BJ, Heatley SL, Kok CH, et al. Pre-B acute lymphoblastic leukaemia recurrent fusion, EP300-ZNF384, is associated with a distinct gene expression. *Br J Cancer.* 2018;118(7). doi:10.1038/s41416-018-0022-0
156. Zarnegar MA, Rothenberg E V. Ikaros represses and activates PU.1 cell-type-specifically through the multifunctional Sfp1 URE and a myeloid specific enhancer. *Oncogene.* 2012;31(43). doi:10.1038/onc.2011.597

157. Köse D, Sarper N, Zengin E, Gelen SA. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemilerinde, ALL-BFM Protokolleri ile İndüksiyon Ölümleri ve Tedavi-İlişkili Ölümler. Kocaeli Med J. 2021;10(1):30-37



HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BİFENOTİPİK AKUT LÖSEMİ HASTALARININ GENETİK KARAKTERİZASYONU

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 8	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	Manola, Kalliopi N.. "Cytogenetic abnormalities in acute leukaemia of ambiguous lineage: an overview", British Journal of Haematology, 2013. Yayın	<% 1
4	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
6	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1