

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI B ÖNCÜL HÜCRELİ AKUT
LENFOBLASTİK LÖSEMİ'DE RELAPS İLİŞKİLİ
GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN TANI
ANINDA BELİRLENMESİ**

Öznur TOKTA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI B ÖNCÜL HÜCRELİ AKUT
LENFOBLASTİK LÖSEMİ'DE RELAPS İLİŞKİLİ
GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN TANI
ANINDA BELİRLENMESİ**

Öznur TOKTA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. SİBEL BERKER KARAÜZÜM

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
“TYL-2020-5172” proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Osman Alphan KÜPESİZ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Zafer ÇETİN
Sanko Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci
Öznur TOKTA

Tez Danışmanı
Sibel BERKER KARAÜZÜM

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimime başladığım günden bu yana bilgisi ve desteğiyle her daim yanımda olan, eğitimim ve tezimin hazırlanması sürecinde büyük katkıları bulunan, kendime her yönüyle örnek aldığım çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e tüm emekleri için sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca sahip oldukları bilgileri ve deneyimlerini aktaran ve yol gösteren tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma, asistan arkadaşlarıma, çalışanlarına ve sekreterine;

Tez çalışmama biyolojik örneklerin sağlanmasında ve çalışma örneklerine ait klinik bilgilere ulaşmamda desteğini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Elif GÜLER, Prof. Dr. Osman Alphan KÜPESİZ ve Dr. Öğr. Üyesi Gülen TÜYSÜZ KINTRUP'a, Arş. Gör. Ayşe Çiğdem SİVRİCE ve Ayşe Nur AKINEL'e;

Tez çalışmam süresince deneylerimi yaparken güler yüzlü destekleri ve her türlü yardımları için Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi çalışanlarına, özellikle Biyolog Ebru KALAY'a;

Her zaman yanımda olan dostlarım; Ebru KÖSE, Ceren HANGÜL, Uğur KESKİN, Murat BİLLOR'a;

Hayatımın her noktasında beni destekleyen ve üzerimde sonsuz emeği olan babam Orhan TOKTA, annem Havva TOKTA ve kardeşlerim Aybüke TOKTA, Sümeyra TOKTA'ya;

Tüm sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Çocukluk çağı öncül B-ALL (pre-B ALL) tanısı alan olguların yaklaşık %85'i tedaviye iyi yanıt vererek remisyona girerken, %15'inde relaps gözlenmekte ve bu nedenle de hastalar kaybedilmektedir. B-ALL'de bazı genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin tedaviye direnç ve hastaların sağ kalım süreleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, çocukluk çağı pre-B ALL olgularında konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerle belirlenemeyen relaps ilişkili *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* ve *Survivin* genlerinin tanı anında ekspresyon düzeylerinde değişiklik olup olmadığının belirlenerek, ekspresyonu değişen gen/genlerin relaps riskinin önceden saptanabilmesi için aday bir biyobelirteç olarak ortaya konabilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Pre-B ALL tanılı 15 çocukluk çağı olgusundan ilk tanı anında alınan kemik iliği ve 5 sağlıklı kemik iliği donörüne ait alınan kemik iliği aspirasyon materyallerinden RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak, *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* ve *Survivin* genlerinin; “housekeeping” gen olarak ise β -Aktin geninin mRNA ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. qRT-PCR elde edilen bulgular Shapiro-Wilk ve Kolmogorov Smirnov Z testi kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır.

Bulgular: Çalışma sonucunda kontrol grubuna kıyasla *AURKA* ($p<0,05$), *CASP1* ($p<0,05$) ve *Survivin* ($p<0,05$) genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde yaygın olarak tercih edilen yöntem olan $2^{-\Delta\Delta CT}$ analizi ile istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunurken, ΔCT değerleri bakımından sadece *Survivin* geninde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir. *GPM6B*, *NUDT15* ve *S100A8* genlerinde ise mRNA ekspresyon düzeylerinde hem ΔCT değerleri bakımından hem de $2^{-\Delta\Delta CT}$ analizi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Sonuç: Çocukluk çağı pre-B ALL olgularında $2^{-\Delta\Delta CT}$ analizi ile *AURKA*, *CASP1* ve *Survivin* genlerinin ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların tespit edilmesi relaps riskinin belirlenmesi için bu üç genin tanı anında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: çocukluk çağı öncül B-ALL, relaps, relaps ilişkili genler, qRT-PCR

ABSTRACT

Objective: While approximately 85% of childhood precursor B-ALL cases go into remission with a good response to treatment, relapse is observed in 15% of cases leading to death. Level changes in the expression of some genes found to be associated with resistance to treatment and survival in B-ALL. We aimed to determine whether there is a change in the expression levels of relapse-related *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* and *Survivin* genes which cannot be determined by conventional cytogenetic and molecular cytogenetic methods in childhood pre-B ALL cases at the time of diagnosis. With this study, in order to determine the relapse risk, it is aimed to identify candidate biomarkers, via analysing the change in the expression level of indicated genes.

Method: cDNA synthesis had been performed following RNA isolation from bone marrow aspiration materials of 15 childhood cases with Pre-B ALL at the time of first diagnosis and from bone marrow aspiration materials of 5 healthy bone marrow donors. mRNA expression levels of *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* and *Survivin* genes; and additionally as a "housekeeping" gene levels of the β -Actin gene had been investigated using Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) method. The findings obtained as a result of qRT-PCR analysis had been statistically analyzed using Shapiro-Wilk and Kolmogorov Smirnov Z test.

Results: As a result of this study, statistically significant increase had been found in the mRNA expression levels of *AURKA* ($p < 0.05$), *CASP1* ($p < 0.05$) and *Survivin* ($p < 0.05$) genes compared to the healthy group with $2^{-\Delta\Delta CT}$ analysis, which is the commonly preferred method. While there was an increase in ΔCT values, a statistically significant difference was determined only in the *Survivin* gene. In the *GPM6B*, *NUDT15* and *S100A8* genes, there was no statistically significant difference in mRNA expression levels both in terms of ΔCT values and $2^{-\Delta\Delta CT}$ analysis.

Conclusion: The detection of statistically significant differences in the expression levels of *AURKA*, *CASP1* and *Survivin* genes with $2^{-\Delta\Delta CT}$ analysis in childhood pre-B ALL cases suggests that these three genes can be used as biomarkers at the time of diagnosis to determine the risk of relapse.

Key words: childhood precursor B-ALL, relapse, relapse-associated genes, qRT-PCR

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 EPİDEMİYOLOJİ.....	3
2.2 BİYOLOJİ	5
2.3 PATOGENEZ	7
2.4 EPİGENETİK	9
2.5 KLİNİK BULGULAR	15
2.6 ÇOCUKLUK ÇAĞI B ÖNCÜL HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ (BCP-ALL).....	18
2.6.1 B-ALL'nin İmmünofenotipik Sınıflandırılması.....	18
2.7 TEDAVİ	19
2.8 RELAPS	22
2.8.1 Relaps ilişkili Genler	25
2.9 TEZ KAPSAMINDA ARAŞTIRILAN GENLER.....	26
2.9.1 <i>Aurora A (AURKA)</i>	26
2.9.2 <i>KASPAZ-1 (CASP1)</i>	28
2.9.3 <i>Glikoprotein M6B (GPM6B)</i>	29
2.9.4 <i>NUDT15</i>	30
2.9.5 <i>S100A8</i>	31
2.9.6 <i>Survivin</i>	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1 HASTA SEÇİMİ	34
3.2 KEMİK İLİĞİNDEN TOTAL RNA İZOLASYONU	34
3.3 REVERS TRANSKRİPSİYON PCR (RT PCR) İLE cDNA SENTEZİ	36
3.4 cDNA ÖRNEKLERİNİN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMÜ	37
3.5 KANTİTATİF REAL-TİME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR).....	37
3.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	38
4.BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	58
EKLER	95
ÖZGEÇMİŞ	96

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO 2.1: Akut Lösemili Çocuklarda Belirti ve Bulgular.....	16
TABLO 2.2: Çocukluk Çağı ALL Risk Sınıflandırılması	17
TABLO 2.3: Çocukluk Çağı ALL Kanseri Genetiğine Göre Risk Sınıflandırılması	17
TABLO 2.4: B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Tanısındaki İmmünofenotipik Belirteçler.....	19
TABLO 3. 1: cDNA Eldesinde Kullanılan Malzemeler ve Miktarı	36
TABLO 3.2: cDNA Sentez Basamakları	36
TABLO 3.3: qRT-PCR'ın Reaksiyon Koşulları	37
TABLO 3.4: qRT-PCR Amplifikasyon Basamakları	38
TABLO 3.5: Tez Projesi Kapsamında Araştırılan Genlerin Primer Dizileri	38
TABLO 4.1: Çalışmaya Dahil Edilen Olguların Yaş Dağılımı	39
TABLO 4.2: Çalışmaya Dahil Edilen Olgu Ve Kontrol Grubuna Ait Cinsiyet Dağılımı Ve Yaş Ortalamaları.	39
TABLO 4.3: <i>Survivin, AURKA, CASP1, GPM6B, NUDT15, S100A8</i> Genlerine Ait Δct Değerlerinin Ham Verileri	41
TABLO 4.4: Deneyler Sonucunda Elde Edilen Kontrol Ve Olgulara Ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değerlerine Ait Veriler	41
TABLO 4.5: Tez Kapsamında Araştırılan Genlerin Δct Ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değerlerinin Normal Dağılım Analizi	42
TABLO 4.6: <i>CASP1</i> ΔCT Değerinin İstatistiksel Analiz Sonucu	43
TABLO 4.7: <i>Survivin, AURKA, GPM6B, NUDT15 VE S100A8</i> Genlerinin İstatistiksel Analiz Sonucu.....	43
TABLO 4.8: <i>AURKA, CASP1, GPM6B, NUDT15, S100A8, SURVİVİN</i> Genlerinin Kolmogorov Smirnov Z Testinin İstatistiksel Analiz Sonuçları	44
TABLO 4.9: Tez Kapsamında İncelenen Genlerin Kaplan-Meier Testi Analiz Sonuçları	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Çocukluk Çağı Kanseri Vakalarının Yüzdesi (2006-2013) 2018)	3
Şekil 2.2: Çocukluk Çağı ALL'nin Alt Tipleri	4
Şekil 2.3: Çocukluk Çağı ALL'nin Yıllara Göre Genel Sağkalımı	5
Şekil 2.4: Çocukluk Çağı ALL'nin Sitogenetik Alt Tiplerinin Sıklığı	8
Şekil 2.5: Akut Lenfoblastik Löseminin Patogenezi	9
Şekil 2.6: Çocukluk Çağı ALL'de Tanısal ve Prognostik Bir Belirteç Olarak miRNA'nın Potansiyel Uygulamaları.....	13
Şekil 2.7: Akut Lenfoblastik Lösemi Alt Grupları İçin Önemli Olan On Ayırt Edici miRNA Seti	14
Şekil 2.8: Çocukluk Çağı ALL İçin Uygulanan Tedavi Programı	20
Şekil 2.9: ALL Hedefleyen İlaçların Yan Etkileri.....	22
Şekil 2.10: B-ALL Patogenezinde Relapsa Neden Olan Yolaklar	24
Şekil 2.11: ALL'de Tanı ve Relaps Örneklerinin Klonal İlişkisi	25
Şekil 2.12: AURKA ve AURKB'nin Mitoz Evreleri Boyunca Görev Aldığı Bölgeler	26
Şekil 2.13: AURKA Geninin Tümör Oluşumunda Etkili Olan Sinyal Yolakları.....	27
Şekil 2.14: Kaspaz-1'in Görev Aldığı Mekanizmalar	28
Şekil 2.15: Survivin'in Tümör Gelişiminde Rol Aldığı Mekanizmalar.	32
ŞEKİL 4.1: Survivin, AURKA, CASP1, GPM6B, NUDT15, S100A8 Genlerine Ait A) Ct Değerlerinin Amplifikasyon Grafiği ve B) Erime Pikleri	40
ŞEKİL 4.2: Göreceli mRNA Ekspresyon Oranı.	44

SİMGELER ve KISALTMALAR

6-MP	6-merkaptopürin
AML	Akut Miyeloid Lösemi
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AURKA	Aurora A
B-ALL	B hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
BCP-ALL	Çocukluk Çağı B Öncül Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
BCR-ABL1	Breakpoint cluster region- ABL protooncogene 1
BIRC5	Baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat containing 5
CASP1	Kaspaz-1
cDNA	Komplementer DNA
Chk2	Kontrol Noktası Kinaz 2
CPC	Kromozomal Yolcu Kompleksi
Ct	Eşik Döngüsü (Cycle Treshold)
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA metiltransferaz
EFS	Event free survival (Olaysız sağkalım)
ETV6	Ets variant 6
GC	Glukokortikoid
GPM6B	Glikoprotein M6B
GSDMD	Gasdermin D
GWAS	Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları
HSCT	Hematopoetik Kök Hücre Nakli
IAP	İnhibitör Apoptotik Protein
ICE	IL-1 beta dönüştürücü enzim
IL-1β	İnterlökin 1 β
IL-18	İnterlökin 18

iAMP21	Intrachromosomal amplification of chromosome 21
KLL	Kronik Lenfoblastik Lösemi
MLL	Mixed lineage leukemia
MDS	Myelodisplastiksendrom
miRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
OS	Overall survival (Genel sağkalım)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
Ph	Philadelphia
PLP	Proteolipid protein
PRC2	Polycomb baskılayıcı kompleks 2
Pre B-ALL	Öncül B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
pro-B ALL/ Erken pre-B-ALL	Erken Öncül B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
qRT-PCR	Kantitatif Real Time-PCR
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Revers-Transkriptaz PCR
RUNX1	Runt related transcription factor 1
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TdT	terminal deoksinükleotidiltransferaz
TP53	Tümör proteini 53
WBC	Lökosit
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Birçok gelişmiş ülkede çocuklarda en yaygın ikinci ölüm nedeni olan kanser, ülkemizde ilk dört sıra içinde yer almaktadır. İmmatür lenfohematopoetik hücrelerin malign proliferasyonu ve birikimi olan lösemi, en sık görülen çocukluk çağı kanseridir. En sık görülen alt tipi olan akut lenfoblastik lösemi, vakaların %75-80'ini oluşturur (Uzunhan ve Karakaş,2012). Akut lenfoblastik lösemilerin Türkiye'de yıllık insidansı ise 1.5/100.000'dir (Yöntem ve Bayram,2018).

Çocukluk çağı ALL olgularının %85'i B hücre öncülerinden köken almaktadır (Tasian ve ark.,2015). Bu lösemik hücrelerin biyolojik davranışlarını ve tedaviye duyarlılıklarını belirleyen en önemli faktör, hücrelerin genetik özellikleridir. Çocukluk çağı B-ALL olgularının yaklaşık %70-75'inde konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle tanımlanabilen rekürrent kromozomal abnormaliteler gözlenmektedir. Bu abnormalitelerin çoğu prognostik öneme sahiptir ve bazı tedavi protokolleri uygulanırken risk belirlemede kullanılır. Sayısal kromozom artışının olduğu hiperdiploidi ve t(12;21)(p13;q22) translokasyonu sonucu oluşan ETV6-RUNX1 füzyonu en sık görülen genetik alt gruplar olup, bu iki kromozomal abnormalite tedaviye iyi yanıt ile ilişkilendirilirken, 11q23 bölgesinde lokalize olan *MLL* genini içeren yeni düzenlenmeler ve 44 veya daha az kromozomun varlığı ile karakterize olan hipodiploidi kötü prognozu işaret etmektedir (Tekgündüz ve ark.,2010). Bunun yanında ALL olgularının %25-30'luk bir kısmı tanı anında rutinde kullanılan genetik yöntemlerle karakterize edilememektedir ve dolayısıyla da hastalığın relaps riski bilinmemektedir (Tasian ve Hunger,2017). Ayrıca yapılan son çalışmalarda tedavi sırasında oluşan ikincil somatik mutasyonlar da tedaviye direnç ve relapsta oldukça büyük önem kazanmaktadır.

Erişkin ALL'de BCR-ABL füzyon geninin olup olmadığına bağlı olarak risk grupları belirlenirken, çocukluk çağı ALL'de de risk grupları belirlenirken yaş, lökosit sayısı, sitogenetik bulgular, başlangıç indüksiyon kemoterapisine cevaplılık, santral sinir sistemi ve testisin etkilenme durumu da değerlendirilmektedir (Schultz ve ark.,2007) Tüm bu kriterler birlikte değerlendirildiğinde tedaviye direnç gösteren risk grubu olguların

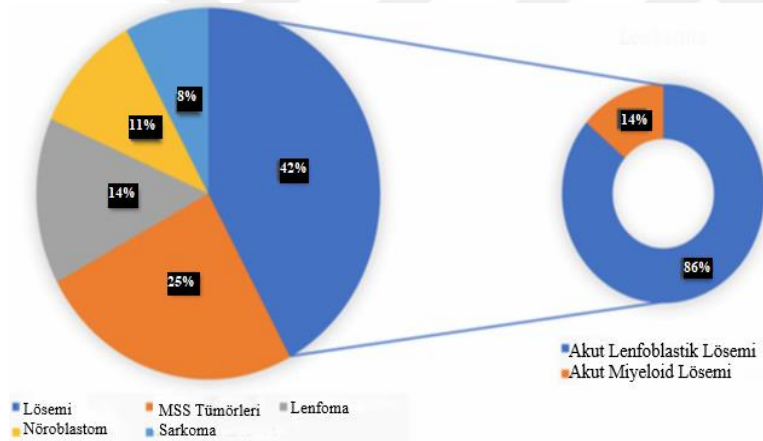
tanımlanması mümkün olamamaktadır. Daha etkili tedavi planları geliştirmek ve hastaların hayatta kalma oranlarını iyileştirmek umuduyla, relaps ALL'yi yöneten moleküler mekanizmalara yönelik daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Gen ekspresyon profili, lösemiler de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için potansiyel biyobelirteç ve yeni terapötik hedefleri tanımlamak için güçlü bir yaklaşımı temsil eder. Gen ekspresyon profili aynı zamanda relaps ALL'ye neden olan genetik mekanizmayı anlamak için kullanılan yöntemlerden biridir. 2016 yılında yapılmış olan bir çalışmada kromozomal düzensizlikleri olup olmadıklarına bakılmaksızın tanı sırasındaki tüm hastaların risk gruplarını belirlemek için gen ekspresyon profilinin kullanılmasının mümkün olabileceği ifade edilmektedir (Núñez-Enríquez ve ark.,2016).

ALL ile yapılan çalışmalarda relaps ile ilişkili yüzden fazla gen tanımlanmıştır. *S100A8*, *Survivin*, *GPM6B*, *NUDT15*, *AURKA* ve *CASP1* genlerinin literatürde yer alan diğer çalışmalarda bu genlerin relaps ilişkili olduğu ve tedaviye direnç geliştiren hastalarda ekspresyonlarının önemli ölçüde değişikliğe uğradığı ortaya konulmuştur. Buradan yola çıkarak, bu çalışmada 0-18 yaş aralığında yeni B-ALL tanısı almış 15 olgu ve 5 sağlıklı kontrol bireyinden alınan kemik iliği aspirasyon materyalinden kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile ALL'de relaps ilişkili *Survivin*, *S100A8*, *GPM6B*, *NUDT15*, *AURKA* ve *CASP1* genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılarak, hedeflenen bu genlerin ekspresyon düzeylerinde kontrol ve hasta grubu arasında fark belirlenmesi durumunda, tanı anında relaps riskini belirleyebilecek biyobelirteçlerin tanımlanabilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

İlk kez 1827'de tanımlanan ve 1845'te ayrı bir hastalık olarak kabul edilen lösemi; kemik iliğindeki blastik hücrelerin olgunlaşma ve farklılaşma fonksiyonunu kaybederek kontrolsüz çoğalması ve bu hücrelerin kan ve diğer dokulara yayılımı ile klinik bulgu veren malign bir hastalıktır. Lösemiler ortaya çıkış ve klinik ilerleme hızına göre akut ya da kronik; köken aldıkları hücre tipine göre ise lenfoid ya da miyeloid lösemiler olarak sınıflandırılmaktadır. Akut lösemi çocuklarda yetişkinlerden daha sık görülür, çocuklarda tüm kanserlerin yaklaşık %40'ını ve tüm akut löseminin ise yaklaşık %85'ini akut lenfoblastik lösemi (ALL) oluşturur (Şekil 2.1) (Pui,1995; Pui ve Evans,1998; Pui ve ark.,2001).



Şekil 2.1: Çocukluk çağı kanser vakalarının yüzdesi (2006-2013). (Mohseini ve ark., 2018)

2.1 Epidemiyoloji

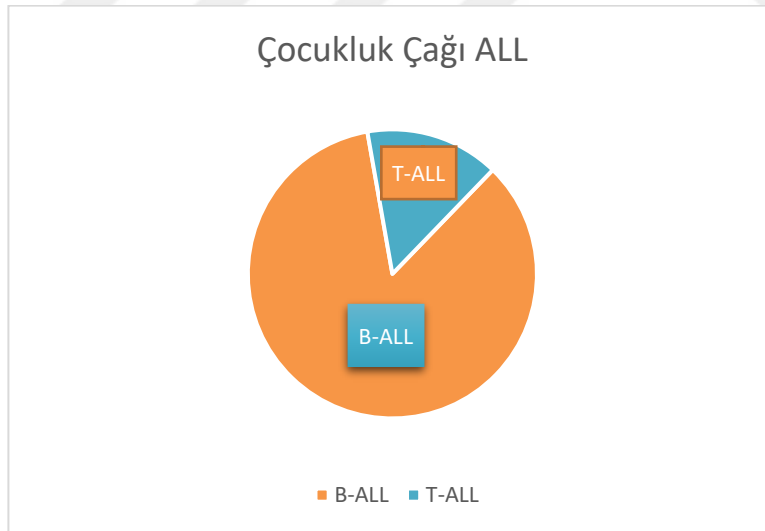
ALL insidansında büyük farklılıklar dünya çapında gözlemlenmiştir. Bu farklılıklar; enfeksiyonlar, tıbbi bakıma etkili erişim, sosyo-ekonomik etkiler ve / veya etnik alt gruplar arasında değişken kanser riski gibi çoklu etmenlerden kaynaklanmaktadır. ALL hem yüksek gelirli ülkelerde hem de düşük gelirli ülkelerde en yaygın çocukluk çağı kanseridir (Abboud ve ark.,2014).

ALL insidansı düşük gelirli ülkelerde milyonda 1 ila 40 oranları arasında değişirken, orta gelirli ülkelerde ve yüksek gelirli ülkelerde ise milyonda 40–50 oranındadır. İnsidansta gerçek bir farklılık olsa da bu farklılıklar düşük gelirli ülkelerde birçok lösemili çocuğun tanı konulmadan ölebilmesi gerçeğiyle de açıklanabilir (Howard ve ark.,2008; Magrath ve ark.,2013).

Görülme sıklığı Kafkasyalılar ve İspanyol popülasyonları arasında en yüksek olan Akut lenfoblastik löseminin ülkemizdeki yıllık insidansı 1,5/100.000'dir (Yöntem ve Bayram,2018).

Çocukluk çağı ALL'nin, 1-4 yaş arasında pik yaptığı belirtilmiştir (Horibe ve ark. 2013). ALL ayrıca erkeklerde kızlara göre daha yaygındır ve erkeklerin prognozu biraz daha kötüdür (Madhusoodhan ve ark.,2016).

Genel olarak bakıldığında çocukluk çağı ALL'nin %85'i B-öncül hücre kökenli olup, kalan %15'i öncül T hücresinden köken almaktadır (Şekil 2.2) (Pui ve ark.,1990).

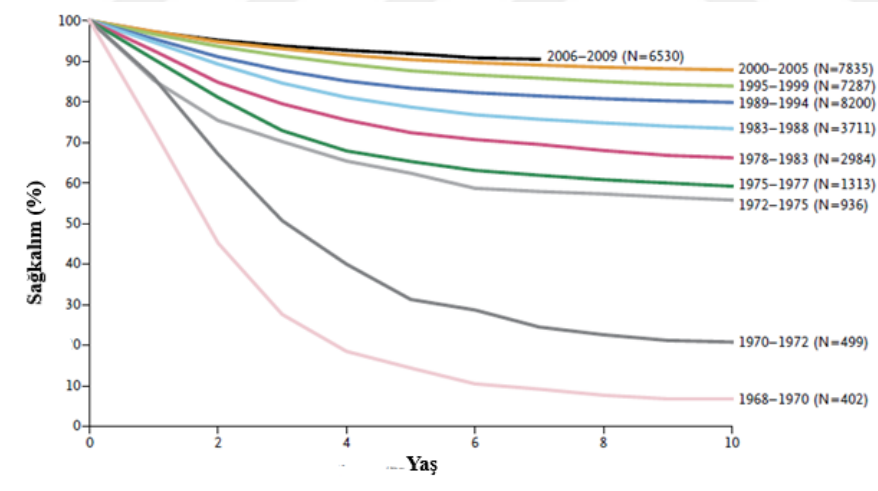


Şekil 2.2: Çocukluk çağı ALL'nin alt tipleri (Hu ve Shu,2018)

2.2 Biyoloji

ALL, B ve T lenfoid hücrelerin gelişiminde ve hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan genlerdeki nokta mutasyonları, kromozomal translokasyonlar ve anöploidi gibi sitogenetik anormallikler sonucu oluşan hematopoetik kök hücrelerin bir malignitesidir. (Hunger ve Mullighan,2015).

Löseminin tanımlanması ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemeler, yeni teknolojilerin geliştirilmesi ve temel biyolojik / tıbbi bilginin birikmesiyle ALL artık bir moleküler genetik bozukluk olarak kabul edilmektedir ve bu nedenle morfolojik, immünofenotipik ve genomik özellikler açısından giderek daha fazla alt tipe ayrılmaktadır. Mevcut terapötik rejim belirlemeleri ve tedavi sonuçları, moleküler alt tip sınıflandırmalarıyla yakından ilişkilidir ve 5 yıllık genel sağkalım (OS) oranları 1960'larda %10 seviyesinin altındayken, günümüzde yaklaşık %85-90'a kadar yükselmiştir (Şekil 2.3) (Xu ve Yang, 2018).



Şekil 2.3: Çocukluk çağı ALL'nin yıllara göre genel sağkalımı, 1968-2009 (Hunger ve ark.,2015)

Kalıtsal bir yatkınlık ve çevresel maruziyetlerin ALL'nin oluşumunda küçük rollere sahip olduğu düşünülmektedir ve vakaların yalnızca %5'inde kalıtsal yatkınlık görülmüştür. B-ALL ile ilişkili en yaygın genetik hastalık, Down sendromudur. Down sendromlu çocuklar hem miyeloid hem de lenfoid lösemiler için daha yüksek risk altındadır (Hasle ve ark., 2000; Hasle 2001). Düşük hipodiploidi (32-39 kromozom) belirlenen ALL hastalarının

yaklaşık yarısının normal hücrelerinde Li-Fraumeni sendromunun özelliği olan tümör proteini p53 (TP53)'ü kodlayan gen mutasyonları mevcuttur (Holmfeldt ve ark., 2013)

Ayrıca Fanconi anemisi, Bloom sendromu ve Nijmegen kırık sendromu gibi DNA onarım mekanizması hataları ile oluşan hastalıklarda ALL'ye yatkınlık bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS) *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE*, *CDKN2A*, *PIP4K2A* ve *GATA3* gibi genlerdeki belirli tek nükleotid polimorfizmlerinin ALL gelişimine yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Moriyama ve ark., 2015). Yine yapılan bir başka GWAS çalışmasında 17q12 'de *IKZF3* genine yakın lokalize olan bir tek nükleotid polimorfizmi (SNP) (rs2290400), 8q24'teki bir diğer SNP (rs4617118) ki bu da *GSDMC* genine yakın bir diğer SNP (rs1991866) ile ilişkilendirilmiş olup, bu lokusların ALL etiolojisine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Ayrıca bu lokuslarda etnik kökenler arasında bir fark görülmediği bildirilmiştir (Wiemels ve ark.,2018; Vijayakrishnan ve ark.,2017). Ancak, ALL insidansında ırksal farklılıklara bağlı olarak, farklı soylardan olan hastalarda bu varyantların yaygınlığında önemli farklılıklar bulunmuştur. Bu varyantların her birinin ALL oluşturma riskinde yaklaşık olarak 1.5-2 kat oranında artışa neden olduğu gösterilmiştir. (Xu ve ark.,2013)

ALL'de cinsiyetle ilişkilendirilmiş SNP'ler de bulunmaktadır. Cinsiyete göre ALL ile ilişkili varyasyon gösteren SNP'ler, *ERCC134* ve *HLA* (örneğin DQA1*01) genlerinde bildirilmiştir. Bu SNP'lerin cinsiyete özgü varyasyonları, ALL insidansının erkeklerde daha sık görülmesinin bir kısmını açıklayabilir (Wang ve ark, 2006; Singh ve ark.,2016).

Çocukluk çağı lösemilerinin ortaya çıkışında rol oynayan çevresel faktörler arasında; doğum öncesi ve / veya çocukluk çağında tütün ve alkole maruz kalma, ev kimyasalları (boya maruziyeti gibi), trafik gazları ve dumanlar, benzen, çözücüler ve böcek ilaçları yer alır (Schüz ve Erdmann,2016). Pestisitlere maruz kalma, çocukluk çağı lösemisi için en sık incelenen risk faktörlerinden biridir ve hamilelik veya çocukluk döneminde pestisit maruziyeti ve çocukluk çağı lösemi riski arasında pozitif bir ilişki olduğu doğrulanmıştır (Van Maele-Fabry ve ark.,2019).

Diğer taraftan, lösemi tanısı alan çocuklar, yaşamları boyunca çevresel maruziyetlerin kümülatif etkisi nedeniyle genellikle kanser geliştiren yetişkinlerden farklı olarak, kansere neden olacak çevresel ajanlara yeterince uzun süreçte maruz kalmazlar. Bu nedenle, genetik duyarlılık, çevresel maruziyetlerin etkileri üzerinde önemli bir rol oynayabilir (Brisson ve ark.,2015). Örneğin *CDKN2A* ve *IKZF1* genlerinin ALL'deki somatik değişiklikler tarafından hedeflenmesi hem kalıtsal hem de somatik genetik varyasyonların ALL'nin oluşumunda birlikte rol oynadığını düşündürmektedir (Mullighan ve ark. 2007, Bhojwani ve ark.,2015).

2.3 Patogenez

ALL' ye neden olan olaylar tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalarda tekrarlayan sitogenetik ve moleküler genetik anormalliklerin, sıklıkla hematopoetik farklılaşmanın hayati moleküler bileşenlerini, hücre döngüsünü, tümör baskılanmasını ve kök hücrenin yenilenmesini hedefleyerek, ALL patogeneğinde anahtar rol oynadığı tespit edilmiştir (Liu ve ark.,2016).

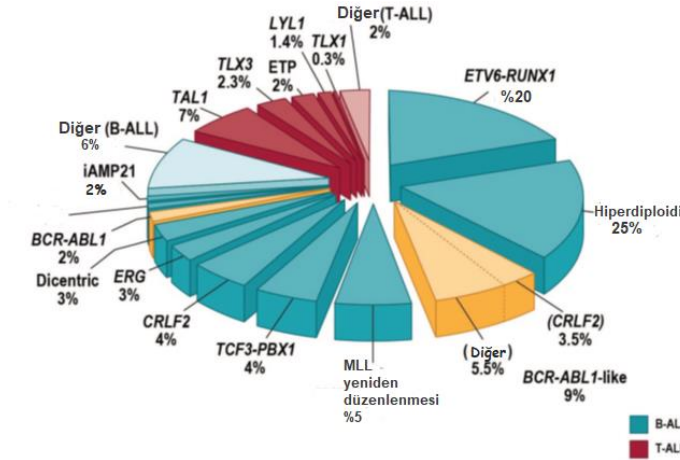
ALL olgularında %25-30'unda en sık görülen sitogenetik anomali; kromozomların sayısal artışı (en sık X,4,6,10,14,17,18 numaralı kromozomların trizomileri ve 21 numaralı kromozomun trizomisi ya da tetrazomisi) ile ortaya çıkan hiperdiploidi (kromozom sayısı: 51-67) dir. En sık 1-4 yaş aralığında görülen bu bulgu tedaviye mükemmel yanıt ile ilişkilendirilmektedir. Diğer bir sayısal sitogenetik anomali ise hipodiploidi (Kromozom sayısının 44'ten az olması ($44 \leq$) olup olguların %5-8'inde görülmekte ve kötü prognozun göstergesi olarak kabul edilmektedir (Paulsson ve Johansson,2009; Dastugue ve ark. 2013; Pui ve ark. 2011).

ALL'de sayısal kromozom anomalilerine ilave olarak kromozomal translokasyonlar, DNA kopya sayısı değişiklikleri (örneğin; delesyonlar ve amplifikasyonlar vb.) ve SNP gibi geniş bir genetik değişiklikler spektrumu vardır. Kromozomal translokasyonlar içinde en önemlilerinden birisi *t(12;21)(p13;q22)(ETV6-RUNX1)* translokasyonudur. B-ALL olgularının %25'inde görülen bu kriptik translokasyonun varlığında, tıpkı hiperdiploidi bulunduran olgularda olduğu gibi tedavide iyi yanıt gözlenmektedir (Schultz ve ark.,

2007). Ancak vakaların %2'sinde belirlenen *RUNX1* genini içeren 21q22 bölgesinin kromozom içi amplifikasyonu (iAMP 21) ise kötü prognozla ilişkilidir (Harrison, 2015).

Yetişkin ALL'de çok daha yüksek insidansına karşılık çocukluk çağı ALL'nin % 2-3'ünde bulunan bir diğer translokasyon ise t(9; 22)(q34; q11)(*BCR-ABL*) translokasyonudur. (Pui ve ark. 2011). Bu translokasyonun ürünü olan Philadelphia (Ph) kromozomu pozitif ALL tarihsel olarak, 5 yılda %34'e varan genel sağkalım (OS) ile kötü bir prognoza sahipken (Aricò ve ark. 2010), tedavide tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımına bağlı olarak 5 yıllık genel sağkalım oranı %70'lere yükselmiştir (Schultz ve ark.,2014).

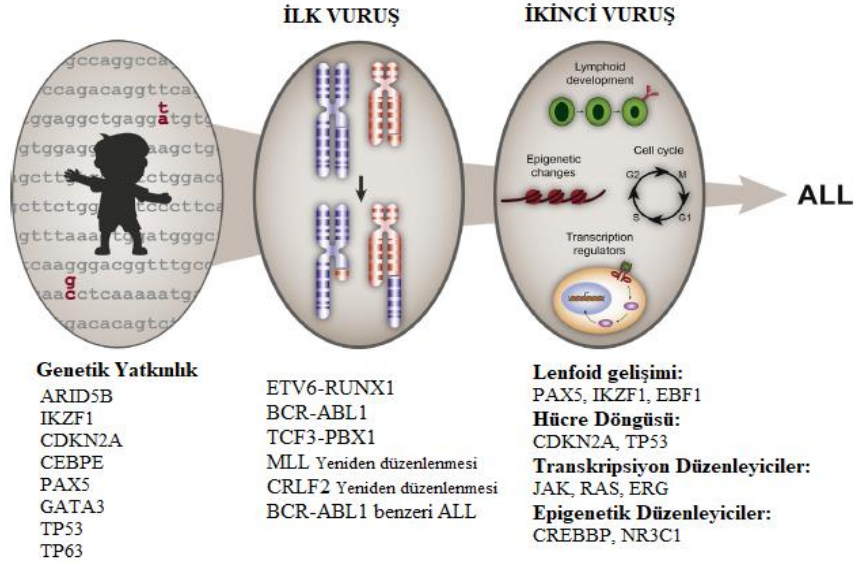
Bir diğer öne çıkan yapısal kromozom anomalisi,11q23 bölgesinde lokalize (*KMT2A=MLL*) genini içeren ve “Epigenetik Malignansi” olarak da adlandırılan yeniden düzenlenmelerdir. Tüm çocukluk çağı B-ALL olgularının %3-10'nunda gözlenirken, infant ALL'nin yaklaşık %75- 90'ında görülür ve kötü prognozla ilişkilidir (Pieters, 2009). Çocukluk çağı ALL'nin patogenezinde rol oynayan sitogenetik alt tiplerinin sıklığı Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Mullighan,2012).



Şekil 2.4: Çocukluk çağı ALL'nin sitogenetik alt tiplerinin sıklığı

Çeşitli çalışmalar, çocukluk çağı ALL'de ilk genetik lezyonun sıklıkla rahimde meydana geldiğini göstermiştir. Guthrie kartlarından alınan kan örneklerindeki ALL'ye ait genetik lezyonların çoğunun taranması, bunların doğum öncesi kökenini destekler. Bu çalışmalar, doğumda alınan kan örneklerinde ve tanı anında lösemik blastlarda aynı gen füzyonunun

varlığını göstermiştir. Yapılan üç farklı çalışmada, infantil ALL olgularında %100 oranında intrauterin bir *MLL-AF4* (Gale ve ark.,1997; Yagi ve ark., 2000; Fasching ve ark., 2000) iki ayrı çalışmada çocukluk çağı ALL'de %75 oranında *ETV6-RUNX1* (Wiemels ve ark.,1999; Hjalgrim ve ark., 2002) bir diğer çalışmada olguların %10'unda *E2A-PBX1* (Wiemels ve ark.,2002) füzyonu doğum öncesinde de gösterilmiş, bir başka çalışmada ise 17 ALL olgusundan 9'unun yenidoğan kan örneğinde hiperdiploidi gözlenmiştir (Taub ve ark., 2002). Ancak, bahsedilen tüm vakalar için bu ilk onkogenik viruşun yeterli olmadığı ve hastalığın ortaya çıkabilmesi için doğum sonrası ilave mutasyonların (ikinci viruşun) gerekli olduğu kabul edilmektedir (Şekil 2.5) (Greaves, 2005).



Şekil 2.5: Akut lenfoblastik lösemnin patogenezi

2.4 Epigenetik

Epigenetik mekanizmalar, normal hücre gelişimi ve işleyişinde rol oynayan temel faktörlerdir. Bu mekanizmadaki değişiklikler kanser gelişimine sebep olur. Epigenetik mekanizmalar arasında; DNA metilasyonu, histon proteinlerinin modifikasyonları, kromatin modifikasyonları ve kodlamayan(non-coding) RNA' lar sayılabilir (San Jose-Eneriz ve ark.,2013).

Histon proteinlerinin modifikasyonları asetilasyon ve metilasyon süreçlerini içerir. Asetilasyon, transkripsiyonel aktivasyona neden olurken de-asetilasyon, transkripsiyonun susturulmasına neden olur. Histonların asetilasyonunda “histon asetiltransferaz” enzimi görev alırken de-asetilasyonunda “histon deasetilaz” enzimi görev alır (San Jose-Eneriz ve ark.,2013; Meyer ve Hermiston,2019).

Metilasyon, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan diğer bir epigenetik düzenleyicidir. Metil grupları, DNA metiltransferazlar (DNMT) yoluyla DNA'ya eklenir ve demetilaz enzimlerinin aktivitesi ile uzaklaştırılır. Sitozin metilasyonu; memeli genomunda promoter dizilerinin önemli bir yüzdesinde bulunan CpG adaları olarak bilinen sitozin-guanin dinükleotid dizisinde meydana gelir. Bu CpG adalarının metilasyonu genellikle gen ekspresyonunun baskılanması ile ilişkilidir. CpG metilasyon modelleri normal gelişim sırasında sıkı bir şekilde düzenlenirken, anormal CpG metilasyonunun iki ana mekanizma yoluyla onkogeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir:

- İlk olarak, promotör bölgesinde bulunan CpG adalarının hipermetilasyonu, ilişkili genlerin transkripsiyonel olarak susturulmasına yol açar. Bu şekilde, tümör baskılayıcı genlerin promotör hipermetilasyonu, bu genlerin epigenetik olarak susturulmasıyla tümör baskılayıcı aktivitesinin tamamen kaybolması ile sonuçlanabilecektir.
- İkinci olarak, promotör bölgesinin dışındaki CpG adalarının global hipometilasyonunun genomik kararsızlığı arttırdığı ve dolayısıyla kromozomal anormalliklerin kazanılmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Bu anormalliklerin her ikisi de ALL'de, hastalığın biyolojisinde farklılıklara ve tedaviye yanıtın etkilenmesine katkı sağlamaktadır (Meyer ve Hermiston,2019).

ALL'de DNA metilasyon modifikasyonlarında (örn., *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* ve *IDH2*) ve histon modifikasyonlarında (örn. *SUZ12*, *EZH2*, *EED* gibi polycomb baskılayıcı kompleks 2 [*PRC2*] üyeleri ve *EP300*) rol oynayan genlerde değişiklikler belirlenmiştir (Girardi ve ark.,2017; Neumann ve ark.,2015). Histon metiltransferaz kodlayan genlerden

KMT2D geninin yetişkin B-ALL’de, *WHSC1* geninin ise çocukluk çağı B-ALL’de yaygın olarak epigenetik modifikasyonu bildirilmiştir (Li ve ark.,2018).

Epigenetik değişiklikler özellikle metilasyon profilleri, ALL'nin biyolojik alt tipleri ile ilişkilendirilmiştir. İnfant ALL’de *MLL* yeniden düzenlenmelerinde sıklıkla hipermetilasyon gözlenmiştir (Carroll ve Raetz, 2012; Nordlund ve Syvänen,2018). *ETV6-RUNX1* füzyonu belirlenen olguların %14-20’sinde ve *TCF3-PBX1* füzyonu gözlenen olguların ise %15’inde ise epigenetik fonksiyonu olan *WHSC1* geninde mutasyonlar saptanmıştır. Ayrıca bir histon metiltransferaz olan *SETD2* gen mutasyonları *KMT2A* ve *ETV6-RUNX1* yeniden düzenlenmeleri görülen olguların %12’sinde; başka bir histon metiltransferaz olan *EZH2* gen mutasyonları hipodiploidi vakalarının %1,3’ünde, histon fosforilasyonunda etkisi olabilen *JAK2* gen mutasyonları ise *BCR-ABL* benzeri ALL ve Down sendromlu ALL olgularında %10 oranında belirlenmiştir (Janczar ve ark., 2017; Jaffe ve ark., 2013; Sun ve ark., 2017).

Epigenetikte rol oynayan *CREBBP*, *WHSC1*, *KMT5B (SUV420H1)*, *SETD2* ve *EZH2* genlerinin somatik mutasyonları, yüksek hiperdiploidi belirlenmiş çocukluk dönemi B-ALL'de tanımlanırken; (Paulsson ve ark.,2015; de Smith ve ark.,2016; Li ve ark.,2018), *PHF6*, *KMT2D/MLL2*, *DNMT3A*, *TET2*, *SUZ12* ve *EP300* gibi epigenetik düzenleyiciler ve kromatinin modifikasyonuna dahil olan genlerin somatik mutasyonları T-ALL'de tanımlanmıştır (Mullighan,2013; Girardi ve ark.,2017; Neumann ve ark.,2015; Zhang ve ark.,2012).

PHF6 ve *DNMT3A* gen mutasyonları ALL'de kötü prognozla ilişkilidir (Girardi ve ark.,2017; Neumann ve ark.,2015). Önemli bir histon asetiltransferaz geni olan *CREBBP* genindeki mutasyonlar B-ALL’de %18 oranında relaps sırasında gözlenmiştir. Ayrıca bu gendeki mutasyonların çocukluk çağı B-ALL’de relapsa bağlı olarak ilaç direncine de (örneğin, glukokortikoidlere) neden olduğu bildirilmiştir (Mullighan ve ark., 2011; Inthal ve ark., 2012; Gao ve ark., 2020).

Ayrıca 2019 yılında yapılan bir çalışmada, radyasyona maruz kalma, annenin alkol, kafein, sigara içmesi ve folik asit alımı gibi çevresel maruziyetlerin sonucu olarak ortaya

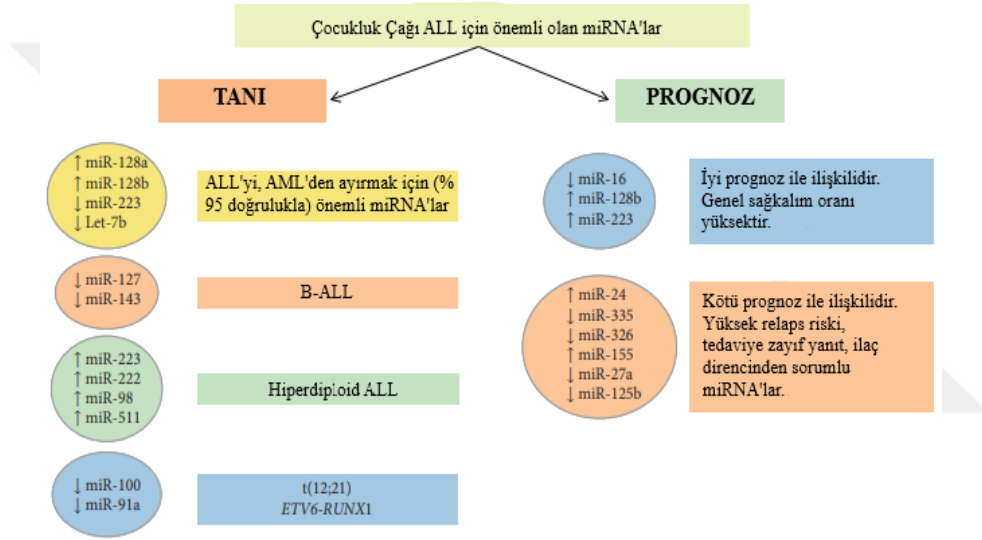
ıkan metilasyon değişikliklerinin çocuklu ağı ALL riskini arttırabileceği ve ALL etiyojisine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Timms ve ark.,2019).

Diğer bir epigenetik mekanizma translasyonu desteklemek veya bloke etmek için mRNA'lara bağlanarak genlerin ekspresyonunu düzenleyen 19-22 nükleotidlik kısa, kodlamayan mikroRNA (miRNA)'lardır. Genomun %1'inin ve genlerin %30'unun mikro RNA'lar tarafından düzenlenebileceği tahmin edilmektedir (Szczepanek, 2020). Kanserlerdeki miRNA ekspresyon düzensizliği; miRNA ile ilişkili genlerin delesyonu veya amplifikasyonu, miRNA'ların anormal transkripsiyonel kontrolü, epigenetik düzensizlik ve miRNA'nın biyogenez mekanizmasındaki kusurlar gibi farklı mekanizmalardan kaynaklanmaktadır (Peng ve Croce, 2016).

Bazı miRNA'ların çocukluk ağı ALL'de ekspresyonlarındaki artış nedeniyle onkojenik bir potansiyele sahip oldukları ileri sürülür. Öte yandan hastaların bir kısmında tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Çocukluk ağı ALL 'deki bazı onkojenik miRNA örnekleri miR-203 ve miR-125b'dir (Gmez-Gmez ve ark.,2019). Çocukluk ağı ALL'de sıklıkla ekspresyon seviyesi azalan tümör baskılayıcı miRNA'lar ise; miR-181a, miR-326 ve miR-200c'dir (Ghodousi ve Rahgozar, 2018; Grobbelaar ve Ford,2019).

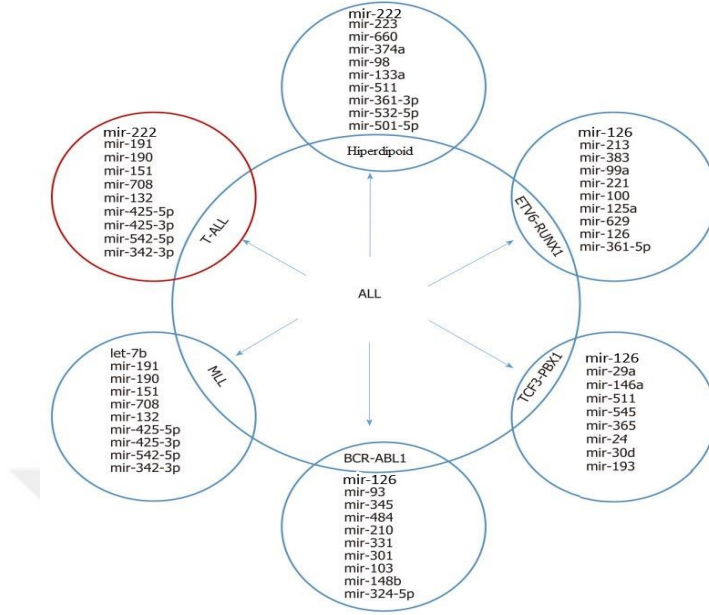
Son alışmalar, salgılanan membran veziküllerinde (mikroveziküller ve ekzozomlar), kan serumu ve diğer vücut sıvılarında hücre dış dolaşımdaki miRNA düzeylerinin çocukluk ağı ALL'nin sınıflandırılması ve prognozunun belirlenebilmesinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Allegra ve ark.,2012; Grobbelaar ve Ford, 2019; Almeida ve ark.,2019; Ultimo ve ark.,2018; Carvalho ve ark.,2018). Örneğin miR-127 ve miR-143'n B-ALL'ye spesifik olduğu; miR-223, miR-222, miR-98 ve miR-511'in ekspresyon değişikliğinin ise hiperdiploidi ile seyreden ALL'ye spesifik olduğu belirtilmiştir (Schotte ve ark.,2011). miR-128b'nin ekspresyon seviyesinin artması; miR-223'n ekspresyon seviyesinin ise azalması iyi prognoz ile ilişkilendirilirken; miR-708'in ekspresyonun artışı standart veya orta risk gruplarıyla; miR -125b'nin ekspresyon seviyesinin azalması, miR-155a ve miR-181a'nın ekspresyon seviyelerinin artışı ise ALL'de kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Nemes ve ark.,2015; Han ve ark.,2011;

Piatopoulou ve ark.,2017; El-Khazragy ve ark.,2019). Diğer taraftan miR-335'in ekspresyon seviyesinin azalması hem kötü prognoz hem de glukokortikoide (GC) karşı direnç (Şekil 2.6), miR-17'nin aşırı ekspresyonu B-ALL'de deksametazona karşı direnç, miR-125b-2 kümesinin (miR-125b, miR-99a ve let-7c'nin) ekspresyon artışı ise çocukluk çağı ALL'de apoptozdan kaçış ve antilösemik ilaçlar olan staurosporin ve daunorubisine karşı direnç ile ilişkilendirilmiştir (Yan ve ark.,2013; Harada ve ark.,2012; Gefen ve ark.,2010).



Şekil 2.6: Çocukluk çağı ALL'de tanısal ve prognostik bir belirteç olarak miRNA'nın potansiyel uygulamaları (Grobblear ve Ford,2018).

ALL kliniği ile ilişkilendirildiğinde, ALL alt gruplarından öne çıkan bazı kritik miRNA'lar aşağıda Şekil 2.7'de özetlenmiştir (Szczepanek, 2020).



Şekil 2.7: Akut lenfoblastik lösemi alt grupları için önemli olan on ayırt edici miRNA seti

miR-125-1 olarak da bilinen miRNA-125b, B-ALL'de tanımlanan ilk miRNA'dır. Normal hücre homeostazının yanında B-ALL patogenezinde ve hastalığın ilerlemesinde önemli bir moleküler düzenleyici olarak tanımlanmıştır (Sun ve ark.,2013; Bousquet ve ark.,2010). So ve arkadaşları, miR-125b aşırı ekspresyonunun (IRF4'ü baskılayarak) tümörjenez, immortalizasyonu ve progenitor hücrelerin kendi kendini yenilemesini indükleyerek miyeloid ve B hücreli lenfoid lösemiye neden olduğunu bildirmişlerdir (So ve ark., 2014). Ayrıca, yüksek miR-125b seviyelerinin, pluripotensi ile ilişkili faktörlerin (OCT4, SOX2, KLF4 ve NANOG) ekspresyonundaki artışla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Puissegur ve ark.,2012). Yapılan çalışmalar sonucunda miR-125b'nin ekspresyonundaki artışın kötü prognoz ve tedavi başarısızlığı ile ilişkili olması nedeniyle ALL tanısında potansiyel biyobelirteç olarak önerilmiştir (Swellam ve ark., 2018).

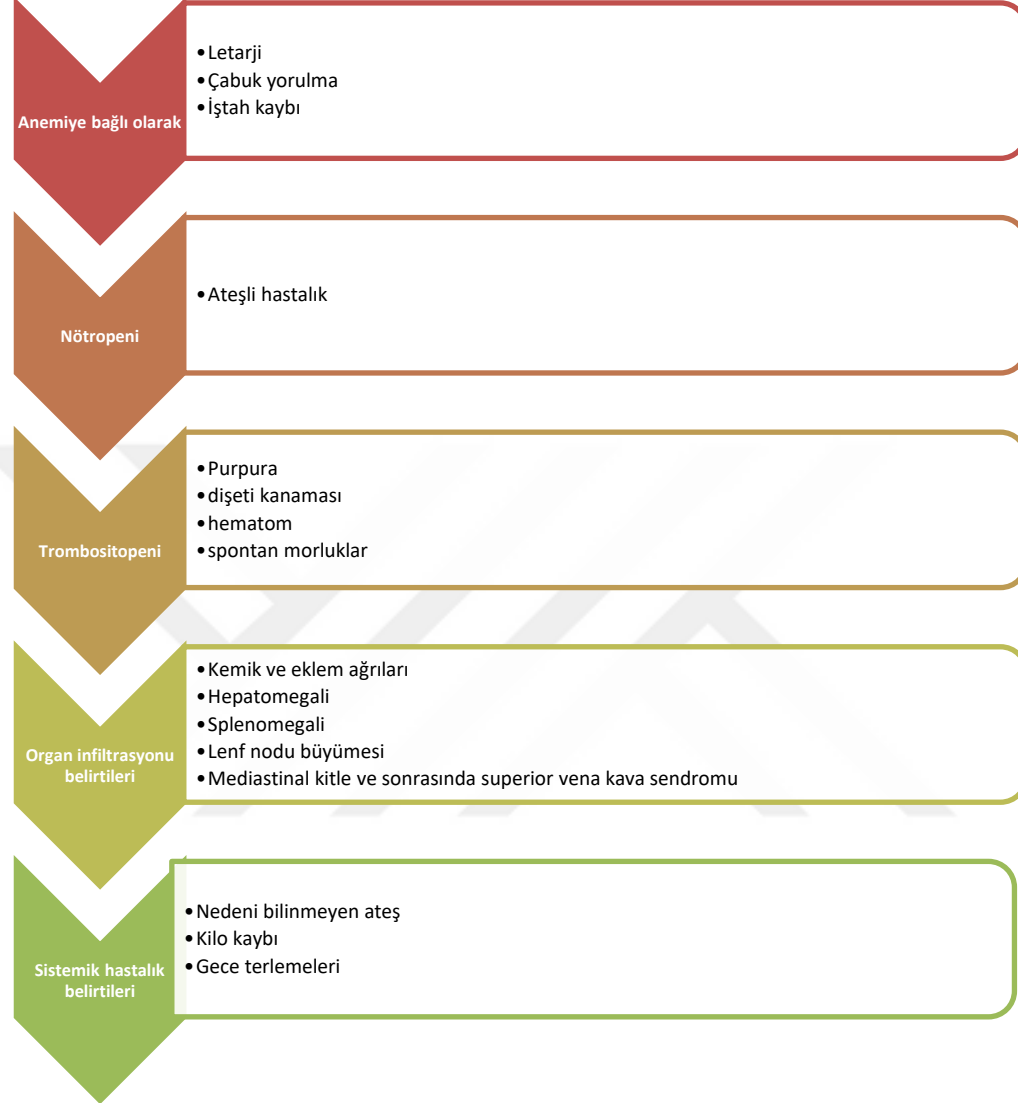
B-ALL ile ilişkilendirilen bir diğer miRNA; miRNA-335 olup miRNA-335'in ekspresyon seviyesinin azalması, çocukluk çağı ALL'de 5 yıllık EFS ve GC direnci ile ilişkilidir. miR-335, MAPK1'i hedeflediğinden, ekspresyonunun azalması, MAPK1, MEK / ERK sinyal yolağı aracılı hayatta kalma, proliferasyon ve lenfoblast hücrelerinde ilaç direncinin artması ile sonuçlanır (Yan ve ark.,2013).

miR-100 ve miR-99a'nın ekspresyon seviyesinin azalması, çocukluk çağı T-ALL'de *MLL*-yeniden düzenleme ve *BCR-ABL* füzyon genlerine sahip çocuklar olgularda bulunmuştur. Bu olgularda genel sağkalım oranının daha düşük ve prognozunu daha kötü olduğu belirlenmiştir (Li ve ark.,2013).

2.5 Klinik bulgular

ALL semptomları hastalığa spesifik olmayıp, genellikle diş eti kanaması, deride mor lezyonlar ve küçük deri altı kanamalar, ağrı, ateş, sitopeni ile ilişkili enfeksiyonlar, anemi, trombositopeni, hepatomegali veya splenomegali, merkezi sinir sistemi bozuklukları, testis ve deri infiltrasyonu, yorgunluk, özellikle boyun veya koltuk altı bölgesinde lenfadenopati ve kilo kaybı olarak gözlenmektedir (Shahverdi ark., 2020). Çocukluk çağı ALL'de görülen belirti ve bulgular Tablo 2.1'de özetlenmiştir (Uzunhan ve Karakaş,2012).

Tablo 2.1: Akut lösemili çocuklarda belirti ve bulgular



Başvuru sırasındaki yaş ve lökosit (WBC) sayısı, Ulusal Kansere Enstitüsü konsensüs kriterlerine göre çocukluk çağı ALL hastalarını riske göre sınıflandırmak için kullanılır. Yüksek riskli özellikler arasında <1 yaş veya > 10 yaş ve WBC sayısı > 50.000 hücre / mm³ bulunur. Merkezi sinir sistemi ve testisler gibi bölgelerde ekstramedüller tutulum ve kortikosteroidlerle uzun süreli ön tedavi de yüksek riskli özellikler olarak kabul edilir (Tablo 2.2). Bu özelliklere ek olarak, genetik bulguların prognostik önemi ve terapötik etkileri bulunmaktadır. ALL’de prognostik öneme sahip genetik değişiklikler Tablo 2.3’te gösterilmiştir (Heikamp ve Pui, 2018).

Tablo 2.2: Çocukluk çağı ALL risk sınıflandırılması (Heikamp ve Pui,2018)

	Standart Risk	Yüksek Risk
Yaş	>1 veya <10 yaş	≤1 veya ≥ 10 yaş
WBC miktarı	<50.000 mm ³	≥50.000mm ³
Ekstramedüller Tutulum	Yok	Var

Tablo 2.3: Çocukluk çağı ALL kanser genetiğine göre risk sınıflandırılması (Heikamp ve Pui, 2018)

KANSER GENOMU	
STANDART RİSK	B- ALL Hiperdiploidi t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1 füzyonu Trizomi 4 ile Trizomi 10 T-ALL NOTCH1/ FBXW7 mutasyonu
ORTA RİSK	B-ALL ZNF384 ilişkili gen füzyonları DUX4 ve ERG deregülasyonu t(1;19)(q23;p13) TCF3/PBX1 T-ALL PTEN inaktivasyonu MLL yeniden düzenlenmesi
YÜKSEK RİSK	B-ALL t(9;22) Philadelphia kromozomu (Ph) ile BCR-ABL 1 füzyonu ve Ph benzeri ALL 11q23 MLL (KMT2A) yeniden düzenlenmesi iAMP21 Hipodiploidi (<44 kromozom) IKZF1 mutasyonu TP53 mutasyonu MEF2D ilişkili gen füzyonları T-ALL Prekürsör T-hücre

Lösemik hücrelerin genetik anormallikler ve kan hücre sayımı parametreleri ile B-ALL'nin immünofenotip olarak sınıflandırılması, hastalığın teşhisi ve prognozunun belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Garza-Veloz ve ark., 2015). Ayrıca ALL'nin flow sitometri ile immünofenotipik sınıflandırılması relaps riskinin belirlenmesi ve ilaçların yan etkilerini azaltmak için önemli parametrelerden biridir.

2.6 Çocukluk Çağı B Öncül Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (BCP-ALL)

B hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), kemik iliğinde B lenfoid öncü hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu ile karakterize hematolojik bir hastalıktır (Purizaca ve ark., 2012).

B-ALL, çocukluk çağında en yaygın görülen hematolojik malignitelerden biridir ve tüm çocukluk çağı ALL vakalarının yaklaşık %85'ine karşılık gelir (Hunger ve ark.,2013). Çocukluk çağı B-ALL hastalarının %85'inden fazlası ilk indüksiyon tedavisinden sonra tam remisyona ulaşsa da hala tedaviye dirençli ve relaps olan birçok hasta vardır. Hastalığın agresif formunda, tedavi edilen çocukların %10-15'inde relaps gözlenir ve %2'si indüksiyon tedavisine yanıt vermez. Relaps olan hastaların genel sağkalımı hala zayıftır ve pek çok çocuk hasta tedavinin yan etkilerine maruz kalır. Bu nedenle, çocukluk çağı B-ALL hastalarında sonucu iyileştirmek ve toksik yan etkileri azaltmak için yeni tedavilerin araştırılması gerekmektedir (Sun ve ark.,2018).

2.6.1 B-ALL'nin İmmünofenotipik Sınıflandırılması

B-ALL hücreleri, B hücre farklılaşma antijenleri CD19, sCD22 ve CD79a'nın ekspresyonu ile karakterize edilir ve sitoplazmik (veya yüzey) CD3 ve miyeloperoksidaz ekspresyonundan yoksundur. Çoğu CD10, CD24, yüzey CD22, CD34 ve terminal deoksिनükleotidiltransferaz (TdT) için pozitif iken CD20 değişkendir. (Compana ve Behm,2000; Jeha ve ark.,2006) B hücresi soyundaki hücre yüzeyi antijenleri ekspresyon profili, B hücresi farklılaşmasına göre değişir. (Szymańska ve Park,2019)

2.6.1.1 Erken Öncül B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (pro-B ALL/ Erken pre-B-ALL)

Erken pre-B-ALL lösemik blast hücreleri, normal kemik iliği B hücresi öncüllerine benzer. Lösemik hücreler her zaman CD19'u eksprese ederler ve hemen hemen tüm vakalarda sitoplazmik CD22 ve CD79α vardır; yüzey CD22 ekspresyonu da çoğu durumda belirgindir. CD10 ve TdT vakaların %90'ında ve CD34 vakaların %75'inden fazlasında pozitifdir. Erken pre-B-ALL hücreleri, yüzey ve sitoplazmik immünoglobulinlerin ekspresyonundan yoksundur.

2.6.1.2 Öncül B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (pre-B ALL)

Pre-B immünofenotipi, saptanabilir yüzey immüoglobulinleri olmaksızın sitoplazmik immüoglobulin μ ağır zincirlerinin birikimi ile tanımlanır. Pre-B ALL; CD19, CD22 ve CD79a'yı ve genellikle CD10 ve TdT'yi eksprese eder, ancak yalnızca üçte ikisi CD34'ü eksprese eder. Birçok pre-B ALL lösemi hücresinin yüzeyinde CD20 yoktur veya düşük seviyelerde eksprese edilir (Vora,2015).

2.6.1.3 Olgun B hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

Çocukluk çağı ALL vakalarının %2-4'ünde, hücreler yüzey immüoglobulin μ ağır zinciri ile κ veya λ hafif zincirini eksprese eder. CD19, CD22, CD20 ve sıklıkla CD10 ifade eder; CD34 negatiftir. (Vora,2015) c-MYC gen yeniden düzenlemeleri ile ilişkili olduklarından olgun B hücreli ALL ve Burkitt lenfomasının lösemik fazı genellikle ayırt edilemez. Olgun B-ALL, evre IV Burkitt lenfoması olarak tedavi edilir (Irving, 2017).

Tablo 2.4'te B hücreli Akut lenfoblastik lösemi tanısındaki immünofenotipik belirteçler gösterilmiştir (Deguchi, 2020).

Tablo 2.4: B hücreli Akut lenfoblastik lösemi tanısındaki immünofenotipik belirteçler

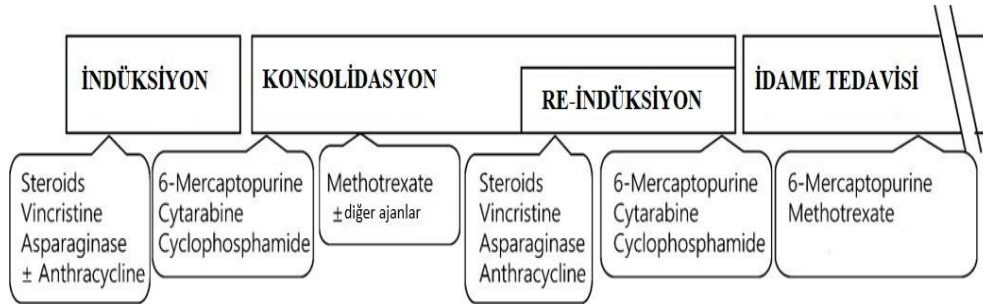
	CD34	CD19	CD10	sCD22	CD20	sIg μ	cIg μ	sIg κ/λ
Pro-B	+	+	-	$\pm$	-	-	-	-
Pre-B	-	+	+	+	$\pm$	-	+	-
Olgun B ALL	-	+	$\pm$	+	+	+	+	+

2.7 Tedavi

ALL tanısı alan olgularda, çocukluk döneminde uygulanan tedaviler sayesinde neredeyse tüm hastalar remisyona ulaşır ve hastaların yaklaşık %85'inin modern tedavi protokolleri ile iyileşmesi beklenir. ALL hastalarının tedavisi genellikle klinik ve laboratuvar özellikleriyle tanımlanan risk grubu sınıflandırmasına göre düzenlenir. (Pavlovic ve ark.,2019). Tedavi süresi 2-3 yıllık bir süre boyunca çoklu ajanlarla uzun süreli

kemoterapi içerir. Tedavi aşamaları geleneksel olarak indüksiyon (indüksiyon remisyonu), konsolidasyon ve idame olarak tanımlanır. Modern denemeler ayrıca, ara bakımdan önce gelen, gecikmiş yoğunlaştırma (re-indüksiyon / konsolidasyon) adı verilen ikinci bir yoğun terapi kürü içerir. Bu aşamalar, tümör yükünü hızlı bir şekilde azaltmak ve ilaca dirençli klonların ortaya çıkmasını önlemek için daha yoğunlaştırılmış bir program ve kemoterapötik ajanlardan oluşur (Madhusoodhan ve ark.,2016).

Tedavinin ilk aşaması olan indüksiyon remisyonunda kullanılan kemoterapi ajanları- vinkristin, kortikosteroid, antrasiklinler ve asparaginazdır (Pui ve ark., 2010). Çocukluk çağı ALL için indüksiyon sonrası (veya konsolidasyon) tedavi seçenekleri arasında siklofosfamid, sitarabin, 6-merkaptopürin ve yüksek doz metotreksat bulunur (Schrappe ve ark.,2000). Konsolidasyon tedavisinin amacı, remisyon indüksiyon tedavisi sonrası hastada kalan lösemik hücreleri uzaklaştırmak ve hastanın erken relaps riskini önlemektir (Dong,2011). Çoğu protokol, aynı ilaçları, yani vinkristin, kortikosteroidler, antrasiklinler ve sitarabini, 6-tiyoguanin gibi başka bir tiyopürinle kombine kullanan bir re-indüksiyon fazı da içerir (Schrappe ve ark.,2000). Yoğun tedavi aşamalarını tamamladıktan sonra, hastaya günlük oral 6-merkaptopürin ve haftalık yine oral metotreksat alımından oluşan idame tedavisi uygulanır (Tomizawa ve Kiyokawa,2017). Çocukluk çağı ALL için uygulanan tedavi yöntemi ve kemoterapi ajanları Şekil 2.8’de gösterilmiştir (Kato,2020).



Şekil 2.8: Çocukluk çağı ALL için uygulanan tedavi programı

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu, klinik ve laboratuvar özellikleri olumsuz olan ALL hastalarında ve relaps olan hastaların tedavisinde çok önemli yer tutar (Pavlovic ve ark.,2019).

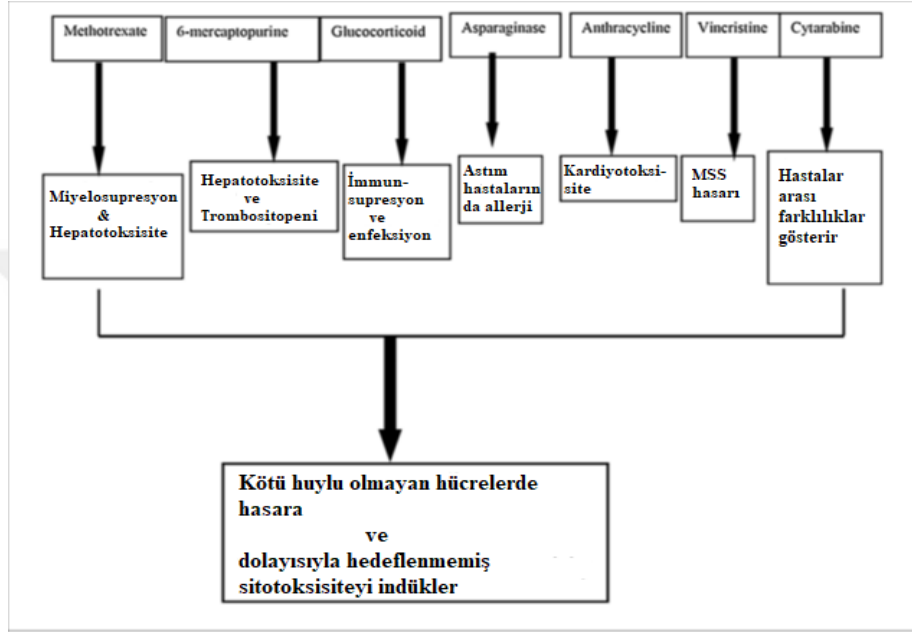
ALL tedavisinde genel sağkalımın (OS) artmasıyla sonuçlanan büyük ilerlemeler olmasına rağmen, ciddi toksisiteler ve relapsa neden olan kemo- direnç gelişimi dahil olmak üzere geleneksel tedavilerin önemli dezavantajları vardır. Bu yüzden yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi, tedavi sonuçlarının iyileştirilmesi için son derece önemlidir (Mohseni ve ark., 2018).

Çocukluk çağı ALL hastalarının %1-3'ünün, hastalığın sonucundan değil, tedavinin yan etkilerinden kaynaklı öldüğü tahmin edilmektedir (Hunger ve Mullighan,2015; Thomas,2015). Çocukluk çağı ALL'de tedavinin yan etkileri; ilaçların yetersiz özgülüğünün, ilaçların küçük terapötik indeksinin ve ilaçlara uzun süreli ve yüksek dozda maruziyetin bir sonucudur. En sık görülen komplikasyonlar; nöro-, kardiyo- ve hepatotoksisite, sindirim sistemi ve böbrek toksisitesi, miyelosupresyon ve osteonekrozdur (Gervasini ve Vagace,2012). Genel toksisite, hasta risk sınıflandırması ile azaltılabilirken, ilaç metabolizmasından sorumlu genlerin genetik varyantlarının neden olduğu bireysel hasta toksisitesi, spesifik genetik testler ve kişiye özel tasarlanmış kemoterapi ile önlenabilir (Pavlovic ve ark.,2019).

Bir bireyin genetik yapısı, ilaç taşınmasını ve metabolizmasını, ilacın etkinliğini ve toksisiteyi etkileyebilir (Bhojwani ve ark.,2015). Çocukluk çağında görülen ALL'de toksisiteye katkısı olan kalıtsal genomik varyasyonun örnekleri bulunmaktadır. *TPMT* gen varyantları (Relling ve ark.,1999; Stanulla ve ark.,2005; Schmiegelow ve ark. 2009) ve *NUDT15* gen varyantı tiyopurin kaynaklı miyelosupresyona (Yang ve ark.,2015); *CEP72* gen polimorfizmi vinkristin ile ilişkili periferik nöropatiye (Diouf ve ark.,2015); *CRHR1* polimorfizmleri ise steroide bağlı düşük kemik yoğunluğuna neden olmaktadır (Jones ve ark.,2008). Asparaginaz tedavisinin yan etkileri arasında en yaygın sorun, alerji indüksiyonudur ve serum asparaginaz klirensinde değişikliklere neden olur. Asparaginazın neden olduğu alerji, astım öyküsü olan hastalarda yaygın olarak gözlenmiştir (Relling ve Ramsey, 2013). Asparaginaz, kısmen lipid homeostazını etkileyerek (Dumitrescu ve ark.,2011) ve kısmen de glukokortikoid ilaçlarının seviyelerini etkileyerek, glukokortikoidlerin osteonekroz riskini artırabilir (Kawedia ve ark.,2012). Diğer taraftan alınan ilaç dozu da kritik bir rol oynar: örneğin, antrasiklin ile indüklenen

kardiyomiyopati, *HAS3* genindeki kalıtsal varyantlarla ilgilidir, yalnızca daha yüksek kümülatif antrasiklin dozları alan hastalarda görülür (Wang ve ark.,2014).

ALL'yi hedefleyen ilaçların yan etkileri Şekil 2.9'da gösterilmiştir (Wu ve Li,2018).



Şekil 2.9: ALL hedefleyen ilaçların yan etkileri

2.8 Relaps

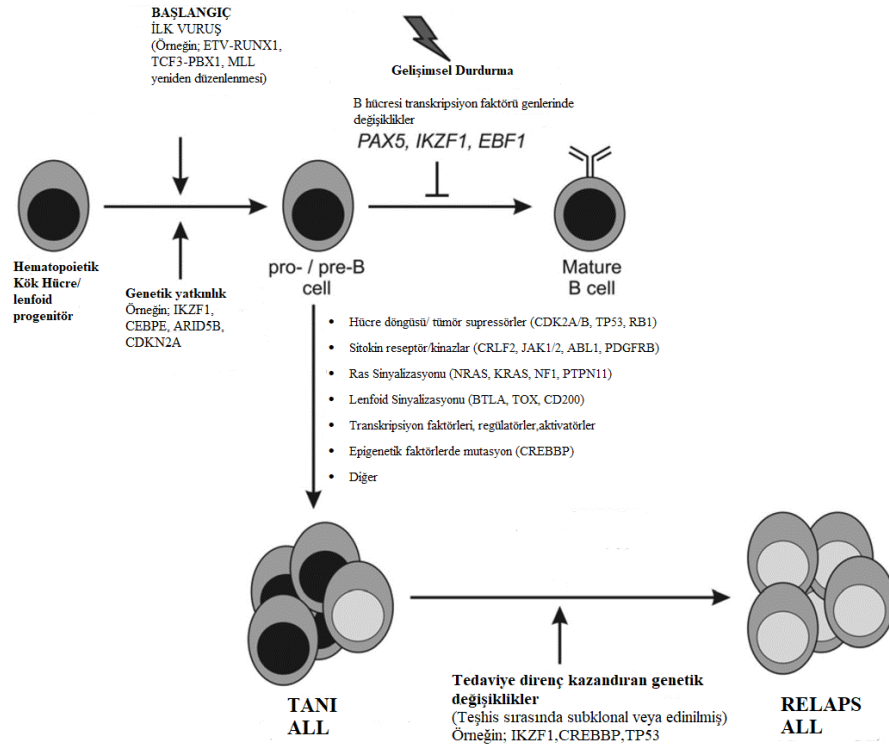
ALL kötü huylu bir hastalık olmasına rağmen, kombinasyon terapisindeki modern gelişmeler ve teşhis yöntemlerindeki gelişmeler gerçek bir başarı öyküsü olmuştur. Bugün ALL hastalarının %85-90'ından fazlası indüksiyon tedavisinden sonra tam klinik remisyona ulaşmaktadır (Hunger ve ark.,2012; Toft ve ark.,2018). Bununla birlikte çocukluk çağı ALL hastalarının yaklaşık %15'inde relaps görülmektedir. Çocukluk çağı kanserlerindeki baskınlığı nedeniyle, relaps ALL, hâlâ çocuklarda kanserden ölümlerin ana nedenidir (Oskarsson ve ark.,2016).

Relaps, tedavi sırasında veya sonrasında, genellikle tedavinin kesilmesinden sonraki 2 yıl içinde meydana gelebilir, ancak bazen daha sonra (tanıdan 10 yıl sonra) meydana gelen

relapslar da bildirilmiştir. Kemik iliği, relapsın en yaygın bölgesi olmaya devam etmektedir, ancak sistemik birinci basamak tedavi daha etkili hale geldikçe, ekstramedüller bölge, özellikle merkezi sinir sistemi (MSS) relapsı olan hastaların oranı, sürekli olarak artmaktadır (Vora, 2015).

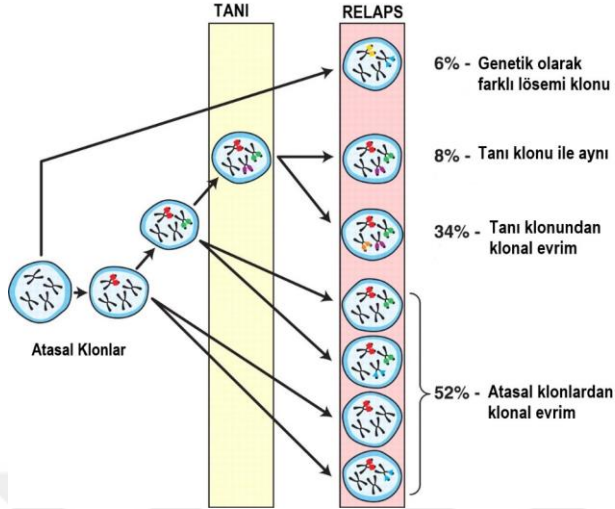
Relaps için ilk remisyonun süresi en önemli prognostik değişkendir. Yani, erken dönemde, tedavi sırasında veya tedaviyi tamamladıktan kısa bir süre sonra (ilk tanıdan 36. aya kadar olan aralık) relaps olan hastalar, daha sonra tekrarlayanlara göre (tanıdan 36 ay sonrası) çok daha kötü sonuçlara sahiptir (Bhojwani ve ark.,2006). Erken kemik iliği relapsında, çeşitli çalışmalarda 5 yılda %11 ve 10 yılda %20'ye kadar değişen genel sağkalım sonuçları bildirmiştir (Raetz ve Bhatla,2012). Geç kemik iliği relapsı, 5 yılda %40 ile %50 arasında değişen genel sağkalım oranı ile daha iyi sonuçlara sahiptir. Erken kemik iliği relapsı olan hastalar için remisyon oranları düşük olduğundan, bu olgular hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) için adaydır, ancak başarılı bir şekilde nakil gerçekleşen olgular için bile, ikinci relaps olma olasılığı son derece yüksektir (Madhusoodhan ve ark, 2016).

ALL'nin alt gruplarında (BCR-ABL1 ve BCR-ABL1 benzeri ALL) genetik değişiklikler anormal sitokin reseptörünü ve kinaz sinyalleşmesini tetikler. Bu olayların birlikteliği, lösemik klonun çoğalması ile sonuçlanır (Şekil 2.10). İlk tanı anında ALL, genellikle klonal olarak heterojendir ve küçük klonlardaki genetik değişiklikler tedaviye direnç sağlayabilir ve relapsa neden olabilir. ALL patogeneğinde gösterilen genetik değişikliklerin çoğunun doğrudan bir rolünün henüz deneysel olarak doğrulanmadığı unutulmamalıdır (Mullighan,2012).



Şekil 2.10: B-ALL patogeneğinde relapsa neden olan yollar (Mullighan,2012).

ALL'deki relaps, genellikle bazı genetik özellikleri paylaşan ve ayrıca tanı sırasında baskın klondan farklı genetik değişiklikler barındıran küçük bir alt klonun ortaya çıkmasından kaynaklanır. Daha az yaygın olarak, teşhis veya relapstaki baskın klonlar aynı da olabilir veya ortak bir özelliği paylaşmayabilir. Bu nedenle, tanı sırasında hastalar, ortak bir klonal orijini paylaşan ve daha sonra antilösemik tedavinin seçici etkisine farklı yanıt veren çok sayıda genetik olarak farklı klonları barındırır (Şekil 2.11) (Mullighan,2012).



Şekil 2.11: ALL'de tanı ve relaps örneklerinin klonal ilişkisi. (Mullighan ve ark.,2008)

2.8.1 Relaps İlişkili Genler

Çocukluk çağı ALL'de relaps sırasında yapılan genetik çalışmalarda; B hücre gelişiminden sorumlu genlerde, tümör baskılayıcı genlerde, Ras sinyal yolağında iş gören, kromatin modifikasyonunda görevli ve ilaç metabolizmasını düzenleyen genlerde mutasyonların varlığı gösterilmiştir. Özellikle *NT5C2* ve *CREBBP*'teki mutasyonlar lösemik hücrelerin spesifik kemoterapötik ajanlara (6-MP, glukokortikoidler) karşı direnç gelişimine neden olabilmektedir (Roberts, 2018).

Relaps ALL'de ayrıca *SETD2*, *KDM6A* ve *NR3C1* genlerinde de mutasyonlar bildirilmiştir (Xiao ve ark.,2016).

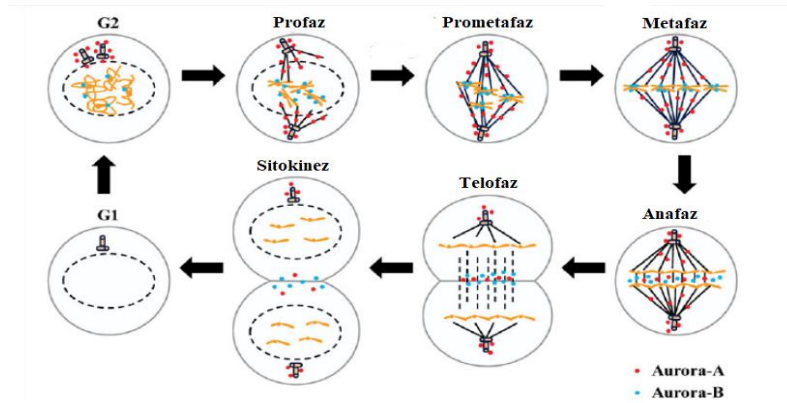
ALL'de tanı anındaki düzeyi ile kıyaslandığında *ARID5B* geninin relapsta daha düşük seviyelerde eksprese edildiği ve yüksek relaps oranları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. *ARID5B* geninin hücre döngüsünde duraklamaya p21 sinyal yolağı aracılığıyla aracılık ettiği ve bu genin ekspresyonunun azalmasının ALL'de antimetabolit ilaçlara (yani merkaptopürin ve metotreksat) özgü direnç yol açtığı gözlemlenmiştir (Xu ve ark.,2020).

2.9 Tez Kapsamında Araştırılan Genler

2.9.1 Aurora A (AURKA)

Aurora A (AURKA), hücre bölünmesi ve mitozda merkezi rol oynayan Aurora ailesinin serin/ treonin kinazlarının bir üyesidir. *AURKA* geninin kromozomal lokalizasyonu 20q13 bölgesidir (Vader ve Lens, 2008).

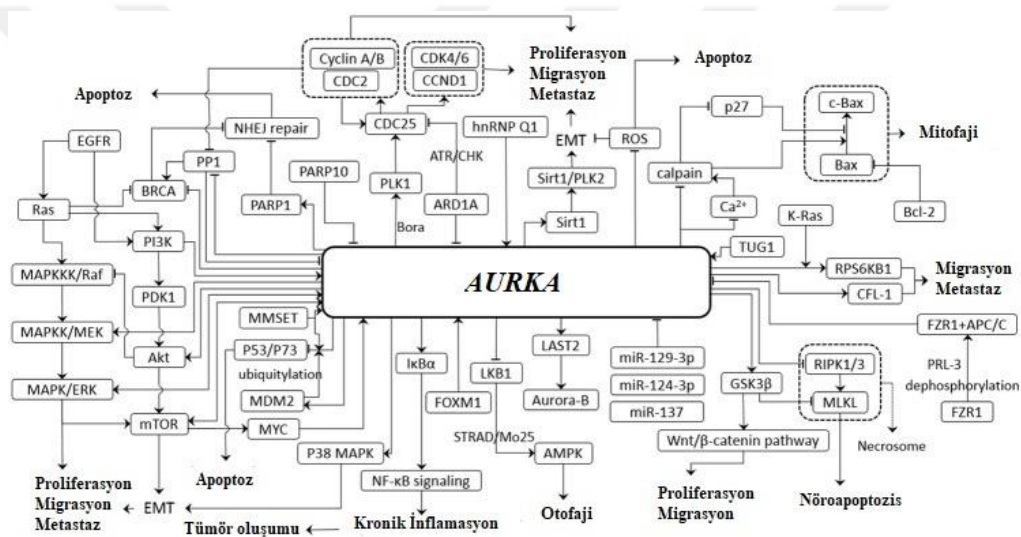
AURKA sentrozomun olgunlaşmasında, mitoz girişte, mikrotübül oluşumunda rol alır. İğ iplikçiğinin oluşumuna ek olarak, AURKA ayrıca sentrozomların uygun şekilde ayrılması için de gereklidir. AURKA, G₂ evresinde sentrozomun yanında lokalize olur. Mitoz ve mayozda hücre döngüsünün G₂ / M kontrol noktasında çok önemli bir rol oynar. Hücre döngüsünde G₂ / M geçişi sırasında bir veya daha fazla fosforilasyonla aktive edilir ve aktivitesi pik yapar. AURKA, prometafaz sırasında da kromozomların düzgün organizasyonunu ve hizalanmasını sağlar ve sitokinezin tamamlanmasına katkıda bulunarak mitozdan çıkışın düzenlemesine yardımcı olur (Şekil 2.12) (Fu ve ark., 2007; Goldenson ve Crispino, 2015; Reboutier ve ark., 2015).



Şekil 2.12: AURKA ve AURKB'nin mitoz evreleri boyunca görev aldığı bölgeler (Yan ve ark., 2016).

Normal hücrelerde kontrollü olarak eksprese edilen *AURKA* geni, akciğer, mesane, meme, kolon, karaciğer, over, pankreas, mide, beyin ve yemek borusu kanserleri dahil olmak üzere birçok insan malignitesinde sıklıkla aşırı eksprese edilmektedir. Anormal *AURKA* sinyali bu tümörlerde invazyon, metastaz, dolayısıyla da ileri evre ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Durlacher ve ark., 2016).

AURKA, tümör hücrelerinde ikili bir rol sergiler. Hem mitoz sırasında molekülleri ve substratları düzenleyici hem de migrasyon, invazyon, metastaz ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerde yer alan molekülleri ve sinyalleri etkileyici rol üstlenmiştir. (Şekil 2.13) (Du ve ark., 2021).



AURKA, şekil 2.13'te de görüldüğü gibi p53 sinyal yolağının önemli düzenleyicilerindendir. *AURKA*'nın aşırı ekspresyonu, *p53*'ün tümör baskılayıcı özelliğini ortadan kaldırarak hücredeki kontrol noktalarının atlanmasına neden olur ve hücrelerin onkojenik dönüşümünü kolaylaştırır (Wang ve ark., 2014).

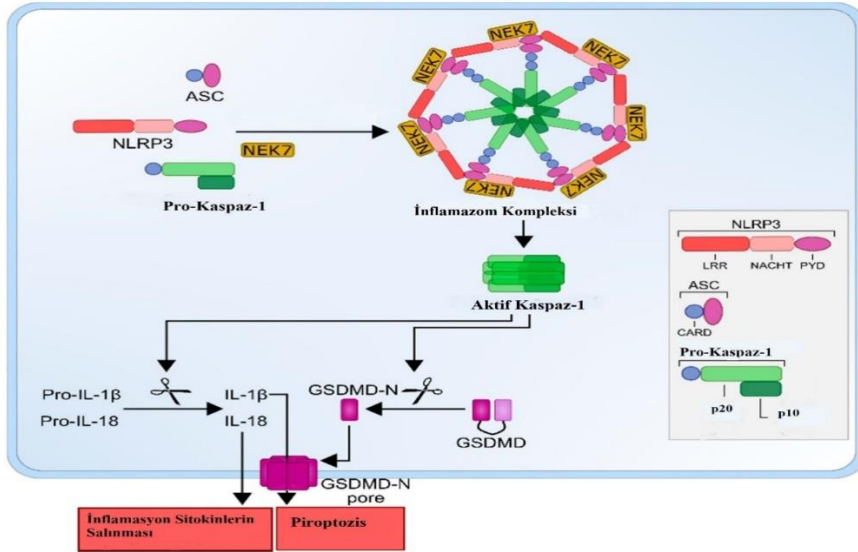
27

2.9.2 KASPAZ-1 (CASP1)

Önceden IL-1 beta dönüştürücü enzim (ICE) olarak adlandırılan kaspaz-1 (CASP1), bir aspartik asit rezidülerini spesifik olarak tanıyan sistein proteaz ailesine ait bir enzimdir. İnsanlarda genomik lokasyonu 11q23'tedir ve p20 ve p10 içeren 2 alt birimden oluşur (Man ve Kanneganti, 2016).

İnflamatuvar yanıt başlatıcı olarak hücre bağışıklığında merkezi bir rol oynayan CASP1, "inflamazom" adı verilen çok proteinli bir kompleks oluşumu yoluyla aktive edildikten sonra (Denes ve ark., 2012; Guey ve Petrilli, 2016), proinflamatuvar bir yanıt başlatır ve böylece iki inflamatuvar sitokin; interlökin 1 β (IL-1 β) ve interlökin 18'in (IL-18) aktifleşmesini sağlar (Sollberger ve ark., 2014).

CASP1'in aktif formu ayrıca, inflamazom efektör sitokinlerin (IL-1 β ve IL-18) biyolojik olarak aktif formlarının serbest bırakıldığı plazma membranı üzerinde porlar oluşturan gasdermin D'yi (GSDMD) de keser ve bu da "piroptosis" (Şekil 2.14) olarak bilinen programlı inflamatuvar hücre ölümüne neden olur (Vince ve Silke ,2016; Kist ve Vucic, 2021).



Şekil 2.14: Kaspaz-1'in görev aldığı mekanizmalar (Urwanisch ve ark., 2021).

Metastatik akciğer kanseri, fibrosarkoma, mide kanseri, melanoma, meme kanseri gibi birçok kanser ile ilişkilendirilmiş (Sharma ve Kanneganti, 2021; Fusco ve ark., 2020) olan CASP1'in, özellikle Akut Miyeloid Lösemi (AML), Myelodisplastiksendrom (MDS), Kronik Lenfoblastik Lösemi (KLL) gibi hematolojik malignitelerde düzensiz IL-1 β salgılanmasının ve/veya sinyalinin, hastalığın ilerlemesi ve kötü prognoz ile pozitif bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Urwanisch ve ark., 2021). ALL tanılı çocuklarda yapılan bir çalışmada CASP1'in aşırı ekspresyonunun lösemi hücrelerinde GC reseptörünün yıkımına neden olduğu ve dolayısıyla GC direncini arttırdığı gösterilmiştir. CASP1'in inhibisyonunun glukokortikoidlere direnci tersine çevirerek ALL hastalarının tedavisinin gerçekleştirilebileceğini düşündürmektedir (Paugh ve ark., 2015).

2.9.3 Glikoprotein M6B (GPM6B)

Glikoprotein M6B (GPM6B), evrim boyunca yüksek oranda korunan proteolipid protein (PLP) ailesine ait transmembran proteinidir. İnsanlarda, *GPM6B* geni kromozom Xp22.2'de bulunur. GPM6B, ilk olarak omurgalı embriyolarının sinir sisteminde yapısal bir protein olarak keşfedilmiştir (Olinsky ve ark.,1996). Nöronlarda, oligodendrositlerde ve astrositlerde yaygın olarak eksprese edilen bu gen nöronal farklılaşma ve miyelinizasyonda rol oynar (Werner ve ark., 2013; Mita ve ark., 2015).

GPM6B'nin, sinaps oluşumunu destekleyebileceği ve merkezi sinir sistemindeki serotonin taşıyıcısının işlevini düzenleyebileceği de gösterilmiştir (Fjorback ve ark.,2009). GPM6B sadece merkezi sinir sisteminde önemli bir rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda kalp, düz kas, iskelet kası, karaciğer, böbrek ve dalak gibi periferik dokularda da eksprese edilir (Werner ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2019). GPM6B, hücre iskeleti ve matris vezikül salınımını kontrol ederek osteoblast farklılaşmasını da düzenler (Drabek ve ark., 2011). Onkoloji çalışmalarında, GPM6B'nin tümör neovaskülarizasyonu ile yakından ilişkili olduğu, tümör hücrelerinin mikrotübül sistemini düzenleyebileceği ve proto-onkogen olarak görev aldığı bildirilmektedir (Bilecova-Rabajdova ve ark., 2014; Charfi ve ark.,2011, 2014).

GPM6B'nin beyin tümörleri, testis, pankreas, renal, hepatoselüler karsinoma ve melanoma gibi tümör hücrelerinde aşırı ekspresyon olduğu gösterilmiştir (Castells ve ark., 2009; Stefanska ve ark., 2013; Chopra ve ark., 2019). Ayrıca prostat, meme ve erken evre over kanserlerinde tümöre spesifik vasküler belirteç olarak önerilmiştir (He ve ark., 2020; Bilecova-Rabajdova ve ark., 2014; Buckanovich ve ark., 2007; Urban ve ark., 2011). ALL için yapılan çalışmalarda ise yalnızca B-ALL'de spesifik olarak aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir (Tesfai ve ark., 2012; Charfi ve ark., 2014).

2.9.4 *NUDT15*

MTH2 olarak da bilinen *NUDT15*, oksitlenmiş dNTP'lerin hidrolizinde yer alan Nudix hidrolaz süper ailesine ait bir nükleosit difosfatazı kodlar. İnsanlarda, *NUDT15* geninin kromozom lokalizasyonu 13q14.2'dir (Zhang ve ark., 2020).

NUDT15, 8-okso-dGTP'yi 8-okso-dGMP'ye seçici olarak hidrolize ederek DNA'daki transversiyonel mutasyonları önler. (Takagi ve ark., 2012) Bu nedenle *NUDT15*, DNA replikasyonunun doğru bir şekilde ilerlemesinde etkili olduğu kadar oksidatif stres altında anormal protein sentezinin önlenmesinde de önemli bir rol oynar (Takagi ve ark., 2012; McLennan, 2006).

NUDT15, tiyopürin ilaçlarının metabolizmasında ve bu ilaçların sitotoksik etkilerinin ortadan kaldırılmasında da rol oynar (Nishii ve ark., 2018). Tiyopürin ilaçları olan azatioprin, merkaptopurin (6-MP) ve tiyoguanin ALL ve enflamatuvar bağırsak hastalığı dahil olmak üzere çeşitli durumların tedavisinde yaygın olarak kullanılan pürin antimetabolitleridir (Cargnin ve ark., 2018).

NUDT15 genindeki mutasyonların 6-MP ilacına bağlı miyelosupresyon ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Cargnin ve ark., 2018; Cheng ve ark., 2019; Kodidela ve ark., 2020). *NUDT15* ile ilişkili miyelosupresyon, merkaptopürinin aşırı aktivasyonundan kaynaklanır ve bu nedenle genotip kılavuzluğunda doz azaltımı, ilacın aktif metabolitine sistemik maruziyet seviyesinin optimizasyonu yoluyla toksisiteyi azaltılabileceği bildirilmiştir (Pui ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2018).

2.9.5 S100A8

S100 kalsiyum bağlayıcı protein ailesinin bir üyesi olan S100A8; homodimer, heterodimer ve oligomer oluşturabilen bir proteindir (Salama ve ark.,2008). Doku ve hücreye özgü ekspresyon gösteren *S100A8* geni, tümör gelişimi sırasında meydana gelen kromozomal yeniden düzenlemeler için hedef bölge olan 1 numaralı kromozomda q21 lokusunda yer alır (Kerkhoff ve Klempt, 1998; Lim ve ark., 2016; Donato, 2001).

S100 proteinleri, protein fosforilasyonunun ve enzim aktivitesinin düzenlenmesi, kalsiyum homeostazı, hücre iskelet bileşenlerinin düzenlenmesi ve transkripsiyonel faktörlerin düzenlenmesi dahil olmak üzere geniş bir hücre içi ve hücre dışı fonksiyon yelpazesine sahiptir (Salama ve ark., 2008). S100A8'in akciğer, mide, meme, prostat, kolon, deri ve over kanseri gibi çeşitli kanserlerde yüksek ekspresyon gösterdiği ve kanserin gelişimi, invazyonu ve metastazı ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Miller ve ark., 2017; Srikrishna, 2012; Zhang ve ark., 2015). S100A8'un Akut Miyeloid Lösemide (AML) yüksek oranda eksprese edildiği ve kötü prognozla ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Nicolas ve ark., 2012; Yang ve ark., 2016).

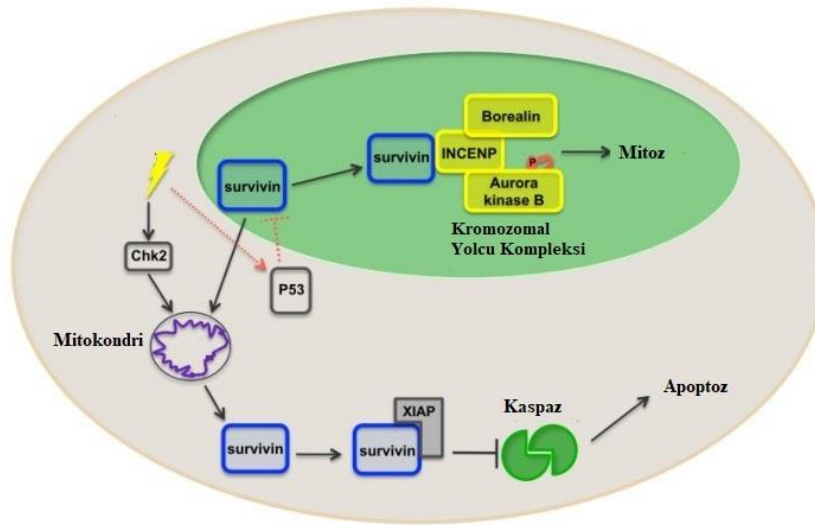
S100A8'in kötü prognoza sahip infant B-ALL'de ise infant olmayan B-ALL ile karşılaştırıldığında aşırı eksprese edildiği ve MLL yeniden düzenlenmiş infant ALL'de prednizolona direnç aracılık ettiği bulunmuştur (Spijkers-Hagelstein ve ark., 2012; Mousavian ve ark., 2017). S100A8 ile indüklenen ilaç direncinin, otofaji ve antiapoptotik etkilerin aktive edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Stewart ve ark., 2018; Yang ve ark., 2016; Sarang ve ark., 2016).

Birçok çalışma lösemi dahil kanserler için geçerli bir tedavi stratejisi olarak S100A8'in inhibisyonunu göstermiştir (Yang ve ark.,2012; Mirza ve ark., 2016; Yan ve ark., 2015). Örneğin, S100A8'in inhibisyonu ile tümör hücrelerinde invazyon ve migrasyonun azaldığı, aynı zamanda tümör hücrelerinde apoptozun ve uygulanan ilaçların etkinliğinin de arttığı gösterilmiştir (Yang ve ark.,2012). Dolayısıyla S100A8'in inhibisyonunun, kanser tedavisinde önemli etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir (Stewart ve ark., 2018).

2.9.6 Survivin

Survivin, “İnhibitör Apoptotik Protein (IAP)” ailesinin en önemli üyesidir. (Altieri, 2003) *API4* veya *BIRC5* (Baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat containing 5) olarak adlandırılan *Survivin* geni, 17q25 kromozomunun telomerik bölgesinde bulunur (Ambrosinive ark., 1998).

Survivin, hücre proliferasyonu ve hayatta kalmasında iki kritik ancak henüz tam olarak açıklanmamış role sahiptir (Li ve ark., 2014). Birincisi; survivin birçok kanserde yüksek oranda eksprese edilir, efektör kaspazların ve pro-kaspazların işlevini inhibe ederek apoptozu engeller. İkincisi; kromozomal yolcu kompleksinin (CPC) bir bileşenidir ve bu nedenle kromozomal ayrılmanın ve sitokinezin anahtar düzenleyicisi olarak işlev görerek genom stabilitesinde çok önemli bir role sahiptir. Bu geniş çapta incelenen işlevlere ek olarak, survivin ayrıca mikrotübül stabilizasyonunda önemli ancak daha az çalışılmış bir role sahiptir. Örneğin kontrol noktası kinaz 2'nin (Chk2) DNA hasarı ile indüklenen aktivasyonu, survivin'in mitokondriden hızlı bir şekilde salınmasına, apoptozun inhibe edilmesine ve tümör hücresinin hayatta kalmasına neden olur. Survivin'in tümör gelişiminde rol aldığı mekanizma Şekil 2.15'te özetlenmiştir (Mobahat ve ark., 2014).



Şekil 2.15: Survivin'in tümör gelişiminde rol aldığı mekanizmalar.

Onkofetal bir protein olan survivin, timus, CD34 (+) hematopoetik kök hücreler, endotelial hücreler, kolon mukozası ve uterin serviksın epitelyal hücreleri haricinde çoğu normal yetişkin farklılaşmış hücrelerde düşük ekspresyona sahiptir (Carter ve ark., 2001; Mesri ve ark.,2001; Deguchi ve ark.,2002; Chiou ve ark., 2003).Bunun yanında akciğer, kolon, meme, prostat, mesane, laringeal, uterin, hepatoselüler, yumuşak doku sarkomları, renal, pankreas, yüksek dereceli lenfomalar, nöroblastomalar, mide kanserlerinin yanı sıra miyelodisplastik sendrom ve akut lösemiler gibi hematolojik kanserlerde dahil birçok kanserle ilgili bağımsız çalışmalarda survivin ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Mita ve ark., 2008; Mobahat ve ark., 2014).Çocukluk çağı kanserlerde survivin'in aşırı ekspresyonu, hastalığın ilerlemesi, metastaz, kötü prognoz ve relaps ile ilişkilendirilmiştir (Choo ve ark., 2019).

Ek olarak survivin'in çeşitli kanser veya dokulardaki ilaç direnci ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir ve meme kanseri, mesane kanseri ve lenfoma gibi bazı tümör tiplerinde tedavi direnci için bir prognostik belirteç olarak kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2015; Kamran ve ark., 2017; Xie ve ark., 2005; Hagenbuchner ve ark., 2013; Dong ve ark., 2013). Öncül akut lenfoblastik lösemide aşırı eksprese edildiği, ilaç direncinde kritik bir rol oynadığı ve survivin ekspresyonunun inhibisyonunun lösemi hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde azaltabileceği ve apoptozu indükleyebileceği bildirilmiştir (Fukuda ve ark.,2009; Park ve ark., 2011). Ayrıca survivin inhibisyonunun kanser hücrelerinde radyoterapinin etkinliğini artırma potansiyeline de sahip olduğu gösterilmiştir (Asanuma ve ark., 2000; Pennati ve ark., 2003; Rodel ve ark., 2003). Normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde yüksek ekspresyon gösteren survivin, sadece prognostik faktör olarak değil aynı zamanda bireyselleştirilmiş moleküler terapi için potansiyel hedef molekül olarak görülmektedir (Zhang ve ark., 2015; Esh ve ark., 2011).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hasta Seçimi

Tez projesinde deneylere başlamadan önce Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' nun (Karar No:781/28.08.2019) onayı ve ailelerden aydınlatılmış onam formu alınmıştır.

Bu çalışmamızda, 2009-2019 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında Pediatrik Hematoloji ve Onkoloji biriminde B-ALL tanısı alan 15 çocuk hastanın tanı sırasında elde edilen kemik iliği örnekleri arşiv taraması yapılarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubu olarak Akdeniz Üniversitesi Çocuk Hematoloji Birimine 2019-2020 yıllarında kemik iliği transplantasyonu için donör olarak başvuran 0-18 yaş arası 5 sağlıklı çocuktan elde edilen kemik iliği materyalinin bir kısmı kullanılmıştır.

Tez kapsamında Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak, 15 olgu ve 5 sağlıklı bireyden oluşan kontrol gruplarında, çocukluk çağı pre-B ALL'de relaps ilişkili *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* ve *Survivin* genlerinin; “housekeeping” gen olarak ise β -Aktin geninin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle tüm örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2 Kemik İliğinden Total RNA İzolasyonu

Hasta grubunun RNA izolasyonu daha önceden yapıldığı için sadece tarama yapılarak hastaların genetik materyalleri arşivden alınmış ve -20°C'de saklanmıştır. Kontrol grubu için QIAamp RNA Blood Mini Kiti kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır.

Total RNA izolasyon aşamaları:

1. 15 ml'lik disposable konik santrifüj tüpüne 1,5 ml kemik iliği örneği konulmuştur. Üzerine 5 ml Eritrozis lizis tamponu olan Buffer El solüsyonu ilave edilip vortekslendikten sonra 15-20 dk, -20°C 'de buzdolabında bekletilmiştir.
2. 2000 rpm $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 6 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj sonrası çökeltiye zarar vermeden üstte kalan kısım atılmış, tüpün dibinde kalan çökeltinin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.
4. Çökeltinin üzerine 3 ml Buffer El solüsyonu eklenerek, vortekslenmiştir. Vortekslenen örnekler 2000 rpm $+4^{\circ}\text{C}$ de 6 dk santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım atılarak, çökeltinin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır. Çökeltinin üzerine 600 μl merkaptotanol eklenerek, pipetaj yapıp, mor kapaklı filtreli tüplere aktarılmıştır.
6. Filtreli tüpler, 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası filtreli kısım atılmış ve kalan kısmın üzerine 600 μl %70'lik etanol ilave edilip pipetaj yapılmıştır.
7. Pipetaj yapılan örnekler, şeffaf kapaklı tüplere aktararak 12000 rpm'de 30 saniye kadar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpünde kalan sıvı kısım atılmıştır.
8. Filtreli kısım farklı tüpe aktararak, filtreli tüpün üzerine 700 μl Buffer RW1'den (Membrana bağlı RNA'nın yıkanmasını sağlayan yıkama tamponu) ilave edilmiş ve 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası filtreli tüpler yeni tüpe oturtularak üzerine 500 μl Buffer RPE (Yıkama tamponu) eklenmiş ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Eppendorfa filtreli tüpler oturtulmuş ve filtreli tüp üzerine 40 μl RNase-free su eklenerek, 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası filtreli tüplere

tekrar 40 µl RNase-free su eklenmiş ve 12000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpler atılarak, elde edilen RNA örneği -20°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.3 Revers Transkripsiyon PCR (RT PCR) ile cDNA sentezi

Arşivden alınan hastaların RNA örnekleri ve kontrol grubundan elde edilen total RNA’lar Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (4368814) ile protokol doğrultusunda Blue-Ray PCR cihazı kullanılarak cDNA’ya çevrilmiştir. cDNA elde edilmesinde kullanılan malzemeler Tablo 3.1’de, cDNA sentez basamakları Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri kısa süreli çalışmalarda +4°C’de, uzun süreli çalışmalar için -20 °C’ de saklanmıştır.

Tablo 3. 1: cDNA eldesinde kullanılan malzemeler ve miktarı

Malzeme Adı	Miktarı (µl) 1X
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free H ₂ O	4,2 µl
RNA	10 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.2: cDNA sentez basamakları

	Primerin bağlanması	cDNA Sentezi	İnaktivasyon	Soğutma
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre (dk)	10 dk	120 dk	5 dk	∞

Not: Reaksiyonun düzgün bir şekilde gerçekleşmesi için RNA örneklerinin ve kit içeriğindeki kimyasalların çözündürülmesi buz üzerinde yapılmıştır.

3.4 cDNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

İzole edilen cDNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri spektrofotometre (Quawell/Q9000B) ile belirlenmiştir. Ölçüm için 2 µl cDNA örneği spektrofotometre cihazına yüklenmiştir. Örneklerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarında elde edilen ölçümlerinin oranı ile cDNA'nın saflığı ve miktarı ng/ µl cinsinden belirlenmiştir. PCR çalışmalarında kullanmak üzere cDNA örnekleri 100 ng/ µl olacak şekilde sulandırılarak -20°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.5 Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Tez projesi kapsamında çocukluk çağı pre-B ALL'de relaps ilişkili hedef genlerin (*AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* ve *Survivin* genlerinin) ve β -Aktin geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR cihazı ve PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (A25779) kiti Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te üretici firmanın belirttiği protokol doğrultusunda kullanılmıştır.

Tablo 3.3: qRT-PCR'in Reaksiyon Koşulları

Malzemeler	Miktar (µl)
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X)	5 µl
F primer (10nM)	0,6 µl
R primer (10nM)	0,6 µl
cDNA (100 ng/µl)	2 µl
RNase Free Su	1,8 µl
Toplam	10 µl

Tablo 3.4: qRT-PCR amplifikasyon basamakları

					Melt Curve	
	1.Basamak	2.Basamak	3. Basamak	4. Basamak	5. Basamak	6. Basamak
Sıcaklık (°C)	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
Süre	10 dk	15 sn	1 dk	15 sn	1 dk	15 sn
Tekrar	1	40		1	1	

96 kuyucuklu plate her hastanın ve kontrolünün cDNA'larını içeren mikslar üzer tekrar olacak şekilde eklenmiştir. Analizi yapılan *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* ve *Survivin* genleri için, içerisinde cDNA bulunmayan negatif kontrol plate yüklenmiştir. Plate, Optical Adhesive Film (Katalog No:4360954) ile kaplanmıştır. Yapılan analizlerde “housekeeping” gen olan β -Aktin geni kontrol gen olarak kullanılmıştır. β -Aktin, *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* ve *Survivin* genleri için kullanılan primer dizileri Tablo 3.5’te verilmiştir.

Tablo 3.5: Tez projesi kapsamında araştırılan genlerin primer dizileri

GEN	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>β- Aktin</i>	5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
<i>AURKA</i>	5'-TCTTCCCAGCGCATTCTTT-3'	5'-GCTGCTTGCTCTTTTGGGTG-3'
<i>CASP1</i>	5'-GCCTGTTCTGATGTGGAG-3'	5'-TGCCACAGACATTACAGTTTC-3'
<i>GPM6B</i>	5'- GGTGCCCGTGTTTATGTTCTA -3'	5'- CACACAGATCTGCTCCACAC -3'
<i>NUDT15</i>	5' AAGCAAATGCAAAGCATCAC -3'	5'-GGCTGAAAGAGTGGGGGATA-3'
<i>S100A8</i>	5'- TGTCTCTTGTCAGCTGTCTTTCA -3'	5'- CCTGTAGACGGCATGGAAAT -3'
<i>Survivin</i>	5'- AGGACCACCGCATCTCTACAT-3'	5'- AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG-3'

3.6 İstatistiksel Analiz

qRT-PCR sonucunda elde edilen genlerin ekspresyon seviyelerindeki ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçlar PASW Statistics 18 ve GraphPad Prism 9 programları kullanılarak, Student T Testi ve Kolmogorov Smirnov Z testi uygulanarak yapılmıştır. Genlerin ekspresyon seviyeleri ile relaps olma süreleri Kaplan-Meier testi ile incelenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında Pediatrik Hematoloji ve Onkoloji biriminde pre-B ALL tanısı almış 15 olgudan alınan kemik iliği örnekleri ile kontrol grubunu oluşturan 5 sağlıklı çocuktan kemik iliği örnekleri kullanılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 15 olgunun hepsi erkektir. Kontrol grubunun cinsiyet dağılımı ise 4 kız (%80) ve 1 erkektir (%20). Olguların yaş dağılımı 3-13 arasındadır, ortalama yaş 6,6 olarak bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen olguların yaş dağılımları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmaya dahil edilen olguların yaş dağılımı

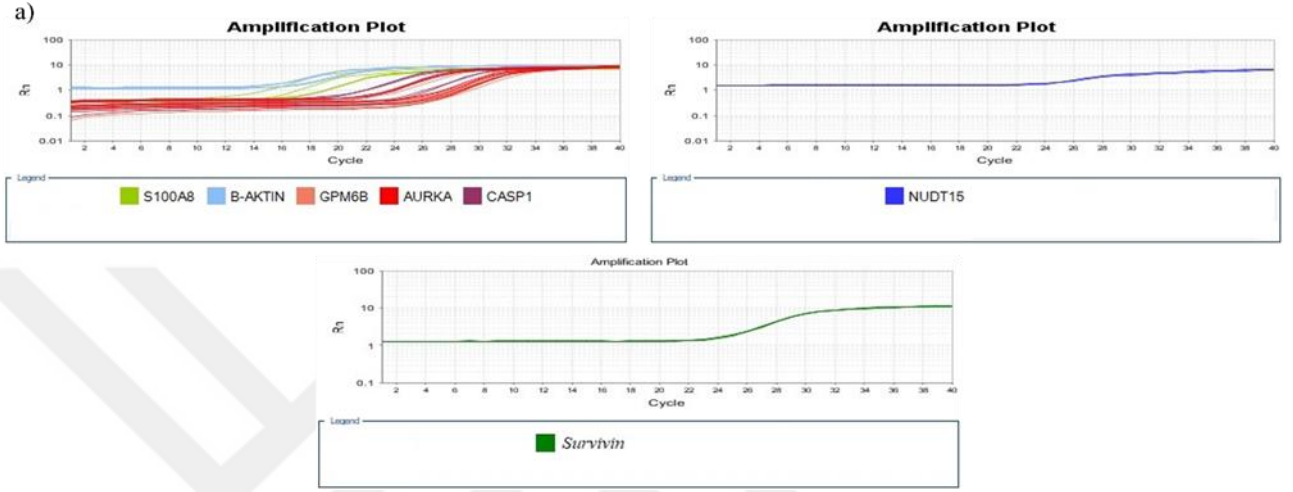


Kontrol grubunun yaş dağılımı 3-16 arasındadır, ortalama yaş 8 olarak bulunmuştur. Olgu ve kontrol grubuna ait cinsiyet dağılımı ve yaş ortalama değerleri Tablo 4.2’de özetlenmiştir.

Tablo 4.2: Çalışmaya dahil edilen olgu ve kontrol grubuna ait cinsiyet dağılımı ve yaş ortalamaları. n: Olgu sayısı

Grup	Cinsiyet		Yaş Ortalaması
	n (%)		
	Kız	Erkek	
Olgu		15 (%100)	6,6
Kontrol	4 (%80)	1 (%20)	8

qRT-PCR analizinde tez kapsamında araştırılan genler olan *Survivin*, *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* genlerine ait Ct değerlerinin amplifikasyon grafiği ve erime pikleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: *Survivin*, *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* genlerine ait a) Ct değerlerinin amplifikasyon grafiği ve b) Erime pikleri

qRT-PCR analizinde “altın standart” olarak bilinen bir analiz yöntemi yoktur. Bazı çalışmalarda analiz için ΔCT değeri kullanılsa da en yaygın kullanılan yöntem, 2001 yılında Kenneth Livak ve Thomas Schmittgen tarafından geliştirilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi olarak da bilinen delta-delta CT yöntemidir; qRT-PCR gerçekleştirirken numunelerin göreceli kat gen ekspresyonunu hesaplamak için kullanılmak üzere basit bir formül geliştirmişlerdir (Livak ve Schmittgen,2001). Bu formül sonucunda elde edilen kontrol ve olgu gruplarına ait üçlü tekrar olarak çalışılan $2^{-\Delta\Delta CT}$ ‘ye ait ham veriler Tablo 4.4’te ve ΔCT değerlerinin ham verileri ise Tablo 4.3’te gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak bu çalışmamızda hem ΔCT hem de $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri arasındaki yöntemsel farklılığın istatistiksel olarak sonuçları etkileyip etkilemediğini görebilmek için iki metot da kullanılmıştır.

Tablo 4.3: *Survivin, AURKA, CASP1, GPM6B, NUDT15, S100A8* genlerine ait ΔCT değerlerinin ham verileri

	<i>Survivin</i> ΔCT	<i>AURKA</i> ΔCT	<i>CASP1</i> ΔCT	<i>GPM6B</i> ΔCT	<i>nudt15</i> ΔCT	<i>S100A8</i> ΔCT
<i>Kontrol 1</i>	2,25272	2,20969	0,71739	3,19034	2,46902	-4,89400
<i>Kontrol 2</i>	3,12225	6,48686	2,00330	4,43755	6,28943	3,65200
<i>Kontrol 3</i>	8,87118	9,71343	5,74013	9,47326	10,04270	3,38800
<i>Kontrol 4</i>	2,23759	3,38709	10,25209	1,82452	1,08489	-4,50300
<i>Kontrol 5</i>	2,85497	0,12200	4,00688	0,69717	2,97136	2,51800
<i>OLGU 1</i>	7,06134	7,26339	5,98855	9,30597	7,85648	-2,13879
<i>OLGU 2</i>	9,57440	9,25685	6,12387	11,65900	10,46266	-0,62983
<i>OLGU 3</i>	-0,59635	0,49873	-1,28456	1,65096	0,30627	-6,13781
<i>OLGU 4</i>	-6,06925	-5,39156	1,65079	1,91567	2,64302	-6,95896
<i>OLGU 5</i>	0,26104	1,13483	0,44955	3,70889	3,54611	-0,27578
<i>OLGU 6</i>	-6,44380	-6,12995	4,05166	0,03804	-0,10103	-0,27883
<i>OLGU 7</i>	0,61197	0,17748	-0,79721	1,22900	2,50981	-1,97964
<i>OLGU 8</i>	0,39809	0,86493	0,51338	2,43665	2,72649	-0,53176
<i>OLGU 9</i>	-1,64380	-0,05253	-1,84611	1,44216	0,37219	-2,45900
<i>OLGU 10</i>	6,55664	9,28373	4,37896	9,41869	10,11514	-2,48304
<i>OLGU 11</i>	-0,13681	1,37084	-4,23065	2,39022	0,95483	-3,81061
<i>OLGU 12</i>	6,58909	9,81344	4,22101	10,82899	10,98626	0,39928
<i>OLGU 13</i>	-0,45562	-0,84410	-1,29452	1,79306	-0,23166	-5,06041
<i>OLGU 14</i>	-0,17766	-0,40450	-1,03477	5,81696	3,29438	0,74296
<i>OLGU 15</i>	-0,27372	-0,15855	-1,30640	5,16815	0,38270	-3,75044

Tablo 4.4: Deneyler sonucunda elde edilen kontrol ve olgulara ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine ait veriler

$2^{-\Delta\Delta CT}$	AURKA			CASP1			GPM6B			NUDT15			S100A8			SURVİVİN		
	$2^{-\Delta\Delta CT_1}$	$2^{-\Delta\Delta CT_2}$	$2^{-\Delta\Delta CT_3}$	$2^{-\Delta\Delta CT_1}$	$2^{-\Delta\Delta CT_2}$	$2^{-\Delta\Delta CT_3}$	$2^{-\Delta\Delta CT_1}$	$2^{-\Delta\Delta CT_2}$	$2^{-\Delta\Delta CT_3}$	$2^{-\Delta\Delta CT_1}$	$2^{-\Delta\Delta CT_2}$	$2^{-\Delta\Delta CT_3}$	$2^{-\Delta\Delta CT_1}$	$2^{-\Delta\Delta CT_2}$	$2^{-\Delta\Delta CT_3}$	$2^{-\Delta\Delta CT_1}$	$2^{-\Delta\Delta CT_2}$	$2^{-\Delta\Delta CT_3}$
KONTROL 1	0,908349	1,274312	0,863915	0,765567	1,125807	1,160253	1,003731	1,072116	0,929268	1,100858	0,909204	0,999096	0,116811	2,547198	3,360874	0,953137	1,115077	0,940892
KONTROL 2	0,470625	1,256871	1,690575	0,175171	2,760388	2,068087	0,077767	77,62496	0,165655	0,417852	4,027812	0,594166	0,53318	1,490348	1,258458	1,477058	0,87097	0,777319
KONTROL 3	1,041484	0,786188	1,221296	0,242802	2,996839	1,374311	1,015657	0,562682	1,749805	0,417852	4,027812	0,594166	0,914174	1,077241	1,01545	0,514373	1,502549	1,293877
KONTROL 4	1,156762	1,152923	0,749818	0,299028	4,437279	0,753654	1,049329	0,932952	1,021478	0,839352	1,053369	1,131032	0,82601	1,27455	0,949857	0,756408	0,793309	1,666486
KONTROL 5	0,828686	0,945033	1,276919	0,724181	1,18882	1,161548	1,082323	1,460596	0,632576	0,973868	0,868163	1,182765	0,729111	1,280853	1,070796	0,803304	1,068335	1,165234
OLGU 1	0,034511	0,027612	0,028641	0,024631	0,025575	0,027565	0,01465	0,013597	0,015058	0,024151	0,021409	0,02637	0,17488	0,143051	0,164292	0,027789	2,578233	0,047319
OLGU 2	0,008559	0,007721	0,006542	0,022348	0,020843	0,028136	0,002065	0,003039	0,003584	0,003354	0,005062	0,003557	0,04446	0,091069	0,044034	0,005982	0,008808	0,004636
OLGU 3	2,052072	2,596277	6,58568	5,028964	2,578233	4,956122	3,250415	2,711903	2,786017	8,4597	3,825165	2,774315	2,107467	2,895506	2,753174	5,970831	8,511121	7,361211
OLGU 4	11557,34	8782,645	6274,848	3,242074	9,70194	0,750677	6,051043	6,995003	3,52284	46,46941	88,95218	5,342985	6940,924	3685,788	1784,389	1928,313	1368,158	904,149
OLGU 5	41,9189	32,71824	49,67827	3,02387	2,620984	3,192594	1,321491	0,36218	0,62701	10,51614	5,153057	5,54047	16,96603	10,97502	17,66168	8,304424	3,902505	11,83788
OLGU 6	5018,691	5285,867	4037,202	0,413505	0,378826	0,036405	9,147425	5,791734	5,057637	55,96834	42,3648	107,6193	6,624746	3,995412	4,669,649	568,305	626,6933	528,4961
OLGU 7	841,9178	670,6953	724,4722	56,21837	38,32415	51,4103	344,8376	260,1402	310,8032	120,1166	182,9623	305,7561	51,40576	30,96142	44,29687	307,8648	283,1787	329,9039
OLGU 8	352,1698	527,8709	526,8822	24,59191	18,62042	15,85023	138,5045	135,5391	120,5491	140,7395	194,889	156,1173	18,25212	13,61473	13,97397	288,6695	388,8586	399,7319
OLGU 9	936,9912	818,6385	860,416	114,8674	82,45409	103,5706	300,7355	239,9211	248,0565	882,9434	802,1332	808,3856	74,2699	56,45368	45,56285	1577,21	1350,676	1470,735
OLGU 10	0,012765	0,019094	0,019405	56,58342	61,96184	61,6868	0,006285	0,005002	0,004409	0,001296	0,00234	0,002307	0,211008	0,26553	0,267887	0,042436	0,056003	0,052912
OLGU 11	2,638994	4,982552	5,034605	16969,22	24946,11	30450,66	0,62402	0,674245	0,733	1,128116	1,480974	0,784437	0,762163	1,463768	0,203314	4,363369	5,730396	5,575566
OLGU 12	0,011525	0,008724	0,015634	88,89119	101,9405	33,14704	0,002158	0,00155	0,002206	0,184411	0,126157	0,127894	0,036484	0,028902	0,035509	0,09118	0,087625	0,013672
OLGU 13	2,759956	1,881583	1,435644	43,54055	38,48813	36,59465	0,496286	0,497393	0,414841	9,091783	9,466424	9,073603	246,1103	163,4677	173,7155	11,82059	8,857164	9,328785
OLGU 14	1,398739	1,476282	1,447343	29,96364	35,74962	33,35725	0,046599	0,022964	0,022231	7,727447	0,318137	0,207795	4,875954	2,738374	3,005284	7,90013	8,572138	8,091242
OLGU 15	1,189625	1,142423	1,31862	35,79304	38,57825	45,52251	0,039777	0,061252	0,037632	6,244179	5,792806	6,017664	76,38506	74,20575	80,89702	8,808294	8,298753	9,153567

qRT-PCR sonucu Ct değerlerinden elde edilen ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları “PASW Statistics 18” ve “GraphPad Prism versiyon 9.1.2” programları kullanılarak ilk olarak grupların normal dağılıma uygun olup olmadığı “Shapiro-Wilk” testi ile değerlendirilmiştir. (Tablo 4.5)

Tablo 4.5: Tez kapsamında araştırılan genlerin ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin Normal Dağılım Analizi

Tests of Normality							
DEĞER		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Survivin ΔCT	KONTROL	,404	5	,008	,669	5	,004
	OLGU	,269	15	,005	,891	15	,071
AURKA ΔCT	KONTROL	,204	5	,200*	,967	5	,859
	OLGU	,266	15	,005	,873	15	,038
CASP1 ΔCT	KONTROL	,174	5	,200*	,946	5	,708
	OLGU	,185	15	,180	,915	15	,163
GPM6B ΔCT	KONTROL	,240	5	,200*	,900	5	,410
	OLGU	,243	15	,017	,856	15	,021
NUDT15 ΔCT	KONTROL	,271	5	,200*	,909	5	,460
	OLGU	,251	15	,012	,817	15	,006
S100A8 ΔCT	KONTROL	,317	5	,113	,763	5	,039
	OLGU	,166	15	,200*	,935	15	,319
Survivin $2^{-\Delta\Delta CT}$	KONTROL	,194	5	,200*	,944	5	,695
	OLGU	,373	15	,000	,651	15	,000
AURKA $2^{-\Delta\Delta CT}$	KONTROL	,455	5	,001	,578	5	,000
	OLGU	,370	15	,000	,519	15	,000
CASP1 $2^{-\Delta\Delta CT}$	KONTROL	,251	5	,200*	,861	5	,231
	OLGU	,531	15	,000	,288	15	,000
GPM6B $2^{-\Delta\Delta CT}$	KONTROL	,211	5	,200*	,861	5	,233
	OLGU	,404	15	,000	,552	15	,000
NUDT15 $2^{-\Delta\Delta CT}$	KONTROL	,366	5	,027	,688	5	,007
	OLGU	,369	15	,000	,477	15	,000
S100A8 $2^{-\Delta\Delta CT}$	KONTROL	,329	5	,081	,776	5	,051
	OLGU	,424	15	,000	,366	15	,000

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Hasta ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalarda sadece *CASP1*'in ΔCT değeri normal dağılıma uygun olduğu için “Student T Testi” analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda $p>0,05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir (Tablo 4.6)

Tablo 4.6: *CASP1* ΔCT değerinin istatistiksel analiz sonucu

Independent Samples Test									
Dependent variables	Statistics								
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
<i>CASP1</i> ΔCT Equal variances assumed	,007	,936	2,051	18	,055	3,505053929	1,7093151	-,08608392560	7,09619178426
Equal variances not assumed			1,888	6,085	,107	3,505053929		-1,02148634538	8,03159420405

CASP1 ΔCT değeri hariç hasta ve kontrol grubu arasındaki ΔCT değerleri Kolmogorov Smirnov Z testi ile yapılmıştır. Alfa anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir. yapılan istatistiksel analiz sonucunda sadece *survivin* ΔCT değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (Tablo 4.7)

Tablo 4.7: *Survivin*, *AURKA*, *GPM6B*, *NUDT15* ve *S100A8* genlerinin istatistiksel analiz sonucu

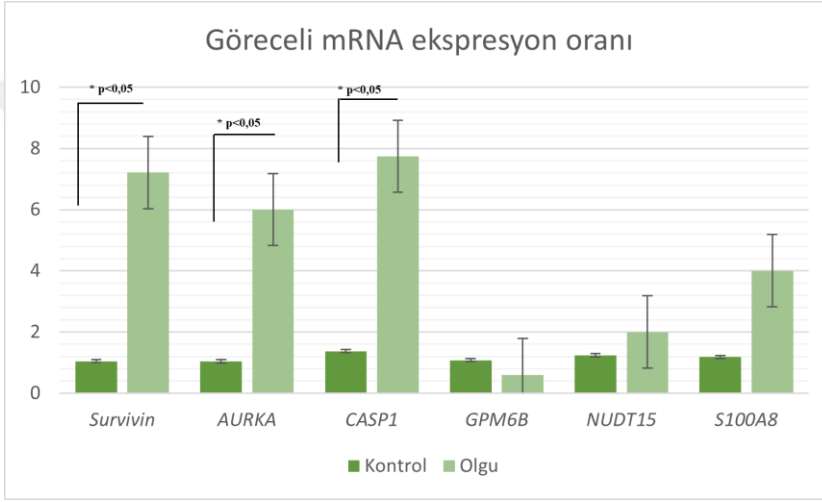
		Survivin ΔCT	AURKA ΔCT	GPM6B ΔCT	NUDT15 ΔCT	S100A8 ΔCT
Most Extreme Differences	Absolute	,733	,533	,200	,400	,600
	Positive	,733	,533	,133	,400	,600
	Negative	-,067	-,067	-,200	-,200	-,200
Kolmogorov-Smirnov Z		1,420	1,033	,387	,775	1,162
Asymp. Sig. (2-tailed)		,035	,236	,998	,586	,134

$2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin ortalaması alınarak yapılan analiz sonucunda; kontrol grupları ile pre B-ALL olgu grupları arasında gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında *Survivin*, *AURKA*, *CASP1* genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0.05$) bulunurken, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* genlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8*, *Survivin* genlerinin Kolmogorov Smirnov Z testinin istatistiksel analiz sonuçları

Kolmogorov Smirnov Z	<i>Survivin</i> 2 ^{-ΔΔCT}	<i>AURKA</i> 2 ^{-ΔΔCT}	<i>CASP1</i> 2 ^{-ΔΔCT}	<i>GPM6B</i> 2 ^{-ΔΔCT}	<i>NUDT15</i> 2 ^{-ΔΔCT}	<i>S100A8</i> 2 ^{-ΔΔCT}
p değeri	,035	,035	,035	,236	,071	,071

Kontrol grubuna göre *Survivin*, *AURKA*, *CASP1*, *GPM6B*, *NUDT15*, *S100A8* genlerinin olgu grubuna göre mRNA ekspresyon oranı Şekil 4.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: Göreceli mRNA ekspresyon oranı. *GPM6B* geni haricinde *Survivin*, *AURKA*, *CASP1*, *NUDT15*, *S100A8* genlerinde kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmiştir.

Genlerin ekspresyon seviyeleri ile relaps olma süreleri bakımından bir ilişki olup olmadığını tanımlamak için Survival analizi olan “Kaplan-Meier” testi kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda tanı anında alınan örneklerde olguların relaps olma süreleri bakımından bir ilişki bulunamamıştır. (Tablo 4.9)

Tablo 4.9: Tez Kapsamında incelenen genlerin Kaplan-Meier testi analiz sonuçları

Overall Comparisons				Overall Comparisons				Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.		Chi-Square	df	Sig.		Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,018	1	,892	Log Rank (Mantel-Cox)	1,719	1	,190	Log Rank (Mantel-Cox)	,110	1	,740
Test of equality of survival distributions for the different levels of <i>AURKA</i> .				Test of equality of survival distributions for the different levels of <i>CASP1</i> .				Test of equality of survival distributions for the different levels of <i>GPM6B</i> .			
Overall Comparisons				Overall Comparisons				Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.		Chi-Square	df	Sig.		Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,789	1	,374	Log Rank (Mantel-Cox)	,018	1	,892	Log Rank (Mantel-Cox)	,379	1	,538
Test of equality of survival distributions for the different levels of <i>NUDT15</i> .				Test of equality of survival distributions for the different levels of <i>S100A8</i> .				Test of equality of survival distributions for the different levels of <i>SURVIVIN</i> .			

5. TARTIŞMA

B lenfoid hücrelerinin olgunlaşmamış bir aşamada (progenitör veya öncül) farklılaşmasının durması ve ardından kontrolsüz proliferasyonu, kemik iliğinde lösemik blastların birikmesine yol açar.

Bu pre-B lösemi blastları; dalak, karaciğer, timüs, lenf düğümleri ve merkezi sinir sistemini infiltre etmek için kemik iliğinden periferik dolaşıma geçer. Hematopoetik sistemin lösemi blastları tarafından bu şekilde ele geçirilmesi, oksijen taşınması (eritrositler) veya pıhtılaşma (trombositler) için önemli olan diğer temel kan hücrelerinin üretimini de tehlikeye atar. Bu durum hastanın immünolojik ve fizyolojik sisteminde en sonunda ölümle sonuçlanan büyük yetersizliklere yol açar (Malouf ve Ottersbach,2018).

Çocukluk çağı pre-B ALL'nin etiyojisi hala tam olarak bilinmemesine rağmen; çevresel faktörler, cinsiyet, etnik köken ve genomik değişiklikler hastalığın gelişimini etkilediği bildirilmiştir (Citalan-Madrid ve ark., 2019).

Çocukları yetişkinlerden daha sık etkileyen pre-B ALL'de kür oranı, günümüz tedavi rejimlerinin uygulanmasıyla %85'lere ulaşmıştır (Fiegl,2016). Bu terapötik ilerlemeler kemoterapinin aşamalı olarak yoğunlaştırılması ve çocukları relaps risklerine dayalı olarak daha yoğun tedavilere hedefleyen risk sınıflandırma şemalarının geliştirilmesi yoluyla elde edilmiştir (Harvey ve ark., 2010). Bu ilerlemelere rağmen yine de hastaların yaklaşık %15'inde relaps gözlenmektedir (Ivanov Öfverholm ve ark.,2016).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çocukluk çağı pre-B ALL'de relaps riskinin ve uygulanan tedavilerin yan etkilerinin en aza indirilmesi için relaps ilişkili genlerin ekspresyon seviye farklılıklarından dolayı “biyobelirteç” olarak yararlanılması önerilmiştir (Hogan ve ark., 2011; Núñez-Enríquez ve ark.,2016; Chow ve ark.,2017; Jing ve Li, 2019).

Bu tez kapsamında çocukluk çağı pre-B ALL'de relaps ilişkili genlerin tanı anında biyobelirteç olarak araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışılan genlerden ilki

AURKA geni olup, bu gen hücre proliferasyonunda, hücre döngüsünde G2'den M fazına geçişte, mitotik iğ oluşumunda, sentromerlerin hücre içindeki kutuplara ayrılmasında ve sitokinezde önemli rol oynamaktadır (Durlacher ve ark.,2016). *AURKA* geninin kolon, meme, melanom, over, mide gibi kanserlerde aşırı eksprese edildiği ve kötü prognoz ile ilgili olduğu bulunmuştur (Lin ve ark., 2020). Hematolojik kanserlerle yapılan çalışmalar ise sınırlı olup, yapılan çalışmalarda özellikle AML'de de aşırı eksprese edildiği ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lucena-Araujo ve ark., 2011; Long ve ark.,2013; Heo ve ark.,2019). ALL için yapılan çalışmalarda ise B-ALL'de aşırı eksprese edildiği bulunmasına rağmen fonksiyonel olarak AML'ye kıyasla çocukluk çağı ALL için daha az önemli olduğu belirtilmiştir (Chow ve ark., 2017; Carlos ve ark.,2020; Hartsink-Segers ve ark., 2013). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, bu tez projemizde çocukluk çağı pre-B ALL olgularından tanı anında alınan kemik iliği örneklerinde kontrol grubuna kıyasla ΔCT değerleri bakımından istatistiksel anlamlı bir fark yokken yaygın olarak tercih edilen yöntem olan $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri karşılaştırıldığında 6 katlık bir farkla *AURKA* geninin aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. İstatistiksel olarak da anlamlı olan bu fark ($p=0,035$) *AURKA* geninin tanı anında relaps riskinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olabileceğini göstermektedir. *AURKA* geninden tanı anında alınan örneklerde ekspresyon seviyeleri ile relaps olma süresi bakımından incelendiğinde ise relaps olma süreleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Bununla birlikte, çalışmamızda örneklem sayısının az olması nedeniyle daha fazla araştırma yapılarak, bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

Pre-B ALL'de relaps ilişkili bir diğer gen *Kaspaz-1 (CASP1)* genidir. *CASP1* hem patojen kaynaklı hem de endojen araçlara yanıt olarak inflamazom komplekslerinin oluşumu yoluyla aktive olan inflamatuvar bir kaspazdır (Sun ve ark., 2016). *CASP1* melanoma, prostat, KLL, AML, kolon ve meme kanseri gibi birçok kanser ile ilişkilendirilmiştir (Sharma ve Kanneganti, 2021; Fusco ve ark., 2020).

Paugh ve arkadaşlarının yeni tanı alan 444 çocukluk çağı ALL hastasının primer lösemi hücrelerinde yaptıkları çalışmada *CASP1* gen ekspresyonunun ALL tedavisinin ana bileşenlerinden olan glukokortikoide (GC) dirençli lösemi hücrelerinde daha yüksek

olduğunu göstermişlerdir. Bu ekspresyon artışının *CASP1* geninin promotör bölgesinin somatik hipometilasyonunun bir sonucu olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca relaps sırasında analiz edilen lösemi hücrelerinde, *CASP1* ekspresyonunun, ilk tanıda analiz edilen lösemi hücrelerine göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca *CASP1*'in GC reseptörlerini parçalayıp inaktive ederek GC'nin biyolojik ve farmakolojik etkilerini modüle ettiğini saptamışlardır. *CASP1*'i aşırı eksprese eden lösemi hücrelerinde *CASP1* aktivitesini inhibe ettiklerinde hücrel GC reseptör sayısının ve GC'lere duyarlılığın önemli ölçüde arttığını da göstermişlerdir (Paugh ve ark.,2015). Ayrıca Laskowska ve ark., 155 AML ve ALL olgularından alınan mononükleer hücrelerde in vitro ilaç direncini belirlemek için yaptıkları gen ekspresyon analizinde de *CASP1*'in aşırı ekspresyonunun glukokortikoid reseptörünün bölünmesine ve glukokortikoid direncinin artmasına neden olduğunu; *CASP1*'in inhibisyonun da ALL hücrelerinde glukokortikoid reseptör seviyelerini önemli ölçüde artırdığını ve glukokortikoid direncini azalttığını bildirerek Paugh ve ark. yaptıkları çalışmayı destekleyen sonuçlar elde etmişlerdir. Ek olarak bu çalışmada, *CASP1*'in ekspresyon değişikliklerinin lösemide immün yanıtı etkileyebileceğini de bildirmişlerdir (Laskowska ve ark., 2016).

Çalışmamızda relaps tanısı almış çocukluk çağı pre-B ALL olgularından tanı sırasında alınan örneklerinde kontrol grubuna kıyasla olgu grubunda ΔCT değerleri bakımından istatistiksel anlamlı bir fark yokken, $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları incelendiğinde 7 kattan fazla *CASP1* geninin aşırı eksprese edildiği gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak da bu fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,035$). Daha önce yapılan çalışmaları destekleyen bu sonuçtan yola çıkarak, relaps riskinin belirlenmesi için biyobelirteç olarak *CASP1* ekspresyonundan ilk tanı anında yararlanılabileceğini önermekteyiz. GC direnci ile ilişkilendirilen *CASP1* kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyelerinde fark olsa da ekspresyon seviyeleri ile relaps olma süreleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. ($p>0,05$) *CASP1* genindeki ekspresyon farklılıklarının ilaç direncinin neden olduğu relapsı belirlemek için daha fazla araştırılma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışma kapsamında incelediğimiz bir diğer gen *Glikoprotein M6B (GPM6B)* genidir. Bu genin ürünü proteolipid protein ailesine ait olan ve nöronlarda, oligodendrositlerde ve

astrositlerde yaygın olarak eksprese edilen transmembran bir proteindir (Zhang ve ark.,2019). Önceki çalışmalar, GPM6B'nin nöronal farklılaşma, miyelinizasyon, düz kas hücrelerinin farklılaşmasında ve osteoblast farklılaşmasında rol oynadığını ortaya koymuştur (Yan ve ark., 1996; Werner ve ark., 2013; Drabek ve ark., 2011; Zhang ve ark.,2019). Kanser araştırmalarında ise over, pankreas kanseri, böbrek, kolorektal, testis kanseri ve melanomada *GPM6B* geninin aşırı eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada, karaciğer kanserinin erken teşhisi ve prognozunun belirlenmesinde biyobelirteç olarak aday gösterilmiştir (Stefanska ve ark.,2013). Başka bir çalışmada ise meme ve yumurtalık kanserlerinde tümör vaskülerizasyonundan sorumlu bir biyobelirteç olarak önerilmiştir (Buckanovich ve ark.,2007; Bilecova-Rabajdova ve ark., 2014).

GPM6B geninin lösemilerde araştırıldığı çok fazla çalışma yoktur. 2011 yılında Charfi ve ark. yaptıkları bir çalışmada *GPM6B* genini ilk kez B-ALL için potansiyel bir belirteç olarak önermişlerdir (Charfi ve ark.,2011). 2012 yılında hem pre-B-ALL hem de T-ALL olguları ile yapılan bir çalışmada, kemik iliğinden tanı anında alınan örneklerde *GPM6B* geninin sadece pre-B ALL'de ekspresyon artışı gösterilmiştir (Tesfai ve ark., 2012). Charfi ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmada, *GPM6B* geninin hem yetişkin hem de çocukluk çağı B-ALL'nin gelişiminde rol oynayabileceğini ve bu nedenle de yeni potansiyel proto-onkogen olarak işlev görebileceğini göstermişlerdir (Charfi ve ark., 2014).

Çalışmamızda ise literatürün aksine relaps tanısı almış çocukluk çağı pre-B-ALL olgularından tanı anında alınan kemik iliği örneklerinde kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyesinde bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak yapılan analiz sonucunda bu azalma hem ΔCT metodu bakımından hem de $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca olgulardan tanı anında alınan kemik iliği örneklerinde *GPM6B* 'nin mRNA ekspresyon seviyeleri ile relaps olma süresi arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durumun örnek sayımızın kısıtlı olmasından kaynaklandığını, örnek sayısının artırılması ile daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, bütçe yetersizliği ve olguların relaps sırasındaki örneklerinin olmayışı nedeniyle, aynı hastaların relaps

örneklerinde *GPM6B* geninin ekspresyonuna bakılması ve tanı anındaki ölçümlerle kıyaslanabilmesi mümkün olmamıştır.

Nükleotid metabolizmasına müdahale etmek, kansere karşı en başarılı tedavi stratejilerinden biridir. Nükleozit analogları, RNA ve DNA sentezi ile ilgili süreçleri bozarak hızla çoğalan kanser hücrelerini hedef alır. Yarı yüzyıllık klinik araştırmalardan sonra bile tiyopürinler çocukluk çağı ALL'ye karşı en etkili idame tedavilerinden biri olmaya devam etmektedir. 6-tioguanin (6-TG), azatioprin (AZA-T) ve 6-merkaptopürin (6-MP) olmak üzere üç tiyopürin tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Valerie ve ark., 2016).

Tiyopürinlerin metabolizması karmaşıktır ve tedavi etkinliğini artırabilecek veya bozabilecek bir dizi enzim ve ara ürünü içerir (Karran, 2006). Tiyopürin metabolize eden enzimleri kodlayan genlerdeki genetik varyasyonların, ALL hastaları arasında; tiyopürin tedavisine bireysel yanıtta farklılıklarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Singh ve ark., 2017). Bu genlerden biri olan Nudix hidrolaz 15 (*NUDT15*), tiyopürin aktif metabolitlerinin (TdGTP) daha az toksik metabolitlere (TdGMP) dönüşümünü katalize eder ve bunu yaparken toksik metabolitlerin DNA'ya dahil edilmesini engellediği için tiyopürinlerin metabolizmasına doğrudan katılır (Yang ve ark., 2015). *NUDT15* aktivitesi azalmış veya *NUDT15* aktivitesi hiç olmayan bireylerde, TdGTP'nin *NUDT15* aracılı bozunmadaki azalma, DNA'ya daha fazla TdGTP'nin katılımı ile sonuçlanır, bu da artan DNA hasarına ve dolayısıyla hücre ölümüne yol açar. Bu bireyler daha sonra, şiddetli miyelosupresyon riski dahil olmak üzere, standart dozlarda tiyopürin uygulamasına karşı artan duyarlılık gösterirler (Yang ve ark., 2014; Yi ve ark., 2018).

Tiyopürin toksisitesi ile ilişkili ilk *NUDT15* yanlış anlamlı varyant (c.415C> T, rs116855232), hem *NUDT15**2 hem de *NUDT15**3 haplotiplerinde amino asit değişimine (p.R139C) neden olur. Bu amino asit değişimi, neredeyse hiç enzimatik aktiviteye sahip olmayan kararsız bir protein oluşumuna neden olur. 2015 yılında Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bu varyantın en çok Doğu Asyalılarda (%10,4) ve Hispaniklerde (%7,1), daha nadir olarak Avrupalılarda (%0,46) olduğunu, Afrikalılarda ise neredeyse hiç olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada 657 hastadan 31 hastanın heterozigot (CT), sadece 2 olgunun *NUDT15* varyantı için homozigot (TT) olduğu bildirilmiştir. TT

genotipine sahip hastalar 6 MP'ye duyarlı olduğundan, standart uygulanan dozun azaltılması gerektirdiğini ileri sürmüşlerdir (Yang ve ark.,2015). Ayrıca farklı popülasyonlarda farklı çalışma grupları tarafından yapılan çalışmalarda da bu varyanta sahip olgularda benzer sonuçlar elde etmişlerdir (Tanaka ve ark.,2015; Chiengthong ve ark.,2016; Liang ve ark.,2016; Yin ve ark.,2017; Zgheib ve ark. 2017; Zhou ve ark.,2018; Cheng ve ark.,2019; Kodidela ve ark.,2020; Taxis ve ark.,2021; Ramalingam ve ark.,2021; Pai ve ark.,2021). Sonuç olarak, bu varyanta (rs116855232) sahip homozigot olgularda yüksek toksisite riski olduğu ve doz azaltımının gerekliliği belirtilmekte ve *NUDT15* geninde varyant tanımlanmasının doğrudan tedavi rejimine dahil edilmesi önerilmektedir (Singh ve ark.,2017; Moriyama ve ark.,2017; Cargnin ve ark.,2018; Relling ve ark.,2018; Puangpetch ve ark.,2020).

Çalışmalar genellikle c.415C>T (rs116855232)'deki tek nükleotidlik polimorfizmin, ilaçların doz ayarlaması ve sitotoksitesi üzerine odaklanmışsa da erken tanıda relaps riskinin belirlenmesi üzerine çalışma yoktur. Çalışmamızda, c.415C>T (rs116855232) varyantına özgü primer kullanılarak erken tanı ve relaps riskinin belirlenmesi için yapılan qRT-PCR analizi sonucunda çocukluk çağı pre-B ALL olgularında kontrol grubuna oranla ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenirken, 6 olguda (%25) çok düşük seviyelerde ekspresyon olduğu saptanmıştır. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda hem ΔCT metodu bakımından hem de $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu bakımından incelendiğinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). *NUDT15* genine ait tanı anında alınan örneklerde mRNA ekspresyon seviyeleri ile relaps olma süreleri bakımından bir ilişki olup olmadığını belirlemek için yapılan istatistiksel analiz sonucunda anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. Bu sonuçlardaki en önemli etkenin örneklem sayısının ve bu SNP'nin görülme sıklığının az olması dolayısıyla daha büyük örneklem sayısında ALL'deki relaps oranı ve rs116855232 arasındaki korelasyonu tanımlamak ve relaps olma süreleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için daha fazla araştırılma yapılmasına gereksinim vardır.

Bu çalışma kapsamına alınan bir diğer gen olan *S100A8* tarafından kodlanan protein (aynı zamanda MRP8 veya calgranulin A olarak da adlandırılır), hücre içi kalsiyum bağlayıcı S100 multigen protein ailesinin bir üyesidir (Ryckman ve ark.,2003). *S100A8*'in

hematolojik malignitelerin gelişiminde ve özellikle akut lösemilerde oynadığı patolojik rol hakkında artan veriler vardır. *S100A8* geni normal miyeloid hücreler tarafından eksprese edilmesine rağmen lenfosit hücrelerde eksprese edilmediği için genellikle çalışmalar Akut Miyeloid Lösemi (AML) üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda AML'de yüksek *S100A8* seviyesinin, ağırlıklı olarak miyelomonositik farklılaşması olan hastalarda (M4, M5) (Mondet ve ark.,2020; Yang ve ark.,2016) ve de novo çocukluk çağı AML hastalarında genel sağkalım süresinde azalma ile korelasyon gösterirken (Nicolas ve ark.,2011; Yan-Fang ve ark.,2012; Yang ve ark.,2016); düşük *S100A8* seviyesinin, *Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1 (IDH1)* geninde mutasyon taşıyan çocukluk çağı AML olgularında iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Damm ve ark.,2011). Ayrıca *S100A8*'in yüksek ekspresyonu, AML'de ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir (Yang ve ark.,2012; Yang ve ark.,2016; Karjalainen ve ark.,2019). Mondet ve ark. 2021 yılında yaptıkları çalışmada *S100A8*'in lösemik klonların sağkalımını ve kemoterapiye duyarlılığını da modüle edebileceği bildirilmiştir (Mondet ve ark.,2021).

Çok sayıda çalışma, lösemi dahil kanserler için geçerli bir tedavi stratejisi olarak *S100A8*'in inhibisyonunu göstermiştir (Yang ve ark.,2012; Moon ve ark.,2008; Mirza ve ark., 2015; Yan ve ark.,2015; Lim ve ark.,2016; Stewart ve ark.,2018). Örneğin *S100A8* proteini ile ilişkili mRNA'nın inhibisyonunun, lösemi hücrelerinin kemoterapi ve apoptoza duyarlılığını önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir (Yang ve ark.,2012). Buradan yola çıkarak AML'de *S100A8* transkripsiyon seviyesinin hem ilaç direnci hem de hastalık prognozu ile önemli ölçüde ilişkili olması nedeniyle, potansiyel olarak gelecekteki yeni terapötik hedeflemenin bir belirteci olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Yang ve ark.,2016).

Çocukluk çağı B-ALL'de, beklendiği gibi, normal lenfoid hücreler *S100A8* eksprese etmediğinden, bu genin ekspresyon seviyesi AML'den önemli ölçüde daha düşük bulunur. Bununla birlikte, 3 araştırmanın verilerinden elde edilen bir meta-analiz çalışmasında, tanıya kıyasla *S100A8*'in relaps B-ALL'de en fazla eksprese edilen gen olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada *S100A8* relaps B-ALL'nin erken teşhisi için biyobelirteç ve terapötik hedef olarak gösterilmiştir (Chow ve ark.,2017). Yine Saint

Fleur-Lominy ve arkadaşlarının çocukluk çağı B-ALL olgularında yaptıkları çalışmada da aynı sonuçları elde etmişlerdir (Saint Fleur-Lominy ve ark.,2020). Ek olarak, B-ALL'nin en agresif formlarında ve ayrıca prednizolona dirençli ve Myeloid/Lymphoid veya Mixed-Lineage Leukemia *MLL* (yeni isimlendirmesi *Lysine Methyltransferase 2A=KMT2A*) gen yeniden düzenlenmesi içeren ALL'de *S100A8* geninin ekspresyonunda önemli bir artış bulunmuştur (Mousavian ve ark.,2017; Spijkers-Hagelstein ve ark.,2012). İnfantil dönemde gözlenen ALL'de belirgin şekilde artan *S100A8* ekspresyonu, *S100* proteinlerinin lökomogeneze ve/veya infantil dönemde gözlenen ALL'nin olumsuz klinik seyrinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Qazi ve Uckun,2010).

Çocukluk çağı 377 ALL'li olguda hem protein hem de mRNA ekspresyon seviyeleri ile yapılan bir çalışmada, *S100A8*'in otofaji yoluyla lösemi hücrelerinin ilaç direncini düzenleyebildiğini ve ayrıca *S100A8*'in ilaca dirençli lösemi hücre hatlarında aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. Bu çalışmada çocukluk çağı ALL'de *S100A8*'in aşırı ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olabileceğini ve ALL'li çocuklarda bireyselleştirilmiş tedavi için yeni bir belirteç olarak *S100A8*'in umut verici olabileceğini önermişlerdir (Ouyang ve ark.,2019). Benzer bir proteomik çalışmasında yine *S100A8*'in otofajiyi düzenleyerek lösemi hücrelerinde ilaç direncinin gelişiminde rol oynadığını ve çocukluk çağı B-ALL veya T-ALL'nin erken teşhisi için yeni tanısal biyobelirteçler olarak da hizmet edebileceğini bildirmişlerdir (Yu ve ark.,2019).

Diğer taraftan, ALL'de başka bir çalışmada ise glukokortikoid direnci olan 26 çocukluk çağı pre-B ALL olgularında *S100A8* gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Sarang ve ark.,2016). Çocukluk çağı ALL'li 14 olgudan (tanıda 7 olgu, relapsta 3 ve tam remisyon aşamasında 4 olgudan) elde edilen kemik iliği mononükleer hücrelerdeki *S100A8* mRNA ekspresyon seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada, *S100A8*'in ekspresyon seviyesinin; tanı, relaps veya tam remisyon olguları ile kontrol grubu arasında önemli ölçüde farklılık göstermediği bulunmuştur (Yang ve ark.,2012). 73 B-ALL'li olgudan 3 farklı dönemde alınan (tanı, tedaviye başladıktan 4 hafta sonra, tedaviye başladıktan 8 hafta sonra) örneklerde yapılan gen ekspresyon analizi sonucunda *S100A8* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Garza-Veloz ve ark., 2015). Son iki

çalışmaya benzer olarak bu çalışmamızda da çocukluk çağı pre-B ALL’li 15 olgudan tanı anında alınan kemik iliği örneklerinde kontrol grubuna kıyasla *S100A8* genin ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmesine rağmen hem ΔCT metodu bakımından hem de $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca ekspresyon seviyeleri ile relaps olma süreleri bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

S100A8 geninin B-ALL’de ekspresyon seviyeleri ile ilgili çelişkili sonuçlar elde edilmesinin en önemli nedeni örneklem büyüklüğü, kullanılan örneklerin tanı veya relaps anında elde edilmesi, seçilen yöntemlerin farklılığıdır (mRNA veya protein düzeyinde incelenmesi). mRNA ve protein seviyeleri arasındaki korelasyon, protein ekspresyon seviyelerini tahmin etmek için yetersizdir. Çünkü bir gen ürünü mRNA’nın; alternatif splicing’i, allelik varyasyonları ve posttranslasyonel modifikasyonları; gen ekspresyonunun kontrol mekanizmaları olarak iş görmektedir. Bu sayede bir genden birden fazla protein üretilebileceği gibi, yine aynı mekanizmalarla protein üretimi engellenebilmektedir. Buradan yola çıkarak, çocukluk çağı öncül B-ALL olgularında *S100A8*’in klinik öneminin hala tam olarak bilinmediği ve daha gerçekçi sonuçların elde edilmesi için hem mRNA hem de protein düzeyinde daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamız kapsamında incelenen son gen olan *Survivin*, hücre bölünmesinin düzenlenmesinde ve kaspaz aktivasyonunu bloke ederek apoptozu inhibe etmede anahtar rollere sahip olan inhibitör apoptotik protein (IAP) ailesinin en küçük üyesidir. Kanser hücrelerinde anormal *survivin* ekspresyonu, tümör hücrelerinin proliferasyon, progresyon, anjiyogenez, terapötik direnç ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Normal dokulara kıyasla kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonu nedeniyle kanser tedavisi için umut verici bir hedef ve prognostik belirteç olarak önerilmiştir (Chen ve ark.,2016).

Yetişkin AML ve T hücreli lösemnin yanı sıra çocukluk çağı AML’de de *survivin* ‘in aşırı eksprese edildiği ve daha kısa hayatta kalma süresi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Carter ve ark.,2001; Nakayama ve Kamihira.,2002; Tamm ve ark.,2004; Wuchter ve ark.,2004).

Mohammadi ve ark., çocukluk çağı B-ALL tanılı 85 olgudan tanı anında ve relaps sırasında alınan örneklerde hem mRNA ekspresyon seviyeleri hem de protein seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; tanı anındaki örneklerde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı bir fark yokken tedaviye yanıt vermeyen olgu grubunda ve relaps evresinde olan olgularda *survivin*'in ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark olduğunu, sağlıklı kontrollere kıyasla rekürrens sırasında B-ALL olgularında *survivin* ekspresyon seviyelerinin arttığını göstermişlerdir ve gelecekte B-ALL'nin prognozunun belirlenmesi için *survivin* potansiyel bir belirteç olarak önerilmiştir. (Mohammadi ve ark.,2019)

Ülkemizde lösemide *survivin* ekspresyon seviyeleri üzerine yapılan çalışmalar az sayıdadır. Paydaş ve ark., 37 AML 28 ALL olgularında yaptıkları çalışmada *survivin* ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla %54 oranında daha fazla eksprese edildiğini bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışmada aşırı *survivin* ekspresyonu ile akut lösemilerde kötü prognostik faktör olan ekstramedüller tutulum ve CD7 ekspresyonu, yüksek WBC sayısı arasındaki ilişki, *survivin*'in akut lösemilerde kötü prognozu belirlemek için aday bir parametre olarak önerilmiştir (Paydaş ve ark.,2003).

Oto ve ark. 33 ALL ve 40 AML olgularında qRT-PCR ile *EPR-1* ve *survivin* ekspresyon seviyelerini incelediklerinde *survivin*'in akut lösemide, özellikle AML'de kötü prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir. (Oto ve ark.,2007)

Eren-Keleş ve ark., çocukluk çağı B-ALL olgularında *survivin*'in farklı fonksiyonlara sahip dört splice varyantı (Δ Ex3 ve 3B antiapoptotik; 2α and 2β proapoptotik) ile risk grupları arasındaki ilişkiyi incelediklerinde, Δ Ex3 varyantının, standart risk grubunda yüksek risk grubuna göre daha yüksek ekspresyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Sonuç olarak Δ Ex3 ekspresyon oranını çocukluk çağı B-ALL olgularında risk gruplarının belirlenmesi için potansiyel bir belirteç olarak önermişlerdir. (Eren-Keleş ve ark.,2018)

Tez çalışmamızda çocukluk çağı B-ALL tanısı almış 15 olgunun tanı anında alınan kemik iliği örneklerinde *survivin* ekspresyon seviyesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulunmuştur

($p=0.35$). ΔCT metodu ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile incelendiğinde de istatistiksel olarak anlamlı olan bu sonucumuzun, özellikle Troeger ve ark. tanı anında *survivin*'in ekspresyonunun artışı gösterdikleri çalışma ile de uyumlu olması, *survivin* geninin tanı anında relaps riskinin belirlenmesinde en önemli belirteç olabileceğini göstermektedir. *Survivin* genin tanı anında alınan örneklerde kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark olmasına rağmen relaps olma süreleri bakımından incelendiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Troeger ve ark. 66 olguda tanı anında alınan örneklerde *survivin*'in aşırı ekspresyonu çocukluk çağı pre-B-ALL'de relaps için güçlü bir risk faktörü olarak tanımlamıştır. (Troeger ve ark., 2007) Bağımsız iki mikroyarray çalışmasında *survivin*'in, tanıya kıyasla relaps ALL'de aşırı eksprese edilen anahtar bir gen olarak bulunduğu bildirilmiştir. (Bhojwani ve ark.,2006; Hogan ve ark.,2011) 3 araştırmanın verilerinden elde edilen bir meta-analiz çalışmasında da çocukluk çağı B-ALL olgularında tanıya kıyasla relaps örneklerinde *survivin*'in aşırı eksprese edildiği ve önceki çalışmaların sonuçlarına paralel olarak da *survivin*'i hedeflemenin umut verici tedavi stratejisi olarak önermişlerdir. (Chow ve ark.,2017)

Park ve arkadaşları, *survivin*'in pre-B-ALL ekspresyon seviyesinin arttığını ve ilaç direncinde kritik bir rol oynadığını ve kemoterapi ile *survivin* ekspresyonunun inhibisyonunun ALL'nin eradikasyonuna yol açtığını göstermiştir (Park ve ark.,2011) Fukuda ve ark., *survivin*'in susturulmasının lösemi hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde azaltabileceğini ve FLT3 mutant farelerde apoptozu indükleyebileceğini bildirmiştir (Fukuda ve ark.,2009). Çocukluk çağı relaps B-ALL hastaları için *survivin* mRNA antagonisti EZN-3042'yi yeniden indüksiyon kemoterapötik ilaçlarla birleştiren bir faz I çalışması geliştirilmiştir (NCT01186328). Bu çalışma önemli hedef dışı toksisite nedeniyle sonlandırılırken, gelecekteki ajanlar için dikkat çekici bir hedef olmaya devam etmektedir. (Raetz ve ark.,2014)

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çocukluk çağı pre-B ALL olgularında yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine bağlı olarak son yıllarda remisyon oranı %85'lere yükselirken, olguların %15'inde hala relaps gözlenebilmektedir. Tedaviye direnç gelişiminde en önemli faktörlerden biri hücredeki genetik değişikliklerdir. Bu değişikliklerin relaps öncesi belirlenmesi giderek önem kazanmaktadır. Bu nedenle relaps gözlenen pre-B ALL tanılı 15 çocuk olguda relaps ilişkili 6 genin ekspresyon düzeyine bakıldığında örneklem sayısının az olmasına rağmen *AURKA* ve *CASP1* genlerinde sadece $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken *survivin* geninin ekspresyon seviyesi incelendiğinde hem ΔCT metodu hem de $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile analizler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiştir. Bu bulgular her üç genin tanı sırasında relapsın göstergesi olabileceğini ve en önemli biyobelirteç olarak *survivin* geninin kullanılabileceğini göstermektedir. Genlerin ekspresyon seviyeleri ile relaps olma süreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamasına rağmen özellikle *CASP1*'in ekspresyon değişikliklerinin lösemide immün yanıtı etkileyebileceğini belirten çalışmadan yola çıkarak daha sonraki araştırmalarda hem ilaç toksisitesine bağlı gelişebilecek risk faktörlerinin hem de relaps riskinin azaltılması için tanı anında *CASP1*'in ekspresyon seviyesine bakılarak hastalar için daha iyi tedavi protokollerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Elbette, elde ettiğimiz bu sonuçların desteklenmesi için yüksek sayıda örnek ile yapılacak ilave çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu yüksek lisans tez projesinin kısıtlı bütçesi ile sadece hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine bakılabilmektedir. Bu genlerin ürüne dönüşümünü gösteren protein düzeyinde yapılacak çalışmalarla da bu sonuçların güçlendirilmesinin gerektiğini düşünmekteyiz.

GPM6B geni için ALL'de az sayıda yapılan çalışmada sadece pre-B ALL'de ekspresyon seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Projemiz kapsamında yapılan çalışmada ise çocukluk çağı pre-B ALL olgularında mRNA ekspresyon seviyesinde kontrol gurubuna kıyasla azalma gözlemlenmiş olup bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Olguların hem tanı hem de relaps sırasındaki örneklerinde ekspresyon düzeylerine bakılması, sonuçların daha anlamlı olmasına olanak sağlayacaktır. Ancak, projenin

planlanması hem tanı hem de relaps sırasındaki örnekleri kıyaslamaya yönelik olmasına rağmen, bütçe kısıtlılığı nedeni ile sadece tanı sırasında alınan örneklerde ekspresyon analizi yapılabilmektedir. Daha yüksek bütçeli bir proje ile daha fazla olguda hem tanı hem de relaps sırasında alınacak örneklerde ekspresyon düzeylerine bakılması hedeflenmiştir.

NUDT15 geninde bir SNP'nin varlığında (c.415C>T (rs116855232)) çocukluk çağı ALL olgularında tedavide MP toleransının azaldığı gözlemlenmiştir. Çalışmalar çoğunlukla *NUDT15* genotipine bağlı olarak bireyselleştirilmiş tedavi dozlarının klinik uygulamalarına yönelik olmasına rağmen, çocukluk çağı pre-B ALL'de erken tanıda *NUDT15* genotipi ile relaps riskinin belirlenmesi üzerine çalışma yoktur. Bu çalışmamızda 15 olgunun 9'unda (%60) tanı sırasında *NUDT15* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmesine rağmen örneklem sayısının az olması nedeniyle bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bu nedenle daha sonraki araştırmalar için hem olgu sayısının arttırılarak *NUDT15* genindeki bu SNP'nin Türk popülasyonundaki görülme sıklığının belirlenmesi hem de bu SNP ile ilaç toksisitesi arasındaki ilişkinin Türk popülasyonunda da araştırılması önerilmektedir.

Miyeloid farklılaşma basamağında görev alan ve AML'de yüksek ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinen *S100A8* geninin son yapılan çalışmalarda lenfoid hücrelerde eksprese edilmemesine rağmen ALL olgularında yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir. Buradan yola çıkarak çocukluk çağı pre-B ALL olgularımızda tanı anında alınan kemik iliği örneklerinde *S100A8* genini ekspresyonuna bakılmış ve mRNA ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yapılan çalışmalarda tanıya kıyasla relaps sırasında ekspresyon seviyesinin arttığı bildirildiği için bir sonraki çalışmada tanı eşleştirilmiş relaps örnekleri karşılaştırılarak ekspresyon seviyesindeki farklılıkların araştırılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abboud MR, Ghanem K, Muwakkit S. Acute lymphoblastic leukemia in low and middle-income countries: disease characteristics and treatment results. *Current opinion in oncology*. 2014;26(6):650-655.
2. Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrunaro A, Gerace D, Musolino C. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol*. 2012;41(6):1897-1912.
3. Almeida RS, Costa E Silva M, Coutinho LL, Garcia Gomes R, Pedrosa F, Massaro JD, Donadi EA, Lucena-Silva N. MicroRNA expression profiles discriminate childhood T- from B-acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol*. 2019;37(1):103-112.
4. Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res*. 2003; 88:31-52.
5. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem*. 1998;273(18):11177-11182.
6. Aricò M, Schrappe M, Hunger SP, Carroll WL, Conter V, Galimberti S, Manabe A, Saha V, Baruchel A, Vettenranta K, Horibe K, Benoit Y, Pieters R, Escherich G, Silverman LB, Pui CH, Valsecchi MG. Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4755-4761.
7. Asanuma K., Moriai R., Yajima T., Yagihashi A., Yamada M., Kobayashi D., Watanabe N. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. *Jpn J. Cancer Res*. 2000; 91:1204–1209.
8. Bhojwani D, Kang H, Moskowitz NP, Min DJ, Lee H, Potter JW, Davidson G, Willman CL, Borowitz MJ, Belitskaya-Levy I, Hunger SP, Raetz EA, Carroll WL.

- Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2006; 108(2):711-717
9. Bhojwani D, Yang JJ, Pui C-H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics*. 2015;62(1):47-60.
 10. Bilecova-Rabajdova M, Urban P, Gregova K, Varga J, Fialkovicová V, Kruzliak P, Marekova M. Breast carcinoma progression and tumour vascular markers related to apoptotic mechanisms. *Dis Markers*. 2014; 2014:156034.
 11. Bousquet M, Harris MH, Zhou B, Lodish HF. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21558-63.
 12. Brisson GD, Alves LR, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review. *Ecancermedicalscience*. 2015; 9:539.
 13. Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, Botbyl J, Hammond R, Katsaros D, Sandaltzopoulos R, Liotta LA, Gimotty PA, Coukos G. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):852-861.
 14. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods*. 2000;243(1-2):59-75.
 15. Cargnin S, Genazzani AA, Canonico PL, Terrazzino S. Diagnostic accuracy of NUDT15 gene variants for thiopurine-induced leukopenia: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res*. 2018; 135:102-111.
 16. Carlos JAEG, Lima K, Coelho-Silva JL, de Melo Alves-Paiva R, Moreno NC, Vicari HP, de Souza Santos FP, Hamerschlak N, Costa-Lotufo LV, Traina F, Machado-Neto JA. Reversine exerts cytotoxic effects through multiple cell death mechanisms in acute lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020;43(6):1191-1201
 17. Carroll WL, Raetz EA. Clinical and laboratory biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr*. 2012;160(1):10-8.

18. Carter BZ, Milella M, Altieri DC, Andreeff M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97(9):2784-2790.
19. Carvalho de Oliveira J, Molinari Roberto G, Baroni M, Bezerra Salomão K, Alejandra Pezuk J, Sol Brassesco M. MiRNA Dysregulation in Childhood Hematological Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2688.
20. Castells X, García-Gómez JM, Navarro A, Acebes JJ, Godino O, Boluda S, Barceló A, Robles M, Ariño J, Arús C. Automated brain tumor biopsy prediction using single-labeling cDNA microarrays-based gene expression profiling. *Diagn Mol Pathol*. 2009;18(4):206-218.
21. Charfi C, Voisin V, Levros LC Jr, Edouard E, Rassart E. Gene profiling of Graffi murine leukemia virus-induced lymphoid leukemias: identification of leukemia markers and Fmn2 as a potential oncogene. *Blood*. 2011;117(6):1899-1910.
22. Charfi C, Edouard E, Rassart E. Identification of GPM6A and GPM6B as potential new human lymphoid leukemia-associated oncogenes. *Cell Oncol (Dordr)*. 2014;37(3):179-191.
23. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer*. 2016;7(3):314-23.
24. Cheng J, Zhang H, Ma HZ, Li J. Homozygous mutation in NUDT15 in childhood acute lymphoblastic leukemia with increased susceptibility to mercaptopurine toxicity: A case report. *Exp Ther Med*. 2019;17(5):4285-4288.
25. Chiengthong K, Ittiwut C, Muensri S, Sophonphan J, Sosothikul D, Seksan P, Suppipat K, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. NUDT15 c.415C>T increases risk of 6-mercaptopurine induced myelosuppression during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(1): e24-6.

26. Chiou S.K., Moon W.S., Jones M.K., Tarnawski A.S. Survivin expression in the stomach: Implications for mucosal integrity and protection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 305:374–379.
27. Choo Z, Loh AHP, Chen ZX. Destined to Die: Apoptosis and Pediatric Cancers. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1623.
28. Chopra N, Choudhury S, Bhargava S, Wajid S, Ganguly NK. Potentials of "stem cell-therapy" in pancreatic cancer: An update. *Pancreatology*. 2019;19(8):1034-1042.
29. Chow YP, Alias H, Jamal R. Meta-analysis of gene expression in relapsed childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*. 2017;17(1):120.
30. Citalan-Madrid AF, Cabral-Pacheco GA, Martinez-de-Villarreal LE, Villarreal-Martinez L, Ibarra-Ramirez M, Garza-Veloz I, Cardenas-Vargas E, Marino-Martinez I, Martinez-Fierro ML. Proteomic tools and new insights for the study of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2019; 24(1):637-650.
31. Damm F, Thol F, Hollink I, Zimmermann M, Reinhardt K, van den Heuvel-Eibrink MM, Zwaan CM, de Haas V, Creutzig U, Klusmann JH, Krauter J, Heuser M, Ganser A, Reinhardt D, Thiede C. Prevalence and prognostic value of IDH1 and IDH2 mutations in childhood AML: a study of the AML-BFM and DCOG study groups. *Leukemia*. 2011;25(11):1704-10.
32. Dastugue N, Suciu S, Plat G, Speleman F, Cavé H, Girard S, Bakkus M, Pagès MP, Yakouben K, Nelken B, Uyttebroeck A, Gervais C, Lutz P, Teixeira MR, Heimann P, Ferster A, Rohrlich P, Collonge MA, Munzer M, Luquet I, Boutard P, Sirvent N, Karrasch M, Bertrand Y, Benoit Y. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. 2013. 28;121(13):2415-23.

33. Davidsson J, Lilljebjörn H, Andersson A, Veerla S, Heldrup J, Behrendtz M, Fioretos T, Johansson B. The DNA methylome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hum Mol Genet.* 2009;18(21):4054-4065.
34. Deguchi M, Shiraki K, Inoue H, Okano H, Ito T, Yamanaka T, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Furusaka A, Hisatomi H, Nakano T. Expression of survivin during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(1):59-64.
35. Deguchi T. Immunophenotype of Pediatric ALL. In: Kato M, ed. *Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia.* 1 st ed. Springer; 2020, p: 29-36.
36. Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis.* 2012;3(7): e338.
37. de Smith AJ, Ojha J, Francis SS, Sanders E, Endicott AA, Hansen HM, Smirnov I, Termuhlen AM, Walsh KM, Metayer C, Wiemels JL. Clonal and microclonal mutational heterogeneity in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(45):72733-72745.
38. Diouf B, Crews KR, Lew G, Pei D, Cheng C, Bao J, et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Jama.* 2015;313(8):815-823.
39. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(7):637–668.
40. Dong D. Relapse Prediction in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Time-Series Gene Expression Profiling. Singapur Ulusal Üniversitesi Bilgisayar Bilimleri Bölümü, Doktora Tezi, 2011, Singapur (Danışman Prof. Limsoon Wong)
41. Dong Z, Yang L, Lai D. KLF5 strengthens drug resistance of ovarian cancer stem-like cells by regulating survivin expression. *Cell Prolif.* 2013;46(4):425-435.

42. Drabek K, van de Peppel J, Eijken M, van Leeuwen JP. GPM6B regulates osteoblast function and induction of mineralization by controlling cytoskeleton and matrix vesicle release. *J Bone Miner Res*. 2011;26(9):2045-51.
43. Du R, Huang C, Liu K, Li X, Dong Z. Targeting AURKA in Cancer: molecular mechanisms and opportunities for Cancer therapy. *Mol Cancer*. 2021;20(1):15.
44. Dumitrescu L, Brown-Gentry K, Goodloe R, Glenn K, Yang W, Kornegay N ve ark. Evidence for age as a modifier of genetic associations for lipid levels. *Annals of human genetics*. 2011;75(5):589-97.
45. Durlacher CT, Li ZL, Chen XW, He ZX, Zhou SF. An update on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of alisertib, a selective Aurora kinase A inhibitor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016;43(6):585-601.
46. El-Khazragy N, Noshi MA, Abdel-Malak C, Zahran RF, Swellam M. miRNA-155 and miRNA-181a as prognostic biomarkers for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Biochem*. 2019;120(4):6315-6321.
47. Eren-Keleş E, Karabulut HG, Çakmaklı HF, Adaklı B, Köse SK, Uğur-Dinçaslan H, Yavuz G, Ertem M, Tükün A. Expression of Survivin and Its Splice Variants in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018;22(12):680-685.
48. Esh AM, Atfy M, Azizi NA, El Naggar MM, Khalil EE, Sherief L. Prognostic significance of survivin in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2011;27(1):18-25.
49. Fasching K, Panzer S, Haas OA, Marschalek R, Gadner H, Panzer-Grümayer ER. Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(8):2722-4.

50. Fiegl M. Epidemiology, pathogenesis, and etiology of acute leukemia. In: Hiddemann, ed. *Handbook of Acute Leukemia*. 1.ed. Adis; 2016, p:3-13.
51. Fjorback AW, Müller HK, Wiborg O. Membrane glycoprotein M6B interacts with the human serotonin transporter. *J Mol Neurosci*. 2009;37(3):191-200.
52. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol. Cancer Res*. 2007; 5: 1–10.
53. Fukuda S, Singh P, Moh A, Abe M, Conway EM, Boswell HS, Yamaguchi S, Fu XY, Pelus LM. Survivin mediates aberrant hematopoietic progenitor cell proliferation and acute leukemia in mice induced by internal tandem duplication of Flt3. *Blood*. 2009;114(2):394-403.
54. Fusco R, Siracusa R, Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R. Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome in Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4223.
55. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):13950-13954.
56. Gao C, Liu SG, Lu WT, Yue ZX, Zhao XX, Xing TY, Chen ZP, Zheng HY, Li ZG. Downregulating CREBBP inhibits proliferation and cell cycle progression and induces daunorubicin resistance in leukemia cells. *Mol Med Rep*. 2020;22(4):2905-2915.
57. Garza-Veloz I, Martinez-Fierro ML, Jaime-Perez JC, Carrillo-Sanchez K, Ramos-Del Hoyo MG, Lugo-Trampe A. et al. Identification of Differentially Expressed Genes Associated with Prognosis of B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Disease Markers*. 2015; 2015:828145.
58. Gefen N, Binder V, Zaliava M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, Edry L, Hertzberg L, Shomron N, Williams O, Trka J, Borkhardt A, Izraeli S. Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival

- advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia*. 2010;24(1):89-96.
59. Gervasini G, Vagace JM. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in genetics*. 2012; 3:249.
 60. Ghodousi ES, Rahgozar S. MicroRNA-326 and microRNA-200c: Two novel biomarkers for diagnosis and prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Biochem*. 2018; 119:6024–6032.
 61. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-all. *Blood*. 2017; 129, 1113–1123.
 62. Goldenson B, Crispino JD. The Aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene* 2015; 34: 537–545.
 63. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Illades-Aguar B, Leyva-Vázquez MA. miRNAs in acute lymphoblastic leukemia: diagnosis, prognosis and target therapeutic. In: Abdul Hamid G, ed. *Advances in Hematologic Malignancies*. London, UK: IntechOpen. 2019, chapter 4.
 64. Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Human Development*. 2005;81(1):123-129.
 65. Grobbelaar C ve Ford AM. The Role of MicroRNA in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: Challenges for diagnosis and therapy. *J Oncol*. 2019:8941471201.
 66. Guey B, Petrilli V. Assessing Caspase-1 Activation. In: Di Virgilio F, Pelegrín P, eds. *NLR Proteins Methods and Protocols*. 1st ed. New York: Springer Protocols; 2016, p:197-206.
 67. Hagenbuchner J, Kuznetsov AV, Obexer P, Ausserlechner MJ. BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. *Oncogene*. 2013;32(40):4748-4757.

68. Han BW, Feng DD, Li ZG, Luo XQ, Zhang H, Li XJ, Zhang XJ, Zheng LL, Zeng CW, Lin KY, Zhang P, Xu L, Chen YQ. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 4903-4915.
69. Harada M, Pokrovskaja-Tamm K, Söderhäll S, Heyman M, Grander D, Corcoran M. Involvement of miR17 pathway in glucocorticoid-induced cell death in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Lymphoma*. 2012; 53:2041–2050.
70. Harrison CJ. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood*. 2015;125(9):1383-6.
71. Hartsink-Segers SA, Zwaan CM, Exalto C, Luijendijk MW, Calvert VS, Petricoin EF, Evans WE, Reinhardt D, de Haas V, Hedtjörn M, Hansen BR, Koch T, Caron HN, Pieters R, Den Boer ML. Aurora kinases in childhood acute leukemia: the promise of aurora B as therapeutic target. *Leukemia*. 2013;27(3):560-568.
72. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, Bedrick EJ, Chen IM, Atlas SR, Kang H, Ar K, Wilson CS, Wharton W, Murphy M, Devidas M, Carroll AJ, Borowitz MJ, Bowman WP, Downing JR, Relling M, Yang J, Bhojwani D, Carroll WL, Camitta B, Reaman GH, Smith M, Hunger SP, Willman CL. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2010;116(23):4874-4884.
73. He S, Huang Z, Li X, Ding Y, Sheng H, Liu B, Jia Z. GPM6B Inhibit PCa Proliferation by Blocking Prostate Cancer Cell Serotonin Absorptive Capacity. *Dis Markers*. 2020; 2020:8810756.
74. Heikamp EB, Pui CH. Next-Generation Evaluation and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr*. 2018; 203:14-24.e2.

75. Heo SK, Noh EK, Jeong YK, Ju LJ, Sung JY, Yu HM, Cheon J, Koh S, Min YJ, Choi Y, Jo JC. Radotinib inhibits mitosis entry in acute myeloid leukemia cells via suppression of Aurora kinase A expression. *Tumour Biol.* 2019;41(5):1010428319848612
76. Hjalgrim LL, Madsen HO, Melbye M, Jørgensen P, Christiansen M, Andersen MT, Pallisgaard N, Hokland P, Clausen N, Ryder LP, Schmiegelow K, Hjalgrim H. Presence of clone-specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer.* 2002;87(9):994-9.
77. Hogan LE, Meyer JA, Yang J, Wang J, Wong N, Yang W, Condos G, Hunger SP, Raetz E, Saffery R, Relling MV, Bhojwani D, Morrison DJ, Carroll WL. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood.* 2011;118(19):5218-26.
78. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, Payne-Turner D, Churchman M, Andersson A, Chen SC, McCastlain K, Becksfort J, Ma J, Wu G, Patel SN, Heatley SL, Phillips LA, Song G, Easton J, Parker M, Chen X, Rusch M, Boggs K, Vadodaria B, Hedlund E, Drenberg C, Baker S, Pei D, Cheng C, Huether R, Lu C, Fulton RS, Fulton LL, Tabib Y, Dooling DJ, Ochoa K, Minden M, Lewis ID, To LB, Marlton P, Roberts AW, Raca G, Stock W, Neale G, Drexler HG, Dickins RA, Ellison DW, Shurtleff SA, Pui CH, Ribeiro RC, Devidas M, Carroll AJ, Heerema NA, Wood B, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, Raimondi SC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Hunger SP, Loh ML, Mullighan CG. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(3):242-252.
79. Horibe K, Saito AM, Takimoto T, Tsuchida M, Manabe A, Shima M, Ohara A, Mizutani S. Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol.* 2013;98(1):74-88.

80. Howard SC, Metzger ML, Wilimas JA, Quintana Y, Pui CH, Robison LL, Ribeiro RC. Childhood cancer epidemiology in low-income countries. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2008;112(3):461-472.
81. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH, Carroll WL. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology*. 2012;30(14):1663.
82. Hunger SP, Loh ML, Whitlock JA, Winick NJ, Carroll WL, Devidas M, Raetz EA; COG Acute Lymphoblastic Leukemia Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60(6):957-963.
83. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(16):1541-52.
84. Inthal A, Zeitlhofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R, Fronkova E, Fahrner B, Mann G, Haas OA, Panzer-Grumayer R. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012; 26: 1797-803.
85. Irving J. Diagnostic Flow Cytometry and Immunophenotypic Classification. In: Vora A, ed. *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. 1st ed. Springer Nature; 2017, p: 49-60.
86. Ivanov Öfverholm I, Tran AN, Olsson L, Zachariadis V, Heyman M, Rudd E, Syk Lundberg E, Nordenskjöld M, Johansson B, Nordgren A, Barbany G. Detailed gene dose analysis reveals recurrent focal gene deletions in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(9):2161-2170.
87. Jaffe JD, Wang Y, Chan HM, Zhang J, Huether R, Kryukov GV, Bhang HE, Taylor JE, Hu M, Englund NP, Yan F, Wang Z, Robert McDonald E 3rd, Wei L, Ma J, Easton

- J, Yu Z, deBeaumont R, Gibaja V, Venkatesan K, Schlegel R, Sellers WR, Keen N, Liu J, Caponigro G, Barretina J, Cooke VG, Mullighan C, Carr SA, Downing JR, Garraway LA, Stegmeier F. Global chromatin profiling reveals NSD2 mutations in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(11):1386-1391.
88. Janczar S, Janczar K, Pastorczak A, Harb H, Paige AJ, Zalewska-Szewczyk B, Danilewicz M, Mlynarski W. The Role of Histone Protein Modifications and Mutations in Histone Modifiers in Pediatric B-Cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel).* 2017;9(1):2.
89. Jeha S, Behm F, Pei D, Sandlund JT, Ribeiro RC, Razzouk BI, Rubnitz JE, Hijiya N, Howard SC, Cheng C, Pui CH. Prognostic significance of CD20 expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2006;108(10):3302-3304.
90. Jing W, Li J. Identification of biomarkers for the prediction of relapse-free survival in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep.* 2019;41(1):659-667.
91. Jones TS, Kaste SC, Liu W, Cheng C, Yang W, Tantisira KG, Pui CH, Relling MV. CRHR1 polymorphisms predict bone density in survivors of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2008;26(18):3031-3037.
92. Kamran M, Long ZJ, Xu D, Lv SS, Liu B, Wang CL, Xu J, Lam EW, Liu Q. Aurora kinase A regulates Survivin stability through targeting FBXL7 in gastric cancer drug resistance and prognosis. *Oncogenesis.* 2017;6(2): e298.
93. Karjalainen R, Liu M, Kumar A, He L, Malani D, Parsons A, Kontro M, Kallioniemi O, Porkka K, Heckman CA. Elevated expression of S100A8 and S100A9 correlates with resistance to the BCL-2 inhibitor venetoclax in AML. *Leukemia.* 2019;33(10):2548-2553.
94. Karran P. Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *Br Med Bull.* 2006;79-80:153-70.

95. Kato M. Treatment of Pediatric ALL. In: Kato M, ed. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Springer; 2020, p:49-58.
96. Kawedia JD, Liu C, Pei D, Cheng C, Fernandez CA, Howard SC, Campana D, Panetta JC, Bowman WP, Evans WE, Pui CH, Relling MV. Dexamethasone exposure and asparaginase antibodies affect relapse risk in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012;119(7):1658-1664.
97. Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta*. 1998;1448(2):200-211.
98. Kızılocak H, Okçu F. Late Effects of Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors. *Turk J Hematol*. 2019;36(1):1-11.
99. Kist M, Vucic D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *EMBO J*. 2021;40(5): e106700.
100. Kodidela S, Dorababu P, Thakkar DN, Dubashi B, Sundaram R, Muralidharan N, Nidanapu RP, Aribandi A, Pradhan SC, Uppugunduri CRS. Association of *NUDT15**3 and *FPGS* 2572C>T Variants with the Risk of Early Hematologic Toxicity During 6-MP and Low-Dose Methotrexate-Based Maintenance Therapy in Indian Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes (Basel)*. 2020;11(6):594.
101. Lampert F. Cellular DNA content and chromosome count in acute childhood leukemia and their significance for chemotherapy and prognosis. *Klin Wochenschr*. 1967;45(15):763-768.
102. Laskowska J, Lewandowska-Bieniek J, Szczepanek J, Styczyński J, Tretyn A. Genomic and transcriptomic profiles and in vitro resistance to mitoxantrone and idarubicin in pediatric acute leukemias. *J Gene Med*. 2016;18(8):165-79.
103. Li X, Luo X, Han B, Duan F, Wei P, Chen Y. MicroRNA-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by

- regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways. *Br J Cancer*. 2013;109:2189.
104. Li JF, Dai YT, Lilljebjörn H, Shen SH, Cui BW, Bai L, Liu YF, Qian MX, Kubota Y, Kiyoi H, Matsumura I, Miyazaki Y, Olsson L, Tan AM, Ariffin H, Chen J, Takita J, Yasuda T, Mano H, Johansson B, Yang JJ, Yeoh AE, Hayakawa F, Chen Z, Pui CH, Fioretos T, Chen SJ, Huang JY. Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(50):E11711-E11720.
 105. Li Z, Pei XH, Yan J, Yan F, Cappell KM, Whitehurst AW, Xiong Y. CUL9 mediates the functions of the 3M complex and ubiquitylates survivin to maintain genome integrity. *Mol Cell*. 2014; 54: 805–819.
 106. Liang DC, Yang CP, Liu HC, Jaing TH, Chen SH, Hung IJ, Yeh TC, Lin TH, Lai CL, Lai CY, Shih LY. NUDT15 gene polymorphism related to mercaptopurine intolerance in Taiwan Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2016;16(6):536-539.
 107. Lim SY, Yuzhalin AE, Gordon-Weeks AN, Muschel RJ. Tumor-infiltrating monocytes/macrophages promote tumor invasion and migration by upregulating S100A8 and S100A9 expression in cancer cells. *Oncogene*. 2016;35(44):5735-5745.
 108. Lin X, Xiang X, Hao L, Wang T, Lai Y, Abudoureyimu M, Zhou H, Feng B, Chu X, Wang R. The role of Aurora-A in human cancers and future therapeutics. *Am J Cancer Res*. 2020;10(9):2705-2729.
 109. Liu YF, Wang BY, Zhang WN, Huang JY, Li BS, Zhang M, Jiang L, Li JF, Wang MJ, Dai YJ, Zhang ZG, Wang Q, Kong J, Chen B, Zhu YM, Weng XQ, Shen ZX, Li JM, Wang J, Yan XJ, Li Y, Liang YM, Liu L, Chen XQ, Zhang WG, Yan JS, Hu JD, Shen SH, Chen J, Gu LJ, Pei D, Li Y, Wu G, Zhou X, Ren RB, Cheng C, Yang JJ, Wang KK, Wang SY, Zhang J, Mi JQ, Pui CH, Tang JY, Chen Z, Chen SJ. Genomic

- Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *EBioMedicine*. 2016;8:173-183.
110. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
 111. Long M, Hao M, Dong K, Shen J, Wang X, Lin F, Liu L, Wei J, Liang Y, Yang J, Gu F, Zhang H. AEG-1 overexpression is essential for maintenance of malignant state in human AML cells via up-regulation of Akt1 mediated by AURKA activation. *Cell Signal*. 2013;25(6):1438-1446.
 112. Lucena-Araujo AR, de Oliveira FM, Leite-Cueva SD, dos Santos GA, Falcao RP, Rego EM. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2011;35(2):260-264.
 113. Madhusoodhan PP, Carroll WL, Bhatla T. Progress and prospects in pediatric leukemia. *Current problems in pediatric and adolescent health care*. 2016;46(7):229-241.
 114. Magrath I, Steliarova-Foucher E, Epelman S, Ribeiro RC, Harif M, Li CK, Kebudi R, Macfarlane SD, Howard SC. Paediatric cancer in low-income and middle-income countries. *The lancet oncology*. 2013;14(3):e104-e16.
 115. Malouf C, Ottersbach K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(3):417-446.
 116. Man SM, Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(1):7-21.
 117. McLennan AG. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(2):123-143.

118. Mesri M., Morales-Ruiz M., Ackermann E.J., Bennett C.F., Pober J.S., Sessa W.C., Altieri D.C. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am. J. Pathol.* 2001; 158:1757–1765.
119. Meyer LK; Hermiston ML. The epigenome in pediatric acute lymphoblastic leukemia: drug resistance and therapeutic opportunities. *Cancer Drug Resistance.* 2019, 2.2: 313-325.
120. Miller P, Kidwell KM, Thomas D, Sabel M, Rae JM, Hayes DF, Hudson BI, El-Ashry D, Lippman ME. Elevated S100A8 protein expression in breast cancer cells and breast tumor stroma is prognostic of poor disease outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;166(1):85-94.
121. Mirza Z, Schulten HJ, Farsi HM, Al-Maghrabi JA, Gari MA, Chaudhary AG, Abuzenadah AM, Al-Qahtani MH, Karim S. Molecular interaction of a kinase inhibitor midostaurin with anticancer drug targets, S100A8 and EGFR: transcriptional profiling and molecular docking study for kidney cancer therapeutics. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119765.
122. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5000-5005.
123. Mita S, de Monasterio-Schrader P, Fünfschilling U, Kawasaki T, Mizuno H, Iwasato T, Nave KA, Werner HB, Hirata T. Transcallosal Projections Require Glycoprotein M6-Dependent Neurite Growth and Guidance. *Cereb Cortex.* 2015;25(11):4111-4125.
124. Mobahat M, Narendran A, Riabowol K. Survivin as a preferential target for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 2494–2516.

125. Mohammadi M, Amirmahani F, Goharrizi KJ, Pakzad R, Dolat H. Evaluating the expression level of Survivin gene in different groups of B-cell acute lymphoblastic leukemia patients of Iran. *Mol Biol Rep.* 2019;46(3):2679-2684.
126. Mohseni M, Uludag H, Brandwein JM. Advances in biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and therapeutic implications. *American journal of blood research.* 2018;8(4):29.
127. Mondet J, Laurin D, Lo Presti C, Jacob MC, Meunier M, Giraudon E, Lefebvre C, Berthier S, Leer AM, Park S, Mossuz P. Increased S100A8 expression in bone marrow plasma by monocytic cells from acute myeloid leukemia patients. *Hematol Oncol.* 2020;38(1):114-118.
128. Mondet J, Chevalier S, Mossuz P. Pathogenic Roles of S100A8 and S100A9 Proteins in Acute Myeloid and Lymphoid Leukemia: Clinical and Therapeutic Impacts. *Molecules.* 2021;26(5):1323.
129. Moon A, Yong HY, Song JI, Cukovic D, Salagrama S, Kaplan D, Putt D, Kim H, Dombkowski A, Kim HR. Global gene expression profiling unveils S100A8/A9 as candidate markers in H-ras-mediated human breast epithelial cell invasion. *Mol Cancer Res.* 2008;6(10):1544–1553.
130. Moriyama T, Relling MV, Yang JJ. Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;125(26):3988-3995.
131. Moriyama T, Nishii R, Lin TN, Kihira K, Toyoda H, Jacob N, Kato M, Koh K, Inaba H, Manabe A, Schmiegelow K, Yang JJ, Hori H. The effects of inherited NUDT15 polymorphisms on thiopurine active metabolites in Japanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics.* 2017;27(6):236-239.
132. Mousavian Z, Nowzari-Dalini A, Stam RW, Rahmatallah Y, Masoudi-Nejad A. Network-based expression analysis reveals key genes related to glucocorticoid

- resistance in infant acute lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017;40(1):33-45.
133. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007. 12;446(7137):758-64.
134. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2008, 322.5906: 1377-1380
135. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, Heatley SL, Holmfeldt L, Collins-Underwood JR, Ma J, Buetow KH, Pui CH, Baker SD, Brindle PK, Downing JR. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2011;471(7337):235-9.
136. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology 2010, the American Society of Hematology Education Program Book*. 2012;(1):389-96.
137. Mullighan CG. Genome sequencing of lymphoid malignancies. *Blood*. 2013;122, 3899–3907.
138. Nakayama K, Kamihira S. Survivin an important determinant for prognosis in adult T-cell leukemia: a novel biomarker in practical hemato-oncology. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(12):2249–2255.
139. Nemes K, Csóka M, Nagy N, Márk Á, Váradi Z, Dankó T, Kovács G, Kopper L, Sebestyén A. Expression of certain leukemia/lymphoma related microRNAs and its correlation with prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pathol Oncol Res*. 2015; 21: 597-604.

140. Neumann M, Vosberg S, Schlee C, Heesch S, Schwartz S, Gökbuget N, Hoelzer D, Graf A, Krebs S, Bartram I, Blum H, Brüggemann M, Hecht J, Bohlander SK, Greif PA, Baldus CD. Mutational spectrum of adult T-ALL. *Oncotarget*. 2015;6(5):2754-2766.
141. Nicolas E, Ramus C, Berthier S, Arlotto M, Bouamrani A, Lefebvre C, Morel F, Garin J, Ifrah N, Berger F, Cahn JY, Mossuz P. Expression of S100A8 in leukemic cells predicts poor survival in de novo AML patients. *Leukemia*. 2011; 25(1):57-65.
142. Nishii R, Moriyama T, Janke LJ, Yang W, Suiter CC, Lin TN, Li L, Kihira K, Toyoda H, Hofmann U, Schwab M, Takagi M, Morio T, Manabe A, Kham S, Jiang N, Rabin KR, Kato M, Koh K, Yeoh AE, Hori H, Yang JJ. Preclinical evaluation of *NUDT15*-guided thiopurine therapy and its effects on toxicity and antileukemic efficacy. *Blood*. 2018;131(22):2466-2474.
143. Nordlund J, Syvänen AC. Epigenetics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2018;51:129-138.
144. Núñez-Enríquez JC, Bárcenas-López DA, Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Hernández E, Bekker-Méndez VC, Flores-Lujano J, Solis-Labastida KA, Martínez-Morales GB, Sánchez-Muñoz F, Espinoza-Hernández LE, Velázquez-Aviña MM, Merino-Pasaye LE, García Velázquez AJ, Pérez-Saldívar ML, Mojica-Espinoza R, Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales S, Mejía-Arangur JM; MIGICCL. Gene Expression Profiling of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children with Very Early Relapse. *Arch Med Res*. 2016;47(8):644-655
145. Olinsky S, Loop BT, DeKosky A, Ripepi B, Weng W, Cummins J, Wenger SL, Yan Y, Lagenaur C, Narayanan V. Chromosomal mapping of the human M6 genes. *Genomics*. 1996;33(3):532-536.
146. Oskarsson T, Söderhäll S, Arvidson J, Forestier E, Montgomery S, Bottai M, Lausen B, Carlsen N, Hellebostad M, Lähteenmäki P, Saarinen-Pihkala UM, Jónsson ÓG, Heyman M; Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO)

- ALL relapse working group. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome. *Haematologica*. 2016;101(1):68-76.
147. Oto OA, Paydas S, Tanriverdi K, Seydaoglu G, Yavuz S, Disel U. Survivin and EPR-1 expression in acute leukemias: prognostic significance and review of the literature. *Leuk Res*. 2007;31(11):1495-501
 148. Ouyang MF, Wang D, Liu YT, Xu LY, Zhao MY, Yin XC, Xie M, Yang LC, Yang MH. [Value of S100A8 in evaluating the prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2019;21(4):359-364. Chinese.
 149. Pai AA, Mohan A, Benjamin ESB, Illangeswaran RSS, Xavier Raj I, Janet NB, Arunachalam AK, Kavitha ML, Kulkarni U, Devasia AJ, Fouzia NA, Abraham A, Srivastava A, George B, Mathews V, Korula A, Balasubramanian P. *NUDT15* c.415C>T Polymorphism Predicts 6-MP Induced Early Myelotoxicity in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Undergoing Maintenance Therapy. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021; 14:1303-1313.
 150. Park E, Gang EJ, Hsieh YT, Schaefer P, Chae S, Klemm L, Huantes S, Loh M, Conway EM, Kang ES, Hoe Koo H, Hofmann WK, Heisterkamp N, Pelus L, Keerthivasan G, Crispino J, Kahn M, Müschen M, Kim YM. Targeting survivin overcomes drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(8):2191-2199.
 151. Paugh SW, Bonten EJ, Savic D, Ramsey LB, Thierfelder WE, Gurung P, Malireddi RK, Actis M, Mayasundari A, Min J, Coss DR, Laudermilk LT, Panetta JC, McCorkle JR, Fan Y, Crews KR, Stocco G, Wilkinson MR, Ferreira AM, Cheng C, Yang W, Karol SE, Fernandez CA, Diouf B, Smith C, Hicks JK, Zanut A, Giordanengo A, Crona D, Bianchi JJ, Holmfeldt L, Mullighan CG, den Boer ML, Pieters R, Jeha S, Dunwell TL, Latif F, Bhojwani D, Carroll WL, Pui CH, Myers RM, Guy RK, Kanneganti TD, Relling MV, Evans WE. NALP3 inflammasome

- upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. *Nat Genet.* 2015;47(6):607-14.
152. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48(8):637-660
153. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, Barbany G, Fogelstrand L, Nordgren A, Sjögren H, Fioretos T, Johansson B. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics.* 2015;47(6):672-676.
154. Pavlovic S, Kotur N, Stankovic B, Zukic B, Gasic V, Dokmanovic L. Pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic profiling of childhood acute lymphoblastic leukemia: paving the way to personalized treatment. *Genes.* 2019;10(3):191.
155. Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, Disel U, Sahin B, Burgut R. Survivin and aven: two distinct antiapoptotic signals in acute leukemias. *Ann Oncol.* 2003;14(7):1045-1450.
156. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1:15004.
157. Pennati M., Binda M., Colella G., Folini M., Citti L., Villa R., Daidone M.G., Zaffaroni N. Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 120:648–654
158. Piatopoulou D, Avgeris M, Marmarinos A, Xagorari M, Baka M, Doganis D, Kossiva L, Scorilas A, Gourgiotis D. miR-125b predicts childhood acute lymphoblastic leukaemia poor response to BFM chemotherapy treatment. *Br J Cancer.* 2017;117(6):801-812.
159. Pieters R. Infant acute lymphoblastic leukemia: Lessons learned and future directions. *Current hematologic malignancy reports.* 2009;4(3):167-74.

160. Puangpetch A, Tiyasirichokchai R, Pakakasama S, Wiwattanakul S, Anurathapan U, Hongeng S, Sukasem C. *NUDT15* genetic variants are related to thiopurine-induced neutropenia in Thai children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2020;21(6):403-410.
161. Pui CH, Behm FG, Singh B ve ark. Heterogeneity of presenting features and their relation to treatment outcome in 120 children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;75(1): 174–179.
162. Pui CH. Childhood leukemias. *New England Journal of Medicine*, 1995, 332.24: 1618-1630.
163. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1998;339(9):605-615.
164. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol*. 2001;2(10):597-607.
165. Pui CH, Pei D, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Campana D, Kun LE, Jeha S, Cheng C, Howard SC, Metzger ML, Bhojwani D, Downing JR, Evans WE, Relling MV. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010; 24, 371–382.
166. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(5):551.
167. Pui CH, Nichols KE, Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(4):227-240.
168. Puissegur MP, Eichner R, Quelen C, Coyaude E, Mari B, Lebrigand K, Broccardo C, Nguyen-Khac F, Bousquet M, Brousset P. B-cell regulator of immunoglobulin

- heavy-chain transcription (Bright)/ARID3a is a direct target of the oncomir microRNA-125b in progenitor B-cells. *Leukemia*. 2012;26(10):2224-32.
169. Purizaca J, Meza I, Pelayo R. Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Arch Med Res*. 2012;43(2):89-101.
170. Qazi S, Uckun FM. Gene expression profiles of infant acute lymphoblastic leukaemia and its prognostically distinct subsets. *Br J Haematol*. 2010;149(6):865-73.
171. Raetz EA, Bhatla T. Where do we stand in the treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia? *Hematology*. 2012;(1):129-136.
172. Raetz EA, Morrison D, Romanos-Sirakis E, Gaynon P, Sposto R, Bhojwani D, Bostrom BC, Brown P, Eckroth E, Cassar J, Malvar J, Buchbinder A, Carroll WL. A phase I study of EZN-3042, a novel survivin messenger ribonucleic acid (mRNA) antagonist, administered in combination with chemotherapy in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): a report from the therapeutic advances in childhood leukemia and lymphoma (TACL) consortium. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014;36(6):458-63.
173. Ramalingam R, Kaur H, Scott JX, Sneha LM, Arun Kumar GP, Srinivasan A, Paul SF. Pharmacogenetic evaluation of 6-mercaptopurine-mediated toxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients from a South Indian population. *Pharmacogenomics*. 2021;22(7):401-411.
174. Reboutier D, Benaud C, Prigent C. Aurora A's functions during mitotic exit: The guess who game. *Front. Oncol*. 2015; 5: 290.
175. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(23):2001-8.

176. Relling MV, Ramsey LB. Pharmacogenomics of acute lymphoid leukemia: new insights into treatment toxicity and efficacy. *Hematology*. 2013(1):126-130.
177. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui CH, Stein CM, Moyer AM, Evans WE, Klein TE, Antillon-Klussmann FG, Caudle KE, Kato M, Yeoh AEJ, Schmiegelow K, Yang JJ. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(5):1095-1105.
178. Roberts KG. Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018;2018(1):137-145.
179. Rodel C, Haas J, Groth A, Grabenbauer GG, Sauer R, Rodel F. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: Survivin as a radioresistance factor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2003; 55:1341–1347.
180. Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Médicis R, Lussier A, Poubelle PE, Tessier PA. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2310-20.
181. Saint Fleur-Lominy S, Evensen NA, Bhatla T, Sethia G, Narang S, Choi JH, Ma X, Yang JJ, Kelly S, Raetz E, Harvey RC, Willman C, Loh ML, Hunger SP, Brown PA, Getz KM, Meydan C, Mason CE, Tsiganos A, Carroll WL. Evolution of the Epigenetic Landscape in Childhood B Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Role in Drug Resistance. *Cancer Res*. 2020;80(23):5189-5202.
182. Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2008;34(4):357-364.

183. San Jose-Eneriz E, Agirre X, Rodríguez-Otero P, Prosper F. Epigenetic regulation of cell signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*. 2013;5(5):525-538.
184. Sarang Z, Gyurina K, Scholtz B, Kiss C, Szegedi I. Altered expression of autophagy-related genes might contribute to glucocorticoid resistance in precursor B-cell-type acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol*. 2016;97(5):453-460.
185. Schmiegelow K, Forestier E, Kristinsson J, Söderhäll S, Vettenranta K, Weinshilbom R, Wesenberg F; Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology. Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Leukemia*. 2009;23(3):557-64.
186. Schotte D, De Menezes RX, Akbari Moqadam F, Khankahdani LM, Lange-Turenhout E, Chen C, Pieters R, Den Boer ML. MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(5):703-11. Erratum in: *Haematologica*. 2011;96(8):1240.
187. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer C, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm H. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*. 2000;95(11):3310-3322.
188. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS, Camitta BM. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007;109(3):926-935.

189. Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, Zheng HW, Davies SM, Gaynon PS, Trigg M, Rutledge R, Jorstad D, Winick N, Borowitz MJ, Hunger SP, Carroll WL, Camitta B; Children's Oncology Group. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia*. 2014;28(7):1467-1471.
190. Schüz J, Erdmann F. Environmental Exposure and Risk of Childhood Leukemia: An Overview. *Arch Med Res*. 2016;47(8):607-614.
191. Shahverdi E, Shahriari M, Zare S, Rahiminejad MS, Soleimani FH, Maki M, Manouchehri R, Abdo MH. Common Presenting Signs and Symptoms in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Basic & Clinical Cancer Research*, 2020;12(1).
192. Sharma BR, Kanneganti TD. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nature immunology*, 2021; 22.5: 550-559.
193. Singh M, Bhatia P, Khera S, Trehan A. Emerging role of NUDT15 polymorphisms in 6-mercaptopurine metabolism and dose related toxicity in acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res*. 2017;62:17-22.
194. Singh SK, Lupo PJ, Scheurer ME, Saxena A, Kennedy AE, Ibrahimou B, Barbieri MA, Mills KI, McCauley JL, Okcu MF, Dorak MT. A childhood acute lymphoblastic leukemia genome-wide association study identifies novel sex-specific risk variants. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(46):e5300.
195. So AY, Sookram R, Chaudhuri AA, Minisandram A, Cheng D, Xie C, Lim EL, Flores YG, Jiang S, Kim JT, Keown C, Ramakrishnan P, Baltimore D. Dual mechanisms by which miR-125b represses IRF4 to induce myeloid and B-cell leukemias. *Blood*. 2014;124(9):1502-12.
196. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer HD. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immun*. 2014;20(2):115-25.

197. Spijkers-Hagelstein JA, Schneider P, Hulleman E, de Boer J, Williams O, Pieters R, Stam RW. Elevated S100A8/S100A9 expression causes glucocorticoid resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(6):1255-1265.
198. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun*. 2012;4(1):31–40.
199. Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, et al. Thiopurine Methyltransferase (*TPMT*) Genotype and Early Treatment Response to Mercaptopurine in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA*. 2005;293(12):1485–1489.
200. Stefanska B, Bouzelmat A, Huang J, Suderman M, Hallett M, Han ZG, Al-Mahtab M, Akbar SM, Khan WA, Raqib R, Szyf M. Discovery and validation of DNA hypomethylation biomarkers for liver cancer using HRM-specific probes. *PLoS One*. 2013;8(8): e68439.
201. Stewart HJS, Chaudry S, Crichlow A, Luiling Feilding F, Chevassut TJT. BET Inhibition Suppresses S100A8 and S100A9 Expression in Acute Myeloid Leukemia Cells and Synergises with Daunorubicin in Causing Cell Death. *Bone Marrow Res*. 2018;5742954.
202. Sun C, Chang L, Zhu X. Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget*. 2017;8(21):35445-35459.
203. Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *J Leukoc Biol*. 2016;100(5):961-967.
204. Sun W, Malvar J, Sposto R, Verma A, Wilkes JJ, Dennis R, Heym K, Laetsch TW, Widener M, Rheingold SR, Oesterheld J, Hijiya N, Sulis ML, Huynh V, Place AE, Bittencourt H, Hutchinson R, Messinger Y, Chang B, Matloub Y, Ziegler DS, Gardner R, Cooper T, Ceppi F, Hermiston M, Dalla-Pozza L, Schultz KR, Gaynon P, Wayne

- AS, Whitlock JA. Outcome of children with multiply relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma study. *Leukemia*. 2018;32(11):2316-2325.
205. Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol*. 2013;6:6.
206. Swellam M, Hashim M, Mahmoud MS, Ramadan A, Hassan NM. Aberrant Expression of Some Circulating miRNAs in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biochem Genet*. 2018;56(4):283-294.
207. Szczepanek J. Role of microRNA dysregulation in childhood acute leukemias: Diagnostics, monitoring and therapeutics: A comprehensive review. *World J Clin Oncol*. 2020;11(6):348-369.
208. Szymańska K, Park S. Acute Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. In: Boffetta P, Hainaut P, eds. *Encyclopedia of Cancer*. 3.th ed. Academic Press. 2019, p:1-8.
209. Takagi Y, Setoyama D, Ito R, Kamiya H, Yamagata Y, Sekiguchi M. Human MTH3 (NUDT18) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates: comparison with MTH1 and MTH2. *J Biol Chem*. 2012;287(25):21541-21549.
210. Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Scholz F, Karawajew L, Ludwig WD, Wuchter C. High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2004;10(11):3737–3744.
211. Tanaka Y, Kato M, Hasegawa D, Urayama KY, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, Komiyama T, Manabe A. Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2015;171(1):109-15.

212. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer*. 2015;121(20):3577-90.
213. Tasian SK, Hunger SP. Genomic characterization of paediatric acute lymphoblastic leukaemia: an opportunity for precision medicine therapeutics. *Br J Haematol*. 2017;176(6):867-882.
214. Taub JW, Konrad MA, Ge Y, Naber JM, Scott JS, Matherly LH, Ravindranath Y. High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99(8):2992-6.
215. Tekgündüz E, Demir M, Akpınar S. Prognostik Faktörler Işığında Akut Lenfoblastik Lösemi. *International Journal of Hematology & Oncology/UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2010, 20.1.
216. Tesfai Y, Ford J, Carter KW, Firth MJ, O'Leary RA, Gottardo NG, Cole C, Kees UR. Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy. *Leuk Res*. 2012;36(3):299-306.
217. Taxis T, Guzmán-Cruz C, Rodríguez-Dorantes M, Sánchez-García S, Mino-León D, Gonzalez-Covarrubias V. Genotyping NUDT15*3 rs1166855232 reveals higher frequency of potential adverse effects of thiopurines in Natives and Mestizos from Mexico. *Pharmacol Rep*. 2021 Jun 6.
218. Thomas A. How can we improve on the already impressive results in pediatric ALL? *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*. 2015;(1):414-9.
219. Timms JA, Relton CL, Sharp GC, Rankin J, Strathdee G, McKay JA. Exploring a potential mechanistic role of DNA methylation in the relationship between in utero and post-natal environmental exposures and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Int J Cancer*. 2019;145(11):2933-2943.

220. Toft N, Birgens H, Abrahamsson J, Griškevičius L, Hallböök H, Heyman M, Klausen TW, Jónsson ÓG, Palk K, Pruunsild K, Quist-Paulsen P, Vaitkeviciene G, Vettenranta K, Åsberg A, Frandsen TL, Marquart HV, Madsen HO, Norén-Nyström U, Schmiegelow K. Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1-45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(3):606-15.
221. Tomizawa D, Kiyokawa N. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Ishii E, ed. *Hematological Disorders in Children: Pathogenesis and Treatment*: Springer; 2017, p: 33-60.
222. Troeger A, Siepermann M, Escherich G, Meisel R, Willers R, Gudowius S, Moritz T, Laws HJ, Hanenberg H, Goebel U, Janka-Schaub GE, Mahotka C, Dilloo D. Survivin and its prognostic significance in pediatric acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007;92(8):1043-50.
223. Ultimo S, Martelli AM, Zauli G, Vitale M, Calin GA, Neri LM. Roles and clinical implications of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol*. 2018;233(8):5642-5654.
224. Urban P, Bilecová-Rabajdová M, Stefeková Z, Ostró A, Mareková M. Prehľad potenciálnych onkomarkerov detekcie skorých fáz rakoviny vaječníkov [Overview of potential oncomarkers for detection of early stages of ovarian cancer]. *Klin Onkol*. 2011;24(2):106-111.
225. Urwanisch L, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The NLRP3 Inflammasome and Its Role in the Pathogenicity of Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1271.
226. Uzunhan T.A; Karakaş Z. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. *Çocuk Dergisi*. 2012; 12.1: 6-15.
227. Vader G, Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1786(1):60-72

228. Valerie NC, Hagenkort A, Page BD, Masuyer G, Rehling D, Carter M, Bevc L, Herr P, Homan E, Sheppard NG, Stenmark P, Jemth AS, Helleday T. NUDT15 Hydrolyzes 6-Thio-DeoxyGTP to Mediate the Anticancer Efficacy of 6-Thioguanine. *Cancer Res.* 2016;76(18):5501-11.
229. Van Maele-Fabry G, Gamet-Payraastre L, Lison D. Household exposure to pesticides and risk of leukemia in children and adolescents: Updated systematic review and meta-analysis. *Int J Hyg Environ Health.* 2019;222(1):49-67.
230. Vijayakrishnan J, Kumar R, Henrion MY, Moorman AV, Rachakonda PS, Hosen I, da Silva Filho MI, Holroyd A, Dobbins SE, Koehler R, Thomsen H, Irving JA, Allan JM, Lightfoot T, Roman E, Kinsey SE, Sheridan E, Thompson PD, Hoffmann P, Nöthen MM, Heilmann-Heimbach S, Jöckel KH, Greaves M, Harrison CJ, Bartram CR, Schrappe M, Stanulla M, Hemminki K, Houlston RS. A genome-wide association study identifies risk loci for childhood acute lymphoblastic leukemia at 10q26.13 and 12q23.1. *Leukemia.* 2017;31(3):573-579.
231. Vince JE, Silke J. The intersection of cell death and inflammasome activation. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11-12):2349-67
232. Vora A, Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. In: Hoffbrand V, Higgs D, Keeling D, Mehta A, eds. *Postgraduate Haematology.* 7.st. ed. WILEY Blackwell; 2015, p:384-398.
233. Wang SL, Zhao H, Zhou B, et al. Polymorphisms in ERCC1 and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Leuk Res.* 2006;30:1341–1345.
234. Wang X, Liu W, Sun CL, Armenian SH, Hakonarson H, Hageman L, Ding Y, Landier W, Blanco JG, Chen L, Quiñones A, Ferguson D, Winick N, Ginsberg JP, Keller F, Neglia JP, Desai S, Sklar CA, Castellino SM, Cherrick I, Dreyer ZE, Hudson MM, Robison LL, Yasui Y, Relling MV, Bhatia S. Hyaluronan synthase 3 variant and

- anthracycline-related cardiomyopathy: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2014;32(7):647.
235. Wang Y, Sun H, Wang Z, Liu M, Qi Z, Meng J, Sun J, Yang G. Aurora-A: a potential DNA repair modulator. *Tumour Biol*. 2014;35(4):2831-6.
 236. Werner H, Dimou L, Klugmann M, Pfeiffer S, Nave KA. Multiple splice isoforms of proteolipid M6B in neurons and oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci*. 2001;18(6):593-605.
 237. Werner HB, Krämer-Albers EM, Strenzke N, Saher G, Tenzer S, Ohno-Iwashita Y, De Monasterio-Schrader P, Möbius W, Moser T, Griffiths IR, Nave KA. A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system. *Glia*. 2013;61(4):567-586.
 238. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*. 1999;354(9189):1499-1503.
 239. Wiemels JL, Leonard BC, Wang Y, Segal MR, Hunger SP, Smith MT, Crouse V, Ma X, Buffler PA, Pine SR. Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):15101-15106.
 240. Wiemels JL, Walsh KM, de Smith AJ, Metayer C, Gonseth S, Hansen HM, Francis SS, Ojha J, Smirnov I, Barcellos L, Xiao X, Morimoto L, McKean-Cowdin R, Wang R, Yu H, Hoh J, DeWan AT, Ma X. GWAS in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals novel genetic associations at chromosomes 17q12 and 8q24.21. *Nat Commun*. 2018;9(1):286.
 241. Wu C, Li W. Genomics and pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2018;126:100-11.

242. Wuchter C, Richter S, Oltersdorf D, Karawajew L, Ludwig WD, Tamm I. Differences in the expression pattern of apoptosis-related molecules between childhood and adult de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004;89(3):363–364.
243. Xiao H, Wang LM, Luo Y, Lai X, Li C, Shi J, Tan Y, Fu S, Wang Y, Zhu N, He J, Zheng W, Yu X, Cai Z, Huang H. Mutations in epigenetic regulators are involved in acute lymphoblastic leukemia relapse following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Oncotarget*. 2016;7(3):2696-708.
244. Xie P, Ruan QR, Li JC. [The influence of Survivin in drug resistance of breast cancer cell]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2005;34(6):367-8.
245. Xu H, Yang W, Perez-Andreu V, Devidas M, Fan Y, Cheng C, et al. Novel susceptibility variants at 10p12.31-12.2 for childhood acute lymphoblastic leukemia in ethnically diverse populations. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(10):733-42.
246. Xu H, Shu Y. Insights of Acute Lymphoblastic Leukemia with Development of Genomic Investigation. In: Huang T, editor. *Computational Systems Biology: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2018, p:387-413.
247. Xu H, Zhao X, Bhojwani D, E S, Goodings C, Zhang H, Seibel NL, Yang W, Li C, Carroll WL, Evans WE, Yang JJ. *ARID5B* Influences Antimetabolite Drug Sensitivity and Prognosis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2020;26(1):256-264.
248. Yagi T, Hibi S, Tabata Y, Kuriyama K, Teramura T, Hashida T, Shimizu Y, Takimoto T, Todo S, Sawada T, Imashuku S. Detection of clonotypic IGH and TCR rearrangements in the neonatal blood spots of infants and children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96(1):264-268

249. Yan J, Jiang N, Huang G, Tay JL, Lin B, Bi C, Koh GS, Li Z, Tan J, Chung TH, Lu Y, Ariffin H, Kham SK, Yeoh AE, Chng WJ. Deregulated MIR335 that targets MAPK1 is implicated in poor outcome of paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2013;163(1):93-103.
250. Yan LL, Huang YJ, Yi X, Yan XM, Cai Y, He Q, Han ZJ. Effects of silencing S100A8 and S100A9 with small interfering RNA on the migration of CNE1 nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2015;9(6):2534-2540.
251. Yan M, Wang C, He B, Yang M, Tong M, Long Z, Liu B, Peng F, Xu L, Zhang Y, Liang D, Lei H, Subrata S, Kelley KW, Lam EW, Jin B, Liu Q. Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy. *Med Res Rev.* 2016;36(6):1036-1079.
252. Yan Y, Narayanan V, Lagenaur C. Expression of members of the proteolipid protein gene family in the developing murine central nervous system. *J Comp Neurol.* 1996;370(4):465-78.
253. Yan-Fang T, Dong W, Li P, Wen-Li Z, Jun L, Na W, Jian W, Xing F, Yan-Hong L, Jian N, Jian P. Analyzing the gene expression profile of pediatric acute myeloid leukemia with real-time PCR arrays. *Cancer Cell Int.* 2012;12(1):40.
254. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, Pei D, Chen Y, Crews KR, Kornegay N, Wong FL, Evans WE, Pui CH, Bhatia S, Relling MV. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2015;33(11):1235.
255. Yang L, Yang M, Zhang H, Wang Z, Yu Y, Xie M, Zhao M, Liu L, Cao L. S100A8-targeting siRNA enhances arsenic trioxide-induced myeloid leukemia cell death by down-regulating autophagy. *Int J Mol Med.* 2012;29(1):65-72.
256. Yang SK, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, Haritunians T, Ye BD, Kim KJ, Park SH, Park SK, Yang DH, Dubinsky M, Lee I, McGovern DP, Liu J, Song K.

- A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genet.* 2014;46(9):1017-20.
257. Yang XY, Zhang MY, Zhou Q, Wu SY, Zhao Y, Gu WY, Pan J, Cen JN, Chen ZX, Guo WG, Chen CS, Yan WH, Hu SY. High expression of S100A8 gene is associated with drug resistance to etoposide and poor prognosis in acute myeloid leukemia through influencing the apoptosis pathway. *Onco Targets Ther.* 2016;9:4887-4899.
258. Yi ES, Choi YB, Choi R, Lee NH, Lee JW, Yoo KH, Sung KW, Lee SY, Koo HH. NUDT15 Variants Cause Hematopoietic Toxicity with Low 6-TGN Levels in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res Treat.* 2018;50(3):872-882.
259. Yin D, Xia X, Zhang J, Zhang S, Liao F, Zhang G, Zhang Y, Hou Q, Yang X, Wang H, Ma Z, Wang H, Zhu Y, Zhang W, Wang Y, Liu B, Wang L, Xu H, Shu Y. Impact of NUDT15 polymorphisms on thiopurines-induced myelotoxicity and thiopurines tolerance dose. *Oncotarget.* 2017;8(8):13575-13585.
260. Yöntem A, Bayram İ. Çocukluk Çağında Akut Lenfoblastik Lösemi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.* 2018; 27.4: 483-499.
261. Yu R, Zhang J, Zang Y, Zeng L, Zuo W, Bai Y, Liu Y, Sun K, Liu Y. iTRAQ-based quantitative protein expression profiling of biomarkers in childhood B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Manag Res.* 2019;11:7047-7063.
262. Zgheib NK, Akika R, Mahfouz R, Aridi CA, Ghanem KM, Saab R, Abboud MR, Tarek N, El Solh H, Muwakkit SA. NUDT15 and TPMT genetic polymorphisms are related to 6-mercaptopurine intolerance in children treated for acute lymphoblastic leukemia at the Children's Cancer Center of Lebanon. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(1):146-150.

263. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, Easton J, Chen X, Wang J, Rusch M, Lu C, Chen SC, Wei L, Collins-Underwood JR, Ma J, Roberts KG, Pounds SB, Ulyanov A, Becksfort J, Gupta P, Huether R, Kriwacki RW, Parker M, McGoldrick DJ, Zhao D, Alford D, Espy S, Bobba KC, Song G, Pei D, Cheng C, Roberts S, Barbato MI, Campana D, Coustan-Smith E, Shurtleff SA, Raimondi SC, Kleppe M, Cools J, Shimano KA, Hermiston ML, Doulatov S, Eppert K, Laurenti E, Notta F, Dick JE, Basso G, Hunger SP, Loh ML, Devidas M, Wood B, Winter S, Dunsmore KP, Fulton RS, Fulton LL, Hong X, Harris CC, Dooling DJ, Ochoa K, Johnson KJ, Obenauer JC, Evans WE, Pui CH, Naeve CW, Ley TJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Mullighan CG. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012;481(7380):157-63.
264. Zhang SM, Desroses M, Hagenkort A, Valerie NCK, Rehling D, Carter M, Wallner O, Koolmeister T, Throup A, Jemth AS, Almlöf I, Loseva O, Lundbäck T, Axelsson H, Regmi S, Sarno A, Krämer A, Pudelko L, Bräutigam L, Rasti A, Göttmann M, Wiita E, Kutzner J, Schaller T, Kalderén C, Cázares-Körner A, Page BDG, Krimpenfort R, Eshtad S, Altun M, Rudd SG, Knapp S, Scobie M, Homan EJ, Berglund UW, Stenmark P, Helleday T. Development of a chemical probe against NUDT15. *Nat Chem Biol*. 2020;16(10):1120-1128.
265. Zhang X, Ai F, Li X, She X, Li N, Tang A, Qin Z, Ye Q, Tian L, Li G, Shen S, Ma J. Inflammation-induced S100A8 activates Id3 and promotes colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2015;137(12):2803-2814.
266. Zhang X, Xie H, Chang P, Zhao H, Xia Y, Zhang L, Guo X, Huang C, Yan F, Hu L, Lin C, Li Y, Xiong Z, Wang X, Li G, Deng L, Wang S, Tao L. Glycoprotein M6B Interacts with T β RI to Activate TGF- β -Smad2/3 Signaling and Promote Smooth Muscle Cell Differentiation. *Stem Cells*. 2019;37(2):190-201.
267. Zhang Y, Chen HX, Zhou SY, Wang SX, Zheng K, Xu DD, Liu YT, Wang XY, Wang X, Yan HZ, Zhang L, Liu QY, Chen WQ, Wang YF. Sp1 and c-Myc modulate

drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Mol Cancer*. 2015; 14:56.

268. Zhou H, Li L, Yang P, Yang L, Zheng JE, Zhou Y, Han Y. Optimal predictor for 6-mercaptopurine intolerance in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia: NUDT15, TPMT, or ITPA genetic variants? *BMC Cancer*. 2018;2;18(1):516.



EKLER

	Cinsiyet	Yaş	Kromozomal Karyotip	FISH
OLGU 1	E	3	46, XY, -12, der(13) t(12;13)(q11;p11), +i(21)(q10) [2]/ 46, XY [3]	nuc ish 12p13(ETV6x2), 21q22(RUNX1x4)(ETV6 con RUNX1x2)[82]
OLGU 2	E	3	46,XY [14]	nuc ish 12p13(ETV6x2), 21q22(RUNX1x4)(ETV6 con RUNX1x2)[8/400]
OLGU 3	E	6	45, XY, der(9) t(9;12)(p13;p13) [18]/ 45, XY, del(3)(q21), der(9) t(9;12)(p13;p13) [5]	nuc ish 12p13(ETV6x1), 21q22(RUNX1x2)[356/400]
OLGU 4	E	8	46, XY, add(6)(p25) [1]/ 46, XY [24]	nuc ish 12p13(ETV6x2), 21q22(RUNX1x4)(ETV6 con RUNX1x1)[268/400]
OLGU 5	E	5	56, X, +X, Y,Y, +4, +5, +6, +10, +14, +18, +21, +21[3]/56, XY, X, Y, Y, inv(1)(p13q32), +4, +5, +6, +10, +14, +18, +21, +21[8]/46, XY[10]	nuc ish 12p13(ETV6x2), 21q22(RUNX1x4)[340/400]
OLGU 6	E	6	46,XY[15]	nuc ish 9p21(p16x0), 9q12(D9Z3x2)[228/400]
OLGU 7	E	4	46, XY, +X, -7, t(7;12;14)(q10;p12;q32)[5]/ 46, XY [1]	nuc ish 12p13(ETV6x3), 21q22(RUNX1x2)[244/400]
OLGU 8	E	4	57,XY,+3,+4,+5,+8,+9,+11,+14,+15,+17,+21,+21[8]	nuc ish 12p13(ETV6x2), 21q22(RUNX1x4)[380/400]
OLGU 9	E	4	46,XY [9]	nuc ish 9p21(p16x3), 9q12(D9Z3x3)[50/100]
OLGU 10	E	9	45, X, -Y, add(9)(p24), add(19)(q13), del(20)(q12) [1]/46, XY [24]	nuc ish 9p21(p16x0), 9q12(D9Z3x2)[220/400]
OLGU 11	E	10		
OLGU 12	E	13		
OLGU 13	E	10	46, XY [20]	nuc ish 12p13(ETV6x3), 21q22(RUNX1x2)[252/400]
OLGU 14	E	7	46, XY, del(7)(q11) [1]/ 46, del(X)(q11), Y, del(3)(p12), del(7)(q22) [3]/ 46, XY, fra(10)(p13) [2]/ 46, XY, fra(3)(p22/p24/q25) [4]/ 53, XY, +X, +4, +6, +14, +i(17)(q10), +21, +21 [1]/ 46, XY [7]	nuc ish 12p13(ETV6x2), 21q22(RUNX1x4)[320/400]
OLGU 15	E	7	46,XY, del(1)(p21),del(6)(q23),-7,t(9;22)(q34;q11),-13,+14,add(19)(q13)[21] / 46,XY, del(1)(p21),del(6)(q23), -7,t(9;22)(q34;q11),add(19)(q13),+der(22),t(9;22)(q34;q11)[2] / 46,XY[2]	nuc ish 9q34(ABL1x3),22q11(BCR1x3),(ABL1 con BCR1x2)[372/400]; nuc ish 13q14.3(DLEU1x1),13q14(D13S1825x1)[28/400]

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Öznur	Uyruğu	
Soyadı	TOKTA	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	
Lisans	

Proje Deneyimi

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler: