

ELİF KIRAT

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ İSTANBUL-2021

← Adınızı soyadınızı giriniz

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



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

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**PEDİATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ HASTALARDA  
PROGNOSTİK MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİN ANALİZİ**

**ELİF KIRAT**

**DANIŞMAN  
PROF.DR.MÜGE SAYITOĞLU**

**GENETİK ANABİLİMDALI  
GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2021**

## 1. İTHAF

Annem, Babam, Kardeşlerim ve Eşim'e ithaf ediyorum.

## 2. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki olarak kendime örnek aldığım, hoşgörüsü, sabrı, enerjisi ile beni daima motive eden, yol gösteren çok değerli sevgili danışmanım Prof. Dr. Müge Sayitoğlu'na şükranlarımı sunarım.

Samimiyeti, ilgi ve alakasıyla tez çalışmalarım boyunca yanımda olup beni yönlendiren, yardımcı olan, mesleki tecrübelerinden faydalandığım sevgili Dr. Yücel Erbilgin'e çok teşekkür ediyorum.

Aziz Sancar DETAE Genetik bölümünde tanışmış olduğum şu anda doktora öğrencisi olan Uzm. Khusan Khodzhaev; tam bir karınca misali çok çalışıp herkese yardımcı olan, branşımızla ilgili hemen hemen bir çok konuya vakıf her soru sorduğumda ve yardım istediğimde sabırla destek olan kıymetli arkadaşşıma şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Uzm. Fulya Tozan; her ne kadar yakın zaman da tanışmış olsakta sanki yıllardır tanışıyormuşuz gibi yakınlık hissettiğim, güler yüzlü, hoş sohbetli ve ne zaman soru sorsam yardım istesem vakit ayırıp destek olan bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli arkadaşşıma çok teşekkür ediyorum.

Bana deney çalışmalarında yardımcı olan ve bilgilerini benimle severek paylaşan sevgili Uzm. Didem Altındirek'e çok teşekkür ederim.

Sevgili Dr. Sinem Fırtına, Uzm. Gizem Şentürk, Uzm. Maide Kaşit, ve Merve Ordu; ayak üstü muhabbetlerimizle neşelendiğimiz ve bilgi alışverişinde bulunduğumuz kıymetli arkadaşşıma gönülden teşekkür ediyorum.

Öğrenci işleri ve resmi işlemlerle alakalı her konuda yardımcı olan sevgili Murat Alkan'a, Şükrü Deligöz'e ve Birgül Kantar'a çok teşekkür ediyorum.

Üzerimde çok fazla emekleri olan kıymetli annem Feride Şahin, babam Hüseyin Şahin; sizlere ne kadar çok teşekkür etsem az kalır. Her konuda maddi ve manevi destek olduğunuz için, beni daima motive ettiğiniz için, bana güvendiğiniz için ve bana hep

dua ettiğiniz için sizlere çok minnetarım ve sizleri çok seviyorum. Sizin gibi bir anne ve babanın evladı olduğum için kendimi çok şanslı hissediyorum. Canım abim ve biricik kızkardeşim; iyi ki sizin gibi kardeşlerim var. Bana destek olup güvendiğiniz için, üzüntülü zamanlarımda beni neşelendirmeye çalıştığınız için, sinirli zamanlarımda bile sabrettiğiniz için sizlere çok ama çok teşekkür ediyorum ve sizleri çok seviyorum.

Hayatıma kattığı güzellikler için, sevgili eşim Uzm.Dr. Emre Kırat'a çok teşekkür ediyorum. Kalbi güzel yüzü güzel canım eşim; tez süresince bana göstermiş olduğun sabır ve hoşgörün için ayrıca teşekkür ederim. Umarım birlikte nice güzel başarılarla adım atarız.



### 3. İÇİNDEKİLER

|                                                                                                          |                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1. TEZ ONAYI .....                                                                                       | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| 2. BEYAN.....                                                                                            | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| 3. İTHAF.....                                                                                            | ii                                      |
| 4. TEŞEKKÜR.....                                                                                         | iii                                     |
| 5. İÇİNDEKİLER .....                                                                                     | v                                       |
| 6. TABLOLAR LİSTESİ.....                                                                                 | vii                                     |
| 7. ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                                                | viii                                    |
| 8. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                                                                 | ix                                      |
| 9. ÖZET .....                                                                                            | x                                       |
| 10. ABSTRACT.....                                                                                        | xi                                      |
| 11. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                                                   | 1                                       |
| 12. GENEL BİLGİLER .....                                                                                 | 2                                       |
| 12.1. LÖSEMİ.....                                                                                        | 2                                       |
| 12.1.1. Löseminin Tanımı ve Sınıflandırması .....                                                        | 2                                       |
| 12.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi .....                                                                   | 4                                       |
| 12.1.2.1. Morfolojik Sınıflama.....                                                                      | 5                                       |
| 12.1.2.2. İmmünolojik Sınıflama .....                                                                    | 6                                       |
| 12.1.3. Lösemilerin Moleküler Temelleri .....                                                            | 7                                       |
| 12.1.4. Lösemilerde Moleküler Genetik Değişiklikler ve Prognostik Önem Taşıyan Genetik Belirteçler ..... | 8                                       |
| 12.1.5. <i>CRLF2</i> Gen Füzyonları ve Lösemi İlişkisi .....                                             | 19                                      |
| 12.1.6. Lösemilerde Prognostik Risk Sınıflandırması .....                                                | 22                                      |
| 13. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                                 | 24                                      |
| 13.1. GEREÇ .....                                                                                        | 24                                      |
| 13.1.1. Hasta Örnekleri ve Klinik Bilgileri.....                                                         | 24                                      |
| 13.1.2. Kullanılan Cihazlar .....                                                                        | 27                                      |

|                                                                               |                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 13.1.3. Kullanılan Kitler .....                                               | 28                                      |
| 13.1.4. Kantitatif RT- PZR Materyali .....                                    | 28                                      |
| 13.1.5. Kullanılan Kimyasallar .....                                          | 28                                      |
| 13.2. YÖNTEM .....                                                            | 28                                      |
| 13.2.1. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini .....                                 | 28                                      |
| 13.2.2. cDNA Sentezi .....                                                    | 29                                      |
| 13.2.3. Kantitatif RT-PZR .....                                               | 30                                      |
| 13.2.4. Relatif Gen Anlatımı Hesaplama .....                                  | 32                                      |
| 14. BULGULAR.....                                                             | 35                                      |
| 14.1. Hücre Hatlarında ve Kontrollerde <i>CRLF2</i> Anlatımı.....             | 35                                      |
| 14.2. Hastalarda <i>CRLF2</i> Anlatımları .....                               | 36                                      |
| 14.3. Yüksek <i>CRLF2</i> Anlatımı Gösteren Hastalarda Klinik Özellikler..... | 42                                      |
| 14.4. Sağkalım Analizi.....                                                   | 44                                      |
| 15. TARTIŞMA .....                                                            | 48                                      |
| 16. KAYNAKLAR .....                                                           | 54                                      |
| 17. HAM VERİLER .....                                                         | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| 18. FORMLAR .....                                                             | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| 19. ETİK KURUL KARARI .....                                                   | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| 20. PATENT HAKKI İZNİ .....                                                   | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| 21. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....                                           | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| 22. ÖZGEÇMİŞ .....                                                            | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |

#### 4. TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1: ALL patogeneğinde etkili olan faktörler .....                                    | 4  |
| Tablo 2: Akut Lösemilerde FAB Sınıflaması .....                                           | 5  |
| Tablo 3: Pediatrik ALL’de prognostik belirteçlerin değerlendirilmesi. ....                | 16 |
| Tablo 4: Pediatrik B-ALL Hastalarında Prognozu Etkileyen Genetik Belirteçler .....        | 23 |
| Tablo 5: Pediatrik ALL hasta klinik özellikleri. ....                                     | 26 |
| Tablo 6: cDNA sentez protokolü .....                                                      | 30 |
| Tablo 7: <i>CRLF2</i> ve <i>CYPA</i> primer dizileri ve prob no.....                      | 31 |
| Tablo 8: QRT-PZR Bileşen Karışımı ve Isı Koşulları.....                                   | 31 |
| Tablo 9: Y- <i>CRLF2</i> gen anlatımına sahip hastaların klinik özellikleri. ....         | 42 |
| Tablo 10: <i>CRLF2</i> yapısal varyasyonlarına göre belirlenen eşik değer analizler ..... | 43 |
| Tablo 11: Yaşam Analizleri Cox Regresyon Analizi .....                                    | 46 |
| Tablo 12: Medyan değere göre klinik analizler .....                                       | 47 |

## 5. ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1: ALL’de görülen genetik değişiklikler ve prevalansları.....                                                         | 10 |
| Şekil 2: Ph-benzeri ALL Sinyal Yolakları.....                                                                               | 13 |
| Şekil 3: <i>CRLF2</i> ve <i>TSLP</i> ’nin kromozom üzerindeki konumu.....                                                   | 17 |
| Şekil 4: <i>CRLF2</i> geni alternatif kırılmaları .....                                                                     | 18 |
| Şekil 5: <i>CRLF2</i> protein yapısı .....                                                                                  | 18 |
| Şekil 6: <i>CRLF2</i> genin etkileşimde olduğu diğer proteinler. ....                                                       | 19 |
| Şekil 7: Ph-benzeri ALL’de <i>CRLF2</i> geni yeniden düzenlenmeleri.....                                                    | 20 |
| Şekil 8: Ph-benzeri ALL’de genetik değişikliklerin dağılımı.....                                                            | 22 |
| Şekil 9: B-ALL ve T-ALL hasta grubu dağılımı .....                                                                          | 24 |
| Şekil 10: Hastaları sağlayan kurumların dağılımı.....                                                                       | 25 |
| Şekil 11: RNA izolasyon aşamaları .....                                                                                     | 29 |
| Şekil 12: ROC eğrisi altında kalan alan AUC .....                                                                           | 33 |
| Şekil 13: Lenfoblastik lösemi hücre hatlarında relatif <i>CRLF2</i> gen anlatım düzeyleri ....                              | 35 |
| Şekil 14: Kontrol grubunda relatif <i>CRLF2</i> gen anlatım düzeyleri.....                                                  | 36 |
| Şekil 15: AUC analizi. ....                                                                                                 | 37 |
| Şekil 16: $\Delta$ CT değerleri ile <i>CRLF2</i> gen anlatım seviyelerinin heterojen dağılımı.....                          | 38 |
| Şekil 17: <i>CRLF2</i> varyasyonları.....                                                                                   | 39 |
| Şekil 18: T-ALL ve B-ALL hastalarında, hücre hatlarında ve kontrol grubunda <i>CRLF2</i> mRNA anlatımı. ....                | 40 |
| Şekil 19: A) Sağlıklı kontrol grubu ile total ALL hastalarının ve B) T-ALL ve B-ALL hastalarının <i>CRLF2</i> anlatımı..... | 42 |
| Şekil 20: Genel sağkalım ve Olaysız sağkalım grafikleri.....                                                                | 44 |
| Şekil 21: <i>CRLF2</i> (negatif), Nüks, 33. gün yanıtı, translokasyon ve MSS tutulumu Cox analizi.....                      | 46 |

## 6. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- ALL: Akut lenfoblastik lösemi
- AML: Akut miyeloid lösemi
- KML: Kronik miyeloid lösemi
- KLL: Kronik lenfositik lösemi
- Ph: Philadelphia kromozomu
- FAB: “French-American-British” Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırması
- TdT: “Terminal deoksinükleotil transferaz” enzimi
- CD: “Cluster of differentiation” farklılaşma kümeleri
- CALLA: “Common leukemia-associated antigen” common ALL
- B-ALL: B hücreli akut lenfoblastik lösemi
- T-ALL: T hücreli akut lenfoblastik lösemi
- BCP ALL: “B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia” B hücre öncüsü akut lenfoblastik lösemi
- MJH: Minimal kalıntı hastalık
- RTK: Reseptör tirozin kinaz
- Ig: İmmunoglobulin
- FISH: Floresan in-situ hibridizasyon
- Q-RT-PCR: “Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction” kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
- PCR: “Polymerase Chain Reaction” polimeraz zincir reaksiyonu
- cDNA: Komplementer DNA
- M-MLV-RT: “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”
- dTTP: “Deoxythymidine triphosphate”
- AUC: “Area Under the Curve”
- ROC: “Receiver Operator Characteristics Curve”
- µl: Mikrolitre
- kb: Kilo baz
- ct: Threshold cycle
- UPL: “Universal prob library”
- *CRLF2*: “Cytokine Receptor-Like Factor 2” sitokin reseptör benzeri faktör 2
- *P2RY8*: “P2Y Receptor Family Member 8”
- *IGH*: “İmmunoglobulin heavy chain gene”
- *CYPA*: Cyclophilin A
- *TSLP*: “Thymic Stromal Lymphopoietin” timik stromal lenfoietinin
- *TEL*: “Translocation ETS Leukemia”
- *RUNX1*: “Runt-related transcription factor 1”
- *BCR*: “Breakpoint Cluster Region”
- *ABL*: Abelson proto-onkogeni
- *MLL*: “Mixed lineage leukemia”
- *JAK*: Janus Kinase
- *STAT*: “Signal Transducer and Activator of Transcription Protein”
- *IKZF1*: “İkaros Family Zinc Finger-1”
- *PAX5*: “Paired Box Domain Gene 5”

## 7. ÖZET

Kırat, E. (2021). Pediatrik Akut Lenfoblastik Lösemili Hastalarda Prognostik Moleküler Belirteçlerin Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik A.D. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) pediatrik kanserler arasında en sık görülen hastalık grubudur. Pediatrik ALL hastalarında sağkalım oranları her ne kadar yüksek olsa da hastalığın tekrar etmesine (%15-20) bağlı ölümlerin gerçekleştiği bilinmektedir. Günümüzde ALL'nin genomik profili hakkında önemli gelişmelerin tanımlanması, hedefe yönelik tedavi protokollerinin uygulanmasına olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar ile yeni genetik değişiklikler tanımlanmıştır. *BCR-ABL1*-benzeri ALL (Ph-like ALL) B-ALL'de özel bir alt grup olup bu hastalarda gen aktivasyonundan sorumlu birçok tirozin kinaz ve sitokin reseptörlerinin yer aldığı gösterilmiştir. *CRLF2* (*Cytokine Receptor-Like Factor 2*) geni sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olup bu yeni alt grubun yaklaşık yarısında *IGH-CRLF2* ve *P2RY8-CRLF2* şeklinde görülmektedir. *CRLF2* geninin artmış anlatımı, ALL hastalarında olumsuz klinik tabloya katkı sağladığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, 59 pediatrik B-ALL ve 11 pediatrik T-ALL hastasının tanı zamanı materyalleri kullanılarak, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile relatif *CRLF2* mRNA anlatım düzeylerinin belirlenmesi ve prognostik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Yüksek anlatım eşik değeri  $\Delta Ct=8,02$  olarak belirlenmiştir. B-ALL hastalarının %15'inde (n=11) yüksek *CRLF2* (Y-*CRLF2*) mRNA anlatımı saptanmıştır.  $\Delta Ct \geq 8,02$  olan 48 B-ALL 11 T-ALL hastasında normal *CRLF2* (N-*CRLF2*) mRNA anlatımı olduğu belirlenmiştir. Y-*CRLF2* ile N-*CRLF2* grupları, BFM protokolü klinik parametreleri göz önünde bulundurularak yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı sonuç tespit edilmemiştir. Benzer şekilde, *CRLF2* medyan üstü ve altı ekspresyon gösteren hastaların klinik verileri arasında anlamlı fark belirlenmemiştir. Y-*CRLF2* gen anlatımına sahip hastaların yaş medyan değeri 4, %6,3'ü sağ, %6,3'ünde nüks gözlenmediği, %5,4'ün tedaviye cevap verdiği, tanı lökosit  $<100.000(x10^9/L)$  olduğu, %0,4'ü yüksek risk ve %0,6'sının düşük risk grubunda olduğu, MSS tutulumunun olmadığı tespit edilmiştir. Genel sağkalım (cox  $p=0.88$ ) ve olaysız sağkalım (cox  $p=0.81$ ) analizlerinde anlamlı sonuç belirlenmemiştir. Pediatrik ALL'de prognostik moleküler belirteç olarak gösterilen *CRLF2* geni aşırı artmış anlatım düzeylerinin kantitatif PZR yaklaşımları ile tespiti eşik değer belirlemedeki farklılıklar nedeni ile güçlükler barındırmaktadır. Bu nedenle ilave olarak gendeki yapısal değişikliklerin de belirlenmesi hastaların doğru ayrıştırılması için önemlidir. Bu çalışmada her ne kadar Y-*CRLF2* saptanan olgularda klinik olarak anlamlı ve prognostik farklılıklar saptanmasa da Ph-benzeri hastaların seçiminde Y-*CRLF2* olguların belirlenmesi önemlidir. Ayrıca Y-*CRLF2* hastalar JAK inhibitörleri ile tedaviye aday hastalardır.

Anahtar Kelimeler: Pediatrik ALL, *BCR-ABL1*-benzeri ALL, *CRLF2*, Gen anlatımı, Prognostik moleküler belirteçler

## 8. ABSTRACT

Kırat, E. (2021). Analysis of Prognostic Molecular Markers in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master thesis Istanbul. 2021

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common disease group among pediatric cancer cases. Although survival rates are increased in pediatric ALL patients, it is known that deaths occur due to recurrence of the disease (15-20%). ALL genome studies led to define various molecular markers that are important in ALL classification and treatment decisions. One of this subtypes, *BCR-ABL1*-like ALL (Ph-like ALL) is involved in gene activation which effects many tyrosine kinase and cytokine receptors. The *CRLF2* (Cytokine Receptor-Like Factor 2) gene is a member of the cytokine receptor family. Approximately half of this new subgroup carry *IGH-CRLF2* and *P2RY8-CRLF2* rearrangements. Overexpression of the *CRLF2* gene has been found as an unfavorable factor and correlated with poor outcome. In our cohort, *CRLF2* gene variations had been reported in our previous studies. In this thesis, we aimed to quantify *CRLF2* mRNA expression in 59 pediatric B-ALL and 11 pediatric T-ALL patients' diagnosed materials by quantitative-real time polymerase chain reaction (RT-PCR), and evaluate prognostic significance. The *CRLF2* expression cut-off value ( $\Delta Ct$ ) was determined as 8.02. Consequently, *CRLF2* overexpression was detected in 11 B-ALL patients (15%).  $\Delta Ct \geq 8.02$  represents normal *CRLF2* expression level and 48 B-ALL and 11 T-ALL patients had normal *CRLF2* expression. Statistical analyzes were performed according to the BFM protocol criterias but there was no statistically significant difference between H-*CRLF2* and N-*CRLF2* groups. Clinical features of the H-*CRLF2* patients; median value of age is 4 years, 6.3% alive, 6.3% no relapse, response to treatment (5.4%), leukocyte count at diagnosis  $<100,000 (x10^9 / L)$ , 0.4% high risk and 0.6% low risk group, no CNS involvement. We did not detect any statistical difference for overall survival (cox  $p = 0.88$ ) and event free survival (cox  $p = 0.81$ ). *CRLF2* overexpression levels were detected by quantitative PCR however, several methods have been used to define a cut-off value for *CRLF2* expression in the literature. Herein, we applied different cut-off levels and evaluated statistical analysis. Detection of constitutional alterations in the gene are important for correct separation of patients. In this study, although no clinically significant and prognostic differences were found in cases with Y-*CRLF2*, it is important to determine Y-*CRLF2* cases for the selection of Ph-like patients. In addition, Y-*CRLF2* patients are candidates for treatment with JAK inhibitors.

**Key Words:** Pediatric ALL, *BCR-ABL1*-like ALL, *CRLF2*, Gene expression, Prognostic molecular markers

## 9. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada en yaygın ikinci ölüm nedeni olan kanser, ülkemizde ilk dört sırada yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) sunduğu rapora göre Türkiye'de her beş ölümden birinin kanser sebebiyle meydana geldiği bildirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) paylaştığı verilere göre ise sadece 2018 yılında, 18,1 milyon insana kanser tanısı konulurken, 9,9 milyon kişinin kanserden hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan önemli çalışmalar ve geliştirilen tedaviler neticesinde kanser kaynaklı ölümlerin %30'dan fazlasının önlenabilir olduğu bildirilmiştir. Pediatrik kanserlerde ise vakaların %35'ini lösemiler oluşturarak birinci sırada yer almaktadır.

Lösemi, kemik iliğindeki immatür kan hücrelerinin olgunlaşma ve bölünme yetilerini kaybederek hızlı bir şekilde çoğalması, kemik iliğini ele geçirmesi, kana ve bazı doku ya da organlara sızması ile hematopoetik elemanların yerini alarak gelişen malign hastalık grubudur. Trombosit, eritrosit ve granülosit yapımı azalır. Buna bağlı olarak halsizlik, yorgunluk, solukluk, nötropeni kaynaklı enfeksiyonlar ve trombositopeniye bağlı kanamalar gibi semptomlar ortaya çıkar. Klonal bir hastalık olup, kök hücre dahil herhangi bir farklılaşma aşamasında gerçekleşebilir. Akut ya da kronik lösemiler, köken aldıkları öncü hücrelerin tipine göre lenfoid veya miyeloid olarak ayrılırlar. Aynı zamanda kendi içlerinde morfolojik, immünolojik, sitokimyasal, sitogenetik ve moleküler açıdan incelendiğinde farklı alt gruplara ayrılırlar. Hastalara doğru tanının konması ve uygulanacak tedavi protokolünün belirlenmesi açısından bunlar önemli unsurlardır. Löseminin temelinde yatan en önemli nedenlerin genetik ve epigenetik etmenler olduğu düşünülmekte ve multifaktöriyel olduğu bilinmektedir. En yaygın alt tipi olan akut lenfoblastik lösemi (ALL) sıklıkla pediatrik hastalarda görülmekte olup, ülkemizdeki yıllık insidans oranı 1,5/100.000'dir. Akut lösemilerin insidansı coğrafi bölgelere göre değişmekle beraber erkeklerde ve latin-siyah ırkta daha sık görülmektedir. ALL, lenfositik progenitörlerin malign hastalığı olup tek bir B ya da T hücre klonundan köken alır. B hücreleri humoral immün yanıttan, T hücreleri ise hücresel savunmadan sorumlu lenfositlerdir.

ALL oluşumunu tetikleyen ve aynı zamanda hastalığın prognozuyla da ilişkilendirilen önemli moleküler ve sitogenetik değişiklikler var olup, hastalığın yeni alt grupları tanımlanmıştır. Ph-benzeri ALL, yüksek risk grubunda yer alan önemli yeni alt tiplerden biridir ve Ph pozitif ALL ile benzer gen anlatımına sahip fakat *BCR-ABL1* onkogeni bulunmayan grup olarak tanımlanmaktadır. Bu alt tip, kötü prognoz ve olumsuz klinik özellikleri ile karakterizedir. Bununla birlikte Ph-benzeri ALL'de çok sayıda tirozin kinaz ve sitokin reseptör gen aktivasyonundan sorumlu genetik değişiklikler tanımlanmıştır. *CRLF2* genide sitokin reseptör ailesindendir ve Ph-benzeri ALL vakalarının yaklaşık yarısında bu genin yeniden düzenlenmeleri, *P2RY8-CRLF2* füzyonu veya *IHG-CRLF2* translokasyonu şeklinde görülmektedir. Günümüzde ALL'de minimal kalıntı hastalık takibi, çoklu kemoterapi uygulaması, yapılan risk sınıflamasının doğruluğu ve hastalığa ait genomik profilin keşfedilmesi ile hastalardaki sağkalım oranlarının geçmiş yıllara kıyasla ciddi boyutta arttığı bildirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında amacımız, pediatrik ALL hastalarında *CRLF2* gen anlatım düzeylerini kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile belirleyerek klinik parametrelerle karşılaştırılması ve prognostik etkilerinin saptanmasıdır.

## 10. GENEL BİLGİLER

### 10.1. LÖSEMİ

#### 10.1.1. Löseminin Tanımı ve Sınıflandırması

Lösemiler kemik iliğinden köken alan kan hücrelerinde meydana gelen olgunlaşmamış blast hücrelerinin çok fazla çoğalmasıyla hematopoetik hücrelerin yerini alması ve malign transformasyonu sonucu gelişen neoplazmlardır (1). Literatürde ilk lösemi vakası; erişkin bir hastanın karın ağrısı, ateş, halsizlik ve idrar yolu taşlarından kaynaklanan şikayetlerini başvurmasıyla 1827 yılında Alfred Velpeau tarafından bildirilmiştir. Hematopoetik hücrelerin tanımlanması ve mikroskopun keşfinden sonra 1845 yılında Craigie ve Bennet tarafından tanımı yapılan lösemi hücreleri, 1847 yılında patolog Rudolf Virchow tarafından kanın beyaz renginden dolayı “leukemia” (weisses blut) şeklinde isimlendirilmiştir. Neumann 1870’de löseminin dalak, miyelojen ve lenfatik lösemi olarak sınıflamasını yapmış ve kemik iliğinden kaynaklandığını vurgulamıştır. 1942 yılında ise Gilman ve ark. lösemilerde ilk kemoterapi tedavisini uygulamıştır. . 1827’de ilk vaka bildiriminden bu yana lösemi hastalığı, hem klinik olarak hem de genetik araştırmalarla ilgi duyulan geniş hastalık grubu olmuştur (2, 3).

Lösemide kan hücreleri kemik iliğindeki kök hücrelerden gelişirler ancak olgunlaşıp farklılaşamazlar. Olgunlaşma gösteremeyen bu hücreler kemik iliğinde proliferasyon olur ve normal hematopoetik hücrelerin yerini alır. Mekanizma tam olarak anlaşılamamakla birlikte gen amplifikasyonları, kromozomlardaki yeniden düzenlenmeler, delesyonlar, nokta mutasyonları, sitogenetik değişimler, translokasyonlar gibi DNA hasarını oluşturabilecek bu genetik faktörler hücrenin farklılaşması ve proliferasyonun düzenlenmesi gibi normal biyolojik süreçlerini olumsuz yönde etkileyerek sağlıklı hücre oluşumunu engeller. Genetik etmenlere ek olarak virus, ilaç ve kimyasal ajanlar, iyonize ışınlar gibi çevresel faktörler de lösemi eğilimini artıran unsurlardır. Lösemiler, morfolojik olarak kemik iliğinden köken aldığı hücre tipine göre miyeloid veya lenfoid, çoğalan kan hücresinin genç ya da olgunlaşmış olmasına göre akut ya da kronik olarak sınıflandırılmaktadır (4). Akut lösemi “blast”

adı verilen olgunlaşmamış hücrelerden kaynaklı olup, hastalığın ilerleme hızı kronik lösemiye oranla daha hızlıdır. Kronik lösemide ise olgunlaşmış (blastik) kemik iliği elemanlarının artışı söz konusudur, hastalığın ilerleme hızı ve hücre sayısındaki artış yavaştır. Lösemiler hücrelerin olgunlaşma derecesi ve öncül hücrelerine göre temel olarak dört gruba ayrılır;

**Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL):** Kemik iliğindeki hücrelerde oluşabilecek genomik hasar sonucu ve lenfoid progenitör hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ile gelişen kötü huylu bir hastalıktır. En sık pediatrik dönemde görülen ALL, nadiren 50 yaş ve üstü erişkinlerde de görülmektedir (5).

**Akut Myeloblastik Lösemi (AML):** Kemik iliğindeki miyeloid seriye ait progenitör hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ile oluşan klonal bir hastalıktır. Erişkinlerde daha sık gözlenirken pediatrik akut lösemilerin %15-20'ni oluşturur. Geliştirilen tedavilere rağmen AML'deki hastalıksız sağ kalım oranı %50'nin altındadır (5).

**Kronik Lenfositik Lösemi (KLL):** Vücutta bağışıklık sisteminden sorumlu olan B ve T lenfosit hücrelerinin kısmende olsa olgun hücre döneminden köken alan ancak tam olarak olgunlaşmamış küçük lenfositlerin kan, kemik iliği, dalak ve lenf bezine sızarak hücre fonksiyonunun bozulması ile karakterize olan habis bir hastalıktır. Pediatrik dönemde daha nadir olarak görülen hastalık genellikle 60 yaş ve üstü erişkinlerde ortaya çıkmasına rağmen hastaların %15'i 50 yaşın altındadır (5).

**Kronik Myeloid Lösemi (KML):** Kemik iliğindeki aşırı myeloid hiperplazi ve kanda yüksek lökosit sayısı ile kendini gösteren klonal myeloproliferatif bir hastalıktır. KML'de lösemi hücreleri, akut lösemi patolojisinin aksine farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir. Philadelphia kromozomu ile karakterize t(9;22) olan hastalık erişkin lösemilerin %20'ni oluştururken sıklıkla erkeklerde (E/K: 1.4/1) görülmektedir (5).

### 10.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi

ALL olgunlaşma dönemindeki immatür blastların lenfoblast aşamasında kalması sonucu kemik iliği, periferik kan ve takiben diğer dokularda kontrolsüz olarak çoğalmasıyla kendini gösteren habis hüylü heterojen bir hastalıktır. En belirgin özelliği ise farklılaşma yönünden kusur göstermeleridir. Çocukluk dönemi kanserlerinin %25-30'unu lösemiler oluştururken vakaların %75-85'ini ALL oluşturmaktadır. Tablo 1'de ALL patogeneğinde rol alan faktörler gösterilmiştir (6). Kızlarda lösemi sıklığı erkeklere göre 1/1.2-1.3 oranla daha az görülmekte olup çoğunlukta beyaz ırkta saptanmaktadır (5, 7). Genom profilendirme analizleri sonucunda ALL prognozu ile ilişkilendirilen birçok genetik değişim ve yeni hastalık alt grupları tanımlanmıştır. ALL'de özellikle pediatrik hastalarda sağkalım oranları yüksektir. Günümüzde hastaların tedavi seçiminde ve risk sınıflamasında, beyaz hücre sayısı, cinsiyet, yaş, minimal düzeyde hastalık takibi ve ek olarak kazanılmış genetik bozukluklara göre bir ayırım yapılmaktadır. Ülkemizde yıllık insidans hızı milyonda 34,4 olan ALL remisyona indüksiyonu yani başlangıç tedavisi, güçlendirme tedavisi (konsolidasyon) ve idame fazlarından oluşan bir protokol ile tedavi edilmekte ve bu uygulamalar neticesinde günümüzde dört yıllık sağkalım %80'in üzerinde olduğu bildirilmektedir (5, 7, 8).

**Tablo 1:** ALL patogeneğinde etkili olan faktörler (6)

| İyonize Radyasyon | Kimyasal Maddeler   | İlaçlar             | Genetik Faktörler <sup>(Görülme Sıklığı)</sup> |
|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------------------------------|
|                   | Benzen              | Alkilleyici ajanlar | İkiz konkordansı (%20)                         |
|                   | Metabolitleri fenol | Epipodofilotoksin   | Down sendromu 1/95                             |
|                   | Hidrokinon          |                     | Bloom sendromu 1/8                             |
|                   | Katekol             |                     | Fankoni anemisi 1/12                           |
|                   | Benzenetriol        |                     | Nörofibratozis                                 |
|                   |                     |                     | Ataksi telenjiyektazi                          |
|                   |                     |                     | Li-Fraumeni sendromu                           |
|                   |                     |                     | Diamond-Blackfan anemisi                       |

Akut lösemide uygulanacak tedavinin belirlenmesi amacıyla lösemik hücrelerin morfolojik, sitokimyasal sınıflama, immüfenotipleme, moleküler genetik ve sitogenetik özelliklerini esas alarak sınıflama yapılmaktadır. Bu özellikleri baz alarak ALL ve akut nonlenfoblastik lösemi veya akut miyoleid lösemi (ANLL-AML) olmak üzere iki farklı grupta incelenirler.

#### 10.1.2.1. Morfolojik Sınıflama

‘French-American-British’ (FAB) sınıflaması, bir grup hematoloğun neoplastik hücreleri; hücre görünümü, kromatin yapısı, çekirdek şekli, sitoplazma ve çekirdekçik boyutları gibi morfolojik özelliklerine göre farklı gruplara ayırarak yaptığı sınıflamadır. Günümüzde de hücrelerin morfolojik olarak değerlendirilmesinde bu sınıflama (FAB) kullanılmaktadır. Akut lösemilerde FAB sınıflaması Tablo 2’de gösterilmiştir. ALL’de sırasıyla; çocukluk tipi L1 (%80-85), erişkin tipi L2 %15 ve burkitt tipi L3 %1-2 oranlarında görülmektedir. (9).

**Tablo 2:** Akut Lösemilerde FAB Sınıflaması

| <b>Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)</b> |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| L1                                    | Çocukluk tipi ALL |
| L2                                    | Erişkin tipi ALL  |
| L3                                    | Burkitt tipi ALL  |

FAB morfolojisinin ALL’nin seyrinde önemli bir prognostik belirteç olduğu bildirilmiştir. L1 tipi hücreler daha uzun süreli remisyona ve sürvi göstergesidir. L2 grubu daha fazla nüks oranıyla kötü prognozu temsil eder. Prognozu en kötü olan grup Burkitt tipi yani L3’tür (10).

Lösemi türlerini ve alt gruplarını tanımlama amacıyla morfolojik özelliklere ek olarak sitokimyasal boyama yöntemleri de uygulanmaktadır. Lenfoid ve myeloid öncü blastların az ya da çok boyanması veya hiç boyanmamasına bakılarak lösemi tipini ayırmak mümkün olmuştur. Bunun içinse enzimatik ve enzimatik olmayan boyalar kullanılmıştır (11). Örneğin; lenfoblastlar, monosit ve granülositlerin içerdikleri enzim aktivitelerini gösteremedikleri için sudan black, peroksidaz, nonspesifik esteraz ve klorasetat esteraz gibi boyalar ile boyanmazlar ancak terminal deoksiniükleotil transferaz (TdT) enzimi varlığında anti TdT ile boyanırlar. “TdT nükleer enzimi” yıllarca tanılarda

kullanılan önemli bir belirteç olmuştur. ALL’li vakaların %90’dan fazlası bu (TdT) enzimini içerirler ve kötü prognostik etkisi vardır (2, 11, 12).

#### 10.1.2.2. İmmünolojik Sınıflama

İmmünofenotiplendirme, flow (akım) sitometrisi kullanılarak yapılan ve blastın gelişim aşamasındayken duraksayıp hangi basamaktan köken aldıklarını tespit etmeye yarayan bir yöntemdir (13). Miyeloid ve lenfoid hücre yüzeylerinde yer alan “Cluster of Differentiation” (CD) yani farklılaşma demetleri olarak tanımlanan antijenler, lösemilerin alt gruplara ayrılmasına ve etiket misali hücrelerin hangi gelişim evresinde olduğunu anlamaya olanak sağlamıştır. Akım sitometri sayesinde akut lösemilerin biyolojik gelişimleri hakkında diğer yöntemlere kıyasen daha duyarlı ve kısa sürede bilgi edinmek mümkün olagelmıştır (14). İmmünolojik sınıflama ile ALL hakkında şu bilgileri sıralayabiliriz;

- ALL’de immünolojik sınıflama; common ALL (CALLA), B-ALL (erken pre-B, pre-B, geçiş pre-B, matür B), T-ALL (erken, orta, geç timosit), non B/non T ALL olmak üzere 4 ana gruba ayrılır.
- Pediatrik dönem ALL’de (%80-85) öncü B hücreleri ve B hücreli antijenler yer almakta, yine pediatrik dönem ALL’nin %15’ini T hücreli, %2’sini matür B hücreli ve CD10 pozitifliği var olan alt grup “*common leukemia-associated antigen*” yani CALLA (+) ya da common ALL olarak adlandırılmaktadır.
- CALLA genelde iyi prognoza sahip olup CD10 monoklonal antikorlarıyla işaretlenmektedir. İntrasitoplazmik immünglobulinler ve T hücre antijenlerine sahip değildir. Pre-B ALL çocukluk dönemi ALL’nin %20’sini kapsamaktadır, CD10 pozitifdir. Pre-B ALL’de nüks erken pre-B-ALL ye göre daha sıktır ve yaşam süresi daha kısadır. Matür-B ALL’nin kötü prognostik grupta yer alır. B-ALL, “CD19, CD20, CD22, CD24 ve CD79a” gibi farklı antijenlerin işaretlenmesiyle karakterizedir.
- T-ALL’de ise “CD2, CD5, CD7, sitoplazmik CD3 ve TdT” taşımakta olup “CD1, CD3, CD4, CD8” T hücreli ALL için spesifik belirleyicileridir. CD10 negatifdir ve kötü prognoza sahiptir. Pediatrik dönem ALL’sinin %10-15’de rastlanır ve erkeklerde daha sıktır.

- Non B/Non T tüm akut lenfoblastik lösemilerin %15'ini oluşturmakta ve common ALL (CALLA), B-ALL veya T-ALL antijenleri görülmeyen hücrelerden meydana gelmektedir (13, 14).

### 10.1.3. Lösemilerin Moleküler Temelleri

Hematopoetik hücre yapımı ve gelişimi embriyogenez ile birlikte başlayıp takiben karaciğer, timus ve kemik iliğinde fetal dönemin sonuna kadar devam etmektedir. Kemik iliği, doğumla beraber tüm yaşam süresince kan hücrelerinin üretimini sağlayan organdır. Kan hücrelerinin yapımı devamlılık gerektiren dinamik bir süreç olup, yapım ve yıkım arasındaki dengenin sağlanması ve kontrolü önemlidir (15-17). Hücre siklusunun kontrolünde rol alan tüm genlerde (proto-onkogen ve/veya tümör baskılayıcı) gerçekleşecek olan mutasyonlar (delesyon, translokasyon veya amplifikasyon), bazı sayısal yada yapısal kromozomal anomaliler ile meydana gelecek kimerik genler, hematopoetik hücrelerin büyümesi, devamlılığı ve farklılaşması arasındaki dengelerin bozulmasıyla lösemi oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum hücrel proto-onkogenlerin onkogen kimliği kazanmasına da yol açmaktadır (18, 19).

Gen anlatımı kontrol mekanizmasının bozulması gibi durumlarda gen füzyonu ve gen aktivasyonu sonucu lösemi oluşumu kaçınılmazdır. Gen füzyonu; bir proteinin transkripsiyon faktörü veya reseptör tirozin kinazın (RTK) alakasız başka protein ile birleşerek onkogenik özelliğe sahip kimerik bir protein oluşturmasıdır. Oluşan bu kimerik protein, hücrenin malign dönüşümüne neden olmaktadır. Buna örnek olarak t(9;22) Philadelphia kromozomu verilebilir. Gen aktivasyonunda, hücrede transkripsiyonu kontrol eden genlerin yanlış bir biçimde başka genlerin “*enhancer*” ya da aktif promotorunun kontrolünde olmasıdır. Ig veya T-hücre reseptörlerinin “*enhancer*” ya da promotorunda görülür (20).

Proto-onkogenler, hücrenin mitozaya girmesi ve apoptoza yönlendirilmesinde düzenleyici rol oynayan genlerdir. Bunu da G protein sinyal yolağı, transkripsiyon faktörü, büyüme faktörü ve büyüme faktörü reseptörleri, kromatin modifikasyonları vb. aracılığıyla yapar. Proto-onkogenler, mutasyonlar ve gen anlatımı değişiklikleriyle onkogen haline dönüşürler. Onkogenler, hücrenin büyümesini ve proliferasyonunu anormal şekilde arttıran mutant genlerdir (21). Tümör baskılayıcı genler, apoptozu

indükleyerek yaşlanmış hücrelerin yok edilmesini sağlar. Proliferasyonu doğrudan (*gatekeeper*) ve dolaylı (*caretaker*) olarak baskılayan iki tip tümör süpresör gen vardır. Bunlardan ilki, hücre siklusunu kontrol eder ve hücre apoptozunu yönlendiren genler bu grup içerisinde yer alır. Diğeri ise genomdan sorumlu DNA tamir genleridir ve mutasyonların ortaya çıkmasını engellerler. Özetle, onkogenler çoğunlukla nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu veya translokasyonlar gibi genetik değişimlerle; tümör baskılayıcı genlerin ise nokta mutasyonu ya da delesyon gibi fonksiyon kaybettirici genetik değişimlerle oluştuğu söylenebilir (22). Kromozom translokasyonları, kromozom monozomisi, nokta mutasyonları, delesyonlar gibi genetik değişimler sonucu tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon gösterememesi durumunda neoplazi oluşur. Tümör baskılayıcı genler homozigot mutasyonlar sonucu kansere sebep olurken, onkogenlerde bu durum heterozigot mutasyonlar sonucu gerçekleşmektedir (20).

Hücre popülasyonunda hücre miktarını etkileyen en önemli unsurlar, çoğalma hızı ve ölüm hızıdır. Anormal olarak gerçekleşen proliferasyonun durdurulması, DNA sentez işleminin ve hücre bölünmesinin engellenmesiyle olur. Çoğalmanın uygun ya da gerekli olduğu zamanda ise inhibitör mekanizmalar engellenerek büyüme ve çoğalma sinyalleri ortaya çıkar. Hücre gelişimi, bazı hormonlar da dahil olmak üzere büyüme faktörleri (hücre dışı), büyüme faktörü reseptörleri tirozin kinazlar (transmembran, *JAK2*, *IL-7R*, *FLT3* gibi), transkripsiyon faktörleri (*PU.1*, *E2A*, *EBF*, *IKZF1* ve *PAX5* gibi.) ve intrasitoplazmik ligandların onkogenik aktivasyonu ile uyarıldıklarında gerçekleşir (23). Büyüme faktörü reseptörleri kromozomal yeniden düzenlenmeler, mutasyonlar veya yüksek anlatım sonucunda aktive olurlar. Normal formdaki büyüme faktörlerinin aşırı anlatımı mutasyonlarından daha sık görülür. Aşırı anlatım bazı durumlarda gen kopyasındaki ve amplifikasyondaki artışa eşlik eder (24).

#### **10.1.4. Lösemilerde Moleküler Genetik Değişiklikler ve Prognostik Önem Taşıyan Genetik Belirteçler**

Lösemi ve diğer kanserlerin patogenezinde rol alan genetik değişiklikleri şu şekilde sıralayabiliriz;

- Sayısal kromozom bozuklukları (Hiperdiploidi, Hipodiploidi)
- Yapısal kromozom bozuklukları (Translokasyon, İnversiyon)
- Gen anlatım değişiklikleri
- Tek gen mutasyon ve delesyonları
- Epigenetik değişiklikleri gibi.

Lösemi oluşumunda rol alan, prognostik açıdan değerlendirmede öneme sahip veya uygulanacak tedaviye yön vermeye yardımcı olan bazı moleküler biyobelirteçler tanımlanmıştır. Literatürde güncel olarak bildirilmiş, pediatrik progenitör B-ALL ve T-ALL’de prognostik önem taşıyan aday biyobelirteçler; hiperdiploidi, hipodiploidi, *iAMP21*, *ETV6-RUNX1*, *ETV6-RUNX1*-benzeri, *KMT2A*, *KMT2A*-benzeri, *BCR-ABL1*, *BCR-ABL1*-benzeri, *CRLF2*, *BCR-ABL1*-benzeri olmayan *CRLF2*, *IKZF1-N159Y*, *TCF3-PBX1*, *PAX5* değişiklikleri, *PAX5-P80R*, *DUX4*, *ZNF384*, *ZNF384*-benzeri, *MEF2D*, *NUTM1*, *BCL2/MYC* ve diğerleri (B-ALL). T-ALL’de *TAL1*, *TLX3*, *ETP*, *LYL1*, *TLX1* olarak sıralanabilir. Bu genetik değişikliklerin çocuklarda düşük risk ve yüksek risk sınıflamasındaki görülme oranı, ergen ve genç erişkinlerde (AYA: *Adolescent and Young Adults*) veyetışkinlerde ki görülme sıklıkları, T-ALL’de görülen genetik değişiklikler ve sıklıkları Şekil 1’de gösterilmiştir (25-28).



**Şekil 1:** ALL'de görülen genetik değişiklikler ve prevalansları. A) Standart riskli pediatrik ALL, B) Yüksek riskli pediatrik ALL, C) AYA (Genç erişkin) ALL, D) Yetişkin B-ALL E) T-ALL

**Hiperdiploidiler:** kromozom sayısı 46'dan fazla olan grup olarak tanımlanmaktadır. Kromozom sayısı 47-50 arası olan grup düşük hiperdiploidi, 51-67 olan ise yüksek hiperdiploidi olarak tanımlanır. Düşük hiperdiploidide kromozom kazanımı genellikle 21, 13, ve 8. kromozomlarda görülürken diğer grupta 14, 18, 4, 21, X, 17, 6 ve 10. kromozomları ilgilendirdiği bildirilmiştir (29). Hiperdiploidi iyi prognoz belirteçidir. Bu grupta sağkalım oranı 5 yılda %83'lere ulaşabilmektedir. Ancak bu oran erişkin hastalarda daha düşüktür. Kromozom sayısı 46 olduğu halde yapısal veya sayısal anomalilerin olduğu duruma psödodiploidi denmektedir. ALL vakaların birçoğu psödodiploidi veya hiperdiploidi ile seyretmektedir. Vakalardan psödodiploidi olanların prognozu daha kötü iken yüksek hiperdiploidisi olanların ise prognozu daha iyidir. Pediatrik ALL'lerin %20-30'u yüksek hiperdiploidi özellik gösterirken, T-ALL hastalarının birçoğu psödodiploidi ya da diploidi göstermektedir. Bazı yapısal kromozom anomalilerinin de dahil olduğu yüksek hiperdiploidilerde ise prognoz farklılık gösterebilir. Örneğin i(17)(q10), t(9;22)(q34;q11), del(6q) gibi. t(9;22)(q34;q11) ile i(17)(q10) arasındaki birliktelik kötü prognoza belirteçidir. **Hipodiploidiler** 45 kromozomun altında kromozom sayısına sahip olan gruptur. ALL hastalarında genel olarak görülme sıklığı %2 olup, kötü prognoz belirteçidir (27-29).

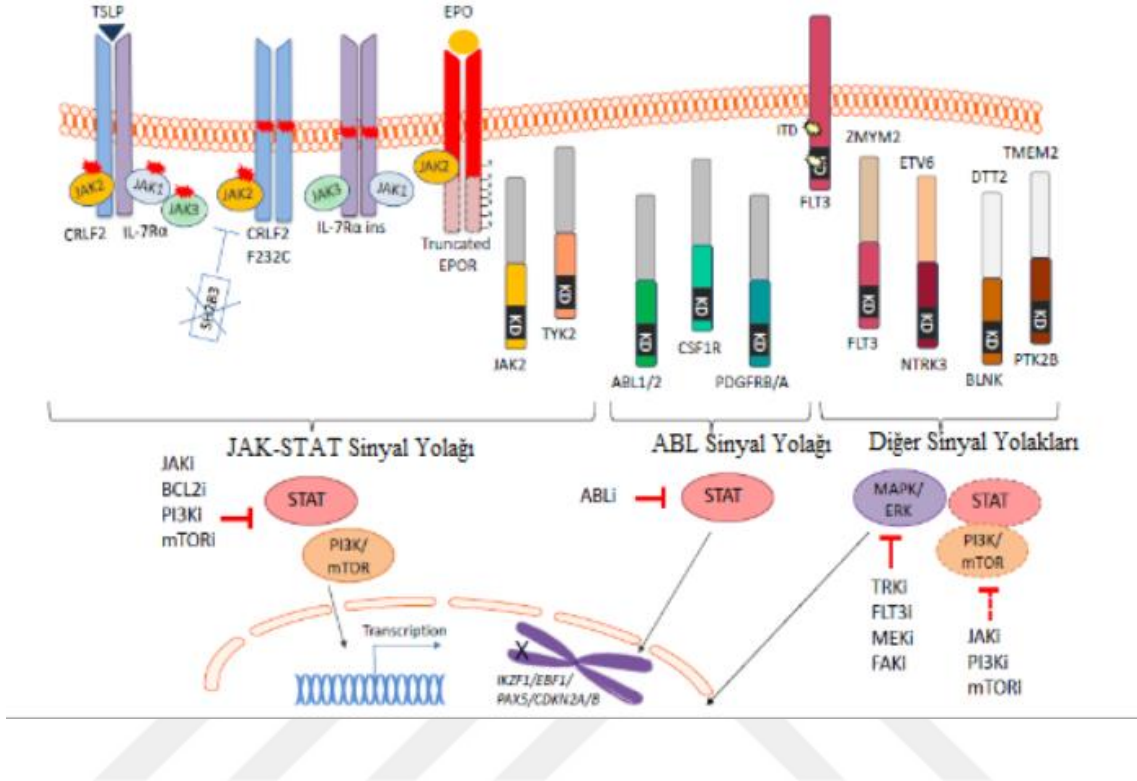
**TEL(ETV6)-AML1(RUNX1) füzyon geni t(12;21)(p13q;q22):** "Translocation ETS Leukemia" geni 12p13'te AML1 geni ise 21q22.3 kromozom bölgelerinde lokalizedir. t(12;21)(p13q;q22) kromozomları arasındaki translokasyon sonucu ETV6/RUNX1(TEL/AML1) kimerik geni oluşmaktadır. RUNX1'deki hedef olan genlerin kontrol mekanizmasının bozulması ya da ETV6 proteinin fonksiyon gösterememesi durumunda pediatrik dönemin en yaygın hastalığı olan ALL'ye neden olmaktadır. Translokasyonların tespiti için sitogenetik yöntemlerden ziyade floresan in-situ hibridizasyon (FISH) tekniği veya gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemine başvurulur. Pediatrik pre-B ALL olgularında t(12;21) sıklığı %25 iken, erişkin ALL hastalarında çok nadir görülmektedir. Bunun yanında, BCP-ALL (pro-b hücreli ALL)'de en çok rastlanan moleküler genetik değişimdir. Yoğun tedavi uygulandığı takdirde prognoz iyidir. Ayrıca bazı hastalarda, bu translokasyona ilave olarak del(12p) (%50-70), +21 (%5-20), +der(21)t(12;21) (%5-15) gibi ek anomaliler de görülebilir. Ek değişimlerin prognostik açıdan etkisi tam olarak bilinmemektedir (30-

32). 21. Kromozomun kromozom içi (**iAMP21**) ALL vakalarının %0,5-2'sinde görülmektedir.

**BCR-ABL1 füzyon geni t(9;22)(q34;q11):** “Breakpoint Cluster Region” geni 22q11.2’de, *ABL* geni ise 9q34.1’de lokalizedir. 9. Kromozomdaki q34.1 bandının 22. kromozomdaki q11.2 bant bölgesi ile translokasyonu sonucunda *BCR-ABL* füzyon geni oluşmaktadır. Bir diğer adı ise Philadelphia (Ph) kromozomudur. Yetişkin ALL’de daha yaygın (%25), çocuklarda ise yaklaşık olarak %5 civarında görülmektedir. Nüks ALL’li olgularda bu rakam %17’ye çıkmaktadır. Pediatrik dönem ALL’de indüksiyon tedavisi sonucunda hastaların yaklaşık %99 oranında remisyona ulaşılmaktadır. Beş yıllık sağkalım %70-80, erişkinlerde ise %35-75 civarlarındadır. Kronik miyeloid lösemi (KML) vakalarının %95’inde *BCR-ABL* kimerik geni mevcuttur. Üç farklı kırık noktası vardır bunlar; p190, p210, p230’dur. KML’de her ne kadar benzeri füzyon geni meydana gelse de oluşacak ürün farklılık göstermektedir. ALL’de en sık olarak 190 kb iken KML’de 210 kb’dir (33, 34).

**BCR-ABL1-benzeri ALL (Ph-like) Alt Grup:** Ph pozitif ALL hastalarının gen anlatım profillerine benzerlik gösteren ancak *BCR-ABL1* translokasyonu taşımayan bir alt gruptur. Mullighan ve ark. *BCR-ABL1* pozitif hastalara benzer gen anlatım profiline sahip, sıklıkla *IKZF1* delesyonu gözlenen bir B-ALL alt grubu olarak tanımlamışlardır (35). Aynı dönemde yapılan bir başka çalışmada, Den Boer ve ark. pediatrik B-ALL olgularında gen anlatım profili analizi yaparak aynı alt grubu tespit etmiş ve “*BCR-ABL1-like*” olarak isimlendirmiştir. B-ALL’nin %15-20’sini bu grup oluşturmaktadır. *BCR-ABL* benzeri ALL grubu *IKZF1*, *EBF1*, *TCF3*, *PAX5* gibi belirteçlerin delesyonları ve artmış *CRLF2* gen anlatımına sahiptir (36). *BCR-ABL*-benzeri ALL, diğer genetik alt tiplerin (Ph-pozitif ALL, kromozomal translokasyonlar veya gen füzyonları ile sınıflanan ALL) aksine gen anlatım profili ile belirlenmektedir. Bu ekspresyon profiline yol açan tirozin kinaz aktivitesini tetikleyecek genetik değişimler; *JAK2*, *CRLF2*, *EPOR* gen yeniden düzenlenmeleri, *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R* ve *PDGFRB* füzyonu, *JAK1*, *JAK2* ve *JAK3* ve interlökin 7 reseptör mutasyonları vb.. *TSLPR* (timik stromal lipoprotein) substratı *CRLF2* reseptörüne bağlanması ile kinaz aktivitesi gösteren *JAK1* ve *JAK2*’yi aktiveleştirir. *JAK2* ailesinin aktivasyonu, STAT5 sinyal yolağı ve PI3K /mTOR aracılığı ile hücre proliferasyonunu ve büyümeyi uyarır, hücre sağkalımını uzatır (Şekil 2) (37, 38). Başlangıçta kötü prognoza sahip bir alt grup iken,

günümüzde tirozin kinaz ve JAK inhibitörlerinin tedavi protokollerine eklenmesi ile bu grupta yer alan hastaların sağkalım süresi iyileştirilmiştir (27, 28).



Şekil 2: Ph-benzeri ALL Sinyal Yolakları (37).

BCP-ALL’de görülen mutasyonlar, Jak/Stat sinyal yolakları, *TP53/RB1* tümör baskılayıcı gen yolakları ve RAS sinyal yolaklarını ilgilendirmektedir. **RAS sinyal yolağı** mutasyonlarının pediatrik ALL’deki sıklığı %15-30 oranındadır. Prognostik etki tam net değildir fakat prognozun kötü olmadığı ön görülmüştür.

**TP53/RB1 yolağı**, birçok tümörde bu yolaklardaki anomaliler tedaviye direnç oluşturmakta ve prognoz açısından değerlendirildiğinde kötü seyrettiği bildirilmektedir. Pediatrik dönem ALL’de *TP53* mutasyonları artmış hastalık nüksü ve azalmış tedavi başarısı ile ilişkilendirilmektedir (32, 37).

**JAK/STAT Sinyal Yolağı:** “Signal Transducer and Activator of Transcription Protein” (STAT)’ler fetal gelişim, hücrelerin gelişimi ve farklılaşması, apoptoz, inflamasyon, immün yanıt ve transformasyon gibi önemli biyolojik işlevlerde rol oynamaktadırlar. *JAK2* 9p24’de lokalize olup 4 üyesi bulunmaktadır (Tyk2, JAK1, JAK2 ve JAK3). *JAK* (Janus Kinase) mutasyonları pre-B-ALL’de yaklaşık %10 sıklıkta görülmektedir. *JAK*

mutasyonları, *BCR-ABL1* benzeri gen anlatım profiline sahip B-ALL’de, lenfoid gelişim (CDKN2A/N, *IKZF1* mutasyonları vb.) , ve tümör baskılanması gibi pek çok hücreyel yolakta sorumlu olan genlerde var olan genetik bozukluklarla ilişkilidir (39, 40). Mutasyonların JAK/STAT yolağını aktive etmesi durumunda tedavi için JAK1/2 inhibitörleri kullanılabilir. *JAK2* mutasyonları, çoğunlukla *IKZF1* ve *CDKN2A/B* ile birliktelik göstermektedir. Down sendromlu ALL’lerde *CRLF2* geni yeniden düzenlenmeleri ile birlikteliği yaklaşık %60 dolaylarındadır. JAK sinyalizasyonunda *JAK1* ve *JAK2*, *CRLF2* ve *IL7R* genlerinin rolü oldukça önemlidir. Yüksek risk grubu ALL’de *IKZF1* mutasyonları sıklıkla *CRLF2* ve *JAK2* mutasyonları ile birliktelik gösterir (41).

***IKZF1 (IKAROS):*** 7p12.2’de lokalize olan *IKZF1*, (Ikaros Family Zinc Finger-1) 8 ekzondan oluşan bir transkripsiyon faktörüdür. *IKZF1*, lenfosit farklılaşmasında düzenleyici rol oynamaktadır. *IKZF1* delesyonları, *BCR-ABL1* pozitif B-ALL olgularında %70, *BCR-ABL1* negatif olgularda ise %40 sıklıkla görülmektedir. *IKZF1*’in delesyonları özellikle de pediatrik öncü B-ALL’de risk sınıflaması için ele alınan prognostik öneme sahip moleküler bir belirteçtir (42, 43).

***PAX5 (Paired Box Domain Gene 5):*** 9p13’te lokalize olan *PAX5*, öncü-B hücre serisi genlerinin aktivasyonunu kontrol etmesi, lenfoid serinin baskılanması ve matür B hücre serisinin oluşumunu sağlamak gibi önemli işlevlere sahip bir transkripsiyon faktörüdür . Baskılayıcı bölgesi ve transaktivatör olması sebebiyle, hedefindekigenleri hem baskılama hem de aktive etme yeteneğine sahiptir. *BCR-ABL* negatif yüksek risk öncü B-ALL’nin %31,7’sinde *PAX5* delesyonları saptanırken, *BCR-ABL1* pozitif olan grup için ise ~ %33 olarak bildirilmiştir. B-ALL’nin %2–3’ünde ise *PAX5* yeniden düzenlenmeleri gözlenmektedir (44, 45).

**11q23 *MLL* geni anomalileri:** “Mixed lineage leukemia” geni olarak da tanımlanan 11q23’teki *MLL* geni yeniden düzenlenmeleri, yenidoğan ALL’lerin 2/3’ünde, pediatrik ve yetişkin dönem ALL’lerin ise %1-10 bildirilmiştir. *MLL* geninin eşlik ettiği çok sayıda translokasyon vardır. Sıklıkla (46);

- t(11;19)(q23;p13.3)/ *MLL-MLLT1* (*ENL*)
- t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AFF1* (*AF4*)
- t(6;11)(q27;q23)/*MLL-AF* (*AF6*)
- t(10;11)(p13-15;q14-21)/*MLLMLLT10* (*AF10*)
- t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3* (*AF9*)

***E2A-PBX1* füzyon geni t(1;19)(q23;p13.3):** Pediatrik ALL vakalarında, ikinci en sık saptanan kromozomal anomalisi t(1;19)(q23;p13.3) translokasyonudur. *TCF3(E2A)-PBX1* füzyon geni oluşur. 1q23 ve 19p13 kromozomları arasında gerçekleşen translokasyon dengeli/dengesiz olabilmektedir. Pediatrik ALL'de %1-6, erişkinlerde %1-3 oranlarında görüldüğü bilinmektedir. B-ALL olgularında daha sıklıkla görülmektedir. Prognostik açıdan değerlendirme tam net olmamakla birlikte yoğun kemoterapi sayesinde iyi tedavi sonuçları elde edilebilmektedir.

***ABL1-NUP214* füzyonu t(9;9)(q34.1;q34.3):** T-ALL'de 9. kromozomda tanımlanmış yeni bir genetik değişikliktir. Hastaların bir çoğunda *TLX3* yada *TLX1* gen anlatımı, t(7;10)(q35;q24) veya t(10;14)(q24;q11), +8, *CDKN2A/B* homozigot veya hemizigot delesyonları görülebilir. Prognozu diğer T-ALL alt gruplarına oranla daha iyidir (46, 47).

***CALM-AF10* füzyon geni t(10;11)(p13;q14):** T-hücreli akut lenfoblastik lösemisinde %10 civarında gözlenmekte olup prognozu iyi seyretmemektedir (*PICALM-MLLT10*). AML ve diğer lösemi türlerinde de görülebilir. Bu grupta, %4 oranında *MLL* mutasyonları saptanmış olup sıklıkla *MLL-MLLT1* t(11;19)(q23;p13) gen füzyonu gözlenmektedir (48).

Pediatrik ALL'de prognostik biyobelirteçlerin değerlendirmesi Tablo 3'te gösterilmiştir (49).

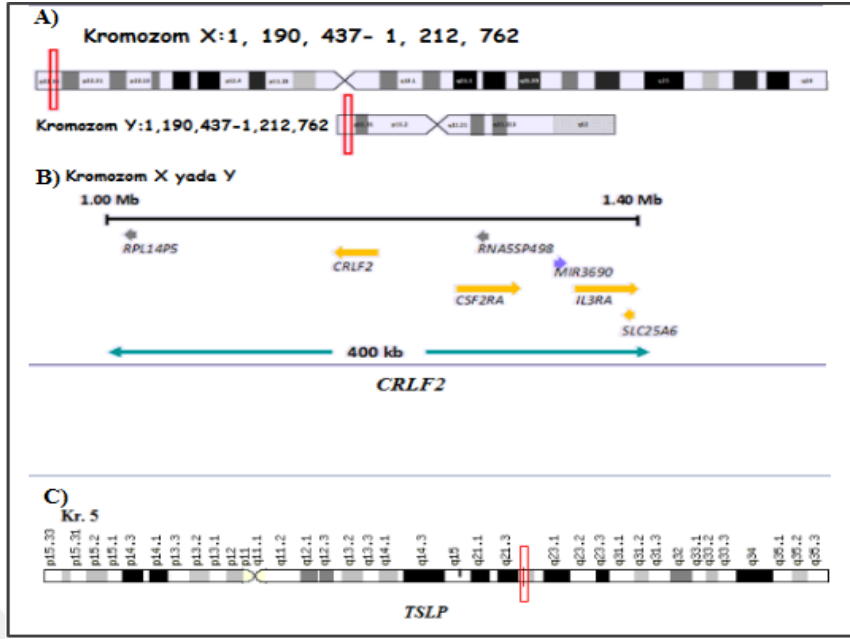
**Tablo 3:** Pediatrik akut lenfoblastik lösemide prognostik belirteçlerin değerlendirilmesi.

| Prognostik Risk Belirteçleri    | İyi Prognozlu           | Kötü Prognozlu              |
|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Yaş                             | 1-9                     | <1;>10                      |
| İrk                             | Beyaz                   | Latin-Siyah ırk             |
| Cinsiyet                        | Kadın                   | Erkek                       |
| Lökosit sayısı                  | <50.000/mm <sup>3</sup> | ≥50.000/mm <sup>3</sup>     |
| MSS durumu                      | MSS1                    | MSS 2 veya 3                |
| Organomegali                    | Yok                     | Var                         |
| İmmunofenotip                   | Öncü B-ALL              | Olgun B-ALL, T-ALL          |
| Sitogenetik                     |                         | t(4;11), t(9;22), t(1;19)   |
| Kromozom sayısı                 | >50                     | <45, özellikle 24-28        |
| DNA indeksi                     | >1.16                   | ≤1.16                       |
| Trizomi 4 ve 10                 | Var                     | Yok                         |
| Moleküler genetik               | <i>TEL-AML1</i>         | <i>MLL</i> geni anomalileri |
| 8.günde periferik kanda blast   | Yok                     | Var                         |
| 7-14.günde kemik iliğinde blast | Yok                     | Var                         |
| Serum immunoglobulin seviyesi   | Normal                  | Düşük                       |

(MSS: Merkezi Sinir Sistemi)

### **CRLF2 Geni**

*CRLF2* (Cytokine Receptor-Like Factor 2) Xp22.33'de lokalize olan ve sekiz ekzondan oluşan bir gendir. Aynı zamanda Yp11.32 kromozom bölgesinde de yer almaktadır. *CRLF2*, Tip1 sitokin reseptör ailesinin üyesi olup sitokin sinyallerinin iletilmesinde aracılık etmektedir. Bu reseptör kompleksi tipik olarak ligand spesifikliği sağlayan alfa domaini ve yüksek affinite ile bağlanma ve sinyal iletiminde görevli beta (gama) domaininden oluşan tipik heterodimerik bir yapıdır. *CRLF2*, Timik Stromal Lipoprotein (Thymic Stromal Lymphopoietin) (*TSLP*) için reseptör görevi üstlenir. *TSLP*, kromozom 5'te q22.1 bölgesinde lokalizedir. 5 ekzondan oluşur (33, 37, 50, 51). *CRLF2* ve *TSLP*' nin kromozom üzerindeki lokalizasyonu Şekil 3'te gösterilmiştir.

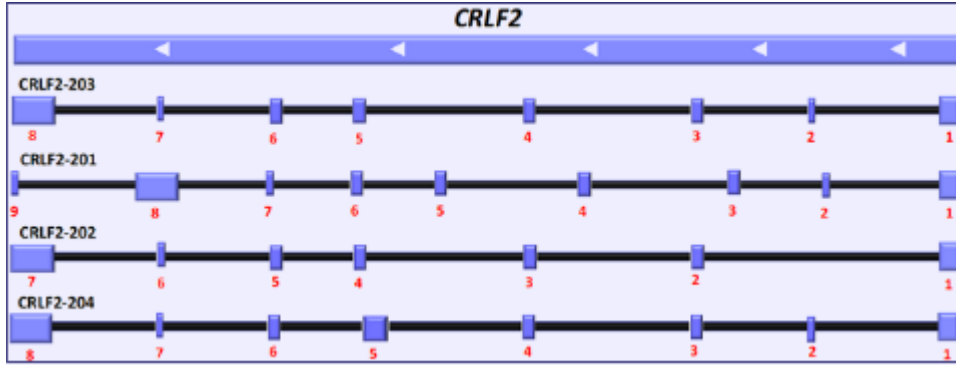


**Şekil 3:** *CRLF2* ve *TSLP*'nin kromozom üzerindeki konumu.

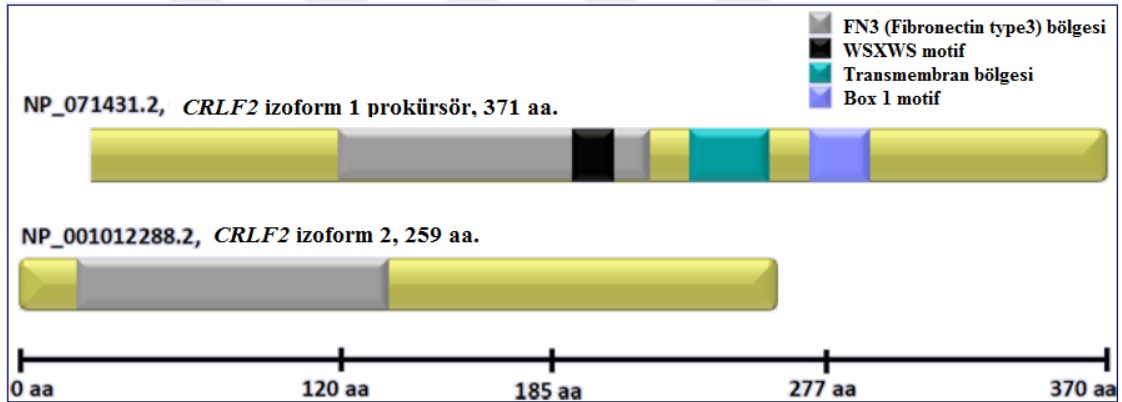
*TSLP* akciğer fibroblastlarında, kas hücrelerinde ifade edilmektedir (52). *CRLF2* gen anlatım düzeyi en çok endometrium, dendritik hücreler, apandis, kemik iliği dokularında görülürken orta düzeyde akciğer, ince bağırsak, mide, mesane, böbrek ve daha az olarak karaciğer, lenf nodu, pankreas, retina, timus dokularında bulunmaktadır. B hücre ve T hücrelerinde ise çok daha az oranda eksprese olduğu görülmüştür (53).

Sitokinler ve reseptörleri, hematopoetik süreçte hücrenin canlılığı, farklılaşması, proliferasyonu gibi önemli görevlerde etkin rol alırlar. *TSLP-CRLF* sinyalizasyonu B-hücre gelişiminde ve inflamasyonda rol oynar. *Cytokine receptor-like 2* yendien yapılanmaları, *JAK/STAT* sinyal yolağı aktivasyonu sonucu oluşan en önemli genetik değişikliklerden bir tanesidir. Diğeri ise nokta mutasyonlarıdır. Aynı zamanda bu genin aberasyonları *JAK/STAT* yolağını aktifleyerek hücre proliferasyonunu tetiklemektedir. *CRLF2*'deki artmış anlatım ve *JAK2* mutasyonları birlikteliği, hematopoetik hücre transformasyonu ve B-ALL oluşumuna yol açabileceği ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Artmış *CRLF2* gen anlatımı profiline sahip adolesan ve çocuk hastaların neredeyse %50'sinde *JAK1/2* mutasyonları birlikteliği görülmektedir g. Literatürde, *CRLF2-F232C* mutasyonunun hematolojik ve hematolojik olmayan tümörlerde

“*dimerization cytokine receptor*” bozduğu ve *JAK2*’nin enzimatik inhibisyonunu ve fosforilasyonunu engellediği bildirilmiştir (54-57).



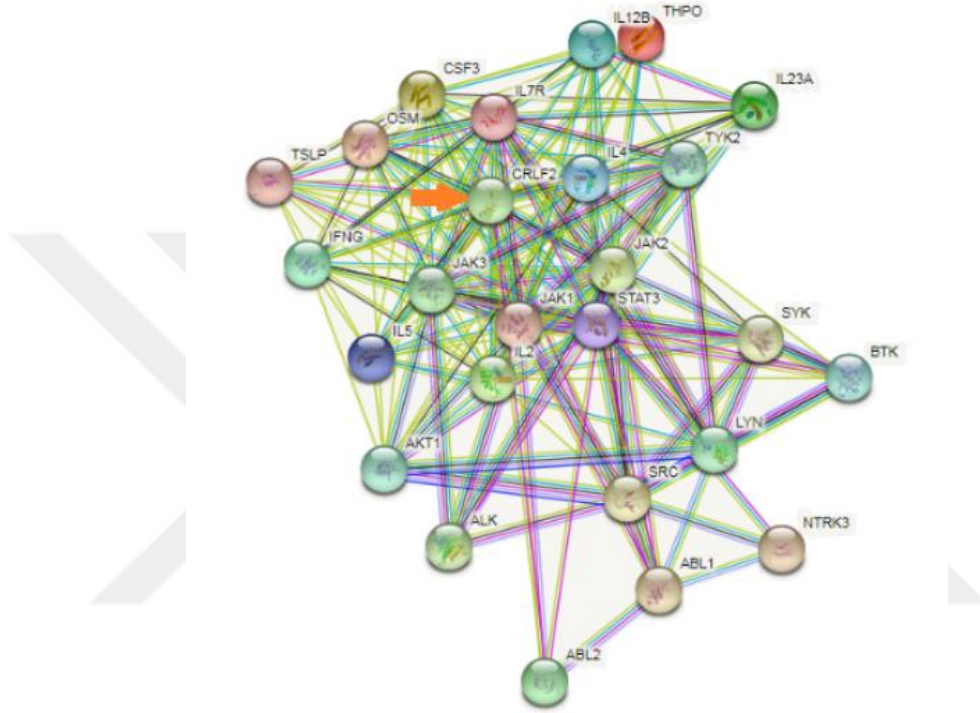
Şekil 4: *CRLF2* geni alternatif kırpılmaları



Şekil 5: *CRLF2* protein yapısı

*CRLF2*-203 ve *CRLF2*-201 transkript varyantları 371 amino asit uzunluğunda en uzun izoformu oluşturarak izoform 1 olarak adlandırılır. İzoform 1 protein dizisi dört ana bölgeyi içermekte olup, FN3 bölge (fibronectin type3) 109’dan 207’inci amino asit bölgesini, WSXWS motif 200’den 204’üncü amino asit bölgesini, Box 1 motif 261’den 269’uncu amino asit bölgesini ve Transmembran bölgesi 232’den 252’nci amino asiti kapsamaktadır. *CRLF2*-204 transkript varyantı, 259 amino asit ile daha kısa izoform oluşturarak *CRLF2* izoform 2 adını alır. Sadece 7’den 76’nci amino asit arasındaki alanı kaplayan FN3 bölgesi yer almaktadır (Şekil 5). *CRLF2* protein düzeyinde yer alan ve önemli işlevlere sahip domainler; **WSXWS**: Uygun protein katlama, hücre içi transfer

ve hücre yüzeyi reseptör bağlanması için gerekli. **Box1:** *JAK-CRLF2* etkileşimi için önemli. **FN3:** Yapısal olarak düzenlenme görevini üstlenmektedir (proteinin formunu koruyor). **Transmembran bölge:** *CRLF2* proteinin hücre zarı seviyesindeki kısmı temsil etmektedir (53).

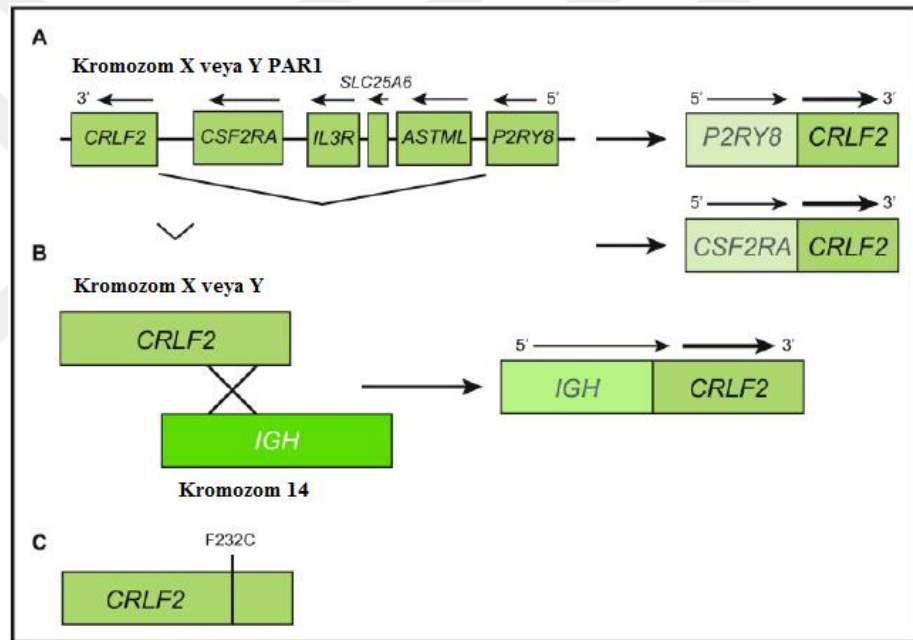


**Şekil 6:** *CRLF2* genin etkileşimde olduğu diğer proteinler.

#### 10.1.5. *CRLF2* Gen Füzyonları ve Lösemi İlişkisi

*CRLF2* gen varyasyonları (*F232C*), katıldığı translokasyonlar sonucu oluşan gen füzyonları ve *CRLF2* artmış anlatımları akut lenfoblastik lösemi hastalarının risk sınıflandırmasında bağımsız ve kötü prognostik bir gösterge olduğu düşünülmektedir. *CRLF2* geninin katıldığı translokasyonlar sonucu *P2RY8-CRLF2* ve *IgH-CRLF2* gen füzyonları oluşmaktadır (Şekil 7) (58). *P2RY8-CRLF2* füzyonu daha küçük yaştaki pediatrik hastalarda daha sık olarak gözlenirken, adolesan ve yetişkin ALL olgularında *IgH-CRLF2* translokasyonu gözlemlendiği bildirilmiştir. Pediatrik ALL olgularında gözlenen major sitogenetik aberasyonların %4'ünü *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri

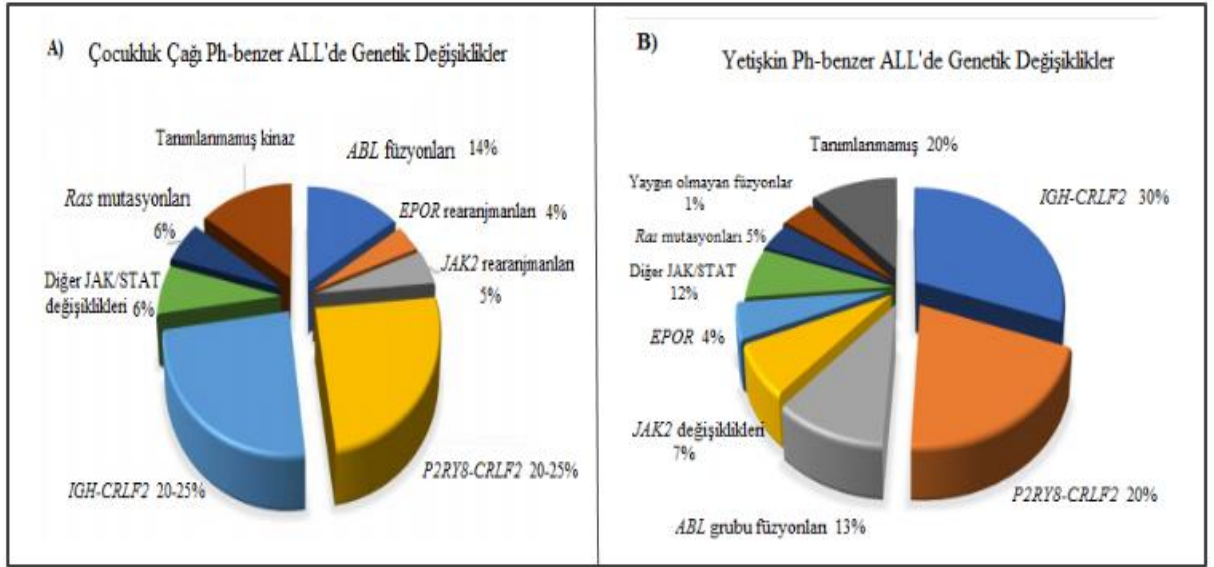
oluşturur. Yetişkin ALL'lerde bu oran %1 dir. Fakat Ph-benzeri ALL olgularının yaklaşık %50'sinde *CRLF2* yeniden düzenlenmesi tespit edilmektedir. 14q32 bölgesinde lokalize *IGH* geni ile Xp22.3/ Yp11.3 bölgesinde lokalize *CRLF2* geni translokasyonu [t(Y;14)(p11;q32) veya t(X;14)(p22;q32)] ve 320-kb'lık delesyon sonucu oluşan *P2RY8-CRLF2* füzyon olmak üzere iki tip *CRLF2* yeniden düzenlenmesi tanımlanmıştır. Ayrıca literatürde bir olguda *CRLF2* geninin 5' bölgesinde promotor bölgesini tamamını içeren 32 kb'lık delesyonun eşlik ettiği *CSF2RA-CRLF2* translokasyonu tanımlanmıştır. Bu olguda genin yüksek anlatıma uğradığı ve *CSF2RA* geninin *CRLF2* anlatımını düzenleyebileceği bildirilmiştir. Ancak olgunun kliniği üzerine ne gibi etkileri olduğu belirtilmemiştir (33, 38, 57-60).



**Şekil 7:** Ph-benzeri ALL'de *CRLF2* geni yeniden düzenlenmeleri. **A)** *PAR1*'in ara delesyonu ile *P2RY8-CRLF2* ve *CSF2RA-CRLF2* füzyonu **B)** t(X;14) veya t(Y;14) ile *IGH-CRLF2* füzyonu oluşmakta. **C)** Nadir *CRLF2* nokta mutasyonları

Ph-benzeri ALL'de prevalans; ırk, etnik köken, yaş ve cinsiyete göre farklılık göstermektedir. *BCR-ABL1*-benzeri B prekürsör ALL, pediatrik hastaların %12'sini, 16-20 yaş grubundakilerin %21'ini, 21-39 yaş aralığındaki erişkinlerin %27'sini ve 40 yaş üzerindekiilerin ise %20-%24'ünü oluşturduğu bildirilmiştir. Ph-pozitif ALL'ye kıyasla çocuklarda 3-4 kat fazla, erişkin grupta hemen hemen aynı prevalansa sahiptir. Den Boer ve arkadaşları Ph-benzeri yeni alt grubu tanımlamış olup bu grubun B-ALL'ye sahip olguların yaklaşık %15-20'sinde görüldüğü ve kötü prognostik etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (36, 38). Aynı zamanda *CRLF2*'nin artmış anlatımları *VPREB1*, *EBF1*, *PAX5*, *TCF3* ve *IKZF1* gibi biyobelirteçlerin delesyonlarıyla ilişkili olduğunda vurgulamışlardır. *BCR-ABL* pozitif olan vakaların neredeyse %50'si *CRLF2* gen bölgesinde kromozomal translokasyonlara sahiptir (36, 38, 61-63).

*CRLF2* erken dönem B-hücre gelişiminde önemli rol oynamaktadır. *CRLF2* mutasyonu yetişkin ve pediatrik öncü B-ALL'de %6 oranında görülmektedir. Down sendromlu ALL hastalarının %60'ından fazlasında *CRLF2* gen anlatımı değişkenliği gözlenmektedir ki genellikle bu duruma *JAK/STAT* yolağındaki aktive edici mutasyonlar eşlik etmektedir. *CRLF2* yeniden düzenlenmesine sahip vakaların yaklaşık 1/3'ünde *JAK* mutasyonu bulunur. Bu genotip artmış nüks riski göstergesidir. Tahminen prekürsör B hücreli ALL de *CRLF2* yüksek anlatımı *JAK* mutasyonun *JAK/STAT* yolağında onkojenik olarak aktivasyonuna zemin hazırlamaktadır. *CRLF2* yüksek anlatımına sahip ALL hastalarının kemoterapiye yavaş cevap verdiği ve indüksiyon sonunda yüksek oranda minimal kalıntı hastalığa sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte hastaların %70'inde nüks görülmektedir (35, 64-67).



**Şekil 8:** Ph-benzeri ALL'de genetik değişikliklerin dağılımı. A) Pediatrik B) Yetişkin.

#### 10.1.6. Lösemilerde Prognostik Risk Sınıflandırması

Günümüzde hastaların tedavi seçiminde ve risk sınıflamasında, beyaz hücre sayısı, cinsiyet, yaş, minimal düzeyde hastalık takibi ve ek olarak kazanılmış genetik bozukluklara göre bir ayırım yapılmaktadır. Prognostik risk grubunun doğru şekilde belirlenmesi, lösemilerde tanı anında uygulanacak tedavinin netlik kazanmasını sağlamaktadır. Tanı esnasındaki lökosit sayısı ve yaş, cinsiyet ve ırk, organomegali, MSS tutulumu, tedaviye yanıt, immünofenotip, DNA indeksi, kromozom sayısı, sitogenetik, moleküler genetik ve minimal kalıntı hastalığı prognostik risk sınıflamasında kullanılan temel belirteçlerdir. Bununla birlikte prognozu etkileyen güncel genetik belirteçler Tablo 4'te gösterilmiştir. Tüm hastalar için ortak bir tedavi uygulanmamakta olup hastalara uygulanacak tedaviler prognostik kriterler ve risk gruplarına bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla risk gruplarına göre spesifik tedavi protokolü uygulanmaktadır. Risk sınıflamasındaki asıl amaç, hastalara bir an önce doğru tanıyı koyabilmek ve diğer alt tiplerde tedavi metodlarında değişikliğe gidilerek ek önlemler almaktır (68-72).

**Tablo 4:** Pediatrik B-ALL Hastalarında Prognozu Etkileyen Genetik Belirteçler

| Risk Grup     | Genetik Belirteçler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Standart Risk | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Yüksek hiperdiploidi (51-67 kromozom) <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ Trizomi 4, 10 ve 17</li> </ul> </li> <li>▪ t(12;21)(p13q;q22): <i>ETV6-RUNX1</i> füzyon geni</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Yüksek Risk   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hipodiploidi (&lt;44 kromozom)</li> <li>▪ <i>KMT2Ar</i> (t[4;11] ya da diğerleri)</li> <li>▪ t(9;22)(q34;q11): <i>BCR-ABL1</i> füzyon geni</li> <li>▪ <i>BCR-ABL1</i>-benzeri (Ph-benzeri) ALL <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ JAK/STAT (<i>CRLF2r</i>, <i>EPORr</i>, <i>JAK1/2/3r</i>, <i>TYK2r</i> ve <i>SH2B3</i>, <i>IL7R</i>, <i>JAK1/2/3</i> genlerinin mutasyonları)</li> <li>➢ ABL grup (<i>ABL1</i>, <i>ABL2</i>, <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, <i>FGFR</i> genleri yeniden düzenlenmeleri )</li> <li>➢ Diğer (<i>NTRKr</i>, <i>FLT3r</i>, <i>LYNr</i>, <i>PTK2Br</i>)</li> </ul> </li> <li>▪ t(17;19): <i>TCF3-HLF</i> füzyon geni</li> <li>▪ <i>iAMP21</i> (Intrachromosomal amplification of chromosome 21)</li> <li>▪ <i>IKZF1</i> değişiklikleri</li> </ul> |

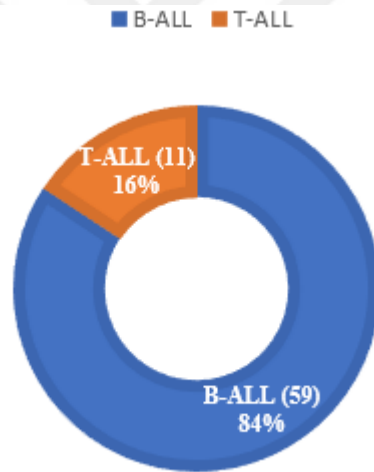
Bu tez çalışmasının amacı, pediatrik B-ALL ve T-ALL hastalarının tanı zamanı örneklerinde *CRLF2* geninin anlatım düzeylerini tespit ederek hastaların klinik parametreleri ile (nüks, sağ kalım, tanı lökosit değerleri, tedavi yanıtı vb.) arasındaki ilişkileri araştırmaktır. Pediatrik ve yetişkin ALL hastalarına alternatif tedavi yaklaşımlarının sunulabilmesi ve lösemi kaynaklı ölümlerin önüne geçebilmesi için moleküler çalışmalar sonucunda ortaya çıkan varyasyonların farklı kohortlarda validasyonları önemlidir.

## 11. GEREÇ VE YÖNTEM

### 11.1. GEREÇ

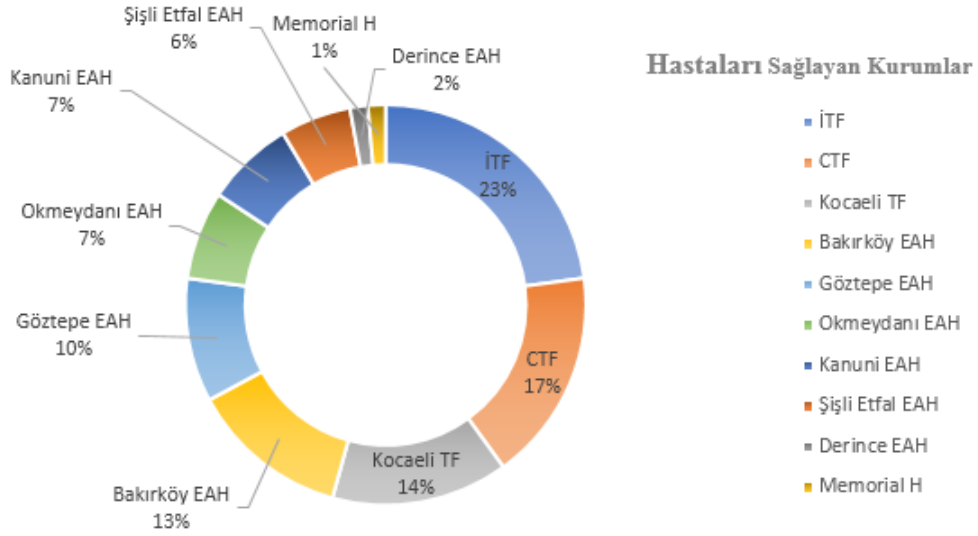
#### 11.1.1. Hasta Örnekleri ve Klinik Bilgileri

Bu tez kapsamında çalışmaya, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ile diğer Hematoloji Bilim Dalı bölümlerinden ALL tanısı almış ve immünofenotip verisi bunu destekleyen B-ALL (n= 59 ) ve T-ALL(n= 11) olmak üzere toplam 70 pediatrik ALL hastası dahil edilmiştir. Hastaların 43'ü erkek ve 27'si kız (E:K=1,59'dur), medyan yaş 5 yıldır (minimum 3 ay-maksimum 18 yıl).



**Şekil 9:** B-ALL ve T-ALL hasta grubu dağılımı

Pediatrik ALL örneklerini sağlayan kurumlar sırasıyla; İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi (n=16), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi (n=12), Bakırköy Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=9), Memorial Hastanesi (n=1), Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=7), Kocaeli Tıp Fakültesi Hastanesi (n=10), Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=5), Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=4), Derince Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=1), Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=5) dir.



**Şekil 10:** Hastaları sağlayan kurumların dağılımı

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul'u tarafınca 24/01/2020 tarihli ve 02 sayılı yazısı ile onaylanmış olup, kan materyali alınan tüm hastaların ebeveyn veya yasal varislerine çalışmanın içeriğini detaylıca anlatan gönüllü onam formu imzalatılmıştır. Çalışmaya dahil olan hastaların klinik özellikleri Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5:Pediatrik ALL hasta klinik özellikleri.

| Klinik Özellikler                             | Olgu sayısı (n=70)  |
|-----------------------------------------------|---------------------|
| Yaş Medyan (min-mak)                          | 5 yıl (3 ay-18 yıl) |
| Cinsiyet (Erkek: Kız)                         | 43:27 (E:K=1,59)    |
| Kİ blast (%) ortalama                         | 90                  |
| Lökosit ( $\times 10^9/L$ ) Medyan (min-mak)  | 18940(1300-520000)  |
| Hemoglobin (dL) Medyan (min-mak)              | 8,1(4-99)           |
| Trombosit ( $\times 10^9/L$ ) Medyan min-max) | 46000(4600-363000)  |
| Sağkalım (ay) Medyan (min-max)                |                     |
| Genel sağkalım                                | 48(1-156)           |
| Olaysız sağkalım                              | 34(0-155)           |
| Nüks n(%)                                     |                     |
| Var                                           | 20 (29)             |
| Yok                                           | 41(58)              |
| Bilinmiyor                                    | 9 (13)              |
| Risk Grup n (%)                               |                     |
| Yüksek                                        | 14 (20)             |
| Orta                                          | 16 (22)             |
| Düşük                                         | 20 (29)             |
| Bilinmiyor                                    | 20 (29)             |
| Son durum n (%)                               |                     |
| Sağ                                           | 44 (63)             |
| Ölü                                           | 17 (24)             |
| Bilinmiyor                                    | 9 (13)              |
| 33. gün kemoterapi yanıtı n (%)               |                     |
| Var                                           | 51 (73)             |
| Yok                                           | 5 (7)               |
| Bilinmiyor                                    | 14 (20)             |
| Fenotip n (%)                                 |                     |
| Pro-B ALL                                     | 9 (13)              |
| Pre-B ALL                                     | 12 (17)             |
| Common B ALL                                  | 38 (54)             |
| T-ALL                                         | 11 (16)             |
| Bilinmiyor                                    |                     |
| Translokasyon n (%)                           |                     |
| <i>BCR-ABL1</i>                               | 2 (3)               |
| <i>MLL-AF4B</i>                               | 3 (4)               |
| <i>TEL-AML</i>                                | 5 (7)               |
| <i>E2A/PBX</i>                                | 1 (2)               |
| Yok                                           | 59 (84)             |
| <i>CRLF2</i> Varyant n(%)                     |                     |
| Var                                           | 10 (14)             |
| Yok                                           | 48 (69)             |
| Bilinmiyor                                    | 12 (17)             |
| Diğer Organ Tutulumları (n (%))               |                     |
| Merkezi Sinir Sistemi                         | 6 (8)               |
| Lenfadenopati                                 | 20 (29)             |
| Splenomegali                                  | 18 (26)             |
| Hepatomegali                                  | 18 (26)             |
| Diğer                                         | 8 (11)              |

Çalışmada hastalar haricinde lösemi hücre hatları ve sağlıklı kontrol örnekleri kullanıldı. Kontrol grubu; sağlıklı bireyden alınan bir periferik kan, iki kemik iliği ve total timus kullanıldı. Lösemi hücre hatlarından B-ALL hücre hattı; REH1/10, 8442-RPMI, FLEB, NALM6, T-ALL hücre hattı; CEM, MOLT4 ve miyeloid hücre hattı K-562 kullanılmıştır.

Daha önceki çalışmalarda MLPA analizi ile saptanan *CRLF2* varyasyon bilgilerine göre hasta grubumuzun %14'ünde *CRLF2* varyantı tespit edilmiş olup yüksek *CRLF2* mRNA anlatımına sahip iki hastada *CRLF2* heterozigot duplikasyonu vardır. Bu iki hastadan bir tanesine *IL3RA* heterozigot duplikasyonu eşlik etmiş olup başka bir hastada ise X kromozomunda heterozigot duplikasyonu vardır. Üç hasta wild type olup diğer hastaların varyasyon bilgilerine ulaşılmamıştır. Normal *CRLF2* mRNA anlatımına sahip hastaların bazılarında *CRLF2* homozigot delesyon bazılarında ise heterozigot delesyon olduğu anlaşılmıştır.

#### 11.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı ve Derin Dondurucular (+4°C, -20°C, -80°C) (Arçelik, Bosch, Sanyo)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, Thermo Scientific)
- Masaüstü mini santrifüj (Hettich, Eppendorf)
- Vorteks (Kermanlar)
- Spektrofotometre (Nanodrop)
- Çeker ocak (Kermanlar)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)
- Otoklav (Sümer)
- Buz makinesi (Cornelius)
- Laminer Akış Kabini (Nuair)
- PZR Cihazı (Thermo-Cycler) Bio-Rad T100
- LC480 RT-PZR cihazı (Light Cycler480 RT-PCR, Roche)

### 11.1.3. Kullanılan Kitler

- Filtreli RNA İzolasyon, Ambion PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA)
- M-MLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Sentez Kit (ThermoFisher Scientific, USA)
- RT-PZR, Light Cycler 480 Hybr ProbMaster Mix Kit (Roche Applied Sciences, Almanya)

### 11.1.4. Kantitatif RT- PZR Materyali

- LC480 Hybr ProbMaster Mix (Roche, Almanya)
- 96 Kuyucuklu Plaklar
- UPL prob (Roche, Almanya)
- UPL primer (Roche, Almanya)

### 11.1.5. Kullanılan Kimyasallar

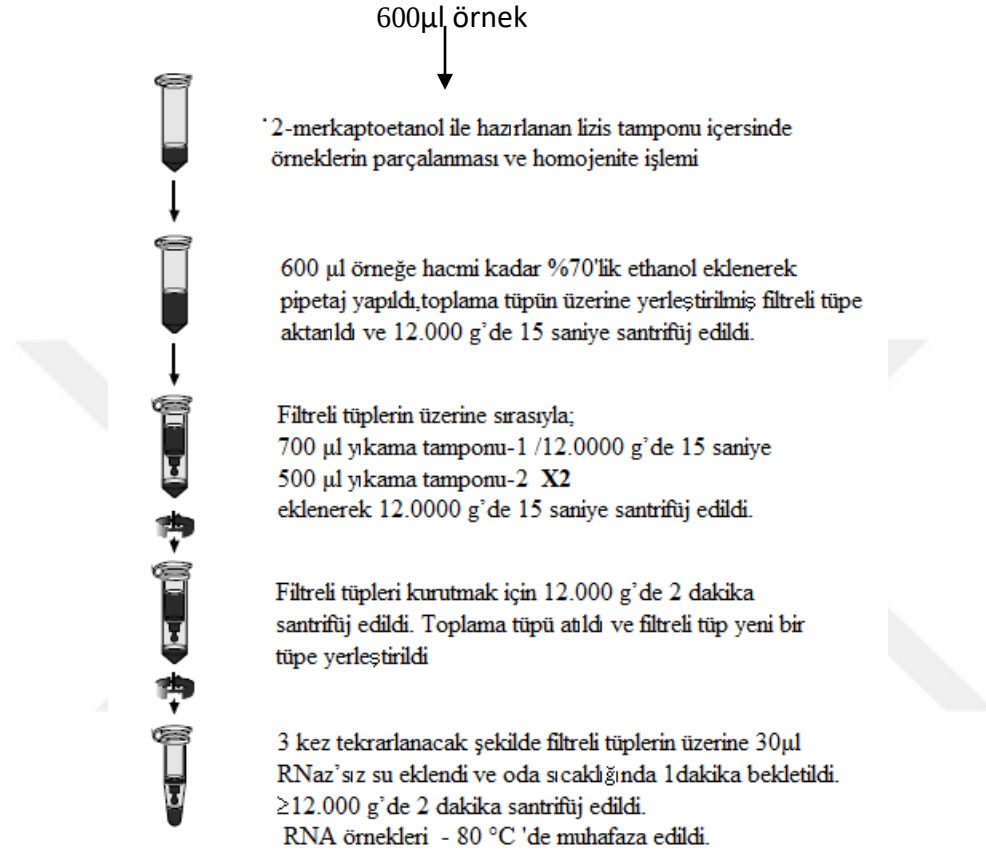
- Etil Alkol (70 ml etil alkol ve 30 ml steril distile su ile %70'lik alkol hazırlandı). (Merck, Almanya)
- Enjeksiyonluk Steril Su, (Eczacıbaşı, Türkiye)

## 11.2. YÖNTEM

### 11.2.1. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Aday genlerin analizinde kullanılacak RNA'ların eldesi için ambion PureLink™ RNA Mini Kit protokolü kullanılarak RNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi (Invitrogen, USA) (Şekil 11). RNA örneklerinden 1 µl alınarak kalite ve miktar tayini ölçümleri spektrofotometre cihazı (Nanodrop) kullanılarak yapıldı. 260/280, 260/230 absorbans değerlerine ve RNA konsantrasyonlarına bakılarak optik dansite oranı 1.8 olanlar saf

kabul edilip çalışmaya dahil edilmiştir. RNA izolasyon aşamaları Şekil 11’de gösterilmiştir.



**Şekil 11:** RNA izolasyon aşamaları

### 11.2.2. cDNA Sentezi

cDNA sentez işlemi M-MLV RT first strand cDNA Sentez Kiti protokolüne uygun şekilde yapıldı. Çalışmada primer olarak Random hegzamer (50-250 ng), enzim olarak M-MLV ters transkriptaz enzimi (200 units/µL) (ThermoFisher Scientific) kullanıldı. Bir mikrogram total RNA örneği kullanılarak Tablo 6'daki protokol izlenmiştir.

**Tablo 6:** cDNA sentez protokolü

| İçerik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Konsantrasyon | Miktar | Yapılan İşlem                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Random hegzamer                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 2,5 µM        | 1µl    |                                                                                                                                                                      |
| dNTP (10 mM)                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0,5 mM        | 1µl    |                                                                                                                                                                      |
| RNA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1000ng        | 10 µl  | ✓ Toplam hacim 12µl oldu. Karışım 65 <sup>0</sup> C’de 5 dk. ısınma sonrası hemen buz üzerine alındı.                                                                |
| 5XFirst-Strand Buffer                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1X            | 4µl    | ✓ Hasta sayısına göre bu üç içeriğin dahil olduğu karışım hazırlandı.<br><br>✓ 7’şer µl olarak pcr tüplerine dağıtıldı. 37 <sup>0</sup> C’de 2 dakika inkübe edildi. |
| DTT (0.1 M)                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0,01 M        | 2 µl   |                                                                                                                                                                      |
| RNaz inhibitörü<br>(40 u/µL)                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 2 u/µL        | 1 µl   |                                                                                                                                                                      |
| M-MLV RT enzimi<br>(200 units/µL)                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 10 u/ µL      | 1 µl   | ✓ Son toplam hacim 20 µl oldu.                                                                                                                                       |
| ✓ Döngü sırası ile 10 dakika 25 <sup>0</sup> C, 50 dakika 37 <sup>0</sup> C, 15 dakika 70 <sup>0</sup> C olacak şekilde PZR cihazına programlandı.<br><br>✓ Sentezlenen cDNA’ lar 10 kat sulandırılıp bir sonraki çalışma olan kantitatif RT-PCR deneylerinde kullanılmak üzere -20 <sup>0</sup> C’de muhafaza edildi. |               |        |                                                                                                                                                                      |

### 11.2.3. Kantitatif RT-PZR

Pediyatrik ALL hastalarında *CRLF2* geninin anlatım düzeylerinin tespiti için kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır (Lightcycler480, Roche). Normalizasyon için referans gen olarak *CYPA* (Cyclophilin A) kullanılmıştır. Hedef gene özgü (*CRLF2*) primer ve prob dizileri “universal probe library” programı kullanılarak tasarlanmıştır (Roche Applied Sciences). Her iki gen bölgesine ait primer dizileri ve prob numaraları Tablo 7’de gösterilmiştir.

**Tablo 7:** *CRLF2* ve *CYPA* primer dizileri ve prob no

| Primer dizisi        |                                         |
|----------------------|-----------------------------------------|
| <i>CRLF2</i> ileri   | 5'- GAG CTG CCG TCT TTC TGC T -3'       |
| <i>CRLF2</i> geri    | 5'- CTC ATC ACC GTT GAA TCT GC -3'      |
| <i>CYPA</i> ileri    | 5'- TAT CTG CAC TGC CAA GAC TGA GTG -3' |
| <i>CYPA</i> geri     | 5'- CTT CTT GCT GGT CTT GCC ATT CC -3'  |
| Prob numarası        |                                         |
| <i>CRLF2</i> prob no | 42                                      |
| <i>CYPA</i> prob no  | 48                                      |

*CRLF2* için primer-prob dizileri NM\_001012288.2 göre tasarlanmıştır. *CYPA* için primer-prob dizileri NM\_021130.4 göre tasarlanmıştır.

Tüm örnekler iki tekrarlı (duplike) olarak çalışılmıştır. Tablo 8 kantitatif PZR protokolünü göstermektedir.

**Tablo 8:** QRT-PZR Bileşen Karışımı ve Isı Koşulları

| İçerik                        | Konsantrasyon | Miktar   |
|-------------------------------|---------------|----------|
| 2X LC480 Hybr Prob Master Mix | 1X            | 5 µl     |
| Forward Primer (20 µM)        | 2 µM          | 1 µl     |
| Reverse Primer (20 µM)        | 2 µM          | 1 µl     |
| Prob (10 µM)                  | 0,2 µM        | 0,2 µl   |
| dH <sub>2</sub> O             | -             | 0,8 µl   |
| <b>Toplam Miktar</b>          | -             | 8 µl     |
| cDNA                          |               | 2 µl     |
| Döngü                         | Süre          | Sıcaklık |
| 1                             | 10 dk         | 95 °C    |
| 45                            | 10 sn         | 95 °C    |
|                               | 20 sn         | 60 °C    |
|                               | 1 sn          | 72 °C    |
| 1                             | 10 sn         | 40°C     |

#### 11.2.4. Relatif Gen Anlatımı Hesaplama

QRT-PZR’da elde edilen verilere göre, *CRLF2* ve *CYPA* gen bölgelerinde her örnek duplike çalışılmıştır. Ct (threshold/cut-off value) yani eşik değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PZR ürününün log-lineer fazda ekponensiyel olarak artmaya başladığı zamandır. İdeal olan PZR etkinlik (efficiency) değeri 1.8-2 ve eğim (slope) -3.1 -3.6’dır.

QRT-PZR kullanılarak yapılan deney çalışmalarında elde edilen verileri analiz etmede iki yaygın yöntem kullanılmaktadır; mutlak (absolute) kantifikasyon ve relatif (relative) kantifikasyon. Relatif kantifikasyon, gen anlatım analizlerinde hedef olan genin mRNA düzeylerini belirlemede referans geni ve hedef geni karşılaştırarak yapılan analiz yöntemidir. mRNA ifade seviyelerinin RT-PCR ile ölçümünde delta Ct yöntemi ( $2^{-\Delta Ct}$  method) kullanılır. Dolayısıyla *CRLF2* ve *CYPA* genlerine ait iki Ct değerinin ortalamaları alınıp relatif gen anlatım düzeyleri delta Ct metodu kullanarak aşağıdaki gibi yapılmıştır.

$$\Delta CT = ct [Hedef] - ct [Referans]$$

*CRLF2*                      *CYPA*

$$CRLF2 \text{ Gen Anlatım Seviyesi} = 2^{-\Delta Ct}$$

\*Eşik değeri (threshold value), sürekli değişkenin ‘anamlı’ olarak ‘ilk’ gösterdiği değeri olup araştırılması yapılan sürekli değişken için verilecek doğru tanı/karar konusunda yön verecek bir değerdir.

Bu çalışmada artmış gen anlatımı için (*overexpression*) eşik değeri belirlemede iki yaklaşım denenmiştir. 1) Hastalarda saptanan *CRLF2* genine ait delta Ct ve/veya gen ekspresyon ( $2^{-\Delta Ct}$  %) değerleri ile gerçekleştirilen AUC analizi. 2) *CRLF2* füzyonlarına sahip hastaların anlatım düzeylerinin eşik değeri olarak alınması.

Ayrıca hastalarda saptanan *CRLF2* relatif gen anlatım düzeyleri medyan değeri üstü ve altı şeklinde de ayrılarak klinik parametreler analiz edilmiştir.

### “Area Under the Curve” Analizi

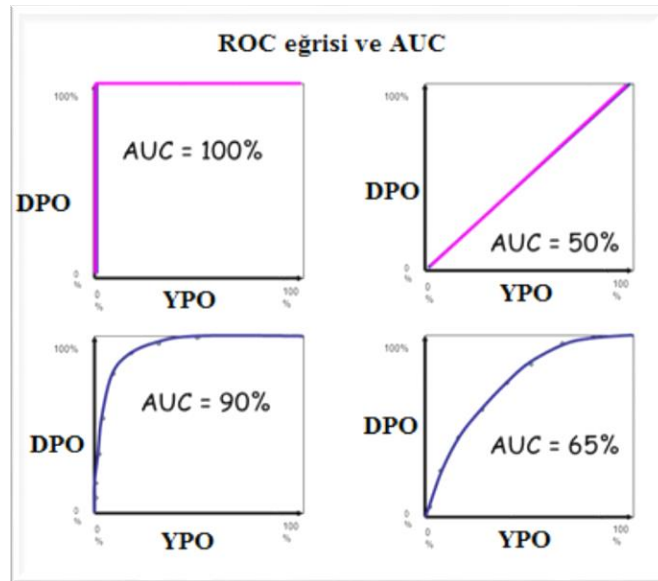
Artmış anlatımı tanımlamak için “Area Under the Curve” AUC analizi kullanılarak eşik değeri belirlenmiştir. AUC, ROC eğrisinin altında kalan alan olarak tanımlanmaktadır. ROC eğrisi, seçicilik ve duyarlılık hakkındaki ilişkiyi grafiksel olarak sunmakta olup klinik tanı testi ve diğer tanı testlerinin yorumlanmasını sağlamaktadır. ROC eğrileri değişkenin sürekli olduğu durumlarda tercih edilmekte olup sürekli değişken için kesim noktalarının hepsini göstermektedir. Kesim noktasındaki her bir sonuç için “doğru pozitif (DP), doğru negatif (DN), yanlış pozitif (YP) ve yanlış negatif (YN)” sıklıkları hakkında olası kestirimler yapılmasını sağlamaktadır. ROC analizinde x eksenini YP oranını ve y eksenini ise DP oranını temsil etmektedir. DPO ve YPO farklı eşik değerlerinin hesaplamasında kullanılmakta olup ROC eğrisini oluşturmaktadır. Bu eğri (0,0) ile (1,1) koordinatları arasında artış gösteren fonksiyondur. ROC, grafiğin (0,1) noktasına yaklaştıkça (sol üst köşe) test/lerin ayırt edilmesi kolaylaşır ve mükemmel test olarak değerlendirilir.

Doğru Pozitif Orantısı (DPO)= Doğru Pozitif/n1=duyarlılık (sensitivite)

Yanlış Pozitif Orantısı (YPO)= Yanlış Pozitif/n2= 1-seçicilik (spesifisite)

n1= Doğru Pozitif + Yanlış Negatif

n2= Yanlış Pozitif + Doğru Negatif



Şekil 12: ROC eğrisi altında kalan alan AUC

ROC analizi sonrasında testlerin tanı koymadaki başarısını değerlendirmek için mükemmel test olarak bilinen AUC analizi tercih edilmektedir. (ROC eğrisi altında kalan alan) Bu alan değişkenin tanı değeri gücünü yansıtmakla birlikte alan değeri 1'e yaklaştıkça tanı değeri yükselir. Pratikte alacağı en küçük değer 0.5'tir. AUC'nin 1'e eşit olması %100'lük tanı performansı başarısını göstermektedir. Eğri altında kalan alan ve %95 güven aralığı belirlenip, 0.5 değeri bu aralık dışında kalıyorsa eğer istatistiksel olarak "anlamlı" yorumunu yapmak mümkün olacaktır. Yani 100 hastadan 95'i sağlam olurken 5'inin hasta olması gibi.

### **İstatistik Analizler**

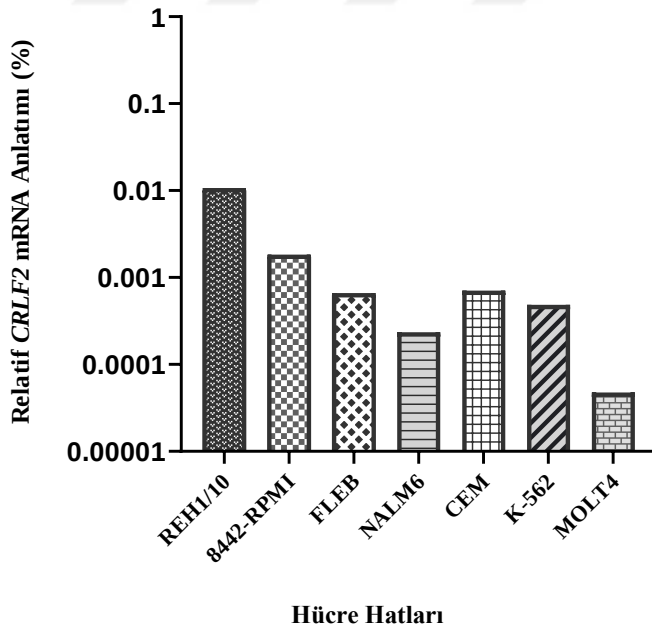
Bu tez çalışmasında, ALL hastalarının relatif *CRLF2* mRNA anlatımları belirlenmiş olup verilerin karşılaştırmalı analizlerinde Mann-Whitney test, one-way ANOVA test, Fisher's exact test, yaşam analizlerinde Log-rank (Mantel-Cox) test, Kaplan Maier ve eşik değer belirlemek için AUC analizi, GraphPad Prism Demo 9 (Updating Prism Windows 9.0.0, USA) ve SPSS (Version 21.0. Armonk, NY:IBM Corp) programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 12. BULGULAR

### 12.1. Hücre Hatlarında ve Kontrollerde *CRLF2* Anlatımı

Lenfoblastik lösemi hücre hatlarında *CRLF2* gen anlatım düzeyi karşılaştırılması yapıldığında B-ALL hücrelerinde daha yüksek gen anlatım düzeyleri saptanmıştır. B-ALL hücre hatlarında özellikle REH1/10 ve 8442 RPMI' da *CRLF2* gen anlatım düzeyi diğer hücre hatlarına kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. T-ALL hücre hatları kendi aralarında kıyaslandığında en çok CEM hücre hattında anlatıma girdiği görülmüştür. Lenfoblastik lösemi hücre hatlarında *CRLF2* gen anlatımının büyükten küçüğe doğru sıralaması;

REH1/10>8442-RPMI>CEM>FLEB>K-562>NALM6>MOLT4 şeklindedir (Şekil 13).



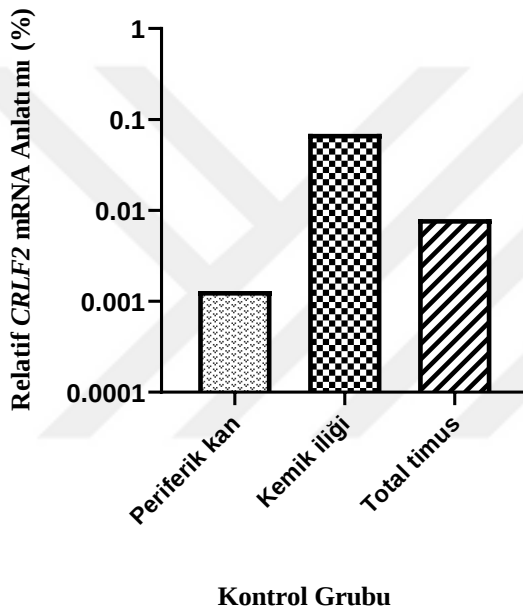
**Şekil 13:** Lenfoblastik lösemi hücre hatlarında relatif *CRLF2* gen anlatım düzeyleri

**B-ALL hücre hattı:** REH1/10, 8442-RPMI, FLEB, NALM6

**T-ALL hücre hattı:** CEM, MOLT4

**Myeloid seri hücre hattı:** K-562

Sağlıklı kontrol grubunda periferik kan, kemik iliği, total timus kullanılmıştır. Kontrollerde *CRLF2* gen anlatım düzeyi karşılaştırılması yapıldığında; en yüksek kemik iliğinde anlatıma girdiği sonrasında total timusta olduğu görülmüştür. Periferik kanda ise bu düzeyin en düşük olduğu görülmüştür. *CRLF2* gen anlatımının büyükten küçüğe doğru sıralaması; KEMİK İLİĞİ> TOTAL TİMUS>PERİFERİK KAN şeklindedir (Şekil 14).

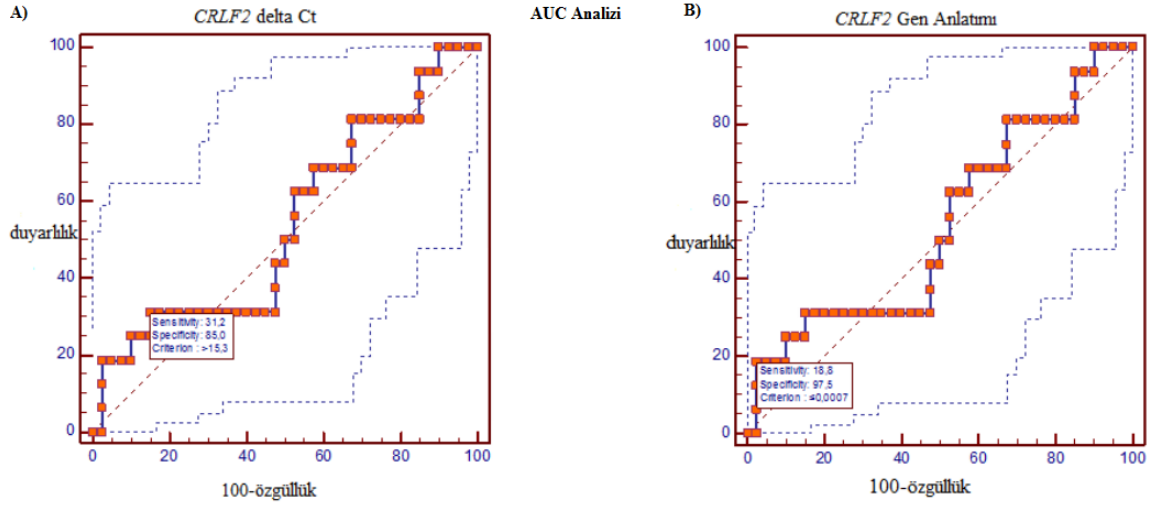


**Şekil 14:** Kontrol grubunda relatif *CRLF2* gen anlatım düzeyleri

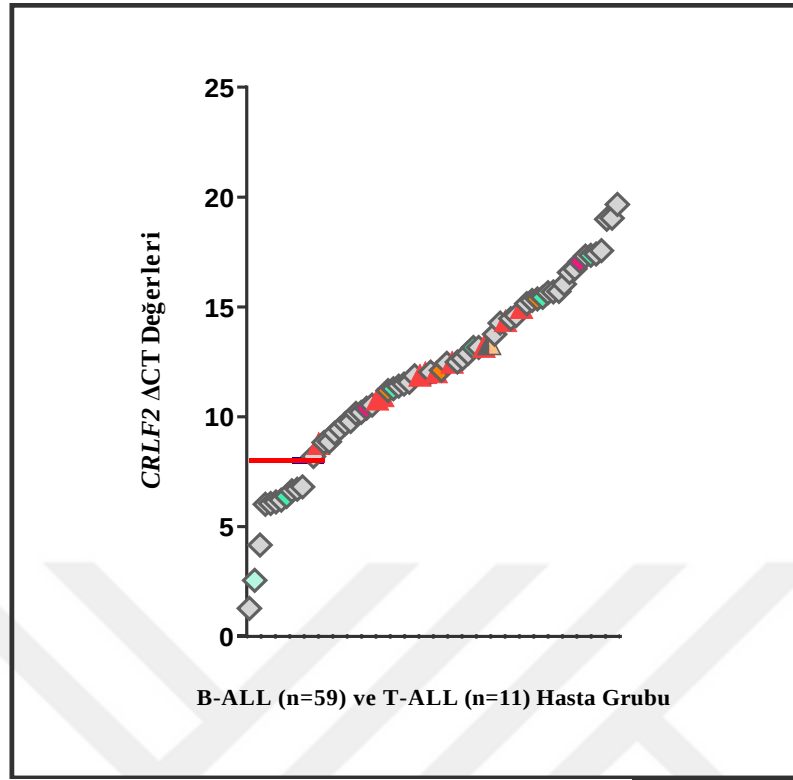
### 12.2. Hastalarda *CRLF2* Anlatımları

Eşik değeri (cut-off value) belirlemek için uygulanan yöntemlerden biri olan AUC analizi sonucuna göre; AUC değeri=0.541, P değeri=0.649 olarak bulundu (Şekil 15). AUC analizine göre hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir kırılım değeri saptanmamıştır. Aynı hasta grubunda, daha fazla örnekle yapılan Chen IM. ve ark ile Chiaretti S. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda *CRLF2*  $\Delta Ct$  değeri  $\Delta Ct=8.08$  ve  $\Delta Ct=8$  olarak belirlenmiştir. (65, 66). Bu çalışmalara paralel olarak, *CRLF2* yeniden düzenlenmelerine sahip hastalarımız eşik değer olarak alındığında, kohortumuzda  $\Delta Ct=8.02$  olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda, *CRLF2* varyasyonu

taşıyan örneklerin gen anlatım değerlerini referans alarak, diğer çalışmalar ile benzer eşik değerini kullandık.



Şekil 15: AUC analizi.



Gri karo: B-ALL  
 Pembe: *BCR/ABL1*  
 Turuncu: *MLL/AF4*  
 Yeşil: *TEL/AML1*

Turuncu üçgen: T-ALL  
 Gri-Turuncu üçgen: *E2A/PBX*

**Şekil 16:**  $\Delta$ CT değerleri ile *CRLF2* gen anlatım seviyelerinin heterojen dağılımı

Şekil 16'daki gösterilen grafikte B-ALL ve T-ALL hasta grubunun (n=70) *CRLF2*  $\Delta$ Ct düzeylerinin oldukça heterojen şekilde dağıldığı gözlenmiştir.  $\Delta$ ct<8 düşük Ct değerleri ile yüksek ("overexpresse") *CRLF2* gen anlatımını,  $\Delta$ ct $\geq$ 8 ise yüksek Ct değerleri ile normal *CRLF2* anlatımını temsil etmektedir. Fenotipik alt gruplar pro-B ALL (n=9), pre-B ALL (n=12), common-B ALL (n=38) ve T-ALL (n=11) şeklindedir.

★ WT (wild type)

**Hom**:homozigot

**Het**:heterozigot

**Dup**:duplikasyon

**Del**:delesyon

**Gri karo**: B-ALL

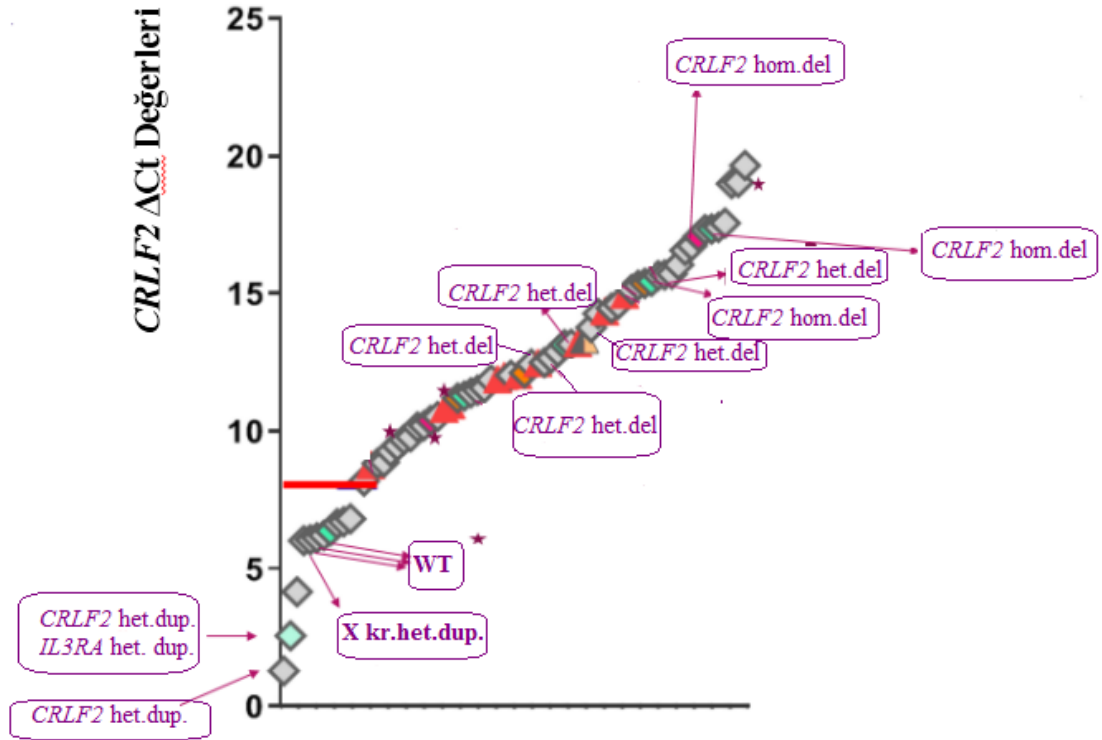
**Pembe**: *BCR/ABL1*

**Turuncu**: *MLL/AF4*

**Yeşil**: *TEL/AML1*

**Turuncu üçgen**: T-ALL

**Gri-Turuncu üçgen**: *E2A/PBX*

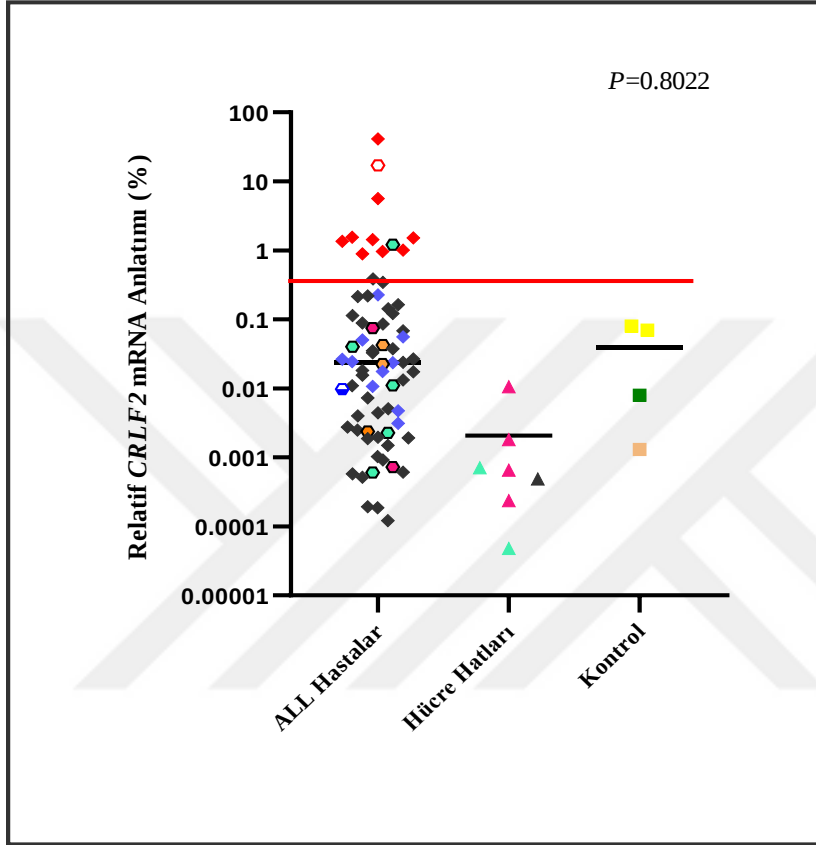


**Şekil 17:** *CRLF2* varyasyonları.

**Het del:** Heterozigot delesyon, **Het dup:** Heterozigot duplikasyon, **Hom del:** Homozigot delesyon, **Hom dup:** Homozigot duplikasyon, **WT:** wild type

*CRLF2* delta Ct değerleri ile oluşturulan grafikte, önceki çalışmalarımızda saptadığımız, *CRLF2* varyasyon bilgileri gösterilmektedir (Şekil 17). MLPA analizleri sonuçlarına göre artmış *CRLF2* mRNA anlatımına sahip iki hastada *CRLF2* heterozigot duplikasyonu gözlenmiştir. Bu iki hastadan bir tanesine *IL3RA* heterozigot duplikasyonu eşlik etmiş olup başka bir hastada ise X kromozomunda heterozigot duplikasyonu gözlenmiştir. Üç hasta wild type olup diğer hastaların varyasyon bilgilerine ulaşamamıştır. Normal *CRLF2* mRNA anlatımına sahip hastaların

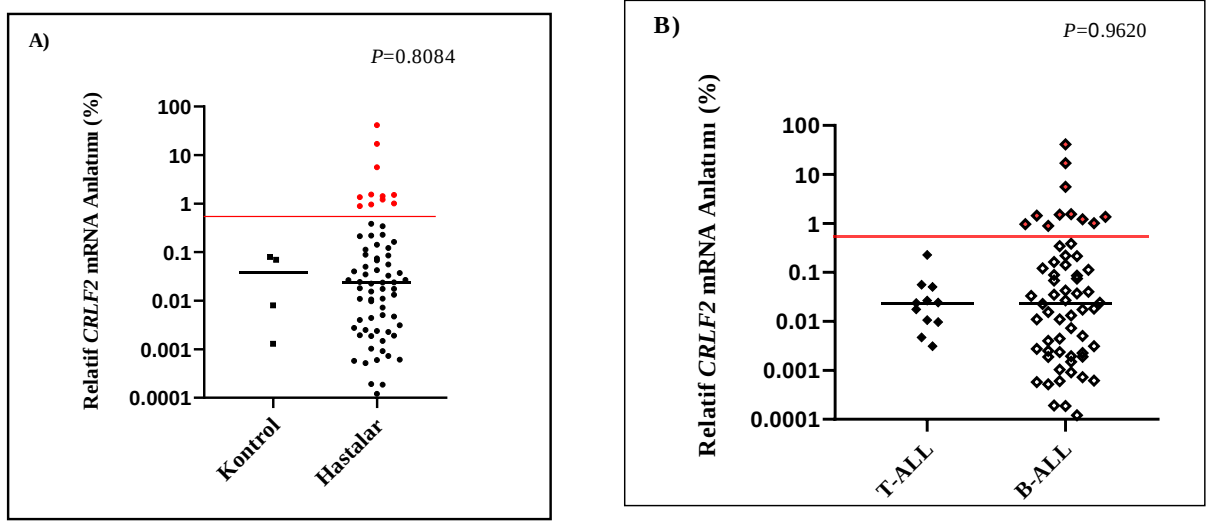
bazılarında *CRLF2* homozigot delesyon bazılarında ise heterozigot delesyon olduğu görülmüştür. Örneğin karo pembe renk, B-ALL grubu *BCR-ABL1* translokasyonu taşıyan bir hastayı temsil etmekte ve MLPA analizi sonucuna göre bu hastada *CRLF2* homozigot delesyon saptandığı gösterilmiştir.



**Şekil 18:** T-ALL (n=11) B-ALL (n=59) hastalarında, hücre hatlarında ve kontrol grubunda *CRLF2* mRNA anlatımı.

B-ALL yüksek *CRLF2* anlatımı (kırmızı karo), B-ALL normal *CRLF2* anlatımı (siyah karo), T-ALL normal *CRLF2* anlatımı (mavi karo), B-ALL *BCR-ABL* pozitif (pembe altıgen), B-ALL *TEL-AML* pozitif (yeşil altıgen), B-ALL *MLL-AF4B* pozitif (turuncu altıgen), T-ALL *E2A/PBX* pozitif (mavi-beyaz altıgen), B-ALL hücre hattı (pembe üçgen), T-ALL hücre hattı (yeşil üçgen), KML hücre hattı (siyah üçgen), Kİ (sarı kare), T. Timus (koyu yeşil kare), PK (açık kahve kare)

Eşik değer olarak  $\Delta\text{ct}$ :8.02 ve  $2^{-\Delta\text{ct}}$  %: 0.385 alındığında yüksek *CRLF2* gen anlatımına sahip hasta sayısı 11'dir (%15) (Şekil 18).



**Şekil 19:** A) Sağlıklı kontrol grubu ile total ALL hastalarının ve B) T-ALL ve B-ALL hastalarının *CRLF2* anlatımı

T-ALL hastaları  $\Delta ct \leq 8.02$  yani eşik çizgisinin altında kalarak normal *CRLF2* gen anlatımına, B-ALL hastalarından 11 tanesi eşik çizgisinin üzerinde kalarak yüksek *CRLF2* gen anlatımına sahip olduğu görülmüştür.

### 12.3. Yüksek *CRLF2* Anlatımı Gösteren Hastalarda Klinik Özellikler

ALL hastalarının %15'inde yüksek *CRLF2* mRNA anlatımı (overekspresyon) saptanmıştır. Tablo 9' da yüksek *CRLF2* gen anlatımı gösteren hastaların klinik özellikleri incelendiğinde E:K=0.83 ve medyan yaş değeri 4'tür (min: 2yıl maks:15 yıl). Hastaların hepsi B-ALL grubunda olup 9'u common-B ALL, 2'si pre-B ALL fenotipik özelliktedir. Bir hastada *TEL/AML1* translokasyonu farklı bir hastanın trizomi 4 kromozomal anomali olduğu görülmüştür. Bazı hastaların nüks, takip ve 33.gün yanıt gibi klinik verilerinin eksik olması nedeniyle kesin yorum yapılamadı ancak eldeki veriler ile değerlendirildiğinde hastaların çoğunluğunda nüks gözlenmediği, büyük çoğunluğunun son kontrol döneminde sağ olması ve 33.gün kemoterapiye yanıtın var olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda BFM protokolüne uygun Tablo 10'da yüksek *CRLF2* ile normal *CRLF2* grubunun karşılaştırması Fisher's exact test ile yapılmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

**Tablo 9:** Y-CRLF2 gen anlatımına sahip hastaların klinik özellikleri.

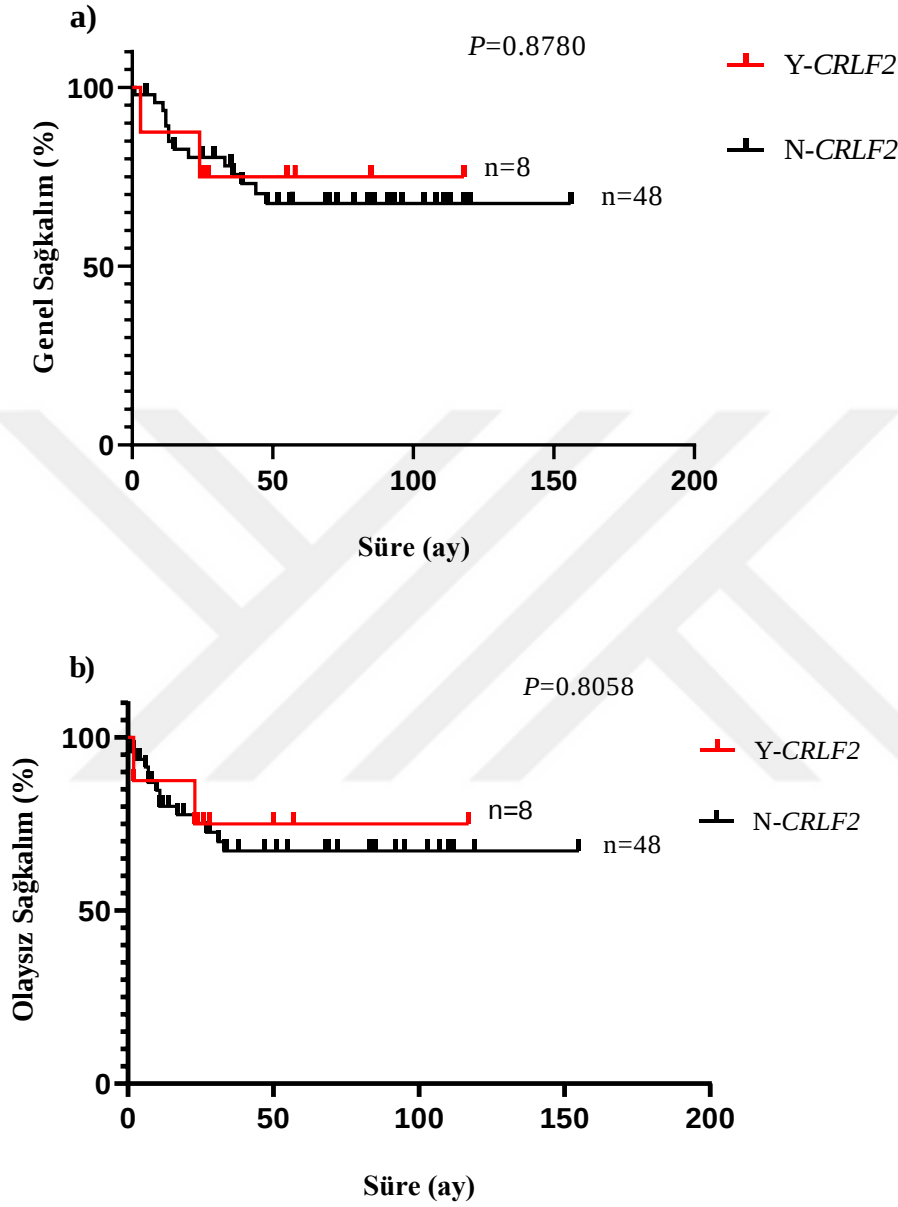
| Hasta No | Yaş | K/E | Fenotip  | Nüks | Takip | 33.gün yanıt | Translokasyon | Organ       | BK    |
|----------|-----|-----|----------|------|-------|--------------|---------------|-------------|-------|
| B-ALL 1  | 12  | K   | Pre-b    | yok  | sağ   | var          | yok           | yok         | 11960 |
| B-ALL 2  | 10  | K   | Common-b | yok  | sağ   | yok          | Trizomi 4     | SP, HP      | 59700 |
| B-ALL 3  | 5   | E   | Common-b | var  | sağ   | var          | yok           | LAP         | 56100 |
| B-ALL 4  | 2   | E   | Common-b | yok  | sağ   | var          | yok           | LAP, SP, HP | 82500 |
| B-ALL 5  | 4   | E   | Common-b | var  | ölü   | yok          | yok           | yok         | 10200 |
| B-ALL 6  | 3   | K   | Common-b | yok  | sağ   | var          | TEL/AML1      | yok         | 30000 |
| B-ALL 7  | 4   | E   | Pre-b    | yok  | sağ   | var          | yok           | yok         | 29800 |
| B-ALL 8  | 2,5 | K   | Common-b | yok  | sağ   | -            | yok           | LAP, SP, HP | 26550 |
| B-ALL 9  | 2   | K   | Common-b | -    | -     | -            | yok           | yok         | 2400  |
| B-ALL 10 | 15  | E   | Common-b | -    | -     | -            | yok           | LAP         | 2300  |
| B-ALL 11 | 2   | K   | Common-b | yok  | ölü   | var          | yok           | LAP, SP, HP | 39300 |

**K:** Kız, **E:** Erkek, **LAP:** Lenfadenopati, **SP:** Splenomegali, **HP:** Hepatomegali, **BK:** Beyaz küre

**Tablo 10:** *CRLF2* yapısal varyasyonlarına göre belirlenen eşik değer analizler

| Klinik Özellikler                                               | Y- <i>CRLF2</i> n:11 | N- <i>CRLF2</i> n:59 | P değeri  |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------|
| Yaş (0-6 vs 6-18) n (%)                                         | 8 (73) vs 3 (27)     | 32 (54) vs 27 (46)   | 0,3305    |
| Cinsiyet (Erkek vs Kız) n (%)                                   | 5 (45) vs 6 (55)     | 38 (64) vs 21 (36)   | 0,3152    |
| Lökosit ( $\times 10^9/L$ )<br>( $>50.000$ vs $<50.000$ ) n (%) | 3 (27) vs 8 (73)     | 17 (30) vs 40 (70)   | $>0,9999$ |
| Hemoglobin (dL)<br>( $>5$ vs $<5$ ) n (%)                       | 5 (100) vs -         | 28 (76) vs 9 (24)    | 0,0550    |
| Nüks n (%)                                                      |                      |                      | 0,7044    |
| Var                                                             | 2 (22)               | 18 (35)              |           |
| Yok                                                             | 7 (78)               | 34 (65)              |           |
| Son durum n (%)                                                 |                      |                      | $>0,9999$ |
| Sağ                                                             | 7 (78)               | 37 (71)              |           |
| Ölü                                                             | 2 (22)               | 15 (29)              |           |
| Risk Grubu n(%)                                                 |                      |                      | 0,3426    |
| Yüksek Risk Grup                                                | 3 (50)               | 12 (27)              |           |
| Standart Risk Grup                                              | 3 (50)               | 33 (73)              |           |
| 33. gün kemoterapi yanıtı n (%)                                 |                      |                      | 0,1886    |
| Var                                                             | 6 (75)               | 46 (92)              |           |
| Yok                                                             | 2 (25)               | 4 (8)                |           |
| Translokasyon n (%)                                             |                      |                      | $>0,9999$ |
| Var                                                             | 1 (9)                | 10 (17)              |           |
| Yok                                                             | 10 (91)              | 49 (83)              |           |
| Lenfadenopati n (%)                                             |                      |                      | 0,2635    |
| Var                                                             | 5 (50)               | 15 (25)              |           |
| Yok                                                             | 5 (50)               | 39 (75)              |           |
| Diğer organ tutulumları n (%)                                   |                      |                      | 0,7041    |
| Var                                                             | 4 (36)               | 29 (53)              |           |
| Yok                                                             | 4 (36)               | 19 (35)              |           |

#### 12.4. Sağkalım Analizi



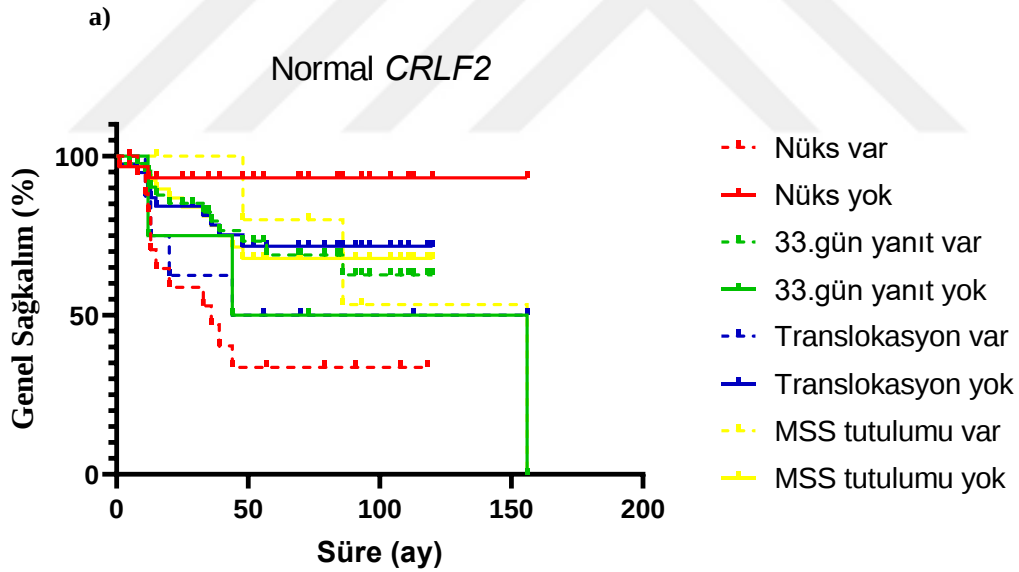
**Şekil 20:** Y-CRLF2 ve N-CRLF2 gen anlatımı gösteren hastalarda **a)** Genel sağkalım, **b)** Olaysız sağkalım grafikleri.

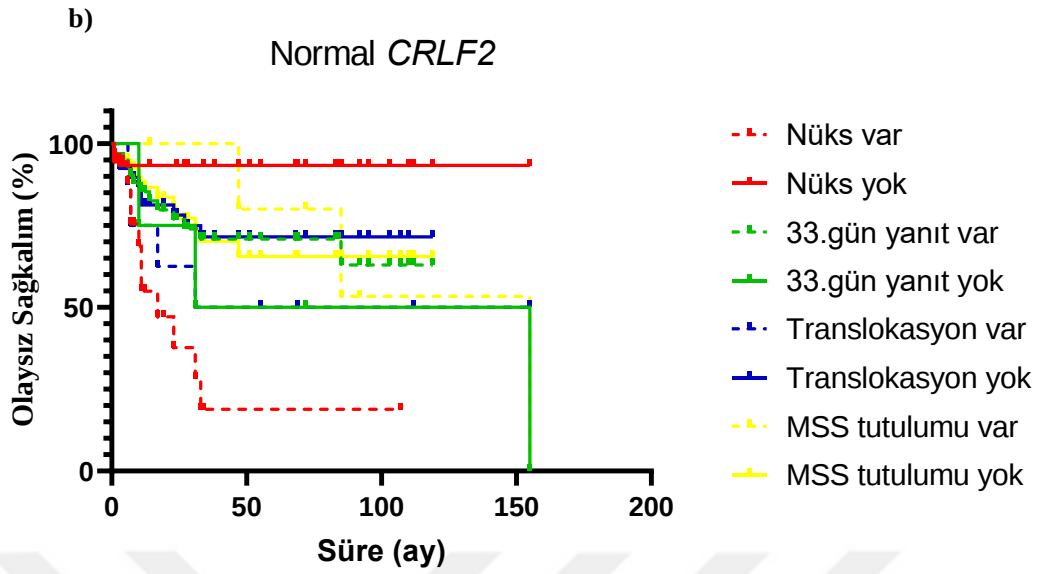
Sağkalım analizleri Kaplan-Maier yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Hastaların sağ/ölü bilgilerini baz alıp, genel sağkalım (GS) ve olaysız sağkalım (OS) sürelerini (ay) girerek grafikler oluşturuldu. GS, hasta bireyin tanı aldığı zaman ile vefat

tarihine veya son kontrol edildiği tarihe kadar geçen süreyi temsil etmektedir. OS, hasta bireyin remisyon tarihinden nüks etme tarihine veya nüks gerçekleşmeden son kontrol tarihleri arasındaki geçen süreyi temsil etmektedir.

Sağkalım analizi sonucunda elde edilen verilere göre; Log-rank (Mantel-Cox) test kullanılarak **a)** Genel sağkalım P= değeri 0.88 **b)** Olaysız sağkalım P=0.81 olarak bulundu. Cox analizi, son durum yani sağ (0) ve ölü (1) bilgilerine bağlı olarak yapılmıştır. Her iki sağkalım analizi için anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (Şekil 20).

Ek olarak medyan değerinin (median:0,023) üzerindeki ve altındaki karşılaştırarak, son durum (sağ/ölü) verilerinin baz alındığı Log-rank (Mantel-Cox) testi yapılmıştır. Genel sağkalım P=0.86, Olaysız sağkalım P=0.80 olarak bulunmuştur.





**Şekil 21:** *CRLF2* (negatif), Nüks, 33. gün yanıtı, translokasyon ve MSS tutulumu Cox analizi.

Tanı döneminde prognostik değeri olan 33. Günü yanıtı, translokasyon varlığı, MSS tutulumu kriterleri ile birlikte *CRLF2* anlatımı için Cox regresyon analizi yapıldığında anlamlı bir model oluşmamıştır (Genel sağkalım  $p=0,358$  Olaysız sağkalım  $p=0,211$ ) (Tablo 11). Normal *CRLF2* anlatımı gösteren hastaların prognostik kriterlere göre sağkalım eğrileri Şekil 21 de gösterilmiştir. Artmış *CRLF2* anlatımı gösteren örnek sayısı az olduğu için hastaların sağkalım eğrileri grafiksel olarak gösterilmemiştir.

**Tablo 11:** Yaşam Analizleri Multivariate Cox Regresyon Analizi

|                | Genel Sağkalım | Olaysız Sağkalım |
|----------------|----------------|------------------|
| Değişken       | P Değeri       | P Değeri         |
| <i>CRLF2</i>   | 0.74           | 0.55             |
| Translokasyon  | 0.88           | 0.93             |
| 33. gün yanıtı | 0.11           | 0.06             |
| MSS tutulumu   | 0.45           | 0.60             |

BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) protokolüne göre Tablo 6'da var olan tüm klinik parametrelerin analizleri yapılmış olup  $P$  değerleri sırasıyla; yaş=0.06 cinsiyet=0.08 tanı lökosit=0.26 translokasyon=0.97 son durum=0.81 organ

tutulumu=0.70 organ infiltrasyonu=0.11 fenotip=0.33 nüks=0.73 risk grup=0.95 33.gün yanıt=0.91 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı görülmüştür.

Ayrıca hasta grubumuz medyan altı ve üstü anlatım değerleri ve klinik özelliklerine göre de analiz edilmiştir (Tablo 12). Hastalarda medyan *CRLF2* gen anlatım ( $2^{-\Delta C_t}$ ) değeri 0.024 olarak belirlenmiştir. Analiz sonucuna göre istatistiksel açıdan anlamlı kırılgınlığın olmadığı tespit edilmiştir.

**Tablo 12:** Medyan değere göre klinik analizler

| Klinik Özellikler                                               | Medyan üstü - <i>CRLF2</i><br>n:34 | Medyan altı - <i>CRLF2</i><br>n: 36 | P değeri  |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------|
| Yaş (0-6 vs 6-18) n (%)                                         | 22 (65) vs 12 (35)                 | 17 (47) vs 19 (53)                  | 0,1574    |
| Cinsiyet (Erkek vs Kız) n (%)                                   | 16 (47) vs 18 (53)                 | 25 (69) vs 11 (31)                  | 0,0888    |
| Lökosit ( $\times 10^9/L$ )<br>( $>50.000$ vs $<50.000$ ) n (%) | 8 (24) vs 26 (76)                  | 12 (35) vs 22 (65)                  | 0,4354    |
| Hemoglobin (dL)<br>( $>5$ vs $<5$ ) n (%)                       | 16 (89) vs 2 (11)                  | 18 (75) vs 6 (25)                   | 0,4307    |
| Nüks n (%)                                                      |                                    |                                     | $>0,9999$ |
| Var                                                             | 10 (34)                            | 11 (33)                             |           |
| Yok                                                             | 19 (66)                            | 22 (67)                             |           |
| Son durum n (%)                                                 |                                    |                                     | 0,7757    |
| Sağ                                                             | 20 (69)                            | 24 (75)                             |           |
| Ölü                                                             | 9 (31)                             | 8 (25)                              |           |
| Risk Grubu n (%)                                                |                                    |                                     | 0,7563    |
| Yüksek Risk Grup                                                | 6 (28)                             | 9 (35)                              |           |
| Standart Risk Grup                                              | 16 (72)                            | 17 (65)                             |           |
| 33. gün kemoterapi yanıtı n (%)                                 |                                    |                                     | $>0,9999$ |
| Var                                                             | 25 (89)                            | 27 (90)                             |           |
| Yok                                                             | 3 (11)                             | 3 (10)                              |           |
| Translokasyon n (%)                                             |                                    |                                     | 0,5152    |
| Var                                                             | 4 (12)                             | 7 (19)                              |           |
| Yok                                                             | 30 (88)                            | 29 (81)                             |           |
| Lenfadenopati n (%)                                             |                                    |                                     | 0,4254    |
| Var                                                             | 12 (35)                            | 8 (30)                              |           |
| Yok                                                             | 21 (65)                            | 23 (70)                             |           |
| Diğer organ tutulumları n (%)                                   |                                    |                                     | 0,1741    |
| Var                                                             | 13 (41)                            | 20 (63)                             |           |
| Yok                                                             | 14 (44)                            | 9 (28)                              |           |

### 13. TARTIŞMA

ALL’de tedavi seçimi ve risk grubunun belirlenmesi, sonradan kazanılmış genetik bozukluklara, yaşa, cinsiyete, lökosit sayılarına ve minimal düzeyde hastalık takibine göre yapılmaktadır. Günümüzde geliştirilen tedaviler neticesinde ALL’de özellikle pediatrik hastalarda sağkalım oranlarının yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu yüksek tedavi başarısı çoklu kemoterapi protokolleri, minimal kalıntı hastalık takibi, hastalığın genomik profilinin daha net anlaşılması ve risk grubunun daha doğru belirlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Fakat tüm gelişmelere karşın hastaların yaklaşık %15-20’inde hastalığın tekrar nüks etmesi durumu ALL kaynaklı ölümlerin en büyük nedenini oluşturmaktadır. Bu sebep ile yüksek nüks riski taşıyan hastaların erken dönemde tespit edilmesi ve böyle hastalara yönelik daha yenilikçi tedavi protokollerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Öte yandan ALL oluşumunu tetikleyen, erken tanı ve uygulanacak tedavinin belirlenebilmesi için prognostik öneme sahip yeni biyobelirteçler *ETV6-RUNX1*-benzeri, *BCR-ABL1*-benzeri, *IKZF1-N159Y*, *ZNF384*, *ZNF384*-benzeri, *CRLF2*, *BCR-ABL1*-benzeri olmayan *CRLF2*, *PAX5* tanımlanmaktadır. Tüm transkriptom profilleri ve bazı tekrarlayan genetik değişiklikler baz alınarak belirlenen ve yüksek risk grubuna giren *BCR-ABL1*-benzeri yeni alt grubu B-ALL hastalarının yaklaşık %15-20’sini oluşturmakta ve bu hastaların kötü prognoz gösterdiği görülmektedir. Bu grup hastada tirozin kinaz ile sitokin reseptör aktivasyonunu harekete geçirecek bazı genetik varyasyonlar (*JAK2*, *EPOR*, *IGH-CRLF2*, *P2RY8-CRLF2* füzyonları, *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *IL7R* mutasyonları ve *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R* ve *PDGFRB* füzyonlarıdır) bulunmaktadır (10, 20, 25-28, 37, 68, 69).

Bu tez çalışmasında, pediatrik ALL hastalarının tanı zamanı örneklerinde, kontrollerde ve ALL hücre hatlarında *CRLF2* gen anlatım seviyelerinin tespit edilerek hastaların klinik özellikleri ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, pediatrik B-ALL (n=59) ve T-ALL(n=11) hastalarının %15’inde (n=11) yüksek *CRLF2* gen anlatımı saptanmıştır. Literatürde yapılmış önceki çalışmalarda yetişkin ve/veya pediatrik ALL olgularında çok değişken oranlar (%7-%61) bildirilmiş olup tespit ettiğimiz %15’lik oran bu bulgular ile uyumludur (38, 57, 62, 65, 67, 70, 71, 73, 74). Yapılan çalışmalar pediatrik ve yetişkin hastalarda *CRLF2* genin artmış anlatım

oranlarının hemen hemen aynı düzeylerde olduğunu göstermektedir. Ancak *CRLF2* geninin katıldığı füzyon genler nedeniyle hastalar arasında gen anlatım düzeylerinde değişkenlik gözlenmektedir. Adolesan ve yetişkin ALL hastalarında daha sık *IGH-CRLF2* translokasyonu gözlenirken, daha küçük yaştaki pediatrik hastalarda *P2RY8-CRLF2* füzyonunun gözleendiği bildirilmiştir. Pediatrik ve yetişkin Ph-benzeri ALL hastaların yaklaşık yarısında *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri bildirilmiştir. Ph-benzeri ALL grubunda *CRLF2* genin artmış anlatımları daha sık gözlenmektedir. Çalışmamızda saptadığımız aşırı anlatım gösteren 11 hastanın Ph-benzeri hasta grubunda yer alıp almadığının devam eden çalışmalarla ortaya çıkartılması amaçlanmaktadır.

Mevcut çalışmalarda belirlenen *CRLF2* gen anlatım düzeylerinde büyük farklılıkların temel nedeni eşik değer belirleme yaklaşımlarıdır. Bu çalışmada *CRLF2* anlatım seviyelerini değerlendirmek amacıyla iki yaklaşım denenmiştir; AUC analizi ve *CRLF2* füzyon varlığına gen anlatım düzeyleri. Literatürde, *CRLF2* ile ilgili çalışmalarda eşik değeri belirlemek için birden fazla yöntemin kullanıldığı görülmüştür. Chen ve ark. 1061 pediatrik B-ALL hastasında, Chiaretti ve ark. 102 yetişkin B-ALL hastasında *CRLF2*  $\Delta Ct$  değerleri ve *CRLF2* varyasyonlarını da baz alarak eşik değeri belirlemişlerdir ( $\Delta Ct=8.08$  ve  $\Delta Ct=8$ ) (65, 66). Cui ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada eşik değeri belirlemek için *CRLF2* gen anlatım değerlerini kullanarak AUC analizi yapılmış, AUC=0.701 duyarlılık (sensitivity) %80 ve özgüllük (specificity) %65.2 olarak bulunmuş ve buna bağlı olarak eşik değerini belirlemişlerdir (67). Yano ve ark. ile Dou ve ark. (10 kat) ve Schmeh ve ark. (5 kat) artmış *CRLF2* anlatımına ait eşik değeri medyana göre belirlemişlerdir (70-72). Mullighan ve ark ve diğer bazı gruplar ise *CRLF2* yeniden yapılanmaları baz alarak eşik değeri ( $\Delta Ct \leq 6$ ) belirlemişlerdir (57, 62, 75). Çalışmamızda eşik değeri belirlemek için ilk olarak *CRLF2*  $\Delta Ct$  ve gen anlatım(%) değerlerini kullanarak AUC analizi gerçekleştirdik ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuca ulaşamadık. AUC analizi sonuçlarımızın Chen ve ark. ile Chiaretti ve arkadaşlarının bulgularına uyumlu olduğu ve hasta sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel anlamlılığa ulaşılmamıştır. Bu iki yayını referans alarak hastalarımızın *CRLF2*  $\Delta Ct$  verileri ve *CRLF2* füzyonu olan hastaları gen anlatım düzeylerini kullanarak eşik Ct değeri 8.02 olarak alınmıştır. Yüksek *CRLF2* mRNA anlatımına giren hastalarda yüksek anlatımın hesaplamalara göre yaklaşık 8 kat artmış olduğu görülmüştür.

*CRLF2* geninin anlatıma girdiği dokular; en çok endometrium, dendritik hücreler, apandis, kemik iliği dokularında görülürken orta düzeyde akciğer, ince bağırsak, mide, mesane, böbrek ve daha az olarak karaciğer, lenf nodları, pankreas, retina, timus olarak bilinmektedir. B hücre ve T hücrelerinde ise normal koşullarda yok denecek kadar az anlatıma girdiği bilinmektedir. Kemik iliği ve timus dokusu B ve T hücre oluşumu için önemli anatomik bölgelerdir. Çalışmamızda sağlıklı kontrol olarak kemik iliği, timus dokusu ve periferik kan örnekleri kullanılmıştır. *CRLF2* gen anlatımının sağlıklı hücrelerde en yüksek oranda kemik iliğinde, takiben timus ve en düşük oranda periferik kanda olduğu görülmüştür. Sitokinler ve reseptörleri hücrenin gelişimi, çoğalması ve farklılaşması gibi önemli işlevlerden sorumludur. Dolayısıyla sitokin reseptör genlerinde ve tirozin kinaz sinyal yollarından sorumlu olan genlerde oluşabilecek varyasyonlar sonucu hücre içi işlevlerin olumsuz yönde etkilenmesi kaçınılmazdır. Aynı zamanda *TSLP-CRLF2* sinyalizasyonu B-hücre gelişiminde ve inflamasyonda rol oynadığı bilinmektedir (53, 55, 76).

Çalışmamızda yüksek *CRLF2* gen anlatımı gösteren hastalar klinik parametrelere bakımından da değerlendirilmiş ve *CRLF2* anlatımları ile klinik bulgular arasında herhangi bir prognostik ilişki saptanmamıştır. Artmış anlatım gösteren 11 hastanın çoğu sağ, indüksiyon tedavisine yanıt veren, nüks gözlenmemiş olgulardır. Bunun yanında, Y-*CRLF2* hastalarının %22'sinde nüks gözlemlendiği ve kaybedildiği, yaklaşık %25'inde, indüksiyon tedavi yanıtının olmadığı görülmektedir. Y-*CRLF2* hastaların hepsi pediatrik B-ALL grubunda olup %8'i common-B ALL, %2'si pre-B ALL hastasıdır. Tablo 10'dan anlaşılabileceği üzere eşik değere göre yapılan klinik değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlenmemiştir. Grubumuzun önceki araştırmalarında elde ettiği aynı hasta grubuna ait mutasyon verisi, bu çalışmada elde edilen *CRLF2* gen anlatım düzeyleri ile karşılaştırıldığında yüksek *CRLF2* gen anlatımı gösteren hastalardan ikisinde *CRLF2* heterozigot duplikasyonu ve başka bir hastada da X kromozomunda heterozigot duplikasyon olduğu görülmektedir. Yapılan önceki çalışmalarda Chen ve ark. artmış *CRLF2* gen anlatımının yüksek riskli hastalar ve çok kötü hastalık seyir ile ilişkili olduğunu, Pastorczak ve ark. artmış *CRLF2* gen anlatımı *IKZF1* delesyonuna bağlı gelişmiş ise artmış nüks riski ile ilişkili olduğunu, Schmäh ve ark. artmış *CRLF2* gen anlatımı, *P2RY8/CRLF2* ve *IGH/CRLF2* gen aberasyonlarının pozitif ALL hastalarında kötü prognoza katkıda bulunabileceğini, Mullighan ve ark.

yüksek riskli hasta grubunda *IGH-CRLF2* değişimi bulunanlarda kötü prognoz prevelansının belirgin dercede yüksek olduğunu, Cui ve ark.'da yine artmış *CRLF2* gen anlatımının kötü seyir ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (57, 65, 71, 74, 77).

Genel olarak literatürde yapılan çalışmalar gösteriyor ki artmış *CRLF2* gen anlatımına sahip hastalarda en çok bu genin aberasyonları veya bu genin artışına sebep olacak başka genlerdeki mutasyonlar ve/veya translokasyonların varlığı ile *CRLF2* gen anlatımının artışı hastalarda kötü prognostik etki yaratmakta olup, bu hastalar yüksek risk grubunda yer alan, artmış nüks riskine sahip olup 33. gün tedaviye yanıt vermeyen ve yaşam beklentileri kısalmış olgulardır (38, 60-63, 67, 72, 74, 75). *CRLF2* füzyonu taşıyan iki hastamız da yüksek risk grubunda yer almakta olup bir tanesinde 33. gün yanıt yoktur ve nüks etmiştir. Her iki olgunun da takip süreleri çok uzun değildir (22ay ve 50ay) ve klinikten alınan bilgilere göre son kontrol zamanlarında sağ oldukları anlaşılmaktadır. Yapılan bir çalışmada yüksek *CRLF2* düzeyleri ile hiperlökositoz ( $p=0.0002$ ) ve trombositopeni ( $p=0.005$ ) klinik parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu gösterilmiştir (66). Başka bir çalışmada regresyon analizinde Y-*CRLF2* hastaları ile t(4;11) t(12;21) arasında anlamlı negatif korelasyon saptamışlardır (59). Ensor ve ark. yüksek *CRLF2* anlatımına sahip ALL hastalarında hepatosplenomegali görülme olasılığının daha yüksek olduğunu ve aynı zamanda artmış *CRLF2* anlatımın yaş cinsiyet veya tanı lökosit gibi klinik parametrelerle ilişkili olmadığını çalışmasında bildirmiştir (56). Bizim çalışmamızda da Y-*CRLF2* hastaların %36'sında organ tutulumu görülmektedir. Yoda ve ark.'da artmış *CRLF2* ve azalmış *CRLF2* seviyeleri ile yaş, cinsiyet yada lökosit arasında anlamlı farklılık tespit etmemişler fakat artmış *CRLF2* ile genel sağkalım ve olaysız sağkalımın belirgin şekilde kötü seyrettiğini bildirmişlerdir (50). Çoğu çalışmada *CRLF2* genin aşırı artmış anlatımlarına sahip hastalarda sıklıkla *P2RY8-CRLF2* ve/veya *IGH@-CRLF2* füzyonların görüldüğü bildirilmiştir (50, 59, 60, 72). Harvey ve ark. ise yüksek *CRLF2* anlatımına sahip ALL hastaların kemoterapiye yavaş cevap verdiği ve indüksiyon sonunda hastalarda yüksek oranda MRD gözlemlendiğini tespit etmişlerdir (64). Bununla birlikte birçok çalışmada bizim bulgularımızla uyumlu olarak *CRLF2* gen anlatım düzeylerinin herhangi bir prognostik gösterge olmadığı bildirilmektedir (38, 59, 70, 73).

Sağkalım analizine göre yüksek *CLRF2* (n=8) ve normal *CRLF2* (n=48) gen anlatımı gösteren hastaların genel ve olaysız sağkalımda anlamlı farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Öte yandan *CRLF2* geni ile nüks, MSS tutulumu, *BCR-ABL1* ve/veya *MLL-AF4* translokasyonları ve 33. gün yanıtı gibi kötü risk parametrelerin baz alındığı cox regresyon analizi, *CRLF2* artmış anlatımının diğer kötü prognostik parametrelere göre konumunu bize göstermektedir. Yano ve ark. yaptığı 167 hastayı içeren çalışmada, yüksek *CRLF2* ile total ve 5 yıllık sağ kalım arasında değerlendirme yaptıklarında anlamlı bir ilişkinin olmadığını saptamışlar. Roberts ve ark. yaptığı 798 hastayı içeren çalışmada da *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri ile diğer genetik değişiklikler arasında genel sağkalım ve 5 yıllık survi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı bildirilmiştir. Farklı olarak Jain ve ark. yüksek *CRLF2* anlatımının yetişkinlerde uzun dönem sağ kalımda kötü prognostik bir belirteç olduğunu göstermişlerdir (38, 62, 70). Çalışmamızın tamamı değerlendirildiğinde özellikle *BCR-ABL1* ve *MLL-AF4B* onkogeni taşıyan, nüks gözlenen bununla birlikte *CRLF2* ve/veya diğer genlerde saptanan mutasyonları taşıyan hastaların sağ olmadığı, böylelikle diğer genlerdeki anomalilerle birlikte *CRLF2* gen anlatımlarının pediatrik ALL hastalarında kötü manada prognostik etkisinin olabileceği yorumu yapılabilir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla;

1. Pediatrik ALL’de prognostik moleküler belirteç olarak öngörülen *CRLF2* geni aşırı artmış anlatım düzeyleri kantitatif PZR ile tespit edilmiştir. Hastaların %15’inde literatür ile uyumlu olarak çok yüksek *CRLF2* gen anlatımı saptanmıştır.

2. Artmış gen anlatımına (“overexpression”) dayalı araştırmalarda eşik değer belirlenmesine dair seçenekler irdelenmiş ve sonraki çalışmalar için yaklaşımlar ortaya konmuştur.

3. Çalışmanın daha geniş hasta grubu ile gerçekleşmiş olması ve aynı zamanda hastalara ait klinik bilgilerin tamamına ulaşılması, yapılacak analizleri ve yorumlamayı önemli derecede değiştireceği görülmüştür. Çünkü hastaların bazı klinik bilgilerinin eksik olması hem analizleri hemde yorumlamayı olumsuz yönde etkilemiş ve özellikle çalışmaya dahil edilen T-ALL (11) hasta sayısının çok az olması bu gruba yönelik yapılacak açıklamaları kısıtladığı görülmüştür. Bununla birlikte *Y-CRLF2* mRNA anlatımlarına sahip hastaların (11) çoğunluğunun sağ olarak bilinmesi, bu hastalara

takibin en son ne zaman yapıldığı ya da bu hastalar uzun süreli takip altında mı sorusunu düşündürmüştür.

4. Ph-benzeri olguların tanımlanması zordur, sonraki çalışamalar *Y-CRLF2* saptanan olguların bu alt gruba dahil olup olmadığını bize gösterecektir. (devam eden bir diğer doktora tez çalışması)

5. Bu çalışmada her ne kadar *Y-CRLF2* saptanan olgularda klinik olarak anlamlı ve prognostik farklılıklar saptanmasa da Ph-benzeri hastaların seçiliminde *Y-CRLF2* olguların belirlenmesi önemlidir. Ayrıca *Y-CRLF2* hastalar JAK inhibitörleri ile tedaviye aday hastalardır.



#### 14. KAYNAKLAR

1. Biondi A, Masera G. Molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1998;83(7):651-9. PubMed PMID: 9718871.
2. Pui C-H. Childhood leukemias. 2nd ed. ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.
3. Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol*. 2001;112(2):282-92. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02411.x. PubMed PMID: 11167820.
4. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51. Epub 2009/04/08. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262. PubMed PMID: 19357394.
5. Arceci R, Hann IM, Smith OP. *Pediatric hematology*. 3rd ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub.; 2006. xiii, 826 p. p.
6. McKenna RW. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1252-9. PubMed PMID: 10926919.
7. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354(2):166-78. doi: 10.1056/NEJMra052603. PubMed PMID: 16407512.
8. Lanzkowsky P. *Manual of pediatric hematology and oncology*. 5th ed. ed. Amsterdam ; London: Academic Press; 2011.
9. Huo FF, Liu X, Sun ZM, Zhu WB, Zheng CC, Wang J, et al. [Study on cytogenetic changes with relation to FAB classification in 397 patients with acute leukemias]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011;19(1):6-10. PubMed PMID: 21362211.
10. Rabin KR GM, Margolin JF, Poplack DG. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia2015.
11. Silverman BL SS. *Hematology of infancy and childhood*. Philadelphia2003.
12. Korsmeyer SJ, Arnold A, Bakhshi A, Ravetch JV, Siebenlist U, Hieter PA, et al. Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. *J Clin Invest*. 1983;71(2):301-13. doi: 10.1172/jci110770. PubMed PMID: 6401769; PubMed Central PMCID: PMC436868.
13. Manera R, Ramirez I, Mullins J, Pinkel D. Pilot studies of species-specific chemotherapy of childhood acute lymphoblastic leukemia using genotype and immunophenotype. *Leukemia*. 2000;14(8):1354-61. doi: 10.1038/sj.leu.2401835. PubMed PMID: 10942229.
14. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10):1783-6. PubMed PMID: 7564526.
15. Margolin JF SCaPD. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*:. Philadelphia2002.
16. Neimenger CM, Sallan, S.E. *Acute Lymphoblastic Leukemia, Hemathology of infancy and childhood*. Philedelphia: W.B. Saunders; 1993.

17. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):71. Epub 2013/06/18. doi: 10.1186/scrt222. PubMed PMID: 23796405; PubMed Central PMCID: PMC3706875.
18. Thompson MW, Willard HF. *Genetics in Medicine* . . Philadelphia: WB Saunders Company; 1991.
19. Lopez CK, Malinge S, Gaudry M, Bernard OA, Mercher T. Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia: Multitasking Fusion Proteins and Oncogenic Cooperations. *Trends Cancer.* 2017;3(9):631-42. Epub 2017/08/18. doi: 10.1016/j.trecan.2017.07.003. PubMed PMID: 28867167.
20. Hammer GD, McPhee SJ. *Pathophysiology of disease : an introduction to clinical medicine.* Eighth Edition ed. New York: McGraw-Hill Education; 2019. xiv, 814 pages p.
21. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(5):502-11. doi: 10.1056/NEJMra072367. PubMed PMID: 18234754.
22. Kumar A, Fausto Aster. *Pathologic Basis of Diseases.* Sounders; 2010.
23. Vogelstein B, Kinzler TW. *The Genetic Basis of Human Cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002.
24. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(5):361-70. doi: 10.1038/nrc1360. PubMed PMID: 15122207.
25. Parikh NI, Vasan RS. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. *Biomark Med.* 2007;1(3):419-36. doi: 10.2217/17520363.1.3.419. PubMed PMID: 20477384.
26. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):463-6. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177. PubMed PMID: 20978388; PubMed Central PMCID: PMC3078627.
27. Kimura S, Mullighan CG. Molecular markers in ALL: Clinical implications. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2020;33(3):101193. Epub 2020/06/07. doi: 10.1016/j.beha.2020.101193. PubMed PMID: 33038982; PubMed Central PMCID: PMC7548398.
28. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2020;105(11):2524-39. Epub 2020/11/01. doi: 10.3324/haematol.2020.247031. PubMed PMID: 33054110; PubMed Central PMCID: PMC7604619.
29. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Clinical and biological importance of cytogenetic abnormalities in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Ann Med.* 2004;36(7):492-503. doi: 10.1080/07853890410018808. PubMed PMID: 15513300.
30. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009;144(2):147-56. Epub 2008/11/01. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07417.x. PubMed PMID: 19006567.
31. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Blood.* 1997;90(2):571-7. PubMed PMID: 9226156.

32. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:389-96. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.389. PubMed PMID: 23233609.
33. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-52. doi: 10.1056/NEJMra1400972. PubMed PMID: 26465987.
34. van Rhee F, Hochhaus A, Lin F, Melo JV, Goldman JM, Cross NC. p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1996;87(12):5213-7. PubMed PMID: 8652835.
35. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(11):1243-6. Epub 2009/10/18. doi: 10.1038/ng.469. PubMed PMID: 19838194; PubMed Central PMCID: PMC2783810.
36. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125-34. Epub 2009/01/08. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70339-5. PubMed PMID: 19138562; PubMed Central PMCID: PMC2707020.
37. G.Mullighan C, editor The new genetics of acute lymphoblastic leukemia. International Conference of the Korean Society of Hematology 2019.
38. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, McCastlain K, Harvey RC, Chen IM, et al. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J Clin Oncol*. 2017;35(4):394-401. Epub 2016/11/21. doi: 10.1200/JCO.2016.69.0073. PubMed PMID: 27870571; PubMed Central PMCID: PMC5455698.
39. Er TK, Lin SF, Chang JG, Hsieh LL, Lin SK, Wang LH, et al. Detection of the JAK2 V617F missense mutation by high resolution melting analysis and its validation. *Clin Chim Acta*. 2009;408(1-2):39-44. Epub 2009/07/10. doi: 10.1016/j.cca.2009.07.002. PubMed PMID: 19595684.
40. Veneri D, Capuzzo E, de Matteis G, Franchini M, Baritono E, Benati M, et al. Comparison of JAK2V617F mutation assessment employing different molecular diagnostic techniques. *Blood Transfus*. 2009;7(3):204-9. doi: 10.2450/2009.0070-08. PubMed PMID: 19657484; PubMed Central PMCID: PMC2719272.
41. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9414-8. Epub 2009/05/22. doi: 10.1073/pnas.0811761106. PubMed PMID: 19470474; PubMed Central PMCID: PMC2695045.
42. Waanders E, van der Velden VH, van der Schoot CE, van Leeuwen FN, van Reijmersdal SV, de Haas V, et al. Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79% of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2011;25(2):254-8. Epub 2010/11/19. doi: 10.1038/leu.2010.275. PubMed PMID: 21102428.
43. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(5):470-80. Epub 2009/01/07. doi: 10.1056/NEJMoa0808253. PubMed PMID: 19129520; PubMed Central PMCID: PMC2674612.

44. Shang Z, Zhao Y, Zhou K, Xu Y, Huang W. PAX5 alteration-associated gene-expression signatures in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2013;97(5):599-603. Epub 2013/03/26. doi: 10.1007/s12185-013-1309-9. PubMed PMID: 23529845.
45. Iacobucci I, Lonetti A, Paoloni F, Papayannidis C, Ferrari A, Storlazzi CT, et al. The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. *Haematologica*. 2010;95(10):1683-90. Epub 2010/06/09. doi: 10.3324/haematol.2009.020792. PubMed PMID: 20534699; PubMed Central PMCID: PMC2948093.
46. Pui CH, Chessells JM, Camitta B, Baruchel A, Biondi A, Boyett JM, et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*. 2003;17(4):700-6. doi: 10.1038/sj.leu.2402883. PubMed PMID: 12682627.
47. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-64. doi: 10.1038/nature05690. PubMed PMID: 17344859.
48. De Keersmaecker K, Marynen P, Cools J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2005;90(8):1116-27. PubMed PMID: 16079112.
49. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):18-24. doi: 10.1200/JCO.1996.14.1.18. PubMed PMID: 8558195.
50. Tasian SK, Loh ML. Understanding the biology of CRLF2-overexpressing acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1-2):13-24. doi: 10.1615/critrevoncog.v16.i1-2.30. PubMed PMID: 22150304; PubMed Central PMCID: PMC294404310.
51. Quentmeier H, Drexler HG, Fleckenstein D, Zaborski M, Armstrong A, Sims JE, et al. Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia*. 2001;15(8):1286-92. doi: 10.1038/sj.leu.2402175. PubMed PMID: 11480573.
52. Zhong J, Sharma J, Raju R, Palapetta SM, Prasad TS, Huang TC, et al. TSLP signaling pathway map: a platform for analysis of TSLP-mediated signaling. *Database (Oxford)*. 2014;2014:bau007. Epub 2014/02/25. doi: 10.1093/database/bau007. PubMed PMID: 24573880; PubMed Central PMCID: PMC2935308.
53. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, et al. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D920-4. Epub 2012/11/17. doi: 10.1093/nar/gks1082. PubMed PMID: 23161685; PubMed Central PMCID: PMC293531131.
54. Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;114(13):2688-98. Epub 2009/07/29. doi: 10.1182/blood-2009-03-208397. PubMed PMID: 19641190.
55. Roll JD, Reuther GW. CRLF2 and JAK2 in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia: a novel association in oncogenesis. *Cancer Res*. 2010;70(19):7347-52. Epub 2010/08/31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1528. PubMed PMID: 20807819; PubMed Central PMCID: PMC2948596.

56. Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, Richards SM, Morrison H, Masic D, et al. Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. *Blood*. 2011;117(7):2129-36. Epub 2010/11/24. doi: 10.1182/blood-2010-07-297135. PubMed PMID: 21106984.
57. Roberts KG, Reshmi SC, Harvey RC, Chen IM, Patel K, Stonerock E, et al. Genomic and outcome analyses of Ph-like ALL in NCI standard-risk patients: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2018;132(8):815-24. Epub 2018/07/11. doi: 10.1182/blood-2018-04-841676. PubMed PMID: 29997224; PubMed Central PMCID: PMC6107876.
58. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130(19):2064-72. Epub 2017/10/02. doi: 10.1182/blood-2017-06-743252. PubMed PMID: 28972016; PubMed Central PMCID: PMC5680607.
59. Palmi C, Vendramini E, Silvestri D, Longinotti G, Frison D, Cario G, et al. Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(10):2245-53. Epub 2012/04/09. doi: 10.1038/leu.2012.101. PubMed PMID: 22484421.
60. Herold T, Schneider S, Metzeler KH, Neumann M, Hartmann L, Roberts KG, et al. Adults with Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia frequently have IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. *Haematologica*. 2017;102(1):130-8. Epub 2016/08/25. doi: 10.3324/haematol.2015.136366. PubMed PMID: 27561722; PubMed Central PMCID: PMC5210243.
61. Tasian SK, Hurtz C, Wertheim GB, Bailey NG, Lim MS, Harvey RC, et al. High incidence of Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in older adults with B-ALL. *Leukemia*. 2017;31(4):981-4. Epub 2016/12/09. doi: 10.1038/leu.2016.375. PubMed PMID: 27932787; PubMed Central PMCID: PMC5382063.
62. Jain N, Roberts KG, Jabbour E, Patel K, Eterovic AK, Chen K, et al. Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood*. 2017;129(5):572-81. Epub 2016/12/05. doi: 10.1182/blood-2016-07-726588. PubMed PMID: 27919910; PubMed Central PMCID: PMC5290985.
63. Shiraz P, Payne KJ, Muffly L. The Current Genomic and Molecular Landscape of Philadelphia-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6). Epub 2020/03/22. doi: 10.3390/ijms21062193. PubMed PMID: 32235787; PubMed Central PMCID: PMC7139642.
64. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(26):5312-21. Epub 2010/02/04. doi: 10.1182/blood-2009-09-245944. PubMed PMID: 20139093; PubMed Central PMCID: PMC2902132.
65. Chen IM, Harvey RC, Mullighan CG, Gastier-Foster J, Wharton W, Kang H, et al. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2012;119(15):3512-22. Epub 2012/02/24. doi: 10.1182/blood-2011-11-394221. PubMed PMID: 22368272; PubMed Central PMCID: PMC3325039.

66. Chiaretti S, Brugnoletti F, Messina M, Paoloni F, Fedullo AL, Piciocchi A, et al. CRLF2 overexpression identifies an unfavourable subgroup of adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia lacking recurrent genetic abnormalities. *Leuk Res*. 2016;41:36-42. Epub 2015/12/23. doi: 10.1016/j.leukres.2015.11.018. PubMed PMID: 26754556.
67. Cui L, Gao C, Wang CJ, Zhao XX, Li WJ, Li ZG, et al. Combined analysis of IKZF1 deletions and CRLF2 expression on prognostic impact in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2021;62(2):410-8. Epub 2020/10/15. doi: 10.1080/10428194.2020.1832668. PubMed PMID: 33054468.
68. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008;111(12):5477-85. Epub 2008/04/03. doi: 10.1182/blood-2008-01-132837. PubMed PMID: 18388178; PubMed Central PMCID: PMC2424148.
69. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405. Epub 2016/04/11. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. PubMed PMID: 27069254.
70. Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu S, Hasegawa D, et al. An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with CRLF2 overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(10):815-23. Epub 2014/06/17. doi: 10.1002/gcc.22190. PubMed PMID: 24935070.
71. Schmäh J, Fedders B, Panzer-Grümayer R, Fischer S, Zimmermann M, Dagdan E, et al. Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high CRLF2 gene expression in childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(10). Epub 2017/04/01. doi: 10.1002/pbc.26539. PubMed PMID: 28371317.
72. Dou H, Chen X, Huang Y, Su Y, Lu L, Yu J, et al. Prognostic significance of P2RY8-CRLF2 and CRLF2 overexpression may vary across risk subgroups of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(2):135-46. Epub 2016/11/05. doi: 10.1002/gcc.22421. PubMed PMID: 27637012.
73. Konoplev S, Lu X, Konopleva M, Jain N, Ouyang J, Goswami M, et al. CRLF2-Positive B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Adult Patients: A Single-Institution Experience. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(4):357-63. doi: 10.1093/ajcp/axq005. PubMed PMID: 28340183.
74. Pastorczak A, Sedek L, Braun M, Madzio J, Sonsala A, Twardoch M, et al. Surface expression of Cytokine Receptor-Like Factor 2 increases risk of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients harboring. *Oncotarget*. 2018;9(40):25971-82. Epub 2018/05/25. doi: 10.18632/oncotarget.25411. PubMed PMID: 29899835; PubMed Central PMCID: PMC5995260.
75. Ge Z, Gu Y, Zhao G, Li J, Chen B, Han Q, et al. High CRLF2 expression associates with IKZF1 dysfunction in adult acute lymphoblastic leukemia without CRLF2 rearrangement. *Oncotarget*. 2016;7(31):49722-32. doi: 10.18632/oncotarget.10437. PubMed PMID: 27391346; PubMed Central PMCID: PMC5226542.
76. Kuang WY, Li WL, Zheng MC, Yang HX, Zhang BS, Wu P, et al. [Clinical Significance of CRLF2 High Expression in Bone Marrow Mononuclear Cells from Children with Acute Lymphoblastic Leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za*

Zhi. 2019;27(4):1058-63. doi: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2019.04.011. PubMed PMID: 31418357.

77. Erbilgin Y, Firtina S, Mercan S, Hatirnaz Ng O, Karaman S, Tasar O, et al. Prognostic gene alterations and clonal changes in childhood B-ALL. *Leuk Res.* 2019;83:106159. Epub 2019/06/08. doi: 10.1016/j.leukres.2019.05.009. PubMed PMID: 31228652.

