



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



RAVER2 GENİNİN MİYELODİSPLASTİK SENDROM VE AKUT MİYELOİD LÖSEMİDEKİ YERİ

Dr. Berna ÖZAYDIN

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nüket YÜRÜR KUTLAY

Dr. Öğr. Üyesi Şule ALTINER

ANKARA

2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**RAVER2 GENİNİN MİYELODİSPLASTİK SENDROM VE
AKUT MİYELOİD LÖSEMİDEKİ YERİ**

Dr. Berna ÖZAYDIN

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nüket YÜRÜR KUTLAY

Dr. Öğr. Üyesi Şule ALTINER

**Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TTU-2023-2849 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*RAVER2* geninin miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid lösemideki yeri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından, 8 Aralık 2022 tarihinde, İ11-658-22 numaralı kararla, ardından 29 Kasım 2023 tarihinde İ10-737-23 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Dr. Berna ÖZAYDIN

Tarih: 28.04.2024

İmza:

RAVER2 GENİNİN MİYELODİSPLASTİK SENDROM VE AKUT MİYELOİD LÖSEMİDEKİ YERİ

by BERNA ÖZAYDIN

Submission date: 18-Apr-2024 04:03PM (UTC+0300)

Submission ID: 2353812349

File name: 180424_turnitin_tez.pdf (2.7M)

Word count: 18924

Character count: 109977

RAVER2 GENİNİN MİYELODİSPLASTİK SENDROM VE AKUT MİYELOİD LÖSEMİDEKİ YERİ

ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

11%

INTERNET SOURCES

8%

PUBLICATIONS

7%

STUDENT PAPERS

KABUL ONAY SAYFASI

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr.Berna ÖZAYDIN	Sınav tarihi: 30.04.2024
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Dr.Öğr.Üyesi Şule ALTINER/ Doc. Dr. Nüket KUTLAY	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: RAVER2 Geninin Miyelodisplastik Sendrom ve Akut Miyeloid Lösemideki Yeri	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak ☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine ☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR
.

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Hatice ILGIN RUHİ
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Dr.Öğr.Üyesi Şule ALTINER
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Dr.Öğr.Üyesi Arda ÇETİNKAYA
HÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid löseminin tanı ve izleminde genetik belirteçler kullanılmaktadır. MDS'den AML'ye geçişte etkili olan faktörler merak konusudur. Bazı genetik belirteçler bu süreçte kazanılmaktadır. Bu çalışmada da MDS'den AML'ye geçişte *RAVER2* geni ekspresyonunun etkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda *RAVER2* ekspresyonuna, yeni tanı primer AML ve AML remisyon grubunda bakılarak, bu markerın hastalık izlemindeki yeri değerlendirilmiştir.

Tıbbi Genetik uzmanlık eğitimimi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında tamamlamaktan mutluluk ve gurur duyuyorum. Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince her daim desteğini hissettiğim, bana yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Nüket Yürür Kutlay'a, Dr. Öğr. Üyesi Şule Altın'er'e ve tıbbi genetik uzmanı olarak yetişmemde katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi, Doç. Dr. Timur Tuncalı, Doç. Dr. Halil Gürhan Karabulut ve Dr. Öğr. Üyesi Ezgi Gökpinar İli'ye, her zaman desteğini hissettiğim Öğr. Gör. Dr. Nedime Arzu Vicdan'a, Öğr. Gör. Dr. Sadiye Ekinci'ye teşekkür ediyorum. Uzmanlık eğitim süresince bir parçası olmaktan büyük mutluluk duyduğum ve aile sıcaklığı hissettiğim asistan ekibimize; Dr. Hande Nur Cesur Baltacı'ya, Dr. Mustafa Oğuz Acar'a, Dr. Okan Kurtçu'ya, Dr. Ahmet Karer Yurtdaş'a, Dr. Can Berk Leblebici'ye, Dr. Sümeyra Özbolat'a, Dr. Hüseyin İlbasmış'a, Dr. İrem Hartuç Çevik'e, Dr. Muhammed Faruk Ürkmez'e ve Dr. Ekin Aydın'a teşekkür ediyorum. Birlikte asistanlık yapmanın bir ayrıcalık olduğu Uzm. Dr. İbrahim Kaplan'a teşekkür ediyorum. Uzmanlık eğitimim boyunca destekleri için AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından '*RAVER2* geninin miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid lösemideki yeri' başlığı ve TTU-2023-2849 proje numarası ile desteklenmiştir.

Hayatımın her anında desteklerini hissettiğim ve benim bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme,

Daima yanımda olan, sevgisini her daim hissettiğim, yol arkadaşım, sevgili eşim Mehmet Serhat Özaydın'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Berna Özaydın

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu	iii
Kabul Onay Sayfası	iv
Önsöz	v
İçindekiler	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller Dizini	xi
Tablolar Dizini	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Miyelodisplastik Sendrom (MDS)	6
4.1.1. MDS Sınıflandırması	6
4.1.2. Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (<i>International Prognostic Scoring System, IPSS</i>)	7
4.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)	9
4.2.1. MDS'ye Sekonder AML (AML-MDS)	11
4.3. <i>RAVER2</i> geni	13
4.3.1. <i>RAVER2</i> ve Kanser	15
5. GEREÇ ve YÖNTEM	18
5.1. Yöntem Basamakları	18
5.1.1. Kemik İliği Örneklerinden RNA Eldesi	18
5.1.1.1. RNA Eldesi Birinci Yöntem	19
5.1.1.2. RNA Eldesi İkinci Yöntem	21
5.1.2. Ters Transkripsiyon Reaksiyonu ile cDNA Sentezi	22
5.1.3. Real-Time PCR ile <i>RAVER2</i> Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	23
5.1.4. Real-time Ürünlerinin Jel Elektroferezinde Görüntülenmesi	24
5.2. Sonuçların Hesaplanması ve İstatistiksel Analiz	25
6. BULGULAR	26
6.1. Hasta Grubu	26
6.2. <i>RAVER2</i> ve <i>ABLI</i> ekspresyon çalışması	37
6.3. Ekspresyon Değerlerinin Hasta Grupları Arasında Karşılaştırılması	48

6.3.1. Ekspresyon Değerlerinin MDS, AML-MDS, Yeni Tanı Primer AML ve AML Remisyon Hasta Grupları Arasında Karşılaştırılması	48
6.3.2. AML Gelişimi Olan ve Olmayan MDS Hastalarının Karşılaştırılması	49
6.3.3. MDS Hastalarının Revize IPSS Sitogenetik Parametrelerine Göre Karşılaştırılması	50
6.3.4. MDS Hastalarının 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması	51
6.3.5. AML-MDS Hastalarının 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması	52
6.3.6. MDS ve AML-MDS Hastalarının 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması	53
6.3.7. MDS ve AML-MDS Hastalarının İzole 5q Delesyonu ile Eşlik Eden Sitogenetik Anomalilere Göre Karşılaştırılması	54
6.3.8. 5q Delesyonuna Sahip MDS ve AML-MDS Hastalarının Karşılaştırılması	55
6.3.9. AML-MDS Hastalarının Monozomi 7/7q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması	55
6.3.10. AML-MDS Hastalarının ELN 2022 AML Risk Sınıflamasına Göre Karşılaştırılması	56
6.3.11. Yeni Tanı Primer AML Hastalarının ELN 2022 AML Risk Sınıflamasına Göre Karşılaştırılması	57
6.3.12. Yeni Tanı Primer AML Hastalarının Konvansiyonel Moleküler Analiz Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması	58
6.3.13. İstatistiksel Analiz Sonuçları Özeti	59
7. TARTIŞMA	60
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	65
9. KAYNAKLAR	66
10. EKLER	70
EK-1: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

abn	: <i>abnormality</i> , anormallik
AML	: akut miyeloid lösemi
AML-MDS	: MDS'ye sekonder AML
ANC	: <i>absolute neutrophil count</i> , mutlak nötrofil sayısı
ARCH	: <i>age-related clonal hematopoiesis</i> , yaş ilişkili klonal hematopoez
bZIP	: <i>basic leucine zipper domain</i> , temel lösin domain alanı
C	: santigrat
CBF	: <i>core binding factor</i> , çekirdek bağlama faktörü
cDNA	: <i>complementary DNA</i> , komplementer DNA
CHIP	: <i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i> , belirsiz potansiyele sahip klonal hematopoez
cnLOH	: <i>copy neutral loss of heterozygosity</i> , nötr kopya heterozigotluk kaybı
Ct	: <i>cycle of threshold</i> , eşik döngü sayısı
del	: delesyon
dH ₂ O	: distile su
dl	: desilitre
EDTA	: etilendiamintetraasetik asit
ELN	: <i>European LeukemiaNet</i> , avrupa lösemi grubu
FISH	: floresan in situ hibridizasyon
g	: <i>rcf, relative centrifugal force/field</i> , göreceli santrifüj kuvveti
gDNA	: genomik deoksiriboz nükleik asit
GEO	: <i>gene expression omnibus</i> , gen ekspresyon antolojisi
GWAS	: <i>genome-wide association studies</i> , genom boyu asosiasyon çalışmaları
Hb	: hemoglobin
hnRNP	: heterojen nükleer ribonükleoprotein
HSC	: <i>hematopoietic stem cells</i> , hematopoietik kök hücreler
IPSS	: <i>International Prognostic Scoring System</i> , Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi
IPSS-R	: <i>Revised International Prognostic Scoring System</i> , Revize Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi
ITD	: internal tandem duplikasyon
i	: izokromozom
inc	: <i>incomplete karyotype</i> , tamamlanmamış karyotip

inv	: inversiyon
Kİ	: kemik iliği
L	: litre
LncRNA	: <i>long non-coding RNA</i> , uzun kodlamayan RNA
LRR	: <i>leucine-rich nuclear export sequence potential</i> , lösinden zengin nükleer <i>export</i> sekansı
MDS	: miyelodisplastik sendrom
mg	: miligram
mikroRNA	: mikro ribonükleik asit
miR	: mikro ribonükleik asit
mM	: milimolar
ml	: mililitre
MPN	: miyeloproliferatif neoplazi
µl	: mikrolitre
n	: araştırma örnekleme
NLS	: nükleer lokalizasyon sinyali
NTC	: <i>no template control</i> , şablonsuz kontrol
OS	: <i>overall survival</i> , ortalama sağ kalım
PBS	: <i>phosphate buffered saline</i> , fosfat tamponlu salin
PTB	: <i>polypyrimidine tract-binding protein</i> , polipirimidin bağlayıcı protein
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i> , polimeraz zincir reaksiyonu
PK	: periferik kan
RFLP	: <i>restriction fragment length polymorphism</i> , restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RFU	: <i>relative fluorescence units</i> , bağıl floresans birimleri
RNA	: ribonükleik asit
RNase	: ribonükleaz
RNAseq	: <i>RNA sequencing</i> , RNA sekansı
sFlt1	: <i>soluble isoform of tyrosine kinase receptor Flt1</i> , tirozin kinaz reseptörü Flt1'in çözünür izoformu (diğer adıyla VEGFR1)
SNP	: <i>single-nucleotide polymorphism</i> , tek nükleotid polimorfizmi
t	: translokasyon
TBE	: tris borik asit EDTA
TCGA	: <i>the cancer genome atlas</i> , kanser genom atlası
TKD	: tirozin kinaz domain

VEGFR1 : *vascular endothelial growth factor receptor 1*, vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 1 (diğer adıyla sFlt1)



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Revize IPSS sitogenetik risk parametreleri	8
Şekil 4.2.	Sekonder AML klonal gelişimi.....	12
Şekil 4.3.	MDS'den sekonder AML'ye ilerleme sırasında klonal evrim.....	13
Şekil 4.4.	RAVER1 ve RAVR2 proteinlerinin yapısı	14
Şekil 4.5.	Ekzon <i>splicing</i> represyonunda RNA-PTB etkileşim modelleri.....	15
Şekil 6.1.	Real-time PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri.. ..	37
Şekil 6.2.	M6, M7, S12, S13, S14, S15, Y11, Y12, Y13 hastalarındaki <i>RAVER2</i> amplifikasyon eğrileri.....	38
Şekil 6.3.	M6, M7, S12, S13, S14, S15, Y11, Y12, Y13 hastalarındaki <i>RAVER2</i> <i>melting curve</i> görüntüleri	38
Şekil 6.4.	M6, M7, S12, S13, S14, S15, Y11, Y12, Y13 hastalarındaki <i>ABL1</i> amplifikasyon eğrileri.....	38
Şekil 6.5.	M6, M7, S12, S13, S14, S15, Y11, Y12, Y13 hastalarındaki <i>ABL1</i> <i>melting curve</i> görüntüleri	39
Şekil 6.6.	M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15 hastalarındaki <i>RAVER2</i> amplifikasyon eğrileri.....	39
Şekil 6.7.	M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15 hastalarındaki <i>RAVER2</i> <i>melting curve</i> görüntüleri	40
Şekil 6.8.	M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15 hastalarındaki <i>ABL1</i> amplifikasyon eğrileri.....	40
Şekil 6.9.	M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15 hastalarındaki <i>ABL1</i> <i>melting curve</i> görüntüleri	41
Şekil 6.10.	Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, R5, R6, R7, R8, S4, S5, S6 hastalarındaki <i>RAVER2</i> amplifikasyon eğrileri	41
Şekil 6.11.	Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, R5, R6, R7, R8, S4, S5, S6 hastalarındaki <i>RAVER2 melting curve</i> görüntüleri	42
Şekil 6.12.	Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, R5, R6, R7, R8, S4, S5, S6 hastalarındaki <i>ABL1</i> amplifikasyon eğrileri	42
Şekil 6.13.	Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, R5, R6, R7, R8, S4, S5, S6 hastalarındaki <i>ABL1 melting curve</i> görüntüleri	43
Şekil 6.14.	Y7, Y8, Y9, Y10, R9, R10, R11, R12 hastalarındaki <i>RAVER2</i> amplifikasyon eğrileri.....	43

Şekil 6.15.	Y7, Y8, Y9, Y10, R9, R10, R11, R12 hastalarındaki <i>RAVER2 melting curve</i> görüntüleri	44
Şekil 6.16.	Y7, Y8, Y9, Y10, R9, R10, R11, R12 hastalarındaki <i>ABL1</i> amplifikasyon eğrileri	44
Şekil 6.17.	Y7, Y8, Y9, Y10, R9, R10, R11, R12 hastalarındaki <i>ABL1 melting curve</i> görüntüleri	45
Şekil 6.18.	Yeni tanı primer AML, AML remisyon, AML-MDS ve MDS grupları arasındaki $2^{-\Delta C_t}$ değerlerinin dağılımı	49



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 4.1.	Dünya Sağlık Örgütü 2022 miyelodisplastik neoplazmların (MDS) sınıflandırılması ve tanımlayıcı özellikleri	7
Tablo 4.2.	Revize IPSS (IPSS-R).....	8
Tablo 4.3.	ELN 2022'ye göre AML sınıflandırması.....	10
Tablo 4.4.	ELN 2022'ye göre AML risk sınıflaması	11
Tablo 5.1.	RNA eldesi birinci kit içeriği.....	19
Tablo 5.2.	RNA eldesi ikinci kit içeriği	21
Tablo 5.3.	<i>Buffer RLT</i> ekleme oranları.....	21
Tablo 5.4.	Genomik DNA eliminasyonu reaksiyon karışımı.....	22
Tablo 5.5.	Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı	23
Tablo 5.6.	Real-time PCR reaksiyon karışımı	23
Tablo 6.1.	Hastaların epidemiyolojik verileri	26
Tablo 6.2.	MDS grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri	27
Tablo 6.3.	MDS grubu hastalarda yeni nesil dizileme analizi ile saptanan mutasyonlar*.....	29
Tablo 6.4.	MDS'ye sekonder AML grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri	30
Tablo 6.5.	MDS'ye sekonder AML grubu hastalarda yeni nesil dizileme analizi ile saptanan mutasyonlar*.....	32
Tablo 6.6.	Yeni tanı primer AML grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri	33
Tablo 6.7.	Yeni tanı primer AML grubu hastalarında yeni nesil dizileme analizi ile saptanan mutasyonlar*	35
Tablo 6.8.	AML remisyon grubu hastalarının yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri.....	36
Tablo 6.9.	MDS (M), MDS'ye sekonder AML (S), yeni tanı AML (Y) ve AML remisyon (R) hasta grubunun <i>RAVER2</i> ve <i>ABL1</i> Ct, Δ Ct ve $2^{-\Delta$ Ct değerleri	46
Tablo 6.10.	MDS, AML-MDS, yeni tanı primer AML ve AML remisyon hastalarının medyan $2^{-\Delta$ Ct, minimum ve maximum $2^{-\Delta$ Ct değerleri	48

Tablo 6.11.	AML gelişen ve gelişmeyen MDS hastalarına ait medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri	50
Tablo 6.12.	MDS hastalarının IPSS-R sitogenetik parametrelerine göre gruplandırılması	50
Tablo 6.13.	MDS hastalarının IPSS-R sitogenetik parametrelerine göre iyi ve orta grubuna ait medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri.....	51
Tablo 6.14.	MDS hastalarının IPSS-R sitogenetik parametrelerine göre iyi ve çok kötü grubuna ait medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri.....	51
Tablo 6.15.	5q delesyonu FISH sonuçlarına göre MDS hastalarının gruplandırılması	52
Tablo 6.16.	5q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri	52
Tablo 6.17.	5q delesyonu FISH sonuçlarına göre AML-MDS hastalarının gruplandırılması	52
Tablo 6.18.	5q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri	53
Tablo 6.19.	5q delesyonu FISH sonuçlarına göre MDS ve AML-MDS hastalarının gruplandırılması	53
Tablo 6.20.	5q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan MDS ve AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri	54
Tablo 6.21.	İzole 5q delesyonu ile eşlik eden sitogenetik anomalilere göre MDS ve AML-MDS hastalarının gruplandırılması	54
Tablo 6.22.	İzole 5q delesyonu ile eşlik eden sitogenetik anomalilere göre gruplandırılan MDS ve AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri	54
Tablo 6.23.	5q delesyonu sahip MDS ve AML-MDS karşılaştırma grubuna ait medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri.....	55
Tablo 6.24.	Monozomi 7/7q Delesyonu FISH sonuçlarına göre AML-MDS hastalarının gruplandırılması	56
Tablo 6.25.	Monozomi 7/7q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri	56
Tablo 6.26.	ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre AML-MDS hastalarının gruplandırılması	56

Tablo 6.27.	ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri.....	57
Tablo 6.28.	Yeni tanı primer AML hastalarının ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre gruplandırılması.....	57
Tablo 6.29.	ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre gruplandırılan yeni tanı primer AML hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri	58
Tablo 6.30.	Yeni tanı primer AML hastalarının konvansiyonel moleküler test sonuçlarına göre gruplandırılması	58
Tablo 6.31.	Konvansiyonel moleküler test sonuçlarına göre gruplandırılan yeni tanı primer AML hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri.....	59
Tablo 6.32.	İstatistiksel Analiz Sonuçları Özeti.....	59

1. ÖZET

***RAVER2* GENİNİN MİYELODİSPLASTİK SENDROM VE AKUT MİYELOİD LÖSEMİDEKİ YERİ**

Amaç

Hematolojik maligniteler arasında yer alan miyelodisplastik sendrom (MDS) ve akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında çeşitli sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik belirteçler izlemde kullanılır. Bazı MDS hastaları AML'ye dönüşürken bazılarında bu ilerleme görülmez. MDS hastalarının AML'ye dönüşümünü öngörebilecek ve hasta izleminde kullanılabilecek bir belirteç henüz tanımlanmamıştır. *RAVER2*'nin kodladığı ribonükleoprotein *splicing* düzenleyicisidir.

Bu çalışmada *RAVER2* gen ekspresyonunun hem MDS'den AML'ye dönüşüm aşamasında rolü olup olmadığını hem de AML seyri sırasında prognostik bir belirteç olarak anlamını araştırmak amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya, miyelodisplastik sendrom, miyelodisplastik sendroma sekonder akut miyeloid lösemi (AML-MDS), primer yeni tanı AML ve AML remisyon olmak üzere dört gruptan toplamda 85 hasta dahil edildi. Kemik iliğinden elde edilen RNA örneklerinde *RAVER2* gen ekspresyonu real-time PCR yöntemi ile değerlendirildi. MDS, AML-MDS ve primer yeni tanı AML hastaları, uluslararası kabul gören kılavuzlardaki genetik belirteçlere göre daha küçük gruplara ayrıldı. Bu araştırma sonucunda, belirtilen gruplarda bulunan ekspresyon profilleri istatistiksel olarak değerlendirilerek *RAVER2* gen ekspresyonunun bu gruplar arasında nasıl değiştiği belirlenmeye çalışıldı.

Bulgular

MDS, AML-MDS, primer yeni tanı AML ve AML remisyon hastaları *RAVER2* geni ekspresyon düzeyi açısından karşılaştırıldığında AML-MDS grubunda ifadenin diğer gruplara göre azaldığı saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Remisyon hastalarında *RAVER2* ekspresyonunun, primer yeni tanı AML grubundan düşük olduğu görüldü. Bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. MDS hastaları IPSS-R sitogenetik parametrelerine göre karşılaştırıldığında; iyi grupta çok kötü gruba göre *RAVER2*

ekspresyonunun arttığı saptandı, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. MDS hastalarında 5q delesyonuna sahip ve normal moleküler sitogenetik sonucu olanlar karşılaştırıldığında; 5q delesyonu olan grupta *RAVER2* ekspresyonunun azaldığı saptandı. Bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Karşılaştırılan diğer küçük gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuç

RAVER2 ekspresyonunun MDS, AML-MDS, primer yeni tanı AML ve AML remisyon hasta gruplarındaki ifade değişikliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. MDS alt grupları IPSS-R'e göre sitogenetik olarak değerlendirildiğinde; istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde iyi grupta *RAVER2* ekspresyonu artmıştı. 5q delesyonu olan MDS hastalarında *RAVER2* ekspresyonu azalmıştı ve bu fark da istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu veri, sınıflandırma ve tedavi seçeneği olarak farklı değerlendirilen "5q delesyonu" alt grubunun bir özelliği olarak değerlendirilebilirse de bu bulgunun daha geniş gruplarda doğrulanması gereklidir. Diğer yandan, IPSS-R'ye göre "normal karyotipin" ve "5q delesyonunun" iyi risk grubunda yer aldığı hatırlanacak olursa, *RAVER2* ekspresyonunun bu iki grupta da istatistiksel olarak farklılık gösterdiği dikkati çekmektedir. Bu nedenle bugün prognostik gidişte yol gösteren bu sınıflamada ileride yapılabilecek alt gruplamalarda, *RAVER2* ekspresyonunun aday belirteç olabileceği düşünülebilir. Bu çalışma verilerine göre; *RAVER2*, MDS AML geçişinde ya da AML klinik seyrinde tek başına bir belirteç olarak anlamlı bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: miyelodisplastik sendrom, akut miyeloid lösemi, gen ekspresyonu, *RAVER2*, real-time PCR

2. ABSTRACT

THE ROLE OF THE *RAVER2* GENE IN MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Aim

Various cytogenetic, molecular cytogenetic and molecular genetic markers are used in the monitoring of patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML), which are among hematologic malignancies. While some MDS patients progress to AML, others do not. A marker that can predict the transformation of MDS patients to AML and can be used in patient follow-up has not yet been defined. The ribonucleoprotein encoded by *RAVER2* is a splicing regulator.

In this study, we aimed to investigate the role of *RAVER2* gene expression in the transformation phase from MDS to AML and its meaning as a prognostic marker during the course of AML.

Materials and Methods

A total of 85 patients from four groups: myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia secondary to myelodysplastic syndrome (AML-MDS), primary newly diagnosed AML and AML remission groups were included in this study. *RAVER2* gene expression in RNA samples obtained from bone marrow was evaluated by real-time PCR method. MDS, AML-MDS and primary newly diagnosed AML patients were divided into smaller groups according to the genetic markers in internationally accepted guidelines. As a result of this research, expression profiles in the specified groups were evaluated statistically and *RAVER2* gene expression changes among these groups were tried to be determined.

Results

When MDS, AML-MDS, primary newly diagnosed AML and AML remission patients were compared in terms of *RAVER2* gene expression levels, it was found that the expression was decreased in the AML-MDS group compared to the other groups, but this difference was not found to be statistically significant. *RAVER2* expression was found to be lower in remission patients than in the primary newly diagnosed AML group. This difference was not found to be

statistically significant. When MDS patients were compared according to IPSS-R cytogenetic parameters, it was determined that *RAVER2* expression increased in the good group compared to the very poor group, and this difference was found to be statistically significant. When MDS patients with 5q deletion and those with normal molecular cytogenetic results are compared, *RAVER2* expression was found to be decreased in the group with 5q deletion. This difference was also found to be statistically significant. No statistically significant differences were found among the other small groups compared.

Conclusion

The change in *RAVER2* expression in MDS, AML-MDS, primary newly diagnosed AML and AML remission patient groups was not found to be statistically significant. When MDS subgroups are evaluated cytogenetically according to IPSS-R, increased *RAVER2* expression in the good group was found to be statistically significant. *RAVER2* expression was found to be decreased in MDS patients with 5q deletion, and this difference was found to be statistically significant. Although this data can be considered as a feature of the “5q deletion” subgroup, which is evaluated differently in terms of classification and treatment options, this finding needs to be confirmed in larger groups. On the other hand, keeping in mind that “normal karyotype” and “5q deletion” are in the good risk group according to IPSS-R, *RAVER2* expression may be a candidate marker in future subgroups in this classification. According to this study data; *RAVER2* was not found to be significant as a stand-alone marker in MDS-AML transition or AML clinical course.

Key Words: myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, gene expression, *RAVER2*, real-time PCR

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Miyelodisplastik sendrom (MDS), kemik iliğinde displaziye neden olan ve etkisiz hematopoezis ile sonuçlanan klonal bir hematopoetik kök hücre bozukluğudur. Akut miyeloid lösemi (AML) ise yetişkinlerde en sık görülen lösemidir. Periferik kanda ve kemik iliğinde olgunlaşmamış “blast hücrelerinin” klonal çoğalması sonucunda ortaya çıkan etkisiz eritropoez ve kemik iliği yetmezliği ile karakterizedir.

Hematolojik malignitelerde diagnostik ve prognostik genetik belirteçler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları moleküler tedavilerin hedeflerini oluşturur. Bu belirteçler, sürekli güncellenen uluslararası kabul gören kılavuzlarda yer almaktadır. MDS’den AML’ye geçişte bugün için tanımlı, genetik bir belirteç bilinmemektedir. Her iki kliniğe özgü belirteçler bulunmakla birlikte, MDS hastalarının hangi aşamada akut faza geçeceğini öngörebilecek bir belirteç henüz yoktur. Bu geçişi öngörebilecek bir belirteç bulunabilir mi? Bu hedefe yönelik olarak, çalışma kapsamında miyelodisplastik sendrom, miyelodisplastik sendroma sekonder akut miyeloid lösemi, primer yeni tanı akut miyeloid lösemi ve AML remisyon hastaları çalışma evrenini oluşturdu. Kanserin multifaktöriyel ve çok basamaklı gelişim süreci dikkate alındığında bir belirtecin MDS’den AML’ye geçişte tek başına etkili olmayacağı açıktır. Çalışma kapsamında amaçlanan bu belirteçlerden en azından birini yakalamaktır. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda bugün için çok çalışılmamış, ancak belirtilen amaç için incelemeye değer olan *RAVER2* genine ulaşıldı. Araştırma kapsamında MDS, MDS’ye sekonder AML (AML-MDS), primer yeni tanı AML ve AML remisyon hastalarının kemik iliği örneklerinde *RAVER2* geni ekspresyon düzeyleri real-time PCR yöntemi ile incelenip, klinik ile *RAVER2* geni ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki tanımlanmaya çalışıldı. *RAVER2* geninin genetik bir belirteç olarak yeri araştırıldı. Bu araştırmanın birincil amacı, *RAVER2* gen ekspresyonunun, miyelodisplastik sendromdan akut miyeloid lösemiye dönüşümdeki rolünü, genetik belirteç olarak anlamını araştırmaktır. Bu süreçte MDS, MDS-AML ve primer yeni tanı AML alt grupları arasındaki değişimi değerlendirmek de hedeflendi. İkincil olarak, remisyon ile yeni tanı primer AML hastalarında *RAVER2* geni ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak, *RAVER2* gen ekspresyonunun AML hastalarında prognostik bir gösterge olarak kullanılıp kullanılamayacağı da değerlendirildi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Miyelodisplastik Sendrom (MDS)

Miyelodisplastik sendrom (MDS), kemik iliğinde displaziye ve etkisiz hematopoezise yol açan klonal bir hematopoetik kök hücre bozukluğudur. MDS insidansı 100.000 nüfus başına yaklaşık 4,9 vaka olarak tahmin edilmektedir. MDS genellikle 65 yaş üstü hastalarda teşhis edilir. Laboratuvar değerlendirmelerinde her üç kan serisinde de azalma bulunabilir. Hastalığın seyri değişkendir. Tedavi, sık kan transfüzyonu gerektiren, semptomatik hastalara verilmektedir. Prognoz ve genel sağkalım; sitopenilerin şiddeti, blast oranı, sitogenetik değişiklikler gibi birçok faktöre bağlıdır (1).

MDS, *de novo* veya kemik iliğindeki çeşitli hasarlara ikincil olarak ortaya çıkabilir. Kemoterapiye (özellikle alkilleyici maddeler), radyasyona veya benzen gibi çevresel toksinlere maruziyeti kapsayan çeşitli çevresel ve iyatrojenik etiyolojiler suçlanmıştır. Nadir olarak, ailesel MDS de bildirilmiştir (1).

'*International Consensus Working Group*', MDS için tanı kılavuzlarında tutarlılık sağlanmasına yardımcı olmak amacıyla, minimum tanı ölçütleri önermiştir. Birlikte bulunması gereken iki ön koşul belirtilmiştir:

- 1- Bir veya daha fazla hücre serisinde kararlı sitopeni (sitogenetik inceleme MDS düşündürmedikçe en az 6 ay boyunca): eritroid (hemoglobin (Hb) <11 gram/dl); nötrofilik (mutlak nötrofil sayısı (*absolute neutrophil count*, ANC) <1500/μl) veya megakaryositik (trombositler <100.000/μl),
- 2- Displazi/sitopeninin veya her ikisinin ana nedeni olarak diğer potansiyel bozuklukların dışlanması gerekmektedir.

Ek olarak, MDS tanısı için MDS ile ilişkili üç kriterden en az biri gerekir:

- 1) Displazi (üç ana kemik iliği hücre serisinden birinde veya daha fazlasında $\geq 10\%$)
- 2) %5 ila %19 arasında bir blast hücre sayısı
- 3) MDS ile ilişkili spesifik bir karyotip [örn. del(5q), del(20q), +8 veya -7/del(7q)].

Ayrıca, birkaç yardımcı kriter, MDS tanısını doğrulamaya yardımcı olabilir. Bu kriterler arasında akım sitometrisi ile anormal immünofenotip, anormal kemik iliği histolojisi ve immünohistokimya veya moleküler belirteçlerin varlığı (anormal CD34 antijen ekspresyonu, olgunlaşmamış progenitörlerin atipik lokalizasyonu, miyeloid klonalite, fibrozis) yer alır (2).

4.1.1. MDS Sınıflandırması

Dünya Sağlık Örgütü, MDS için tanı ölçütlerini belirlemiştir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Dünya Sağlık Örgütü 2022 miyelodisplastik neoplazmların (MDS) sınıflandırılması ve tanımlayıcı özellikleri (3)

	Blast oranı	Sitogenetik	Mutasyon
Genetik anormallikler ile tanımlanan MDS			
Düşük blast sayısı ve izole 5q delesyonu	Kİ'de <%5 PK'de <%2	Tek başına 5q delesyonu ya da monozomi 7/7q delesyonu dışında başka bir anormallikle birlikte	
Düşük blast sayısı ve <i>SF3B1</i> geni mutasyonu ^a		5q delesyonu, monozomi 7 veya kompleks karyotip olmaması	<i>SF3B1</i> geninde
Bialelik <i>TP53</i> inaktivasyonu	Kİ ve PK'de <%20	Genellikle kompleks karyotip	İki veya daha fazla <i>TP53</i> geni mutasyonu ya da bir <i>TP53</i> geni mutasyonuna eşlik eden kopya sayısı kaybı veya cnLOH kanıtı olan bir mutasyon
Morfoloji ile tanımlanan MDS			
Düşük blast sayısı	Kİ'de <%5 PK'de <%2		
Hipoplastik ^b			
Artmış blast sayısı			
Artmış blast sayısı-1	Kİ'de %5–9 veya PK'de %2–4		
Artmış blast sayısı-2	Kİ'de %10–19 veya PK'de %5–19 veya 'Auer rods'		
Fibrozis ile birlikte	Kİ'de %5–19; PK'de %2–19		

a $\geq$ %15 ring sideroblastlarının saptanması, *SF3B1* mutasyonunun yerine geçebilir. İlgili terminoloji: Düşük blast ve ring sideroblastlı MDS.

b Yaşa göre düzeltilmiş, $\leq$ %25 kemik iliği selüleritesi.

Kİ: kemik iliği, PK: periferik kan, cnLOH (*copy neutral loss of heterozygosity*, nötr kopya heterozigotluk kaybı): heterozigotluk kaybına kopya sayısı değişikliğinin eşlik etmemesidir (4).

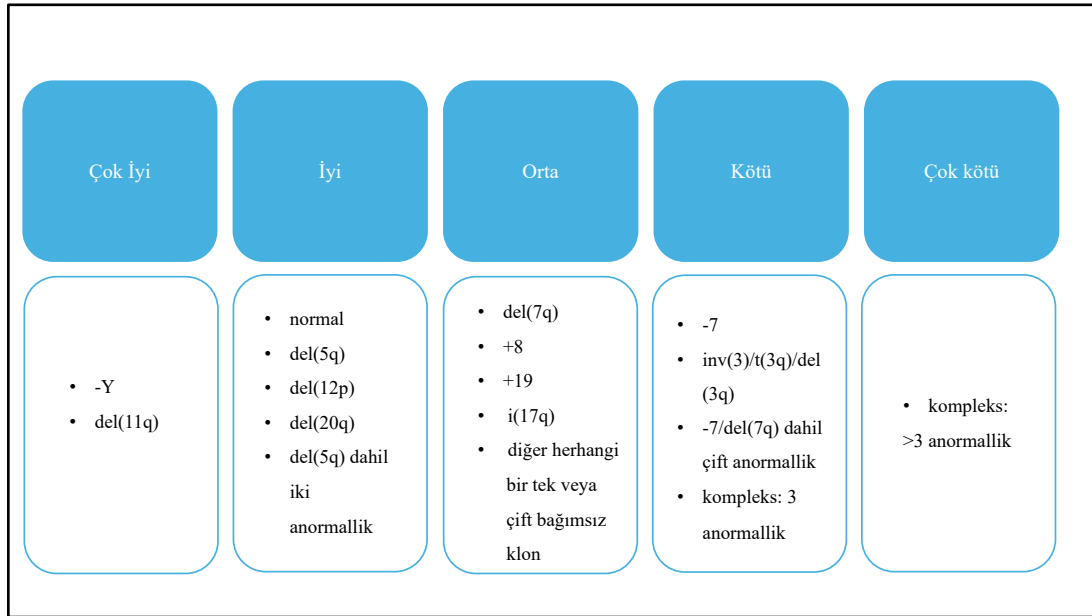
4.1.2. Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (*International Prognostic Scoring System, IPSS*)

Prognoz tahmininde Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (*International Prognostic Scoring System, IPSS*), günümüzde daha çok revize IPSS (IPSS-R) risk sınıflaması yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 4.2., Şekil 4.1.).

Tablo 4.2. Revize IPSS (IPSS-R) (5)

	Skor değeri						
Prognostik değişken	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Sitogenetik	Çok iyi	-	İyi	-	Orta	Kötü	Çok Kötü
Kemik iliği blast (%)	≤2	-	>2, <5	-	5-10	>10	-
Hemoglobin (g/dl)	≥10	-	8-<10	<8	-	-	-
Trombosit (x10 ⁹ /L)	≥100	50-<100	<50	-	-	-	-
Mutlak nötrofil sayısı (x10 ⁹ /L)	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-

IPSS risk kategorisi	Ortalama skor	Tedavi yokluğunda Ortalama sağ kalım (survival) (yıl)	Tedavi yokluğunda %25 AML progresyonu (yıl)
Çok düşük	≤1.5	8.8	Erişilmemiş
Düşük	>1.5, ≤3	5.3	10.8
Orta	>3, ≤4.5	3	3.2
Yüksek	<4.5, ≤6	1.6	1.4
Çok Yüksek	>6.0	0.8	0.7

**Şekil 4.1.** Revize IPSS sitogenetik risk parametreleri (5)

De novo MDS'nin bir veya daha fazla somatik mutasyonla gelişen onkojenik bir süreçle meydana geldiği varsayılmaktadır. Son yıllarda hastaların %80 ile %90'ında bir veya daha fazla gende mutasyon olduğu gösterilmiştir (1). En sık mutasyona uğrayan genler *TET2*, *SF3B1*,

ASXL1, DNMT3A, SRSF2, RUNX1, TP53, U2AF1, EZH2, ZRSR2, STAG2, CBL, NRAS, JAK2, SETBP1, IDH1, IDH2 ve ETV6’dır (6, 7). Bu gen mutasyonlarının birçoğu, kompleks karyotip (*TP53*), kemik iliği blast oranı yüksekliği (*RUNX1, NRAS ve TP53*) ve şiddetli trombositopeni (*RUNX1, NRAS ve TP53*) gibi kötü klinik özelliklerle ilişkilendirilmiştir. Bazı genlerdeki mutasyonlar bağımsız prognostik değere sahiptir: *TP53, EZH2, ETV6, RUNX1 ve ASXL1* mutasyonlarının, azalmış ortalama sağ kalım (*overall survival, OS*) öngördüğü gösterilmiştir (8).

4.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

Akut miyeloid lösemi (AML), yetişkinlerde en sık görülen lösemidir. Tüm lösemi vakalarının yaklaşık %80’ini oluşturur. Periferik kanda ve kemik iliğinde olgunlaşmamış “blast hücrelerinin” klonal genişlemesi sonucunda ortaya çıkan etkisiz eritropoez ve kemik iliği yetmezliği ile karakterizedir. AML insidansı yılda 100.000 nüfus başına yaklaşık 4,2 yeni vaka olarak bildirilmektedir. Ortalama tanı yaşı yaklaşık 65’tir. Erkeklerde hastalık görülme sıklığı, kadınlara göre daha fazladır (5:3). Etiyoloji, genetik değişiklik, immün fenotip ve morfolojiye göre AML için kullanılan farklı sınıflandırmalar vardır (9).

Genellikle, AML *de novo* olarak görülür. AML hasta grubunun %25 ila %35’i sekonder AML ve tedavi ilişkili AML’dir. Bu grup daha kötü prognoza sahiptir (10-12). Sekonder AML; MDS, MPN (miyeloproliferatif neoplazi) veya MDS/MPN örtüşme (*overlap*) sendromuna sekonder olarak gelişir. Tedavi ilişkili AML ise lenfoma, solid tümörler veya otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan kemoterapiye/radyasyona maruziyet sonrası gelişen gruptur (11). Kemoterapötik ajanlar, radyasyon, tütün dumanı ve benzen gibi çevresel maruziyetler de AML için risk faktörleridir. Down sendromu ve Bloom sendromu gibi çeşitli doğumsal bozukluklar da 20’li yaşların başında AML gelişme riskini artırır.

AML’de, hematopoezde yer alan genlerdeki mutasyonlar sıklıkla gözlenir. Bu mutasyonların etkisiyle, periferik kanda ve kemik iliğinde farklılaşmamış miyeloid öncüllerinin (blastlar) klonal genişlemesi, etkisiz eritropoez ve kemik iliği yetmezliği meydana gelir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar AML’nin; yaşla birlikte, hematopoetik kök hücrede tekrarlayan bir dizi genetik değişikliğin birikiminden kaynaklanabileceğini ortaya koymuştur. AML, değişken prognoza sahip oldukça heterojen bir hastalıktır. Genetik mutasyonlar geniş bir spektrumda oluşmaktadır; sayısal ve yapısal kromozomal değişikliklerden ve/veya gen düzeyindeki mutasyonlardan kaynaklanabilir (9). Avrupa lösemi grubunun (*European LeukemiaNet -ELN*) yaptığı AML sınıflaması Tablo 4.3.’te verilmiştir.

Tablo 4.3. ELN 2022'ye göre AML sınıflandırması (13)

Tekrarlayan genetik anormallikler taşıyan AML (Kİ veya PK $\geq$ %10 blast)
t(15;17)(q24.1;q21.2)/<i>PML::RARA</i> taşıyan APL t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i> taşıyan AML inv(16)(p13.1;q22) veya t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB::MYH11</i> taşıyan AML t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3::KMT2A</i> taşıyan AML t(6;9)(p22.3;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i> taşıyan AML inv(3)(q21.3;q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2;MECOM(EV11)</i> taşıyan AML Diğer nadir tekrarlayan translokasyonları taşıyan AML <i>NPM1</i> mutasyonu taşıyan AML <i>CEBPA</i> 'in-frame' bZIP mutasyonu taşıyan AML t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i> taşıyan AML^a
AML (Kİ veya PK $\geq$ %20 blast) veya MDS/AML (Kİ veya Kİ %10-19 blast) olarak belirlenmiş kategoriler
<i>TP53</i> mutant AML Miyelodisplazi ilişkili genlerde mutasyon taşıyan AML <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> ve/veya <i>ZRSR2</i> mutasyonları ile tanımlanır. Miyelodisplazi ilişkili sitogenetik anomali taşıyan AML Başka türlü sınıflandırılmayan AML
Niteleyiciler
Tedavi ilişkili • Önceki kemoterapi, radyoterapi, immün müdahaleler MDS'ye sekonder • MDS, standart tanıyla ve AML tanısından >3 ay önce doğrulanmalıdır MDS/MPN'ye sekonder • MDS/MPN, standart tanıyla ve AML tanısından >3 ay önce doğrulanmalıdır <i>Germline</i> yatkınlık
Miyeloid sarkom

Kİ: Kemik İliği, PK: Periferik Kan.

a: Kemik iliği veya periferik kan blast sayısı $\geq$ %20 olan t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1* taşıyan AML hariç, kemik iliği veya periferik kan blast sayısı $\geq$ %10 gereklidir.

Prognoz tahmininde genetik anormallikleri temel alan risk sınıflaması kullanılmaktadır (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. ELN 2022'ye göre AML risk sınıflaması (13)

Risk kategorisi	Genetik anormallik
İyi	• t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i> • inv(16)(p13.1;q22) veya t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB::MYH11</i> • <i>FLT3</i>-ITD mutasyonu olmadan <i>NPM1</i> mutasyonu • <i>CEBPA</i> bZIP 'in-frame' mutasyon
Orta	• <i>FLT3</i>-ITD mutasyonu ile birlikte <i>NPM1</i> mutasyonu • <i>FLT3</i>-ITD mutasyonu ve yaban tip <i>NPM1</i> (kötü risk faktörü yokluğunda) • t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLL3::KMT2A</i> • İyi veya kötü olarak sınıflandırılmamış sitogenetik ve/veya moleküler anormallik
Kötü	• t(6;9)(p23.3;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i> • t(v;11q23.3)/<i>KMT2A</i>- yeniden düzenlenmesi • t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i> • t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i> • inv(3)(q21.3;q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2, MECOM(EV11)</i> • t(3q26.2;v)/<i>MECOM(EV11)</i> yeniden düzenlenmesi • -5 veya del(5q); -7; -17/abn(17p) • Kompleks karyotip*, monozomal karyotip** • <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> ve/veya <i>ZRSR2</i> mutasyonu • <i>TP53</i> mutasyonu^a

* Kompleks karyotip: sınıfı tanımlanan diğer tekrarlayan genetik anormalliklerin yokluğunda ≥ 3 ilişkisiz kromozomal anormallik; yapısal anormallikleri olmayan üç veya daha fazla trizomili hiperdiploid karyotipler dahil değildir.

** Monozomal karyotip: iki veya daha fazla farklı monozomi varlığı (X veya Y kaybı hariç) veya bir otozomal monozomi ile birlikte en az bir yapısal kromozomal anomali (çekirdek bağlama faktörü (*Core binding factor, CBF*)-AML hariç).

a En az %10 alel fraksiyonunda *TP53* mutasyonu (mono- veya bialelik mutasyon olmasına bakılmaz); *TP53* mutasyonları, kompleks ve monozomal karyotipe sahip AML ile büyük ölçüde ilişkilidir.

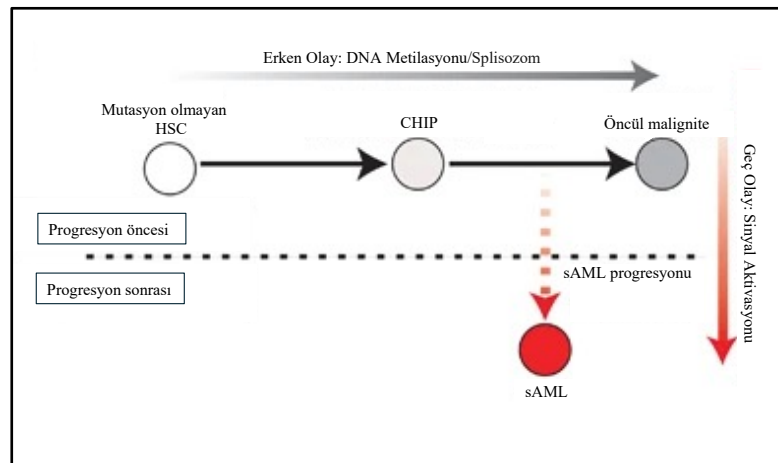
4.2.1. MDS'ye Sekonder AML (AML-MDS)

MDS hastalarının yaklaşık %30'u AML'ye ilerlemektedir; bu durum, kemik iliğindeki blast sayısının ≥ 20 olması ile teşhis edilir (14). Sekonder AML, toplam AML vakalarının %25 ila %35'ini oluşturur; bunların çoğu (yaklaşık %60) önceki bir MDS'den kaynaklanır (10, 12).

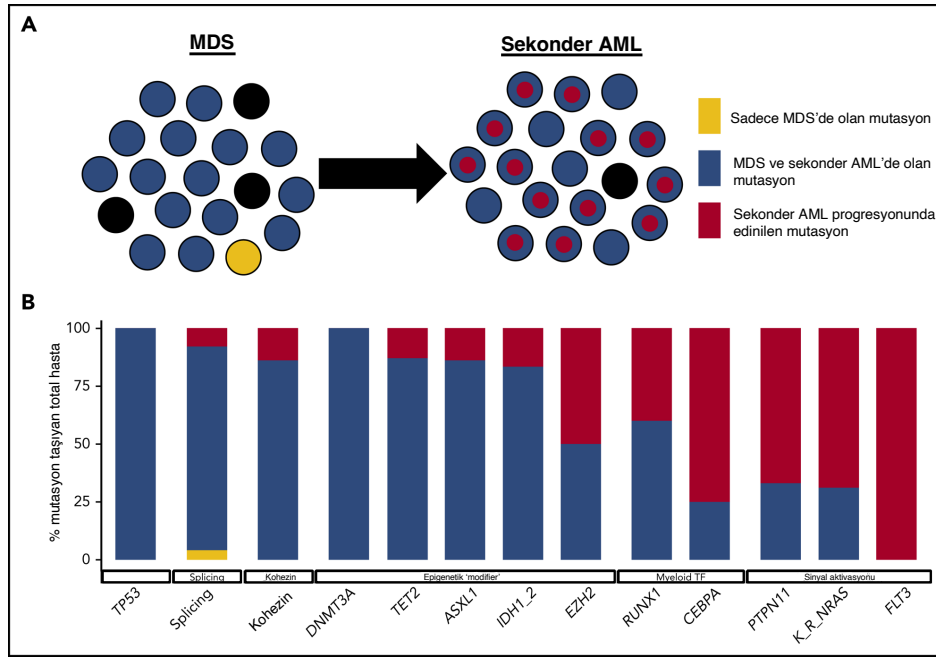
MDS ve AML-MDS arasında hücre biyolojisi, olgunlaşmasında farklılıklar olmasına rağmen, bu iki hastalık genetik olarak ilişkilidir. Bazı sitogenetik anormallikler; del(5q), del(7q), del(20q) ve kompleks karyotip gibi, MDS ile sekonder AML'de ortaktır. MDS ile ilişkili sitogenetik anormallikler, genellikle *de novo* AML'de daha yaygın olan dengeli yeniden düzenlemelerin (örneğin, t(15;17), t(8;21), inv(16) ve *KMT2A* yeniden düzenlemeleri) aksine kopya sayısı değişiklikleridir. MDS ve MDS'ye sekonder AML hücreleri, kromatin modifikasyonu, DNA metilasyonu, RNA eklenmesi, kohezin kompleksi, transkripsiyon

faktörleri, hücre sinyali, DNA hasarı başta olmak üzere aynı işlevsel yollardaki proteinlerin genlerindeki mutasyonları taşırlar. Bu durum, MDS ve AML-MDS'nin ortak bir hastalık süreci olduğunu destekler. Bununla birlikte, MDS ve MDS'ye sekonder AML'deki mutasyona uğramış genlerin sıklığındaki farklılıklar, progresyon sırasında mutasyon edinme sırasının rastgele olmadığını gösterir. Hemen hemen her durumda, hastalığın ilerlemesi klonal evrim ile ilişkilidir. Bu durum diğer hücrelere proliferasyon kapasitesi açısından üstünlük sağlayacak, bir mutasyon kümesine sahip bir alt klonun genişlemesi veya ortaya çıkması olarak tanımlanır. Tümör yükü ve klonal evrimin izlenmesinde kullanılan genetik testler, hastalarda klinik progres olmadan önce bilgi verir (14).

Epigenetik düzenleyiciler (örneğin, *TET2*, *DNMT3A*), *TP53*, splisozom (örneğin *U2AF1*) mutasyonları gibi MDS ve sekonder AML'de yaygın olan değişikliklerin, sekonder AML progresyonundan önce erken dönemde MDS patogenezinde ortaya çıktığı gösterilmiştir (15-17). Tanımlanan genlerdeki mutasyonlar bu durumlar dışında yaş ilişkili klonal hematopoez (*age-related clonal hematopoiesis*, ARCH), belirsiz potansiyele sahip klonal hematopoez (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP) ve *de novo* AML gibi çeşitli klonal hematopoetik hastalıklarda da yaygındır (18, 19). Transkripsiyon faktörü genlerindeki (örneğin, *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*), aktive edici sinyal genlerindeki (örneğin, RAS ailesi genleri, *FLT3*) ve *NPM1* genindeki mutasyonlar MDS ile kıyaslandığında sekonder AML'de daha yaygındır. Buradan yola çıkarak; bu mutasyonların, hastalığın ilerlemesi sırasında daha sonra edinildiği düşünülebilir (20-24) (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Sekonder AML klonal gelişimi (HSC: *hematopoietic stem cells*, hematopoetik kök hücreler, CHIP: *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, belirsiz potansiyele sahip klonal hematopoez) (Kim, T., et al. "The clonal origins of leukemic progression of myelodysplasia." *Leukemia* 31.9 (2017): 1928-1935. adlı makaleden uyarlanmıştır).



Şekil 4.3. MDS'den sekonder AML'ye ilerleme sırasında klonal evrim. Aynı hastalardan önceden yayınlanmış MDS ve sekonder AML örnekleri kullanılmıştır (n = 60) (Menssen, Andrew J., and Matthew J. Walter. "Genetics of progression from MDS to secondary leukemia." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 136.1 (2020): 50-60. adlı makaleden uyarlanmıştır).

MDS'ye sekonder AML hastalarında, miyeloid transkripsiyon faktörü (*RUNX1* ve *ETV6*), kromatin modifiye edici gen (*ASXL1* ve *BCOR*), splisozom kompleksi (*SRSF2* ve *U2AF1*), kohezyon kompleksi (*STAG2*) ve tümör supresör gen (*TP53*) mutasyonları, *de novo* AML hastalarına kıyasla daha yüksek oranda görülmektedir. *De novo* AML grubunda ise *FLT3*-ITD, *NPM1* ve *CEBPA* mutasyonları en sık genetik değişikliklerdir (25).

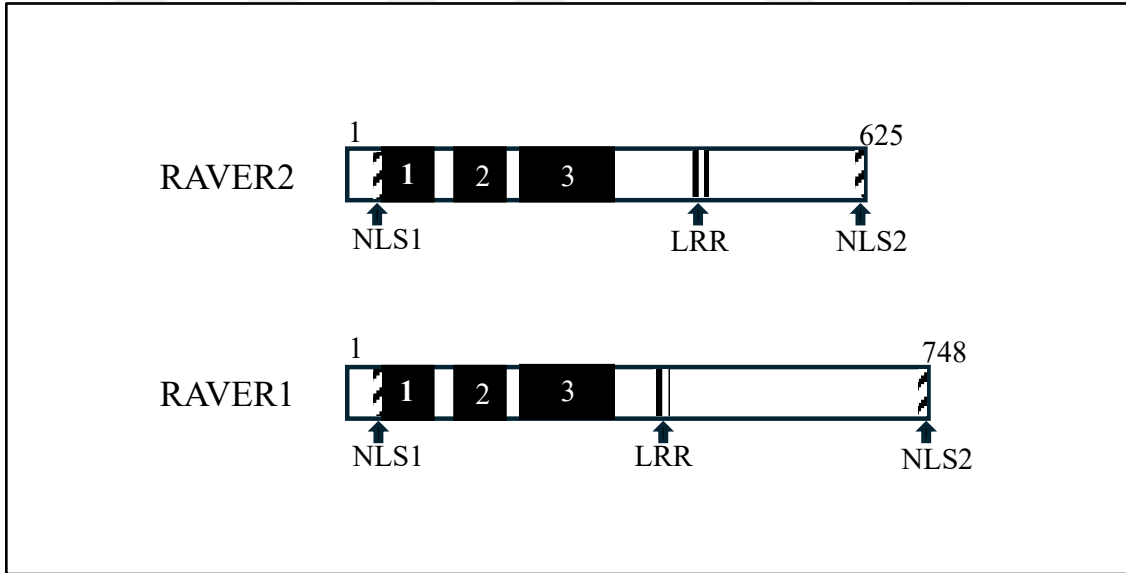
4.3. *RAVER2* geni

Heterojen nükleer ribonükleoproteinler (hnRNP'ler), çoğu RNA tanıma motifleri ile karakterize edilen çeşitli RNA bağlayıcı protein ailesini içerir (26). Bu motifler sadece RNA bağlanmasında işlev görmez, aynı zamanda protein-protein etkileşimlerine aracılık eder. HnRNP'lerin birçoğu nükleer ve sitoplazmik alan arasında geçiş yapabilse de esas olarak çekirdekte bulunur. HnRNP'ler, transkripsiyonel düzenleme, telomer uzunluğunun korunması, immünglobulin gen rekombinasyonu, *splicing*, pre-ribozomal RNA işlenmesi ve 3'-uç işleme gibi çeşitli nükleer olaylara katılır. HnRNP'ler aynı zamanda mRNA'nın nükleositol plazmik

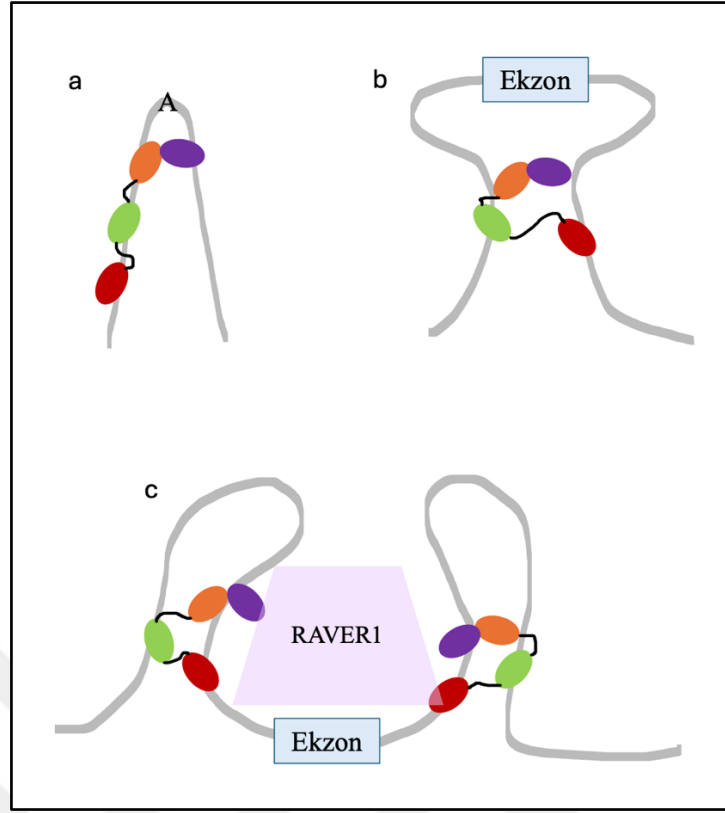
transportu, mRNA lokalizasyonu, translayon ve stabilite gibi çeşitli hücresel süreçlerde de görev almaktadır (27).

HnRNP ailesinde yer alan polipirimidin bağlayıcı protein (PTB, *polypyrimidine tract-binding protein* /hnRNPI) intronun polipirimidinden zengin elementlerine bağlanır (28). PTB *splicing*/alternatif *splicing* represörlerinden biridir (29, 30).

RAVER1, çoğu hücre tipinde çekirdekte lokalize olan, birkaç genin alternatif *splicing* düzenleyicisi olarak görev yapan, PTB ile etkileşime girebilen, her yerde eksprese edilen bir hnRNP' dir (31). Fare dokularında yapılan bir çalışma ile; RAVeR2 genel etki alanı, nükleo-sitoplazmik taşıyım kapasitesi ve PTB-bağlama özelliklerinin RAVeR1 ile benzer olduğu gösterilmiştir. RAVeR2'nin ilk tanımlanması RNA tanıma bölgesinin RAVeR1 ile homoloji göstermesi ile olmuştur. Her iki protein de üç N-terminal RNA tanıma motifi, N- ve C-terminallerinde iki nükleer lokalizasyon sinyali ve merkezi bir lösin açısından zengin bölge dahil olmak üzere ortak işlevsel organizasyona sahiptir (Şekil 4.4.). İkisi de çekirdekte bulunur, ancak sitoplazmaya taşınabilirler. PTB ortak nükleer ligandlarıdır; bu durumda RAVeR1'e benzer şekilde RAVeR2'nin de PTB'nin *splicing* aktivitesinin regülatörü olduğu ileri sürülmüştür (32) (Şekil 4.5.). Padonou ve arkadaşlarının fare timik epiteline yaptıkları çalışmada RAVeR2'nin alternatif *splicing* olaylarını artırdığı gösterilmiştir (33).



Şekil 4.4. RAVeR1 ve RAVeR2 proteinlerinin yapısı (NLS: nükleer lokalizasyon sinyali, 1, 2, 3: RNA tanıma motifleri, LRR: *leucine-rich nuclear export sequence potential*, lösinden zengin nükleer *export* sekansı) (Kleinhenz, Berenike, et al. "Raver2, a new member of the hnRNP family." *FEBS letters* 579.20 (2005): 4254-4258. adlı makaleden uyarlanmıştır).



Şekil 4.5. Ekzon *splicing* represyonunda RNA-PTB etkileşim modelleri. a: Dal noktasındaki adenozinin çevresinde PTB loop oluşumu. b: Loop oluşumu ile alternatif ekzonun atlanması. c: PTB uzak intronlardaki primidin zengin noktalara bağlanarak kofaktör RAVER1 ile işbirliği yaparak alternatif ekzonun inklüzyonunu baskılanması. (Romanelli, Maria Grazia, Erica Diani, and Patricia Marie-Jeanne Lievens. "New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein." *International journal of molecular sciences* 14.11 (2013): 22906-22932. adlı makaleden uyarlanmıştır).

RAVER2'nin, ilk keşfinde farelerde farklılaşmış nöronlar ve gliada eksprese olduğu gösterilse de (32) insanda yapılan ekspresyon çalışmalarında yetişkin dokularda her yerde eksprese edildiği görülmüştür. İnsan *RAVER2* geni 1. kromozom üzerinde 1p31.3 konumunda bulunur (34).

4.3.1. *RAVER2* ve Kanser

Liu ve arkadaşları, hepatoblastomda biyomarker belirlemek için, gen ekspresyonlarını içeren ulusal veri tabanında, hepatoblastomu içeren verileri '*random forest*' ve '*artificial neural network*' yöntemlerini kombine ederek analiz etmişlerdir. Hepatoblastom tümör dokusunda belirgin şekilde ekspresyonu artan genler arasında *RAVER2* geni de yer almıştır (35).

Shi ve arkadaşları 'Gene Expression Omnibus' (GEO) ve 'The Cancer Genome Atlas' (TCGA) veri tabanlarını kullanarak, normal mukoza, kolorektal adenom ve kolorektal kanser mikroRNA ekspresyon profillerini çıkarmışlardır. Ekspresyonu değişen 20 tümörojenik mikroRNA'nın (18 mikroRNA azalmış, 2 mikroRNA artmış ekspresyon) hedef genleri belirlenmiştir. *RAVER2*'nin de tümörojenik mikroRNA'ların hedef genleri arasında olduğu ve tümörde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (36).

Wedler ve arkadaşları, 33 kanser için TCGA'dan aldıkları RNA sekansı (RNA sequencing, RNAseq) verilerini analiz ettiklerinde *RAVER2* ekspresyonunun azaldığını ifade etmişlerdir (37). Holt ve arkadaşları, *RAVER2*'nin sFlt1 (*soluble isoform of tyrosine kinase receptor Flt1*) üretimini artırdığını göstermişlerdir (38). sFlt1 (VEGFR1, *vascular endothelial growth factor receptor 1*) inhibitörleri terapötik olarak kanser ve başka hastalıklarda anjiogenezi azaltmak için kullanılmaktadır (39). Ruta ve arkadaşları, pankreatik duktal adenokarsinom klasik alt tipte *RAVER2* ekspresyonunun yüksek olduğunu göstermişlerdir (40).

Yao ve arkadaşlarının çalışmasında MDS hastaları incelenmiş ve MDS'den AML'ye transformasyon, prognoz tahmini yapılması amaçlanmıştır. MDS hastalarından elde edilen RNA'lardan gen ekspresyon düzeyleri profillenmiştir. LncRNA (*Long non-coding RNA*, uzun kodlamayan RNA) problemleri ile elde edilen veri eşleştirilmiş ve lncRNA'lar içerisinde dört tanesi kullanılarak bir lncRNA risk skoru hesaplaması yapılmıştır. Yüksek ve düşük lncRNA risk skoruna sahip hastalarda gen ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Bu çalışma sonunda yüksek lncRNA risk skoruna sahip grupta AML transformasyonunun daha fazla olduğu ve bu grubun daha kötü prognoz ile seyrettiği sonucuna varılmıştır. Yüksek lncRNA risk skoruna sahip grupta *RAVER2* gen ekspresyonunun artmış olduğu görülmüştür (41).

Genom boyu asosiasyon çalışmalarında (*Genome-wide association studies*, GWAS), atalarına benzer ancak fenotipik olarak farklı olan bireylerdeki genetik varyantların alel frekansındaki farklılıklar test edilerek genotipleri fenotiplerle ilişkilendirmek amaçlanmaktadır. GWAS, insan genomundaki kopya sayısı değişikliklerini veya dizi varyasyonlarını dikkate alabilir, ancak en yaygın olarak incelenen genetik varyantlar tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP'ler, *single-nucleotide polymorphisms*). GWAS tipik olarak genomik risk lokusları olarak adlandırılan, incelenen özellik ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösteren SNP gruplarını bildirir (42). Çeşitli malignitelerde GWAS çalışmaları yapılmaktadır. Lin ve arkadaşları tarafından yapılan GWAS çalışmasında AML duyarlılık lokusu olarak gösterilen lokuslar arasında 1p31.3 de yer almaktadır. Bu lokusta tanımlanan genlerden biri *RAVER2*'dir. Bu çalışmadaki hücre ve doku (kan/kemik iliği) örneklerinin çoğunluğu remisyonadaki AML hastalarından elde edilmiş olup *RAVER2* ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur (43).

Khalaj ve arkadaşlarının çalışmasında hem insan hem de fare hematopoetik kök hücrelerinde *RAVER2*, normal ve malign hematopoetik kök hücrenin kendi kendini yenilemesini düzenleyen miR-99 için hedef genler arasında tanımlanmıştır. Lösemik kök hücrelerde miR-99'un bloke edilmesi durumunda *RAVER2* ifadesinin arttığı gösterilmiştir. miR-99'un inhibe edildiği akut monositik lösemi hücre serisinde ise *RAVER2* ifadesinin etkilenmediği görülmüştür. *RAVER2*'nin monositik hücre hattındaki diferansiasyona katkısının çok olmadığı sonucuna varılmıştır (44).

Si ve arkadaşları 18 hastadan oluşan AML hasta kohortunda, lösemik kök hücreler ve lösemik olmayan kök hücrelerde mikroRNA ekspresyon profiline bakmışlardır. Lösemik kök hücrelerde miR-99a'nın artmış ekspresyon seviyelerinin AML'de genel sağ kalım ve olaysız sağ kalımı kötü etkilediği gösterilmiştir (45).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *RAVER2* ifadesinin, MDS, AML-MDS ve AML hastalarındaki yerinin tam olarak tanımlanamamasının ötesinde birbiriyle uyuşmayan sonuçlar da elde edilmiştir. Tüm malignitelerin olduğu gibi, hematolojik malignitelerin de genetik heterojenitenin görüldüğü karmaşık, çok etkenli hastalıklar oldukları dikkate alındığında, MDS-AML geçişinin tek bir faktöre indirgenmesinin zor olacağı açıktır. Çalışmamızdaki amacımız doğrudan *RAVER2*'yi hedef alarak, bu süreçteki yerini küçük bir örnekleme göstermektir. Çalışma kapsamında MDS, MDS'ye sekonder AML, primer yeni tanı AML ve AML remisyon hasta grupları arasında *RAVER2* geni ekspresyon düzeyleri real-time yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya dahil edilen hastaların, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalına 2016 yılından 2024 yılına kadar gelen kemik iliği örnekleri, rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında alınmış olup hastaların tanısında kullanıldıktan sonra kalan ve yasal olarak arşivlenen bu materyaller, hastaların onamları doğrultusunda çalışmaya dahil edilmiştir.

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilme Ölçütleri:

- 1) Aşağıda belirtilen hastalıklardan en az birinin tanısını almış olmak;
 - a) Miyelodisplastik sendrom
 - b) Miyelodisplastik sendroma sekonder akut miyeloid lösemi
 - c) Primer yeni tanı akut miyeloid lösemi (Akut promiyelositer lösemi dışındaki AML hastaları)
 - d) AML remisyon

- 2) 18 yaşından büyük olmak

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilmeme Ölçütleri:

- 1) Akut promiyelositer lösemi
- 2) 18 yaşından küçük hastalar
- 3) 1. kromozom veya 9. kromozoma ait sayısal anormallik bulundurmamak
- 4) 9. kromozoma ait yapısal anormallik bulunduran vakalarda *ABL1* lokusuna ait floresan in situ hibridizasyon (FISH) incelemesinde anormallik saptanması
- 5) AML remisyon grubundaki hastalarda tanı veya takip aşamasında pozitif olan genetik markerların pozitif olması

5.1. Yöntem Basamakları

- 1- Kemik iliği örneklerinden RNA eldesi
- 2- RNA örneklerinden ters transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA (*complementary DNA*) sentezi
- 3- Real-Time PCR ile *RAVER2* ekspresyonunun değerlendirilmesi
- 4- Real-time PCR ürünlerinin jel elektroforezinde görüntülenmesi

5.1.1. Kemik İliği Örneklerinden RNA Eldesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalında rutin hasta hizmeti kapsamında çalışılan testler çerçevesinde araştırmadaki hastalar iki grupta değerlendirilebilir;

- 1) MDS ve AML hastalarından rutin işlemleri sırasında RNA izolasyonu gerçekleştirilen örnekler bulunmaktadır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim

Dalına kemik iliği örneği kabul edilmiş, aydınlatılmış olur formu alınmış, MDS ve AML hastalarının kemik iliği örneklerinden elde edilmiş arşiv RNA'ları olanlar kullanılmıştır. Bu hastaların rutin tanı işlemleri bitmiş olup, kalan örnekler yasal olarak arşivlenmektedir.

- 2) MDS ve AML hastalarında rutin olarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmemiş hastalar vardır. Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyan MDS ve AML hastalarından, proje kabulünden itibaren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalına kemik iliği örneği kabul edilenlerden önce aydınlatılmış olur formu alındı. Rutin işlemleri sonrasında kalan kemik iliği örneklerinden, RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Sonuç olarak çalışmada kullanılan RNA'lar için iki prosedür kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen arşiv RNA'lar birinci yöntem ile izole edilmiştir. Proje kabulü sonrası dahil edilen hastalarda ise ikinci yöntem kullanıldı. Toplamda 81 hastada birinci yöntem ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olup proje kabulü sonrası izole edilen S8, M5, M12, M16 numaralı hastalarda ise RNA izolasyonunda ikinci yöntem ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

5.1.1.1. RNA Eldesi Birinci Yöntem

Kemik iliği örneklerinden RNA eldesi için birinci yöntemde '*Geneall Hybrid-R Blood RNA*' kiti kullanılmıştır.

Tablo 5.1. RNA eldesi birinci kit içeriği

'Geneall Hybrid-R Blood RNA' Kiti	
<i>RiboExTM LS</i>	50 ml
<i>Buffer RL</i>	50 ml
<i>Buffer RB1</i>	60 ml
<i>Buffer RBW</i>	30 ml
<i>Buffer RNW</i>	30 ml
<i>RNase-free water</i>	15 ml
<i>GeneAll[®] EzPureTM filter</i> (sarı) (toplama tüpü ile birlikte)	50 adet
<i>GeneAll[®] Column type W</i> (mavi halka) (toplama tüpü ile birlikte)	50 adet
1,5 ml toplama tüpü	50 adet

İzolasyona başlamadan önce izolasyonda kullanılacak tampon çözeltiler hazırlanmıştır. 10X *RL Buffer* 450 ml distile su eklenerek 1X'e düşürülmüştür. *RB1 Buffer* 55 ml %96-100 etanol eklenerek çalışma tamponu elde edilmiştir. *RBW Buffer*'a 17 ml %96-100 etanol eklenmiştir. '*RNW Buffer*'a 24 ml %96-100 etanol ilave edilmiştir.

Uygulama yönergesine göre izolasyon aşağıdaki sırayla yapılmıştır:

- 1) Falkon tüpü (15 ml'lik) içine 1 ml kemik iliği eklenmiştir. Falkon tüpünün içerisine 3 ml *RL Buffer* eklenmiştir.
- 2) Tüpler vortekslenmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 600 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- 3) Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tüp içerisine 1 ml *RL Buffer* eklenmiştir. Eklenen tampon ve pelet, pipetaj yardımı ile karıştırılmıştır. Karışım 1,5 mililitrelik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- 4) Oda sıcaklığında üç dakika inkübe edilmiştir. 3000 rpm hızda iki dakika santrifüj edilmiştir.
- 5) Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tüplerin üzerine 250 µl PBS (*Phosphate Buffered Saline*) eklenmiştir. Eklenen PBS ve pelet, pipetaj yardımı ile karıştırılmıştır.
- 6) Tüplerin üzerine 750 µl *RiboEx* eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında iki dakika inkübe edilmiştir.
- 7) Tüplere 200 µl kloroform eklenmiştir. Vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. İki dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüpler 15.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- 8) Aköz faz kitin içinden çıkan *GeneAll EzPure* filtrelelere eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 10000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- 9) Filtrelerin altındaki toplama tüplerine 900 µl *RBI Buffer* eklenmiştir. Pipetaj yapılarak iyice karıştırılmıştır.
- 10) Karışımın 700 µl'si kitin içinden çıkan *GeneAll Column type W* filtrelelere eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 10.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- 11) Tüplere 500 µl *RBW Buffer* eklenmiştir. 10.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 12) Tüplere 500 µl *RNW Buffer* eklenmiştir. 10.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 13) Tüpler fazla yıkama tamponunun uzaklaştırılması için 10.000 x g'de bir dakika santrifüj edilmiştir.
- 14) Kolon membranının ortasına 50 µl *RNase-free water* aktarılmıştır ve 10000 x g'de bir dakika santrifüj edilmiştir.
- 15) Elde edilen RNA'nın derişim ve saflığı spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. RNA örnekleri -80 °C'de saklanmıştır.

5.1.1.2. RNA Eldesi İkinci Yöntem

Kemik iliği örneklerinden RNA eldesi için uygulanan ikinci yöntemde ‘*QIAamp RNA Blood Mini Kit*’ kullanıldı.

Tablo 5.2. RNA eldesi ikinci kit içeriği

‘QIAamp RNA Blood Mini Kit’	
<i>Buffer EL</i>	30 ml
<i>Buffer RLT</i>	45 ml
<i>Buffer RW1</i>	45 ml
<i>Buffer RPE</i>	11 ml
<i>RNase-free water</i>	10 ml
Spin kolon	100 adet
Toplama Tüpü (1,5 ml)	50 adet
Toplama Tüpü (2 ml)	200 adet

İzolasyona başlamadan önce izolasyonda kullanılacak tampon çözeltilerden olan *Buffer RPE* çalışma solüsyonu için 1 volüm tampon konsantresine 4 volüm %96’lık etanol eklendi. 1 ml *Buffer RLT* çözeltilisine, 10 µl β-merkaptoetanol eklenerek çalışma tamponu hazırlandı.

Uygulama yönergesine göre aşağıdaki sırayla işlemler yapıldı:

- 1) EDTA antikoagülan içeren tüpe alınmış olan kemik iliği örneği, 5 katı oranda *Buffer EL* ile 10 ml tüpte karıştırıldı.
- 2) Buz üzerinde 10-15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 2 kez vorteksleyerek karıştırıldı.
- 3) On dakika boyunca 400 x g’de santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
- 4) Hücre peletine kullanılan başlangıç kemik iliği örneğinin iki katı oranında *Buffer EL* eklendi. Kısaca vorteksleyerek hücreler yeniden süspanse edildi.
- 5) On dakika boyunca 400 x g’de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 6) Tablo 5.3.’de belirtilen oranlarda *Buffer RLT* eklendi.

Tablo 5.3. *Buffer RLT* ekleme oranları

<i>Buffer RLT</i> (µl)	Kemik iliği (ml)	Lökosit Sayısı
350	<0.5	2×10^6
600	0,5-1,5	$2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$

- 7) Homojenleştirme için vorteks kullanıldı.
- 8) İki mililitrelik bir toplama tüpünde doğrudan bir spin kolona eklendi ve homojenleştirmek için maksimum hızda iki dakika santrifüj edildi. Spin kolon atıldı ve homojenleştirilmiş lizat saklandı.

- 9) Homojenize lizata 1 hacim (350 µl veya 600 µl) %70 etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- 10) Oluşmuş olabilecek herhangi bir çökelti de dahil olmak üzere dikkatlice numune, 2 mililitrelik bir toplama tüpünde yeni bir spin kolona eklendi. Santrifüj edildi ($\geq 8.000 \times g$ 'de 15 saniye). Maksimum yükleme hacmi 700 µl idi. Numunenin hacmi 700 µl'i aşarsa, spin kolona art arda alikotlar yüklendi. Toplama tüpü atıldı.
- 11) Spin kolon yeni bir 2 ml toplama tüpüne koyuldu. Spin kolon üzerine 700 µl *Buffer RWI* konuldu.
- 12) Santrifüj edildi ($\geq 8.000 \times g$ 'de 15 saniye). Toplama tüpü atıldı.
- 13) Spin kolon, yeni 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi. Spin kolona 500 µl *Buffer RPE* eklendi ve $\geq 8.000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
- 14) Spin kolon dikkatli bir şekilde açıldı ve 500 µl *Buffer RPE* eklendi. Kapağı kapatılıp $20.000 \times g$ 'de üç dakika santrifüj edildi.
- 15) Spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Bir dakika $20.000 \times g$ 'de santrifüj edildi.
- 16) Spin kolon 1,5 mililitrelik bir mikrosantrifüj tüpüne koyuldu ve 30 µl *RNase-free water* eklendi, bir dakika $\geq 8000 \times g$ 'de santrifüj edildi.
- 17) Elde edilen RNA'nın derişim ve saflığı spektrofotometrik olarak değerlendirildi. RNA örnekleri -80°C 'de saklandı.

5.1.2. Ters Transkripsiyon Reaksiyonu ile cDNA Sentezi

Kemik iliği örneklerinden elde edilen RNA'dan '*QuantiTect Reverse Transcription Kit*' kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

- 1) Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu için 200 mikrolitrelik mikrosantrifüj tüplerinde reaksiyon karışımları Tablo 5.4.'de verilen oranlarda hazırlandı.

Tablo 5.4. Genomik DNA eliminasyonu reaksiyon karışımı

Reaktif	1x reaksiyon hacmi
<i>7x gDNA Wipeout Buffer</i>	2 µl
<i>RNase-free Water</i>	12-x µl
RNA Örneği	x µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	14 µl

- 2) Karışım 42°C'de iki dakika inkübe edildi ve hemen buza konuldu. Sonrasında Tablo 5.5.'e göre reaksiyon karışımları hazırlandı.

Tablo 5.5. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı

Reaktif	1x reaksiyon hacmi
5x RT Buffer	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Genomik DNA elimine edilmiş RNA	14 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	20 µl

- 3) Isıl dönüştürücüde (*thermal cycler*) aşağıdaki program ile reaksiyon gerçekleştirildi:
- Ters transkripsiyon basamağı; 42°C'de 15 dakika
 - Reverse transkriptaz enziminin inaktivasyonu; 95°C'de 3 dakika
 - Saklama; 4°C'de sonsuz
- 4) Ters transkripsiyon reaksiyon örnekleri buz üzerine alındı ve real-time PCR reaksiyonu ile devam edildi. Eğer real-time PCR reaksiyonuna hemen devam edilmeyecekse -20°C sıcaklıkta cDNA örnekleri saklandı.

5.1.3. Real-Time PCR ile *RAVER2* Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

RAVER2 geni ekspresyonunun real-time PCR ile kantite edilmesi için '*QuantiNova SYBR Green PCR Kit*' ve '*QuantiNova LNA PCR Assay*' kullanıldı. Her bir örnekte hem hedef gen olan *RAVER2* hem de kontrol gen olan *ABLI* için reaksiyonlar duplike olarak çalışıldı. Bu basamak aşağıdaki sırayla yapıldı:

1. İlk olarak, 200 mikrolitrelik mikrosantrifüj tüplerinde cDNA'lara 19 µl *RNase-free water* eklendi 1:20 oranında seyreltildi. Tablo 5.6.'da verilen oranlardaki reaktifler ile karıştırıldı.

Tablo 5.6. Real-time PCR reaksiyon karışımı

Reaktif	1x Reaksiyon Hacmi
2x SYBR Green PCR Master Mix	5 µl
PCR Primer Mix	1 µl
cDNA Örneği	1 µl
<i>RNase-free water</i>	3 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 µl

2. PCR platelerine karışım dağıtıldı ve oda sıcaklığında nazikçe santrifüj edildi.
3. Real-time PCR '*BioRAD CFX96*' cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:
 - PCR ısıl aktivasyon için 95°C'de 2 dakika

- İki basamaklı döngü (40 döngü)
 - Denatürasyon basamağı; 95°C’de 5 saniye
 - Birleşik *annealing*/uzama; 60°C’de 10 saniye
- *Melting curve* analizi için 60-95°C

Real-time PCR sonrası cihazın yazılımı (*CFX Maestro Software*) kullanılarak hem hedef genin (*RAVER2*) hem de kontrol genin (*ABLI*) Ct (*cycle of threshold*) değerleri hesaplandı. *Threshold* ayarı her çalışma için, tüm çalışmalardaki NTC (*No Template Control*, şablonsuz kontrol) görüntülerine ve reaksiyon eğrilerine uygun olacak şekilde, manuel olarak 14 RFU (*relative fluorescence units*, bağıl floresans birimleri) değerlerine karşılık gelecek biçimde yapıldı.

5.1.4. Real-time Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

Optimizasyon aşamasında uygun ampikonların çoğaltılıp çoğaltılmadığını test etmek amacıyla real-time PCR ürünleri %2’lik agaroz jel elektrofrezinde yürütüldü.

Solüsyonların hazırlanması:

- **5x TBE (1 L):** 54 gr Tris base, 27,5 gr Borik asit ve 20 mL 0,5 mM EDTA karıştırılarak dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon +4°C’de saklandı.
- **1x TBE:** 5x TBE solüsyonu 1:4 oranında dH₂O ile sulandırılarak hazırlandı. Solüsyon +4°C’de saklandı.
- **0,5 M EDTA (100 ml):** 18,61 gr EDTA ve 2 gr NaOH tableti, 80 ml distile su içinde çözündürüldü. pH 8,0 yapılarak dH₂O ile hacim 100 mililitreye tamamlandı. Solüsyon +4°C’de saklandı.
- **Etidyum Bromid (10 ml):** 100 mg Etidyum Bromid, 10 ml distile su içinde vorteks ile karıştırıldı. Alüminyum folyo ile sarılarak +4°C’de saklandı.
- **Yükleme tamponu (1 ml):** 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,025 gr xylene cyanole, 0,3 ml gliserol ve 1 ml’ye tamamlayacak kadar distile H₂O karıştırıldı.

Agaroz jel için; 60 ml 1x TBE ve 1,2 gr agaroz beher tüpte karıştırılarak oluşan çözelti mikrodalga fırında orta (*medium*) ayarda 2 dakika ısıtıldı. Eriyen jel içine 1 µl EtBr (Etidyum Bromid) (10 mg/ml) eklenerek karıştırıldı. Jel, elektrofrez aparatına döküldükten sonra soğumaya bırakıldı. Elektrofrez tankı 1x TBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirildi.

Agaroz jele, 5 µl PCR ürünü 2 µl yükleme tamponu kullanılarak yüklendi. Ürünler, 90 volt (V)’da 60 dakika yürütüldü. Jel, *Kodak Gel 200* cihazında görüntülenerek, *Kodak 1D Image Analysis Software* (Rochester, New York) kullanılarak analiz edildi. Elde edilen bantların boyları, *GeneRuler 50 bp DNA Ladder* kullanılarak kontrol edildi.

5.2. Sonuçların Hesaplanması ve İstatistiksel Analiz

Real-time PCR işlemi her örnekte, hem hedef gen (*RAVER2*) hem de kontrol gen (*ABL1*) için duplike olacak şekilde gerçekleştirildi. Her reaksiyonun sonucunda, 'BioRAD CFX96' cihazının yazılımı kullanılarak her reaksiyona ait Ct değerleri hesaplandı. Hem hedef gen hem de kontrol geni için iki reaksiyondan elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı.

Kantitasyon için $2^{-\Delta Ct}$ kullanıldı (46):

- $\Delta Ct = Ct \text{ (Hedef Gen)} - Ct \text{ (Kontrol Gen)}$ denklemi kullanılarak her bir örneğin Ct değişimi hesaplandı.
- İstatistiksel analiz için her örneğin $2^{-\Delta Ct}$ değerleri kullanıldı.

RAVER2 geni ekspresyon düzeyleri açısından; MDS, MDS'ye sekonder AML, primer yeni tanı AML ve AML remisyon hasta grupları değerlendirilirken verilerin normal dağılıma uygunluğuna Shapiro-Wilk testi kullanılarak bakıldı. Normal dağılıma uygunluk sağlamayan sayısal değişkenler için bağımsız gruplar arası farklılığı incelemek üzere Kruskal-Wallis testi yapıldı. MDS, AML-MDS ve primer yeni tanı AML hastaları gruplara (uluslararası kabul gören kılavuzlardaki genetik belirteçlere göre) ayrıldı. Karşılaştırmada grup sayısı iki olanlarda Mann Whitney U testi, iki üzerinde olanlarda ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Hasta Grubu

Çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalına 2016 yılından 2024 yılına kadar gelen MDS, AML-MDS, yeni tanı primer AML ve AML remisyon olarak takip edilen vakaların kemik iliği örneklerinden yasal olarak arşivlenen materyalleri alınmış olup hastaların onamları doğrultusunda toplamda 85 kişi dahil edildi. Hasta grubuna ait epidemiyolojik bilgiler Tablo 6.1.'de verildi.

Tablo 6.1. Hastaların epidemiyolojik verileri

Hastalık grubu	Kadın Sayısı	Erkek Sayısı	Toplam Hasta Sayısı	Ortalama Yaş (yıl)
MDS	8	13	21	66,8
AML-MDS	10	11	21	59,5
Yeni tanı primer AML	12	10	22	46,9
AML remisyon	11	10	21	43,7

Çalışmaya katılan bireylerin sitogenetik, moleküler sitogenetik, moleküler ve yeni nesil dizilemesine ilişkin sonuçlar Tablo 6.2., Tablo 6.3., Tablo 6.4., Tablo 6.5., Tablo 6.6., Tablo 6.7. ve Tablo 6.8.'de ayrıntılı olarak yazıldı.

Tablo 6.2. MDS grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik	Moleküler Sitogenetik	Moleküler	Yeni Nesil Dizileme
M1	46	E	47,XY,+8[7]/46,XY[7]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	AML paneli ⁹ : normal
M2	63	E	46,XY[20]	MDS paneli ¹ : normal	-	-
M3	84	K	46,XX[16]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
M4	86	K	46,XX[20]	MDS paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
M5	53	E	Yeterli metafaz elde edilemedi.	AML paneli ² : normal	-	MDS paneli ⁴ : <i>RUNX1</i> : c.424 445dupGCTGAGCTGAGAAAT GCTACCG (p.A149fs*2) <i>NFI</i> : c.2033dupC (p.I679fs*21) <i>NFI</i> : c.2T>C (p.M1T)
M6	42	E	46,XY,t(2;11)(p2?;q23)[1]/46,sl,del(5)(q)[29]	AML paneli ⁴ : 5q31 delesiyonu	AML paneli ⁶ : normal	-
M7	61	K	46,XX[20]	MDS paneli ¹ : normal	AML paneli ⁷ : normal	-
M8	78	K	46,XX,del(5)(q)[7]/46,XX[1]	MDS paneli ¹ : 5q31 ve 5q33 delesiyonu	-	-
M9	90	E	45,X,-Y[8]/46,XY[12]	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
M10	71	K	Yeterli metafaz elde edilemedi.	AML paneli ⁴ : 5q31 delesiyonu	AML paneli ⁵ : normal	-
M11	55	E	42-45,XY,del(5)(q),-7,-13,-16,-21,+mar1,+mar2,+mar3,inc[cp15]/46,XY[5]	AML paneli ⁴ : 5q31 delesiyonu, monozomi 7	AML paneli ⁵ : normal	-
M12	55	E	46,XY[20]	MDS paneli ¹ : normal	-	-
M13	69	E	48,XY,+18,+19[5]/46,XY[10]	MDS paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
M14	74	E	45,XY,-7[5]/45,sl,i(17)(q10)[13]/46,XY[1]	MDS paneli ¹ : 17p delesiyonu, monozomi 7, <i>MECOM</i> amplifikasyonu, ayrıca der(3)(atipik füzyon kalıbı)	AML paneli ⁸ : normal	-
M15	76	K	46,XX,del(5)(q)[19]/46,XX[1]	AML paneli ⁴ : 5q31 delesiyonu	AML paneli ⁵ : normal	-
M16	68	E	46,XY[14]	MDS paneli ¹ : normal	-	MDS paneli ⁴ : <i>ASXL1</i> : c.3042delT (p.S1014fs*10) <i>U2AF1</i> : c.101C>T (p.S34F)

Tablo 6.2.(Devam) MDS grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik	Moleküler Sitogenetik	Moleküler	Yeni Nesil Dizileme
M17	69	K	46,XX[17]	MDS paneli ³ : normal	-	-
M18	78	K	46,XX[20]	MDS paneli ¹ : normal	-	-
M19	62	E	46,XY[11]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	AML paneli ⁹ : ASXL1: c.1900_1922delAGAGAGGCGGCCAC CACTGCCAT (p.E635fs*15)
M20	65	E	46,XY,i(17)(q10)[8]/46,XY[1]	AML paneli ¹ : 17p delesiyonu	AML paneli ⁸ : normal	AML paneli ⁹ : normal
M21	58	E	46,XY[20]	MDS paneli ¹ : normal	-	-

AML paneli¹: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31/5q33 delesiyonu, 7q31 delesiyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesiyonu, inv/t(3)(q21q26) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli²: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31/5q33 delesiyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesiyonuna yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli³: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesiyonu, 7q31 delesiyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesiyonu, inv/t(3)(q21q26) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli⁴: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesiyonu, 7q31 delesiyonu, 17p13.1 (*TP53*) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

MDS paneli¹: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31/5q33 delesiyonu, 7q31 delesiyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesiyonu, 20q delesiyonu, trizomi/monozomi 8, trizomi/monozomi 7 değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

MDS paneli²: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesiyonu, 7q31 delesiyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesiyonu, 20q delesiyonu, trizomi/monozomi 8, trizomi/monozomi 7, inv/t(3)(q21q26) d değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

MDS paneli³: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31/5q33 delesiyonu, 7q31 delesiyonu, 20q delesiyonu, trizomi/monozomi 8, trizomi/monozomi 7 değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli⁵: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁶: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁷: *FLT3* ITD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁸: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁹: *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *WT1*, *KIT*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* genlerine yönelik yeni nesil dizileme analizini içermektedir.

MDS paneli⁴: *IDH1*, *NF1*, *NRAS*, *SETBP1*, *DNMT3A*, *ZRSR2*, *U2AF1*, *CALR*, *IDH2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *SRSF2*, *STAG2*, *JAK2*, *TET2*, *EZH2*, *MPL*, *TP53*, *SF3B1*, *CBL* genlerine yönelik yeni nesil dizileme analizini içermektedir.

Yeni nesil dizileme varyant analizinde QIAGEN Clinical Insight yazılımı kullanılmıştır.

VAF'lar %1 altı rapor edilmemiştir.

TIER sınıflaması MDS'ye göre yapılmıştır.

Yeni nesil dizileme yapılan hastalarda patojenik ve olası patojenik varyantlar raporlanmıştır.

Tablo 6.3. MDS grubu hastalarda yeni nesil dizileme analizi ile saptanan mutasyonlar*

Hasta No	Panel	Gen	Mutasyon Noktası	VAF**	Patojenite
M5	MDS paneli	<i>RUNX1</i> (NM_001754.5)	c.424_445dupGCTGAGCTGAGAAATGCTACCG (p.A149fs*2)	%2.54	TIER IA/PATOJENİK
		<i>NFI</i> (NM_001042492.3)	c.2033dupC (p.I679fs*21)	%17	TIERIIC/PATOJENİK
		<i>NFI</i> (NM_001042492.3)	c.2T>C (p.M1T)	%2.13	TIERIIC/OLASI PATOJENİK
M16	MDS paneli	<i>ASXL1</i> (NM_015338.6)	c.3042delT (p.S1014fs*10)	%1.02	TIER IA/OLASI PATOJENİK
		<i>U2AF1</i> (NM_006758.3)	c.101C>T (p.S34F)	%33	TIERIA/PATOJENİK
M19	AML paneli	<i>ASXL1</i> (NM_015338.6)	c.1900_1922delAGAGAGGCGGCCACCACTGCCAT (p.E635fs*15)	%18	TIERIA/PATOJENİK

VAF: Varyant Alel Fraksiyonu

Yeni nesil dizileme varyant analizinde QIAGEN Clinical Insight yazılımı kullanılmıştır.

*Yeni nesil dizileme yapılan hastalarda patojenik ve olası patojenik varyantlar raporlanmıştır.

**VAF'lar %1 altı rapor edilmemiştir.

TIER sınıflaması MDS'ye göre yapılmıştır.

Tablo 6.4. MDS'ye sekonder AML grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik	Moleküler Sitogenetik	Moleküler	Yeni Nesil Dizileme
S1	32	E	46,XY[11]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
S2	52	E	46,XY[20]	AML paneli ² : monozomi 7	AML paneli ⁵ : normal	-
S3	22	K	46,XX[20]	MDS paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : <i>NPM1</i> mutA	AML paneli ⁹ : <i>IDH2</i> : c.419G>A (p.Arg140Gln) <i>IDH1</i> : c.395G>A (p.Arg132His) <i>NPM1</i> : mutA
S4	39	E	47,XY,+8,del(9)(q?)[8]*	AML paneli ² : <i>MLL</i> yeniden düzenlenmesi	AML paneli ⁵ : normal	AML paneli ⁹ : normal
S5	48	K	46,XX,t(6;9)(p22;q34)[19]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁵ : <i>FLT3</i> ITD mutasyonu	AML paneli ⁹ : <i>IDH2</i> : c.419G>A (p.R140Q) <i>FLT3</i> : ITD mutasyonu <i>WT1</i> : c.1119_1120insAG (p.R374fs*7)
S6	80	K	46,XX[20]	MDS paneli ¹ : normal	AML paneli ⁶ : normal	-
S7	69	K	38~44,XX,-5,-7, der(11),del(12)(p),-18,-19,-21,-4mar,inc[cp19]/46,XX[1]	MDS paneli ¹ : <i>MLL</i> amplifikasyonu, monozomi 5, monozomi 7	AML paneli ⁵ : normal	-
S8	77	E	46,XY,del(5)(q)[20]	MDS paneli ¹ : 5q31 ve 5q33 delesyonu	-	MDS paneli ² : <i>TP53</i> : c.524G>A (p.R175H) <i>TP53</i> : c.783-1G>T, <i>TP53</i> : c.760A>T (p.I254F) <i>ASXL1</i> : 1900_1922delAGAGAGGCGGCCACCACTGCCAT (p.E635fs*15)
S9	60	E	45,XY,-7[3]/46,XY[11]	AML paneli ² : monozomi 7	AML paneli ⁷ : normal	AML paneli ⁹ : <i>RUNX1</i> : c.1096_1103delATCGGCAT (p.Ile366fs*?)
S10	74	K	45,XX,-7[2]/46,XX,del(5)(q),inc[1]/46,XX[1]	MDS paneli ¹ : 5q31 ve 5q33 delesyonu, monozomi 7, <i>MECOM</i> yeniden düzenlenmesi (t(3;?)) ve <i>MECOM</i> atipik yeniden düzenlenmesi	AML paneli ⁶ : normal	MDS paneli ² : <i>TP53</i> : c.518T>G (p.Val173Gly) <i>TP53</i> : c.709A>G (p.Met237Val) <i>TET2</i> : c.2224C>T (p.Gln742*)

Tablo 6.4.(Devam) MDS'ye sekonder AML grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik	Moleküler Sitogenetik	Moleküler	Yeni Nesil Dizileme
S11	62	K	46,XX[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁶ : inv(16)(p13q22)	-
S12	80	E	47,XY,+8[5]/47,XY,+mar[2]	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁵ : NPM1 mutA	-
S13	79	K	Yeterli metafaz elde edilemedi.	AML paneli ² : 5q31 ve 5q33 delesyonu, 7q delesyonu/monozomi 7	AML paneli ⁶ : normal	-
S14	64	E	-	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
S15	56	E	46,XY[20]	AML paneli ⁴ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
S16	62	E	46,XY[20]	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
S17	54	K	Yeterli metafaz elde edilemedi.	AML paneli ³ : 7q delesyonu	-	-
S18	86	K	46,XX,inv(3)(q26)[6]	MDS paneli ¹ : inv/t(3)(q26), monozomi 7	AML paneli ⁸ : normal	-
S19	44	K	46,XX[20]	-	-	-
S20	53	E	46,XY[17]	-	AML paneli ⁵ : inv(16)(p13q22)	AML paneli ⁹ : normal
S21	58	E	45,X,-Y[4]/46,XY[13]	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁵ : NPM1 mutA	AML paneli ⁹ : CEBPA: c.950T>C (p.L317P) NPM1: mutA

AML paneli¹: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonu, inv/t(3)(q21q26) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli²: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31/5q33 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonu, inv/t(3)(q21q26) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli³: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonuna yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli⁴: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonuna yönelik FISH analizini içermektedir.

MDS paneli¹: 11q23 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31/5q33 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1(*TP53*) delesyonu, inv/t(3)(q21q26), 20q delesyonu, trizomi/monozomi 8, trizomi/monozomi 7 değişikliklerine yönelik ilgili FISH analizini içermektedir.

AML paneli⁵: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁶: *FLT3* ITD mutasyonu, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁷: *FLT3* ITD mutasyonu, *NPM1* mutasyonu moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁸: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁹: *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *WT1*, *KIT*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* genlerine yönelik yeni nesil dizileme analizini içermektedir.

MDS paneli²: *IDH1*, *NF1*, *NRAS*, *SETBP1*, *DNMT3A*, *ZRSR2*, *U2AF1*, *CALR*, *IDH2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *SRSF2*, *STAG2*, *JAK2*, *TET2*, *EZH2*, *MPL*, *TP53*, *SF3B1*, *CBL* genlerine yönelik yeni nesil dizileme analizini içermektedir.

*ABL1 bölgesine yönelik yapılan FISH incelemesinde dozaj farklılığı görülmemiştir.

Yeni nesil dizileme varyant analizinde QIAGEN Clinical Insight yazılımı kullanılmıştır.

TIER sınıflaması AML'ye göre yapılmıştır.

Yeni nesil dizileme yapılan hastalarda patojenik ve olası patojenik varyantlar raporlanmıştır.

VAF'lar %1 altı rapor edilmemiştir.

Tablo 6.5. MDS'ye sekonder AML grubu hastalarda yeni nesil dizileme analizi ile saptanan mutasyonlar*

Hasta No	Panel	Gen	Mutasyon Noktası	VAF**	Patojenite
S3	AML paneli	IDH2(NM_002168.4)	c.419G>A p.Arg140Gln	%8.94	TIER IA / PATOJENİK
		IDH1(NM_005896.4)	c.395G>A p.Arg132His	%1.51	TIER IA/ PATOJENİK
		NPM1(NM_199185.4)	c.773_776dupTCTG p.Trp259fs*?	%37	TIER IA / PATOJENİK
S5	AML paneli	IDH2(NM_002168.4)	c.419G>A p.R140Q	%46	TIER IA/PATOJENİK
		FLT3(NM_004119.3)	c.1833_1834insACGCACGAGTACTTCTACGT TGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAA TGGGAGTTTCCAAGAGAAAAATTTAGAG p.E611_F612ins*	%11	TIER IA/ PATOJENİK
		WT1(NM_024426.6)	c.1119_1120insAG p.R374fs*7	%14	TIER IIC/ OLASI PATOJENİK
S8	MDS paneli	TP53(NM_000546.6)	c.524G>A p.R175H	%15	TIERIA/PATOJENİK
			c.783-1G>T	%1.49	TIERIA/PATOJENİK
			c.760A>T p.I254F	%1.4	TIERIA/PATOJENİK
		ASXL1(NM_015338.6)	1900_1922delAGAGAGGCGGCCACCACTGCCAT p.E635fs*15	%1.61	TIERIB/PATOJENİK
S9	AML paneli	RUNX1(NM_001754.5)	c.1096_1103delATCGGCAT p.Ile366fs*?	%1.42	TIER IA/OLASI PATOJENİK
S10	MDS paneli	TP53(NM_000546.6)	c.518T>G p.Val173Gly	%18	TIERIA/PATOJENİK
			c.709A>G p.Met237Val	%18	TIERIA/PATOJENİK
		TET2(NM_001127208.3)	c.2224C>T p.Gln742*	%1.92	TIER IIC/OLASI PATOJENİK
S21	AML paneli	CEBPA(NM_004364.5)	c.950T>C (p.L317P)	%31	TIER IIC/OLASI PATOJENİK
		NPM1(NM_002520.7)	c.860_863dupTCTG (p.W288fs*?)	%36	TIER IA/PATOJENİK

VAF: Varyant Alel Fraksiyonu

Yeni nesil dizileme varyant analizinde QIAGEN Clinical Insight yazılımı kullanılmıştır.

TIER sınıflaması AML'ye göre yapılmıştır.

*Yeni nesil dizileme yapılan hastalarda patojenik ve olası patojenik varyantlar raporlanmıştır.

**VAF'lar %1 altı rapor edilmemiştir.

Tablo 6.6. Yeni tanı primer AML grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik	Moleküler Sitogenetik	Moleküler	Yeni Nesil Dizileme [^]
Y1	28	E	46,XY[10]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : <i>FLT3</i> ITD mutasyonu	AML paneli ⁷ : <i>FLT3</i> ITD mutasyonu <i>WT1</i> : c.1152_1153insGGTCCTTGTA (p.R385fs*) <i>WT1</i> : c.1150_1151delGT (p.V384fs*) <i>WT1</i> : c.1151_1152insCCTTGT (p.L383_V384dup)
Y2	21	E	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[9]/46,XY[4]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : t(8;21)(q22;q22)	-
Y3	26	E	Yeterli metafaz elde edilemedi.	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : normal	-
Y4	26	E	-	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : normal	AML paneli ⁷ : <i>FLT3</i> ITD mutasyonu <i>WT1</i> : c.1146_1156dupTCTTGTACGGT (p.S386fs*72)
Y5	24	K	46,XX[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : normal	AML paneli ⁷ : <i>CEBPA</i> : c.923_927delTGGAGinsCCACTTCC (p.V308_E309delinsATS) <i>CEBPA</i> : c.268A>T (p.Lys90Ter)
Y6	42	K	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[8]/46,XX[12]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : t(8;21)(q22;q22)	-
Y7	21	K	Yeterli metafaz elde edilemedi.	-	AML paneli ⁴ : inv(16)(p13q22)	AML paneli ⁷ : normal
Y8	84	K	45,XX,del(4)(p),-17,-18,+mar[1]	AML paneli ¹ : monozomi 17	AML paneli ⁵ : normal	-
Y9	73	K	41~43,X,-X,der(4),-5,-7,der(8),der(10)add(10)(p),-12,-16,del(17)(p),der(19)add(19)(q),+21,der(22)(p),+mar1,+mar2,inc[cp17]/46,XX[3]	AML paneli ¹ : monozomi 5 ve 17p delesyonu	AML paneli ⁴ : normal	-
Y10	29	K	Yeterli metafaz elde edilemedi.	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : <i>FLT3</i> ITD mutasyonu	-

Tablo 6.6. (Devam) Yeni tanı primer AML grubu hastaların yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik	Moleküler Sitogenetik	Moleküler	Yeni Nesil Dizileme [^]
Y11	51	K	46,XX[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : <i>FLT3</i> TKD mutasyonu	AML paneli ⁷ : <i>FLT3</i> TKD mutasyonu
Y12	27	E	46,XY[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁴ : <i>NPM1</i> mutA	-
Y13	62	E	46,XY[20]	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁴ : normal	-
Y14	66	E	46,XY[19]	AML paneli ¹ : <i>MLL</i> amplifikasyonu	AML paneli ⁴ : normal	AML paneli ⁷ : <i>RUNX1</i> : c.593A>G (p.Asp198Arg) <i>FLT3</i> ITD mutasyonu
Y15	58	K	46,XX[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : inv (16)(p13q22)	AML paneli ⁷ : normal
Y16	50	E	46,XY[21]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : normal	-
Y17	62	E	46,XY[3]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁶ : normal	-
Y18	72	K	47,XX,inv(9)(p12q13),+13[14]/46,XX,inv(9)(p12q13)[6]	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁴ : normal	-
Y19	43	K	46,XX[20]	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁴ : normal	-
Y20	81	K	46,XX[12]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁴ : <i>NPM1</i> mutA	-
Y21	45	K	46,XX[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-
Y22	41	E	46,XY[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : <i>FLT3</i> ITD mutasyonu, <i>NPM1</i> mutA	AML paneli ⁷ : <i>NPM1</i> mutA <i>FLT3</i> ITD mutasyonu

AML paneli¹: 11q23.3 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31/5q33 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonu, inv/t(3)(q21q26) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli²: 11q23.3 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonuna yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli³: 11q23.3 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonu, inv/t(3)(q21q26) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli⁴: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁵: *FLT3* ITD mutasyonu, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁶: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁷: *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *WT1*, *KIT*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* genlerine yönelik yeni nesil dizileme analizini içermektedir.

[^]: Yeni nesil dizileme yapılan hastalarda patojenik ve olası patojenik varyantlar tabloya eklenmiştir.

Yeni nesil dizileme varyant analizinde QIAGEN Clinical Insight yazılımı kullanılmıştır.

TIER sınıflaması AML'ye göre yapılmıştır.

**VAF'lar %1 altı rapor edilmemiştir.

Tablo 6.7. Yeni tanı primer AML grubu hastalarında yeni nesil dizileme analizi ile saptanan mutasyonlar*

Hasta No	Panel	Gen	Mutasyon Noktası	VAF**	Patojenite
Y1	AML paneli	<i>FLT3</i> (NM_004119.3)	c.1791_1792insCAGGGGTTTTTGGTAGAATAT (p.Y597_E598insQGFLVEY)	%44	TIER IA/ PATOJENİK
		<i>WT1</i> (NM_024426.6)	c.1152_1153insGGTCCTTGTA (p.R385fs*8)	%43	TIER IIC/ PATOJENİK
			c.1150_1151delGT (p.V384fs*)	%52	TIER IIC/ OLASI PATOJENİK
			c.1151_1152insCCTTGT (p.L383_V384dup)	%1.15	TIER IIC/ OLASI PATOJENİK
Y4	AML paneli	<i>FLT3</i> (NM_004119.3)	c.1798_1799insGCCCCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATG (p.Y599_D600ins*)	%3.50	TIER IA/ PATOJENİK
			c.1757_1837dupATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATG AATATGATCTCAAATGGGAGTTTCCAAGAGAAAATTTAGAGTTTG (p.D586_F612dup*)	%2.78	TIER IA/ PATOJENİK
		<i>WT1</i> (NM_024426.6)	c.1146_1156dupTCTTGTACGGT (p.S386fs*72)	%1.92	TIER IIC/ OLASI PATOJENİK
Y5	AML paneli	<i>CEBPA</i> (NM_004364.5)	c.923_927delTGGAGinsCCACTTCC (p.V308_E309delinsATS)	%38	TIER IA/ OLASI PATOJENİK
			c.268A>T (p.Lys90Ter)	%45	
Y11	AML paneli	<i>FLT3</i> (NM_004119.3)	c.2504A>C (p.D835A)	%14	TIER IA/ PATOJENİK
			c.2505T>G (p.D835E)	%3.36	TIER IA/ PATOJENİK
			c.2508_2510delCAT (p.I836del)	%1.01	TIER IA/ PATOJENİK
Y14	AML paneli	<i>RUNX1</i> (NM_001754.5)	c.593A>G (p.Asp198Arg)	%37	TIER IA/ PATOJENİK
		<i>FLT3</i> (NM_004119.3)	c.1809_1810insAATGAATATGATCTCAAATGG (p.W603_E604insNEYDLKW)	%23	TIER IA/ PATOJENİK
Y22	AML paneli	<i>NPM1</i> (NM_199185.4)	c.773_776dupTCTG (p.Trp259fsTer)	%35	TIER IA/ PATOJENİK
		<i>FLT3</i> (NM_004119.3)	c.1754_1795dupCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAAT (p.Ser585_Glu598dup)	%28	TIER IA/ PATOJENİK

VAF: Varyant Alel Fraksiyonu

Yeni nesil dizileme varyant analizinde QIAGEN Clinical Insight yazılımı kullanılmıştır.

TIER sınıflaması AML'ye göre yapılmıştır.

*Yeni nesil dizileme yapılan hastalarda patojenik ve olası patojenik varyantlar raporlanmıştır.

**VAF'lar %1 altı rapor edilmemiştir.

Tablo 6.8. AML remisyon grubu hastalarının yaş, cinsiyet, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve yeni nesil dizileme analizi bilgileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik	Moleküler Sitogenetik	Moleküler	Yeni Nesil Dizileme	Nakil bilgisi
R1	35	E	46,XY[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : normal	-	+
R2	67	K	46,XX[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁴ : normal	AML paneli ⁹ :normal	?
R3	51	K	46,XX[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	-
R4	29	E	46,XY[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁶ : normal	-	?
R5	44	K	46,XX[15]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	+
R6	56	K	46,XX[14]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	-
R7	32	E	46,XY[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁴ : normal	AML paneli ⁹ :normal	+
R8	62	K	46,XY[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	+
R9	39	E	46,XY[21]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁷ : normal	-	?
R10	27	E	46,XX[21]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁷ : normal	-	+
R11	48	E	46,XY[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁴ : normal	-	+
R12	23	E	46,XX[10]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	+
R13	26	E	46,XY[16]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	?
R14	42	K	46,XY[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁴ : normal	AML paneli ⁹ :normal	+
R15	62	E	46,XY[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁶ : normal	-	?
R16	49	K	Yeterli metafaz elde edilemedi.	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁸ : normal	-	+
R17	23	E	46,XY[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	?
R18	53	K	46,XX[20]	AML paneli ¹ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	+
R19	26	K	46,XX[11]	AML paneli ³ : normal	AML paneli ⁵ : normal	-	?
R20	62	K	46,XY[20]	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁷ : normal	AML paneli ⁹ : normal	?
R21	62	K	Yeterli metafaz elde edilemedi.	AML paneli ² : normal	AML paneli ⁵ : normal	AML paneli ⁹ : normal	-

AML paneli¹: 11q23.3 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonu, inv/t(3)(q21q26) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli²: 11q23.3 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31/5q33 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonu, inv/t(3)(q21q26) değişikliklerine yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli³: 11q23.3 (*MLL*) yeniden düzenlenmesi, 5q31 delesyonu, 7q31 delesyonu, 17p13.1 (*TP53*) delesyonuna yönelik FISH analizini içermektedir.

AML paneli⁴: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁵: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁶: *FLT3* ITD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁷: *FLT3* ITD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁸: *FLT3* ITD/TKD mutasyonları, *NPM1* mutasyonu, t(8;21)(q22;q22), inv (16)(p13q22) moleküler analizlerini içermektedir.

AML paneli⁹: *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *WT1*, *KIT*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* genlerine yönelik yeni nesil dizileme analizini içermektedir.

?: Nakil bilgisi net öğrenilemeyen hastalar için kullanılmıştır.

Yeni nesil dizileme varyant analizinde QIAGEN Clinical Insight yazılımı kullanılmıştır.

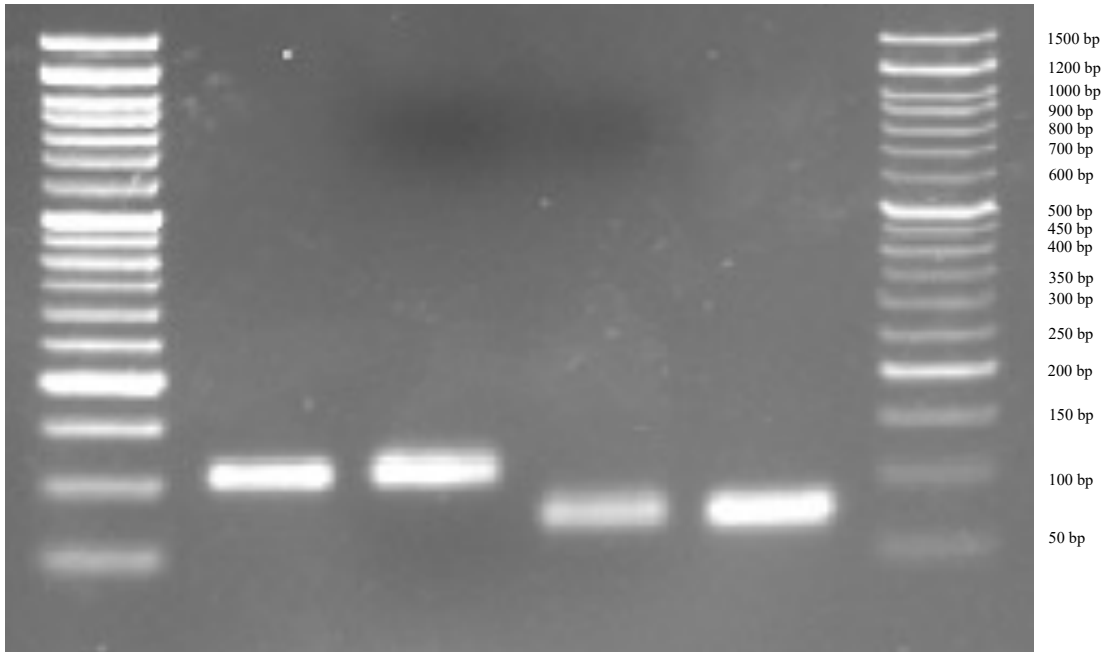
Yeni nesil dizileme yapılan hastalarda patojenik ve olası patojenik varyantlar raporlanmıştır.

**VAF'lar %1 altı rapor edilmemiştir.

6.2. *RAVER2* ve *ABL1* ekspresyon çalışması

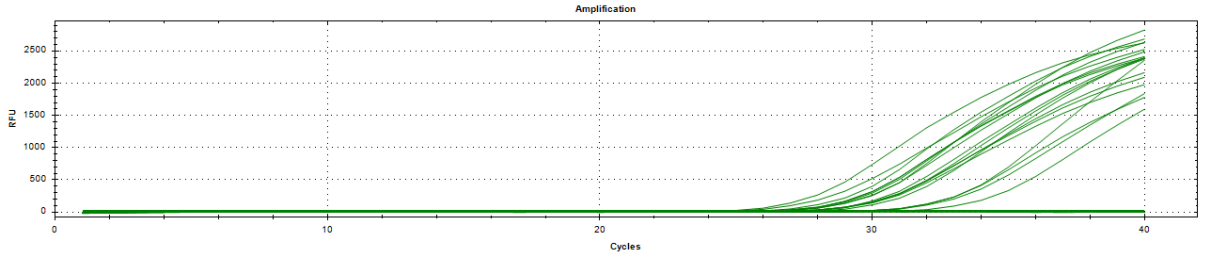
Çalışmaya dahil edilen örneklerde hem hedef gen olan *RAVER2* hem de normalizasyon için kullanılan *ABL1* için duplike ekspresyon çalışması yapıldı. Ct değerleri duplike çalışmalar sonucunda uyumsuz olduğu (± 2 sınır olarak koyuldu) durumda çalışma tekrarlandı.

Optimizasyon aşamasında real-time PCR ürünleri jel elektroforezinde görüntülendi. Bir örnek Şekil 6.1.'de gösterildi. Amplikon boyları *RAVER2* real-time PCR ürünü için 108 baz çifti, *ABL1* real-time PCR ürünü için 75 baz çifti ile uyumlu olarak '*Quantinova LNA PCR Assay Product Data Sheet*' inde belirtildiği boyda çıktı.

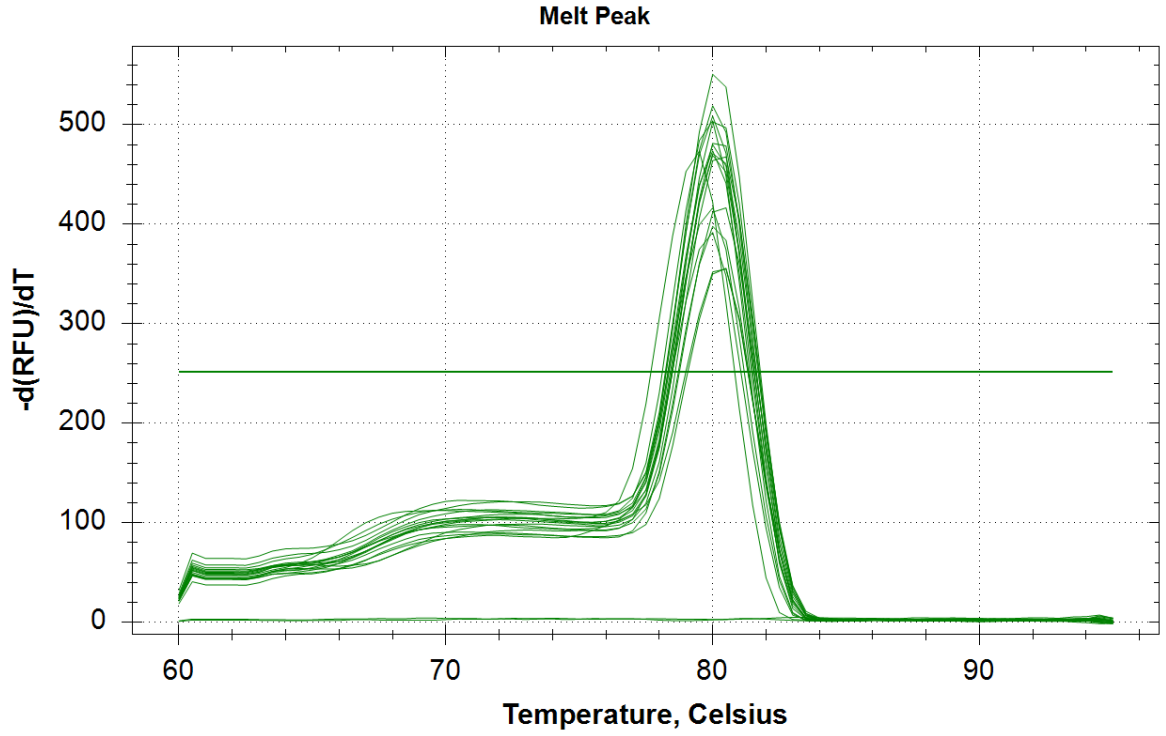


Şekil 6.1. Real-time PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. Soldan sağa; ladder, Y22 numaralı hasta *RAVER2*, Y5 numaralı hasta *RAVER2*, Y5 numaralı hasta *ABL1*, Y22 numaralı hastanın *ABL1* real-time PCR ürünleri, ladder.

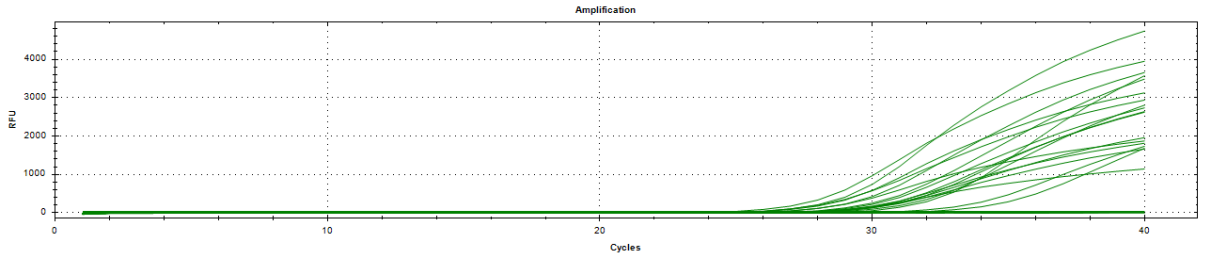
Yapılan çalışmalardan elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 6.2., Şekil 6.4., Şekil 6.6., Şekil 6.8., Şekil 6.10., Şekil 6.12., Şekil 6.14, Şekil 6.16.'da gösterildi. Ayrıca Şekil 6.3., Şekil 6.5., Şekil 6.7., Şekil 6.9., Şekil 6.11., Şekil 6.13., Şekil 6.15., Şekil 6.17.'de *melting curve* görüntüleri verildi.



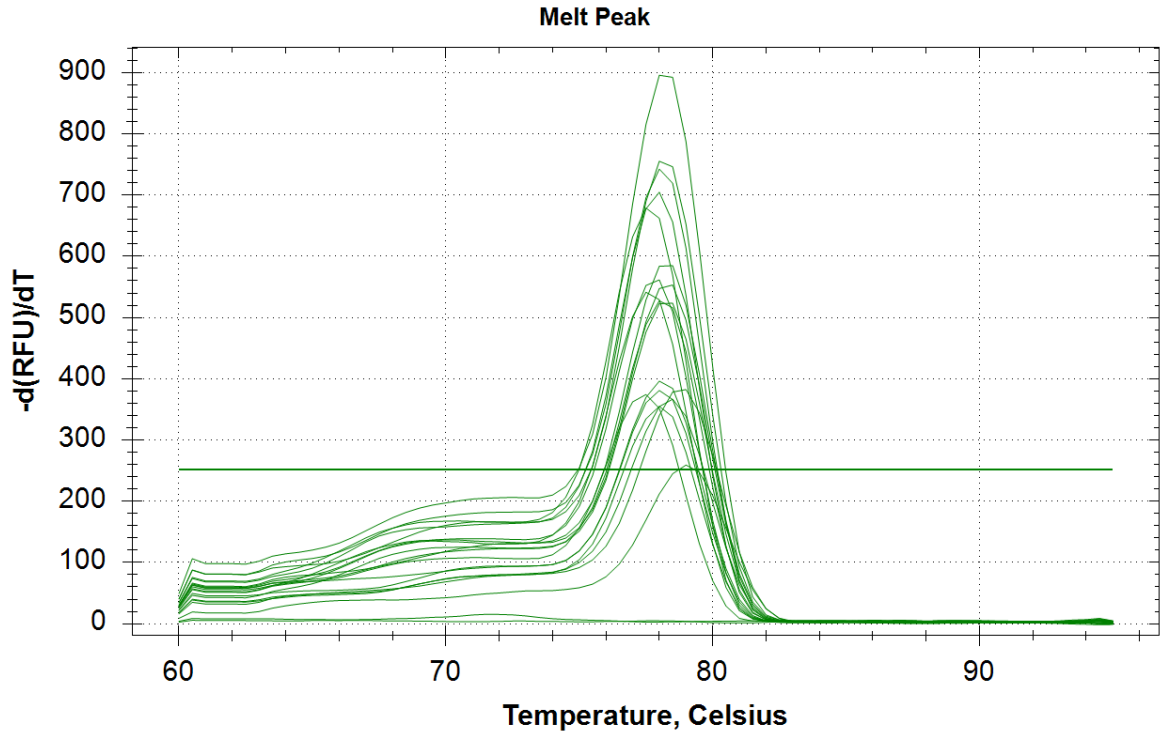
Şekil 6.2. M6, M7, S12, S13, S14, S15, Y11, Y12, Y13 hastalarındaki *RAVER2* amplifikasyon eğrileri



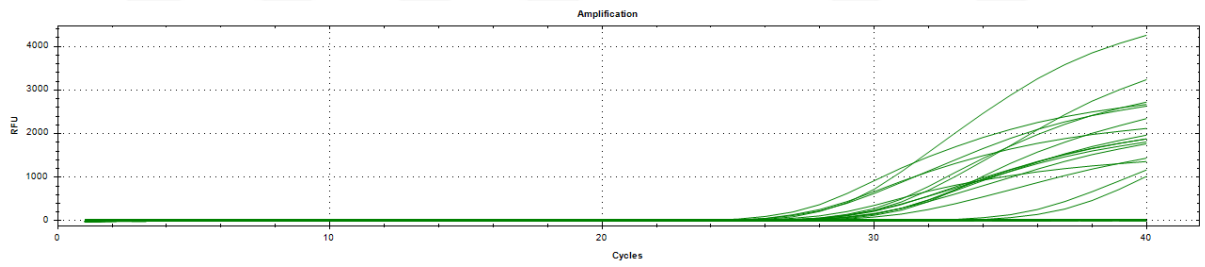
Şekil 6.3. M6, M7, S12, S13, S14, S15, Y11, Y12, Y13 hastalarındaki *RAVER2* melting curve görüntüleri



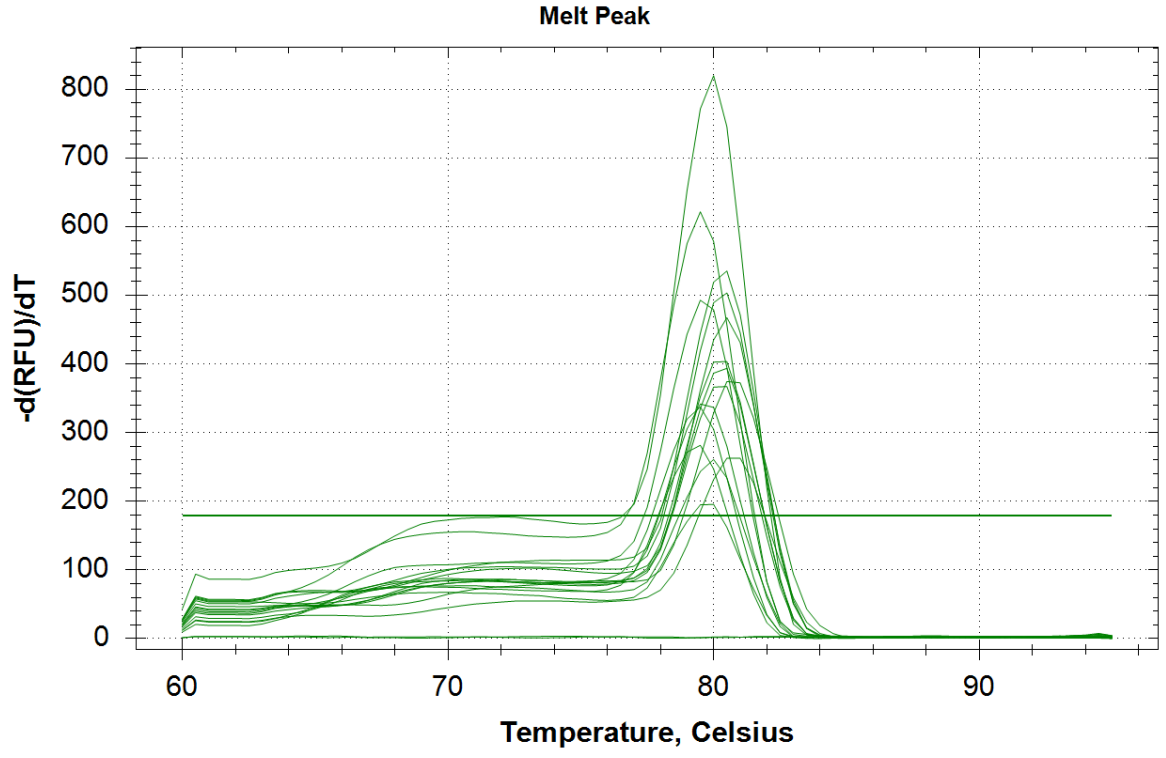
Şekil 6.4. M6, M7, S12, S13, S14, S15, Y11, Y12, Y13 hastalarındaki *ABL1* amplifikasyon eğrileri



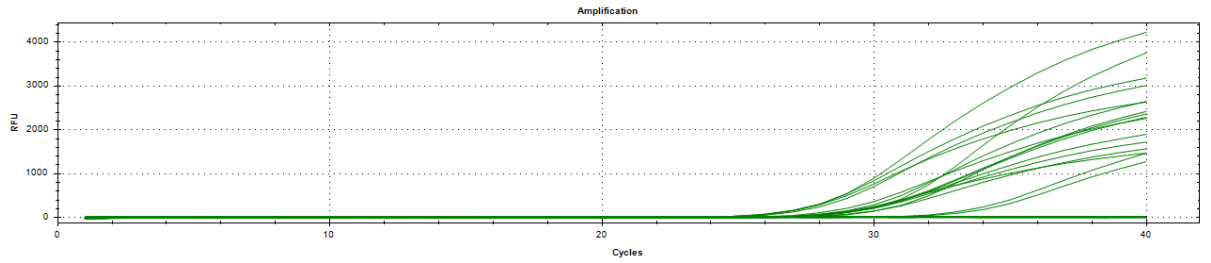
Şekil 6.5. M6, M7, S12, S13, S14, S15, Y11, Y12, Y13 hastalarındaki *ABL1* melting curve görüntüleri



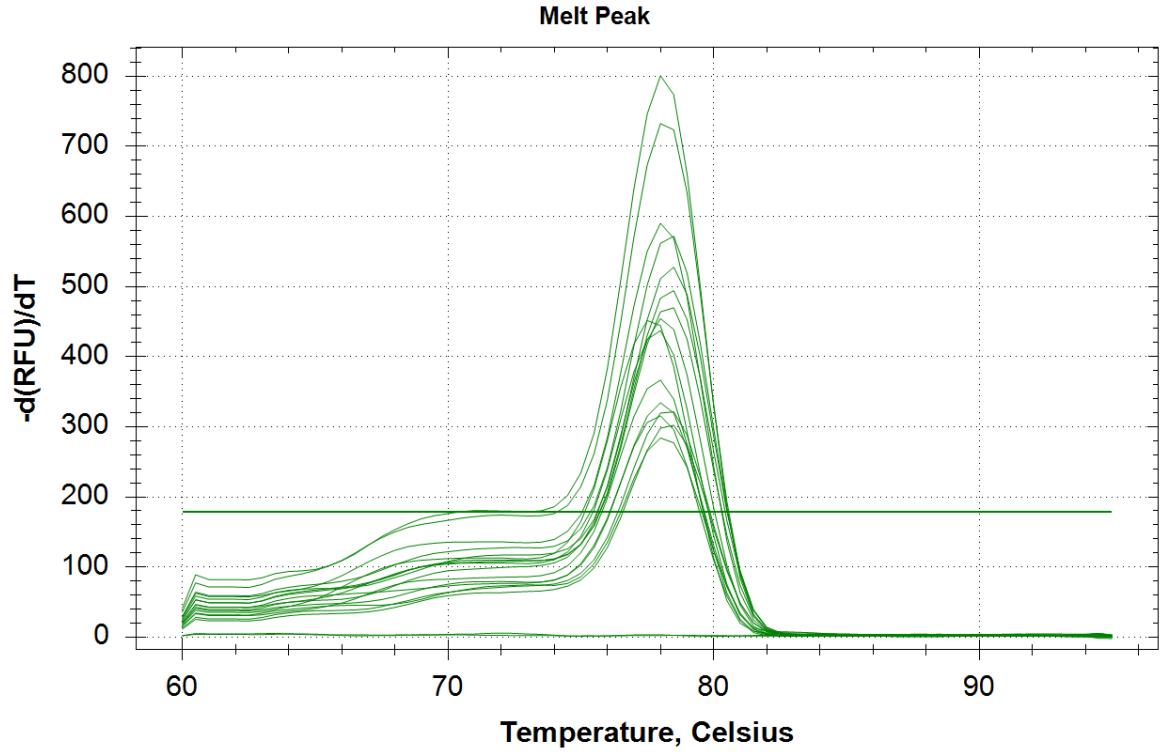
Şekil 6.6. M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15 hastalarındaki *RAVER2* amplifikasyon eğrileri



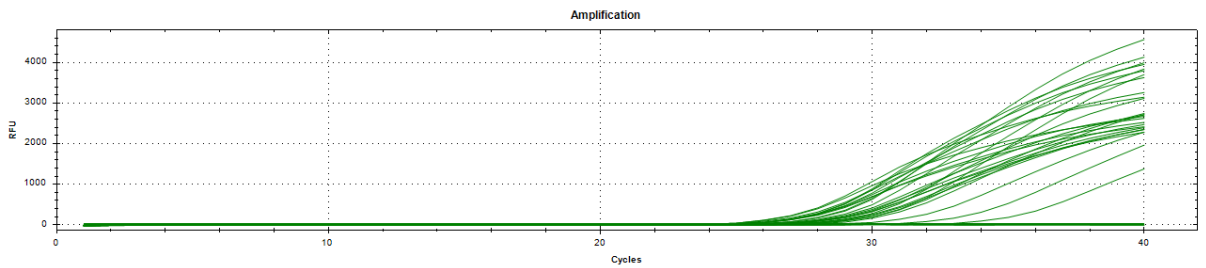
Şekil 6.7. M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15 hastalarındaki *RAVR2* melting curve görüntüleri



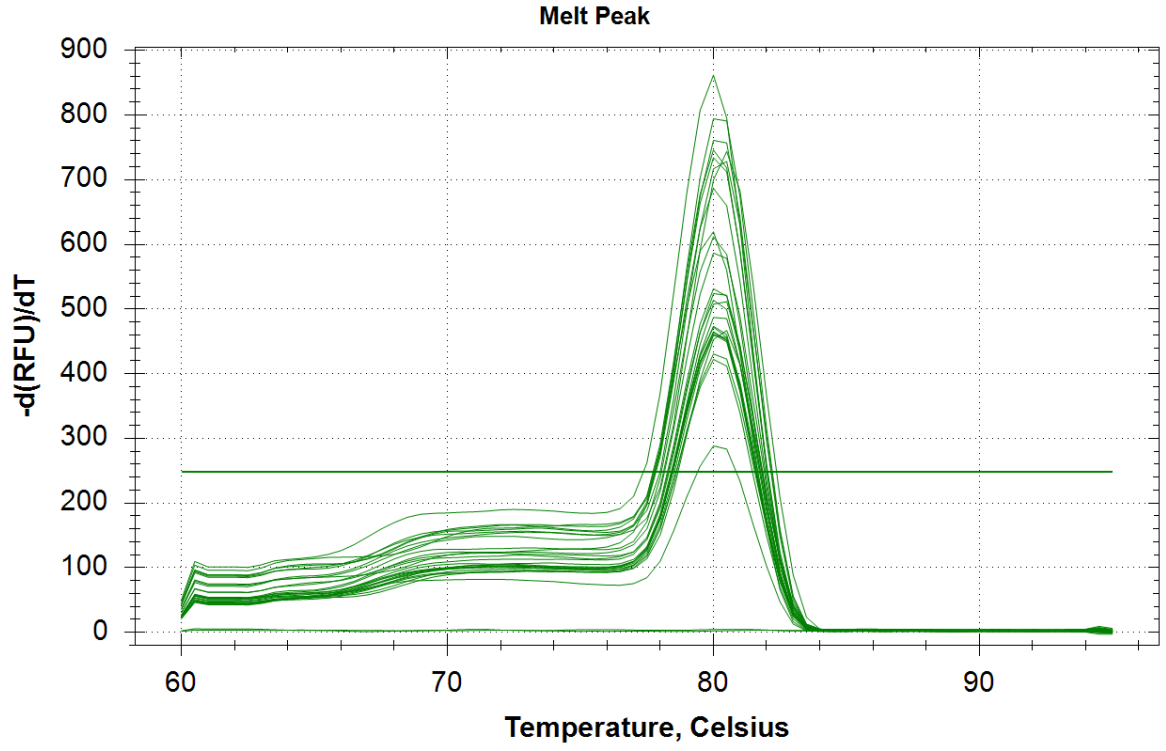
Şekil 6.8. M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15 hastalarındaki *ABL1* amplifikasyon eğrileri



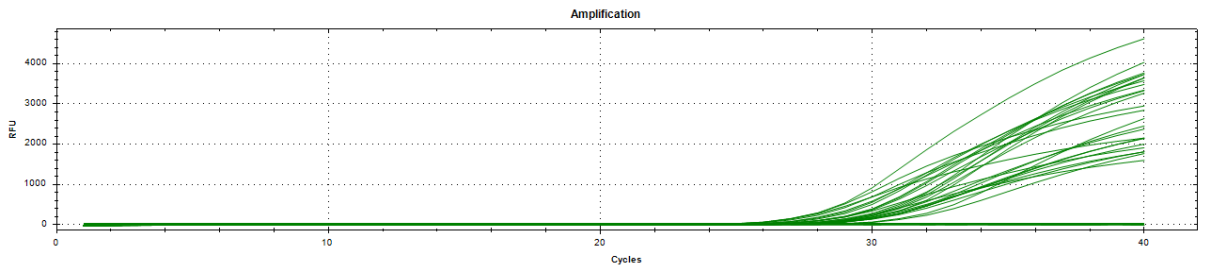
Şekil 6.9. M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15 hastalarındaki *ABL1* melting curve görüntüleri



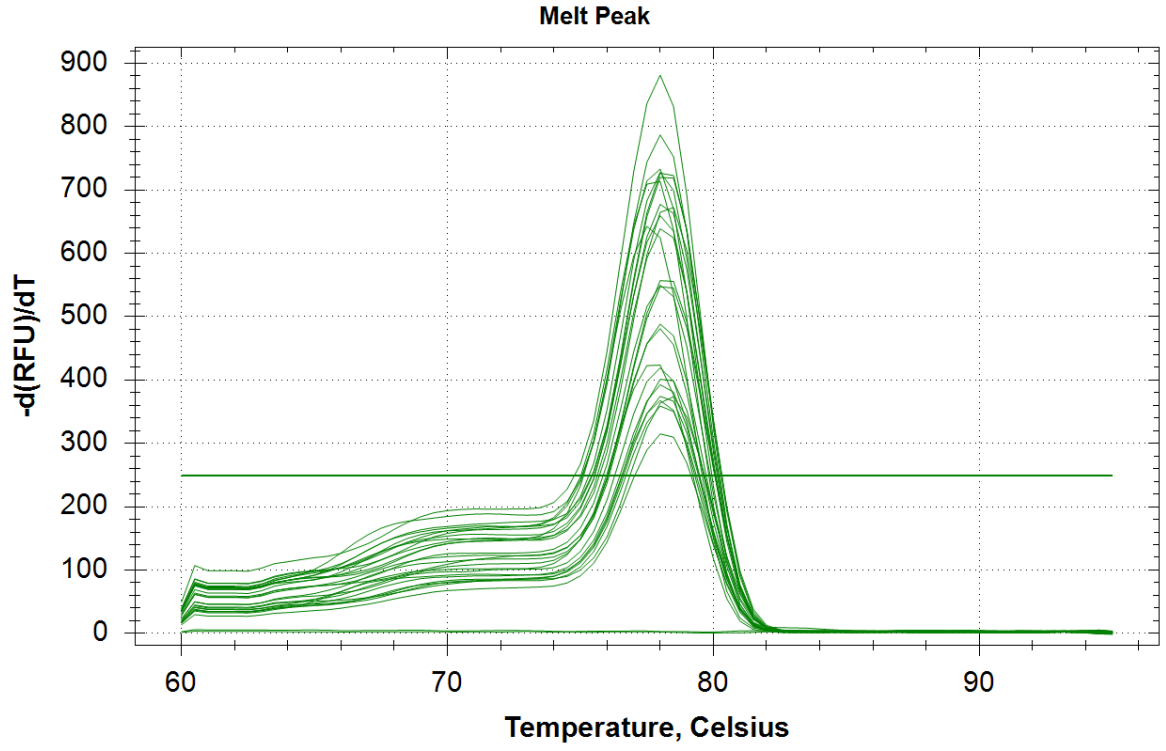
Şekil 6.10. Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, R5, R6, R7, R8, S4, S5, S6 hastalarındaki *RAVR2* amplifikasyon eğrileri



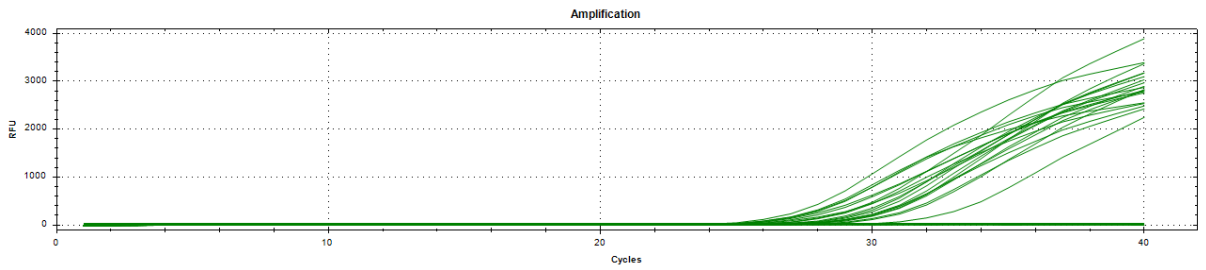
Şekil 6.11. Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, R5, R6, R7, R8, S4, S5, S6 hastalarındaki *RAVER2* melting curve görüntüleri



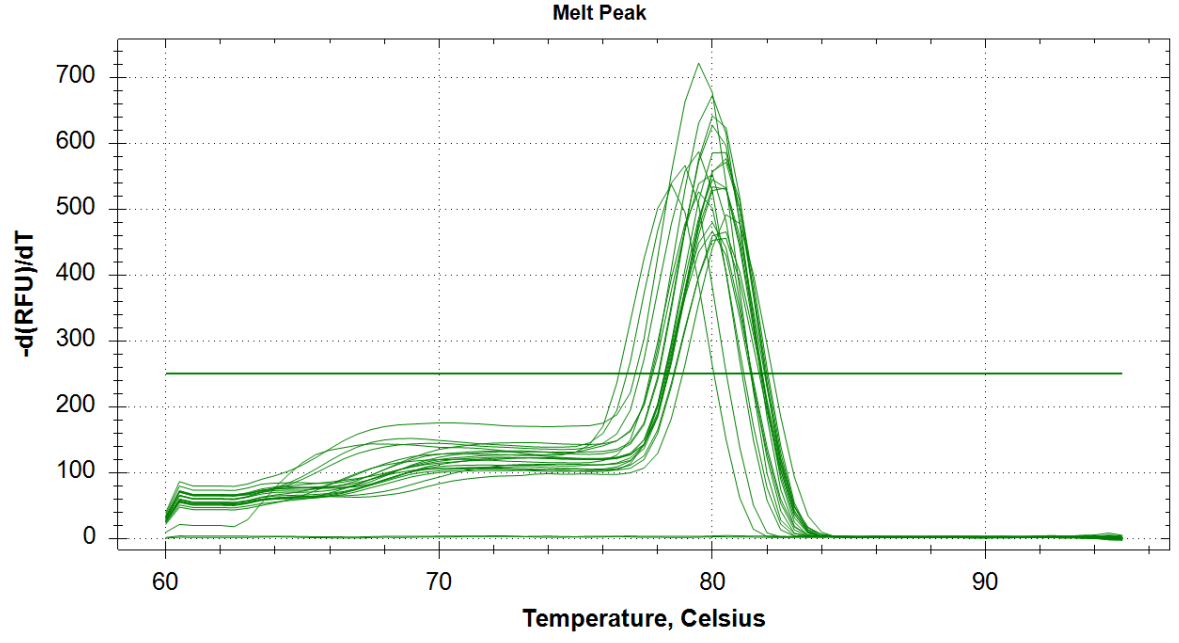
Şekil 6.12. Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, R5, R6, R7, R8, S4, S5, S6 hastalarındaki *ABL1* amplifikasyon eğrileri



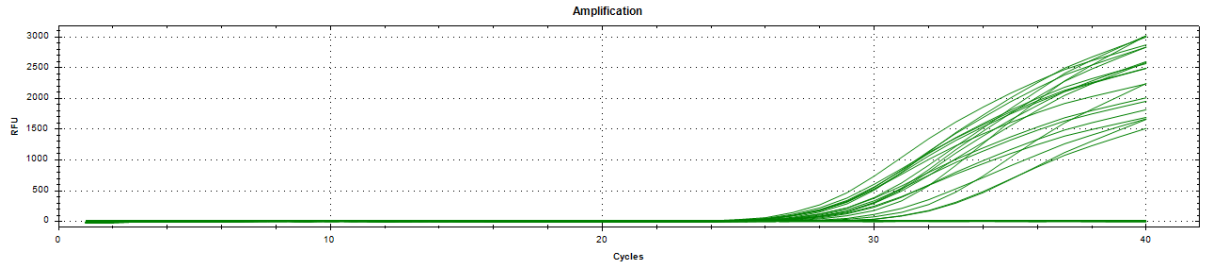
Şekil 6.13. Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, R5, R6, R7, R8, S4, S5, S6 hastalarındaki *ABL1* melting curve görüntüleri



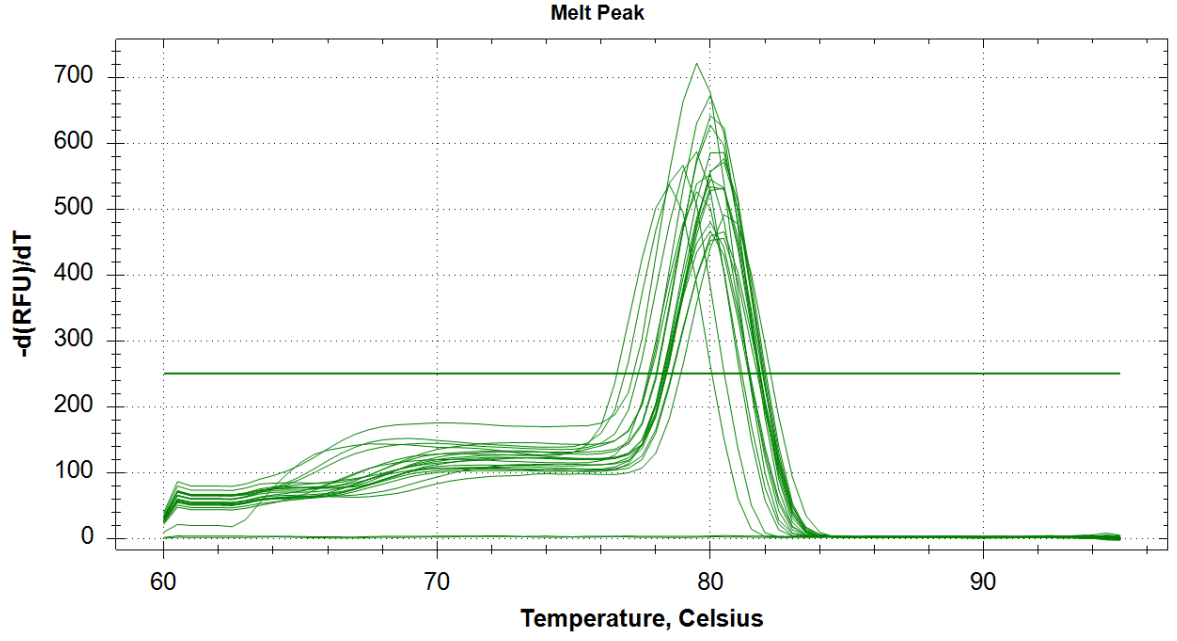
Şekil 6.14. Y7, Y8, Y9, Y10, R9, R10, R11, R12 hastalarındaki *RAVR2* amplifikasyon eğrileri



Şekil 6.15. Y7, Y8, Y9, Y10, R9, R10, R11, R12 hastalarındaki *RAVER2* melting curve görüntüleri



Şekil 6.16. Y7, Y8, Y9, Y10, R9, R10, R11, R12 hastalarındaki *ABL1* amplifikasyon eğrileri



Şekil 6.17. Y7, Y8, Y9, Y10, R9, R10, R11, R12 hastalarındaki *ABL1* melting curve görüntüleri

Yapılan duplike çalışmaların sonucunda kullanılan cihazın programının hesapladığı her iki gen için Ct değerlerinin ortalaması (ortalama Ct) alındı. Tablo 6.9.'da real-time PCR sonuçlarından elde edilen Ct, ortalama Ct, ΔCt , $2^{-\Delta Ct}$ değerleri verildi.

Tablo 6.9. MDS (M), MDS'ye sekonder AML (S), yeni tanı AML (Y) ve AML remisyon (R)hasta grubunun *RAVER2* ve *ABL1* Ct, Δ Ct ve $2^{-\Delta$ Ct değerleri

No	<i>RAVER2</i> Ct1	<i>RAVER2</i> Ct2	Ortalama <i>RAVER2</i> Ct	<i>ABL1</i> Ct1	<i>ABL1</i> Ct2	Ortalama <i>ABL1</i> Ct	Δ Ct	$2^{-\Delta$ Ct
M1	27,36	25,89	26,625	27,58	28,23	27,905	-1,28	2,428
M2	26,12	27,05	26,585	29,14	27,38	28,26	-1,675	3,193
M3	25,54	24,97	25,255	26,9	27,01	26,955	-1,7	3,249
M4	24,02	25,32	24,67	25,26	26,09	25,675	-1,005	2,006
M5	27,55	27,54	27,545	28,26	28,67	28,465	-0,92	1,892
M6	26,79	27,07	26,93	27,06	26,55	26,805	0,125	0,917
M7	26,09	26,1	26,095	26,51	26,16	26,335	-0,24	1,180
M8	26,65	25,03	25,84	26,4	25,73	26,065	-0,225	1,168
M9	26,05	26,45	26,25	25,64	24,08	24,86	1,39	0,381
M10	24,92	24,3	24,61	25,93	24,33	25,13	-0,52	1,433
M11	27,49	27,29	27,39	27,05	26,38	26,715	0,675	0,626
M12	24,03	23,52	23,775	24,1	23,99	24,045	-0,27	1,205
M13	32,99	31,55	32,27	30,54	30,33	30,435	1,835	0,280
M14	26,9	26,86	26,88	26,98	26,36	26,67	0,21	0,864
M15	26,13	26,3	26,215	26,09	25,13	25,61	0,605	0,657
M16	23,47	24,19	23,83	24,27	25,48	24,875	-1,045	2,063
M17	28,89	28,26	28,575	28,68	28,28	28,48	0,095	0,936
M18	30,14	28,91	29,525	30,59	32,29	31,44	-1,915	3,771
M19	30,51	29,02	29,765	29,65	30,08	29,865	-0,1	1,071
M20	32,16	32,18	32,17	32,46	31,98	32,22	-0,05	1,035
M21	29,69	29,79	29,74	32,51	31,05	31,78	-2,04	4,112
S1	25,48	26,34	25,91	25,36	25,64	25,5	0,41	0,752
S2	26,73	26,03	26,38	25,79	26,13	25,96	0,42	0,747
S3	28,23	28,4	28,315	26,6	27,64	27,12	1,195	0,436
S4	24,11	24,03	24,07	25,73	25,43	25,58	-1,51	2,848
S5	24,09	24,2	24,145	25,27	26,18	25,725	-1,58	2,989
S6	26,52	26,37	26,445	26,23	26,08	26,155	0,29	0,817
S7	26,17	26,49	26,33	25,39	25,98	25,685	0,645	0,639
S8	23,52	23,7	23,61	24,42	25,08	24,75	-1,14	2,203
S9	26,62	27,48	27,05	26,77	26,53	26,65	0,4	0,757
S10	30,04	28,32	29,18	29,14	29,79	29,465	-0,285	1,218
S11	24,62	25,38	25	25,23	25,5	25,365	-0,365	1,287
S12	29,35	29,23	29,29	26,33	27,76	27,045	2,245	0,210
S13	26,9	26,03	26,465	25,17	25,23	25,2	1,265	0,416
S14	29,53	30,64	30,085	30,92	29,79	30,355	-0,27	1,205
S15	27,12	26,18	26,65	27,04	26,9	26,97	-0,32	1,248
S16	29,86	29,64	29,75	32	32,42	32,21	-2,46	5,502
S17	26,62	26,44	26,53	24,42	24,44	24,43	2,1	0,233
S18	25,93	24,69	25,31	26,11	26,11	26,11	-0,8	1,741
S19	25,65	25,44	25,545	25,94	24,9	25,42	0,125	0,917
S20	25,79	25,19	25,49	25,2	24,44	24,82	0,67	0,628
S21	26,14	26,26	26,2	26,11	27,41	26,76	-0,56	1,474

Tablo 6.9. (Devam) MDS (M), MDS'ye sekonder AML (S), yeni tanı AML (Y) ve AML remisyon (R) hasta grubunun *RAVER2* ve *ABL1* Ct, Δ Ct ve $2^{-\Delta$ Ct değerleri

No	<i>RAVER2</i> Ct1	<i>RAVER2</i> Ct2	Ortalama <i>RAVER2</i> Ct	<i>ABL1</i> Ct1	<i>ABL1</i> Ct2	Ortalama <i>ABL1</i> Ct	Δ Ct	$2^{-\Delta$ Ct
Y1	24,4	23,49	23,945	24,28	25,03	24,655	-0,71	1,635
Y2	29,71	30,09	29,9	28,23	28,68	28,455	1,445	0,367
Y3	25,24	25,92	25,58	25,03	26,54	25,785	-0,205	1,152
Y4	27,01	28,2	27,605	27	27,1	27,05	0,555	0,680
Y5	25,81	25,3	25,555	26,29	26,79	26,54	-0,985	1,979
Y6	23,4	23,63	23,515	24,03	24,15	24,09	-0,575	1,489
Y7	24,39	24,45	24,42	25,26	25,41	25,335	-0,915	1,885
Y8	23,45	24,66	24,055	24,12	24,28	24,2	-0,145	1,105
Y9	27,57	29,05	28,31	24,65	24,35	24,5	3,81	0,071
Y10	24,16	23,97	24,065	24,58	24,2	24,39	-0,325	1,252
Y11	24,5	24,18	24,34	24,44	23,22	23,83	0,51	0,702
Y12	26,74	27,43	27,085	27,04	28,39	27,715	-0,63	1,547
Y13	25,65	25,49	25,57	24,62	24,8	24,71	0,86	0,550
Y14	25,26	25,95	25,605	27,11	26,32	26,715	-1,11	2,158
Y15	23,94	24,98	24,46	25,39	25,71	25,55	-1,09	2,128
Y16	23,32	23,48	23,4	24,26	23,98	24,12	-0,72	1,647
Y17	27,12	27,19	27,155	30,36	29,11	29,735	-2,58	5,979
Y18	27,57	27,12	27,345	27,12	26,35	26,735	0,61	0,655
Y19	24,65	23,65	24,15	23,19	23,98	23,585	0,565	0,675
Y20	28,04	27,63	27,835	26,03	25,57	25,8	2,035	0,244
Y21	27,9	28,4	28,15	27,3	26,38	26,84	1,31	0,403
Y22	24,91	25,51	25,21	23,45	24,27	23,86	1,35	0,392
R1	26,32	27,17	26,745	25,03	25,89	25,46	1,285	0,410
R2	31	30,59	30,795	30,89	30,97	30,93	-0,135	1,098
R3	27,48	27,74	27,61	27,58	25,79	26,685	0,925	0,526
R4	26,16	26,27	26,215	27,09	27,72	27,405	-1,19	2,281
R5	25,17	24,44	24,805	25,62	24,33	24,975	-0,17	1,125
R6	25,92	25,44	25,68	26,04	26,41	26,225	-0,545	1,45
R7	26,42	26,73	26,575	25,77	26,49	26,13	0,445	0,734
R8	25,49	25,06	25,275	26,9	26,51	26,705	-1,43	2,694
R9	27,24	26,58	26,91	27,69	26,6	27,145	-0,235	1,176
R10	25,27	26,07	25,67	25,58	25,95	25,765	-0,095	1,068
R11	23,99	25,16	24,575	25,11	25,8	25,455	-0,88	1,840
R12	26,74	27,09	26,915	28,77	28,83	28,8	-0,055	1,038
R13	27,12	27,01	27,065	27,33	26,91	27,12	-1,885	3,693
R14	26,3	25,93	26,115	27,11	26,49	26,8	-0,685	1,607
R15	26,63	24,96	25,795	26,46	26,47	26,465	-0,67	1,591
R16	29,62	30,19	29,905	30,21	29,81	30,01	-0,105	1,075
R17	27,59	28,46	28,025	26,68	27,23	26,955	1,07	0,476
R18	25,15	25,29	25,22	26,4	26,51	26,455	-1,235	2,353
R19	30,86	31,14	31	30,5	31,37	30,935	0,065	0,955
R20	27,48	27,38	27,43	25,45	27,31	26,38	1,05	0,482
R21	28,53	29,43	28,98	27,53	27,31	27,42	1,56	0,339

$2^{-\Delta$ Ct değerleri virgülden sonraki kısım üç rakam kalacak şekilde sadeleştirilmiştir.

6.3. Ekspresyon Değerlerinin Hasta Grupları Arasında Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen hastalar aşağıda belirtildiği şekilde gruplara ayrılmış ve gruplar arasındaki *RAVER2* ekspresyon farkı incelenmiştir:

1. MDS, AML-MDS, yeni tanı primer AML ve AML remisyon
2. AML Gelişimi Olan ve Olmayan MDS Hastaları
3. MDS Hastaları Revize IPSS Sitogenetik Parametrelerine Göre
4. MDS Hastaları 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre
5. AML-MDS Hastaları 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre
6. MDS ve AML-MDS Hastaları 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre
7. MDS ve AML-MDS Hastaları İzole 5q Delesyonu ile Eşlik Eden Sitogenetik Anomalilere Göre
8. 5q Delesyonuna Sahip MDS ve AML-MDS Hastaları
9. AML-MDS Hastaları Monozomi 7/7q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre
10. AML-MDS Hastaları ELN 2022 AML Risk Sınıflamasına Göre
11. Yeni Tanı Primer AML Hastaları ELN 2022 AML Risk Sınıflamasına Göre
12. Yeni Tanı Primer AML Hastaları Konvansiyonel Moleküler Analiz Sonuçlarına Göre

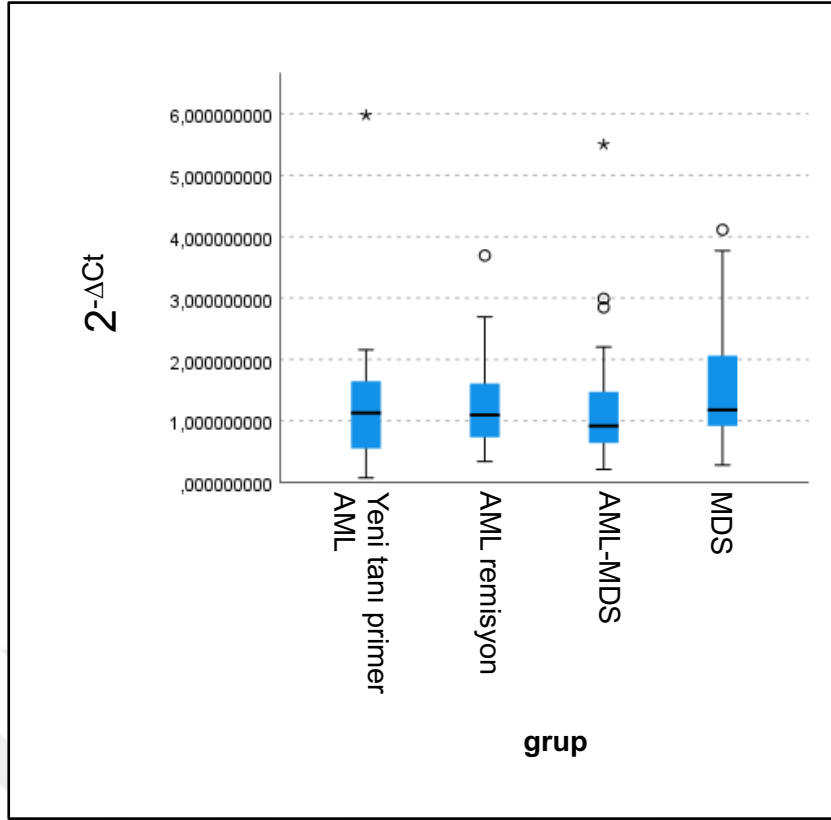
Gen ekspresyonunun değerlendirilmesi için gereç ve yöntem kısmında anlatıldığı üzere $2^{-\Delta Ct}$ değeri kullanıldı. İstatistiksel analizde iki karşılaştırma grubu olanlarda Mann Whitney U testi, ikiden fazla karşılaştırma grubu olanlarda ise Kruskal-Wallis testi yapıldı.

6.3.1. Ekspresyon Değerlerinin MDS, AML-MDS, Yeni Tanı Primer AML ve AML Remisyon Hasta Grupları Arasında Karşılaştırılması

MDS, AML-MDS, yeni tanı primer AML ve AML remisyon hastaları arasında *RAVER2* ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmasında elde edilen grupların medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Tablo 6.10.'da verildi. Gruplar arasındaki $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin dağılımı Şekil. 6.18.'de grafik olarak gösterildi.

Tablo 6.10. MDS, AML-MDS, yeni tanı primer AML ve AML remisyon hastalarının medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta Ct}$ (minimum-maximum)			
MDS grubu (n=21)	AML-MDS grubu (n=21)	Yeni tanı primer AML grubu (n=22)	AML remisyon grubu (n=21)
1,18 (0,28-4,11)	0,91 (0,21-5,50)	1,12 (0,07-5,97)	1,09 (0,33-3,69)



Şekil 6.18. Yeni tanı primer AML, AML remisyon, AML-MDS ve MDS grupları arasındaki $2^{-\Delta C_t}$ değerlerinin dağılımı (Koyu çizgi:medyan, mavi kutu: verilerin %50 dağılım gösterdikleri alan, medyan ile verilerin %25'er dağılım gösterdikleri iki alana bölünür, kutu kenarından uzanan çizgiler: kalan verilerin %25'er dağılım gösterdikleri alanlar, o:aşırı değer, *:çok aşırı değer).

Her örneğin $2^{-\Delta C_t}$ değerlerinin normal dağılıma uygunluğuna Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Veri setinin normal dağılıma uygunluk sağlamadığı gözlemlendi için bağımsız gruplar arası farklılığı incelemek üzere Kruskal-Wallis testi yapıldı. MDS'ye sekonder AML grubunun *RAVER2* ekspresyonu diğer üç gruba göre azalmış saptandı. Ekspresyon düzeyleri; AML-MDS<AML remisyon<yeni tanı primer AML<MDS şeklinde saptandı. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p değeri:0,632).

6.3.2. AML Gelişimi Olan ve Olmayan MDS Hastalarının Karşılaştırılması

MDS tanısı ile çalışmamıza dahil olan, sonrasında hastane bilgi sisteminden AML geliştiği öğrenilen; M8, M13 ve M20 numaralı hastalar iken, AML geliştiği görülmeyen; M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M9, M10, M12, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M21 numaralı

hastalardı. M11 numaralı hasta için net bir bilgi edinilemedi. Bu karşılaştırma grubunun medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Tablo 6.11.'de verildi.

Tablo 6.11. AML gelişen ve gelişmeyen MDS hastalarına ait medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta Ct}$ (minimum-maximum)	
AML gelişen (n=3)	AML gelişmeyen (n=17)
1,03 (0,28-1,16)	1,43 (0,38-4,11)

Grupların $2^{-\Delta Ct}$ değerleri, Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. AML gelişen grubun *RAVER2* ekspresyonunun daha düşük olduğu görüldü, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p değeri:0,146).

6.3.3. MDS Hastalarının Revize IPSS Sitogenetik Parametrelerine Göre Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen MDS hastaları revize IPSS sitogenetik parametrelerine göre gruplandırıldı ve Tablo 6.12.'de bu gruplandırma gösterildi. M5 ve M10 numaralı hastalar sitogenetik değerlendirmede yeterli metafaz olmadığı için sınıflandırılmadı.

Tablo 6.12. MDS hastalarının IPSS-R sitogenetik parametrelerine göre gruplandırılması

IPSS-R sitogenetik grubu	Hasta numarası
Çok iyi	M9
İyi	M2, M3, M4, M6, M7, M8, M12, M15, M16, M17, M18, M19, M21
Orta	M1, M13, M20
Kötü	-
Çok kötü	M11, M14

İyi hasta grubu orta ve çok kötü grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmalardan iyi ve orta karşılaştırma grubunun medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Tablo 6.13.'te gösterildi.

Tablo 6.13. MDS hastalarının IPSS-R sitogenetik parametrelerine göre iyi ve orta grubuna ait medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta C_t}$ (minimum-maximum)	
İyi (n=13)	Orta (n=3)
1,20 (0,65-4,11)	1,03 (0,28-2,42)

Grupların $2^{-\Delta C_t}$ değerleri ile yapılan karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı. İyi grubun orta gruba göre *RAVER2* ekspresyonu daha yüksekti, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p değeri:0,364).

Diğer karşılaştırma çifti olan iyi ve çok kötü karşılaştırma grubunun medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri Tablo 6.14.'de yer almaktadır.

Tablo 6.14. MDS hastalarının IPSS-R sitogenetik parametrelerine göre iyi ve çok kötü grubuna ait medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta C_t}$ (minimum-maximum)	
İyi (n=13)	Çok kötü (n=2)
1,20 (0,65-4,11)	0,74 (0,62-0,86)

İki grubun $2^{-\Delta C_t}$ değerleri, Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. *RAVER2* ekspresyonu iyi grupta çok kötü gruba göre daha yüksek saptandı, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p değeri:0,038).

6.3.4. MDS Hastalarının 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması

MDS hastaları FISH sonuçlarına göre; 5q delesyonu ve normal olarak iki gruba ayrıldı. Yeterli metafaz elde edilemeyen M5 dışında, normal grubuna karyotip sonucunun da normal olmasına dikkat edilerek hastalar dahil edildi. M14 ve M20 numaralı hastalarda 17p delesyonu olması nedeniyle bu karşılaştırmaya alınmadı. FISH sonuçlarına göre Tablo 6.15.'te belirtildiği şekilde gruplandırılan hastaların *RAVER2* ekspresyon sonuçları karşılaştırıldı. Gruplarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri Tablo 6.16.'da gösterildi.

Tablo 6.15. 5q delesyonu FISH sonuçlarına göre MDS hastalarının gruplandırılması

FISH	Hasta numarası
5q delesyonu	M6, M8, M10, M11, M15
Normal	M2, M3, M4, M5, M7, M12, M16, M17, M18, M19, M21

Tablo 6.16. 5q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta Ct}$ (minimum-maximum)	
5q delesyonu (n=5)	Normal (n=11)
0,91 (0,62-1,43)	2 (0,93-4,11)

5q delesyonu ve normal gruptaki *RAVER2* ekspresyon karşılaştırmasında, örneklerin $2^{-\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak Mann Whitney U testi yapıldı. *RAVER2* ekspresyonu 5q delesyonu olan grupta azalmıştı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p değeri:0,013).

6.3.5. AML-MDS Hastalarının 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması

FISH sonuçlarına göre; MDS'ye sekonder AML grubu, 5q delesyonu ve normal hastalar olarak sınıflandırıldı. Normal gruba karyotip sonucunun da normal olmasına dikkat edilerek hastalar alındı. Sadece S14 numaralı hastada kromozom analizi istenmemişti ancak AML FISH paneli normal olması nedeniyle normal gruba alındı. 5q delesyonu FISH sonuçlarına göre Tablo 6.17.'de belirtildiği şekilde gruplandırılan hastaların *RAVER2* ekspresyon sonuçları karşılaştırıldı. Tablo 6.18.'de saptanan medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri yer almaktadır.

Tablo 6.17. 5q delesyonu FISH sonuçlarına göre AML-MDS hastalarının gruplandırılması

FISH	Hasta numarası
5q delesyonu	S8, S10, S13
Normal	S1, S3, S6, S11, S14, S15, S16

Tablo 6.18. 5q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta C_t}$ (minimum-maximum)	
5q delesyonu (n=3)	Normal (n=7)
1,21 (0,41-2,2)	1,20 (0,43-5,5)

Normal ve 5q delesyonu olan grup, Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p değeri:1).

6.3.6. MDS ve AML-MDS Hastalarının 5q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması

MDS ve AML-MDS hastaları FISH sonuçlarına göre 5q delesyonu ve normal hastalar olarak gruplandırıldı. Normal gruptaki hastalarda yapılan FISH panelinde başka anomali saptanmamıştı. Normal gruba karyotip sonucunun da normal olmasına dikkat edilerek hastalar alınmakla birlikte M5 numaralı hastada yeterli metafaz elde edilememişti, S14 numaralı hastada karyotip istenmemişti ancak AML FISH panelleri normal olması nedeniyle normal gruba alındılar.

Tablo 6.19.'da belirtildiği şekilde, 5q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan hastaların *RAVER2* ekspresyon sonuçları karşılaştırıldı. Saptanan medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri Tablo 6.20.'de verildi.

Tablo 6.19. 5q delesyonu FISH sonuçlarına göre MDS ve AML-MDS hastalarının gruplandırılması

FISH	Hasta numarası
5q delesyonu	M6, M8, M10, M11, M15, S8, S10, S13
Normal	M2, M3, M4, M5, M7, M12, M16, M17, M18, M19, M21, S1, S3, S6, S11, S14, S15, S16

Tablo 6.20. 5q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan MDS ve AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta C_t}$ (minimum-maximum)	
5q delesyonu (n=8)	Normal (n=18)
1,04 (0,41-2,2)	1,26 (0,43-5,5)

Gruplar Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. 5q delesyonu olan grupta *RAVER2* ekspresyonunun azaldığı saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p değeri:0,09).

6.3.7. MDS ve AML-MDS Hastalarının İzole 5q Delesyonu ile Eşlik Eden Sitogenetik Anomalilere Göre Karşılaştırılması

MDS ve AML-MDS hastaları izole 5q delesyonu ve 5q delesyonuna eşlik eden sitogenetik anomalilere sahip grup olarak ikiye ayrıldı. Tablo 6.21.'de hasta grupları ve Tablo 6.22.'de saptanan medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri gösterildi.

Tablo 6.21. İzole 5q delesyonu ile eşlik eden sitogenetik anomalilere göre MDS ve AML-MDS hastalarının gruplandırılması

Sitogenetik anomali	Hasta numarası
İzole 5q delesyonu	M8, M10, M15, S8
5q delesyonuna eşlik eden sitogenetik anomali	M6, M11, S10, S13

Tablo 6.22. İzole 5q delesyonu ile eşlik eden sitogenetik anomalilere göre gruplandırılan MDS ve AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta C_t}$ (minimum-maximum)	
İzole 5q delesyonu (n=4)	5q delesyonuna eşlik eden sitogenetik anomali (n=4)
1,3 (0,65-2,2)	0,77 (0,41-1,21)

Mann Whitney U testi kullanılarak gruplar karşılaştırıldı. İzole 5q delesyonu olan gruptaki *RAVER2* ekspresyonu artmıştı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değeri:0,2).

6.3.8. 5q Delesyonuna Sahip MDS ve AML-MDS Hastalarının Karşılaştırılması

5q delesyonuna sahip hastalar MDS ve AML-MDS hasta grupları şeklinde karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmaya ait medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Tablo 6.23.'te yer almaktadır.

Tablo 6.23. 5q delesyonu sahip MDS ve AML-MDS karşılaştırma grubuna ait medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta Ct}$ (minimum-maximum)	
MDS (n=5)	MDS'ye Sekonder AML (n=3)
0,91 (0,62-1,43)	1,21 (0,41-2,2)

Gruplara ait $2^{-\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak Mann Whitney U testi yapıldı. 5q delesyonu olan MDS hastalarında *RAVER2* ekspresyonunun, AML-MDS hastalarına kıyasla daha düşük olduğu saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değeri:0,786).

6.3.9. AML-MDS Hastalarının Monozomi 7/7q Delesyonu FISH Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması

AML-MDS grubu FISH sonuçlarına göre; monozomi 7/7q delesyonu ve normal olarak iki gruba ayrıldı. Normal gruba karyotip sonucunun da normal olmasına dikkat edilerek hastalar dahil edildi. S13 ve S17 numaralı hastalarda yeterli metafaz elde edilemediği için sadece FISH sonuçları dikkate alındı. S14 numaralı hastada kromozom analizi istenmemişti ancak AML FISH paneli normal olması nedeniyle normal gruba alındı. S4, S8 ve S21 numaralı hastalar ise sahip oldukları başka sitogenetik ve/veya moleküler sitogenetik anomaliler nedeniyle bu karşılaştırmaya dahil edilmedi. S19 ve S20 numaralı hastalardan FISH istemi olmadığı için bu hastalar bu karşılaştırma grubunda yer almadı. Tablo 6.24.'te belirtildiği şekilde, monozomi 7/7q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan hastaların *RAVER2* ekspresyon sonuçları karşılaştırıldı. Tablo 6.25.'te, saptanan medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri verildi.

Tablo 6.24. Monozomi 7/7q Delesyonu FISH sonuçlarına göre AML-MDS hastalarının gruplandırılması

FISH	Hasta numarası
Monozomi 7/7q delesyonu	S2, S7, S9, S10, S13, S17, S18
Normal	S1, S3, S6, S11, S14, S15, S16

Tablo 6.25. Monozomi 7/7q delesyonu FISH sonuçlarına göre gruplandırılan AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta C_t}$ (minimum-maximum)	
Monozomi 7/7q delesyonu (n=7)	Normal (n=7)
0,74 (0,23-1,74)	1,2 (0,43-5,5)

Monozomi 7/7q delesyonu ve normal hasta grubunun karşılaştırılmasında $2^{-\Delta C_t}$ değerleri kullanılarak Mann Whitney U testi yapıldı. Monozomi 7/7q delesyonu grubunun *RAVER2* ekspresyonu normal gruba göre daha düşük saptandı, ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p değeri:0,209).

6.3.10. AML-MDS Hastalarının ELN 2022 AML Risk Sınıflamasına Göre Karşılaştırılması

AML-MDS hasta grubu ELN-2022 AML risk sınıflamasına göre; iyi, orta ve kötü olarak gruplara ayrıldı ve kendi aralarında karşılaştırıldı (13). Bu gruplandırma Tablo 6.26.'te verildi. Tablo 6.27.'de saptanan medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri gösterildi.

Tablo 6.26. ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre AML-MDS hastalarının gruplandırılması

Risk grubu	Hasta numarası
İyi	S3, S11, S12, S20, S21
Orta	S1, S6, S14, S15, S16, S17, S19
Kötü	S2, S4, S5, S7, S8, S9, S10, S13, S18

Tablo 6.27. ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre AML-MDS hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta C_t}$ (minimum-maximum)		
İyi (n=5)	Orta (n=7)	Kötü (n=9)
0,62 (0,21-1,47)	0,91(0,23-5,50)	1,21(0,41-2,98)

ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre iyi, orta ve kötü olarak sınıflandırılan AML-MDS hastalarının $2^{-\Delta C_t}$ değerleri Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. *RAVER2* ekspresyon düzeyleri iyi<orta<kötü şeklindeydi. Prognostik değerlendirme kötü yönde arttıkça bununla uyumlu olarak *RAVER2* ekspresyon artışı görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p değeri:0,47).

6.3.11. Yeni Tanı Primer AML Hastalarının ELN 2022 AML Risk Sınıflamasına Göre Karşılaştırılması

ELN-2022 AML risk sınıflamasına göre, yeni tanı primer AML hasta grubu; iyi, orta, kötü olarak gruplandırıldı ve karşılaştırıldı (13). Tablo 6.28.'de, bu gruplandırma verildi. Tablo 6.29.'da, medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri gösterildi.

Tablo 6.28. Yeni tanı primer AML hastalarının ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre gruplandırılması

Risk grubu	Hasta numarası
İyi	Y2, Y5, Y6, Y7, Y12, Y15, Y20
Orta	Y1, Y3, Y4, Y10, Y11, Y13, Y16, Y17, Y18, Y19, Y21, Y22
Kötü	Y8, Y9, Y14

Tablo 6.29. ELN 2022 AML risk sınıflamasına göre gruplandırılan yeni tanı primer AML hastalarının medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta Ct}$ (minimum-maximum)		
İyi (n=7)	Orta (n=12)	Kötü (n=3)
1,54 (0,24-2,12)	0,69 (0,39-5,97)	1,1(0,07-2,15)

Grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi yapıldı. *RAVER2* ekspresyon düzeyleri orta<kötü<iyi şeklinde saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p değeri:0,759).

6.3.12. Yeni Tanı Primer AML Hastalarının Konvansiyonel Moleküler Analiz Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması

Bütün hastalarda yeni nesil dizileme test sonuçları bulunmadığı için, yeni tanı primer AML hastaları yalnız konvansiyonel moleküler test sonuçları değerlendirilerek Tablo 6.30.'da belirtildiği şekilde gruplandırıldı. Ardından hastaların *RAVER2* ekspresyon sonuçları karşılaştırıldı. Y11 numaralı hasta *FLT3*-TKD mutasyonuna sahip tek hasta olduğu için, Y22 numaralı hasta *FLT3*-ITD ve *NPM1* varyantlarını birlikte bulundurması nedeniyle karşılaştırmaya dahil edilmediler. Medyan $2^{-\Delta Ct}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Tablo 6.31.'de verildi.

Tablo 6.30. Yeni tanı primer AML hastalarının konvansiyonel moleküler test sonuçlarına göre gruplandırılması

Konvansiyonel moleküler test	Hasta numarası
t(8;21)	Y2, Y6
inv(16)	Y7, Y15
<i>FLT3</i> -ITD	Y1, Y10
<i>NPM</i>	Y12, Y20
Normal	Y3, Y4, Y5, Y8, Y9, Y13, Y14, Y16, Y17, Y18, Y19, Y21

Tablo 6.31. Konvansiyonel moleküler test sonuçlarına göre gruplandırılan yeni tanı primer AML hastalarının medyan $2^{-\Delta C_t}$, minimum ve maximum $2^{-\Delta C_t}$ değerleri

Medyan $2^{-\Delta C_t}$ (minimum-maximum)				
t(8;21) (n=2)	inv(16) (n=2)	<i>FLT3</i> -ITD (n=2)	<i>NPM</i> (n=2)	Normal (n=12)
0,92 (0,36-1,49)	2 (1,88-2,12)	1,44 (1,25-1,63)	0,896* (0,24-1,54)	0,893* (0,07-5,97)

*Sadece bu hasta gruplarında $2^{-\Delta C_t}$ değerleri birbirine çok yakın olduğu için virgülden sonra üç rakama yer vermiştir.

$2^{-\Delta C_t}$ değerleri kullanılarak Kruskal-Wallis testi yapıldı. *RAVER2* ekspresyon düzeyleri Normal $\approx$ *NPM1*<t(8;21)<*FLT3*-ITD<inv(16) şeklindeydi, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değeri:0,444).

6.3.13. İstatistiksel Analiz Sonuçları Özeti

Karşılaştırma yapılan gruplara ait istatistiksel analiz sonuçları Tablo 6.32.'de özetlendi.

Tablo 6.32. İstatistiksel Analiz Sonuçları Özeti

Hasta Grubu	Karşılaştırma Grubu	<i>RAVER2</i> Ekspresyon Düzeyi	p değeri
MDS, AML-MDS, Yeni Tanı Primer AML ve AML Remisyon	MDS, AML-MDS, Yeni Tanı Primer AML ve AML Remisyon	MDS-AML<AML Remisyon<Yeni Tanı Primer AML<MDS	0,632
MDS	AML Gelişimi Olan ve Olmayan	AML Gelişimi Olan <AML Gelişimi Olmayan	0,146
MDS	Revize IPSS Sitogenetik Parametrelerine Göre	İyi ve Orta	0,364
		İyi ve Çok Kötü	0,038
MDS	5q Delesyonu Olan ve Normal	5q Del<Normal	0,013
AML-MDS	5q Delesyonu Olan ve Normal	5q Del $\approx$ Normal	1
MDS ve AML-MDS	5q Delesyonu Olan ve Normal	5q Del<Normal	0,09
MDS ve AML-MDS	İzole 5q Delesyonu ve 5q Delesyonuna Eşlik Eden Sitogenetik Anomali	İzole 5q Del>5q Dele Eşlik Eden Sitogenetik Anomali	0,2
5q Delesyonuna Sahip MDS ve AML-MDS	MDS ve AML-MDS	MDS<AML-MDS	0,786
AML-MDS	Monozomi 7/7q Delesyonu Olan ve Normal	Monozomi 7/7q Delesyonu<Normal	0,209
AML-MDS	ELN 2022 AML Risk Sınıflamasına Göre	İyi<Orta<Kötü	0,47
Yeni Tanı Primer AML	ELN 2022 AML Risk Sınıflamasına Göre	Orta<Kötü<İyi	0,759
Yeni Tanı Primer AML	Konvansiyonel Moleküler Analiz Sonuçlarına göre	Normal $\approx$ <i>NPM1</i> <t(8;21)< <i>FLT3</i> -ITD<inv(16)	0,444

7. TARTIŞMA

Miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid löseminin tanı, sınıflandırma ve izleminde genetik belirteçler kullanılmaktadır. MDS ve MDS'ye sekonder akut miyeloid löseminin genetik olarak ilişkili ortak bir hastalık süreci olduğunu destekleyen bulgular arasında bazı genetik belirteçlerin ortak olması yatmaktadır. MDS'ye sekonder AML progresyonunda kazanılan mutasyonlar da tanımlanmıştır. Ancak hala bu geçişin altındaki mekanizmalar merak konusudur. Bazı hastalar MDS'den AML'ye geçiş gösterirken bazıları göstermemektedir. Çalışmamızda bu soruya odaklanılarak, miyelodisplastik sendrom, miyelodisplastik sendroma sekonder akut miyeloid lösemi, yeni tanı primer akut miyeloid lösemi ve remisyonadaki akut miyeloid lösemi hastalarında *RAVER2* geni ekspresyon düzeyi real-time PCR yöntemi ile değerlendirildi. Bu konudaki araştırmalardan biri olan, Yao ve arkadaşlarının çalışmasında; MDS hastalarında gen ekspresyon profilleri değerlendirilerek lncRNA risk skoru hesaplanmış, sonrasında lncRNA risk skoru yüksek grubun daha yüksek AML transformasyonu gösterdiği, aynı zamanda bu grupta *RAVER2* gen ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir (41). Bizim çalışmamızda; miyelodisplastik sendroma sekonder akut miyeloid lösemi grubunda *RAVER2* ekspresyonunun MDS grubuna göre azaldığı görülse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Lin ve arkadaşlarının çalışmasında normal karyotipli grupta AML duyarlılık lokusu olarak verilen 1p31.3'de yer alan genlerden biri de *RAVER2*'dir. Araştırmaya dahil edilen örneklerin büyük çoğunluğunun AML remisyon hastalarının oluşturduğu bu çalışmada *RAVER2* ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (43). Çalışmamızda da AML remisyon hasta grubunda *RAVER2* gen ekspresyonunun yeni tanı primer AML grubuna göre azaldığı saptandı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Khalaj ve arkadaşlarının çalışmasında, hematopoetik kök hücrelerin kendini yenilemesini düzenleyen miR-99 için hedef genler arasında *RAVER2* olduğu bildirilmiştir. Lösemik kök hücre serisinde miR-99 *knockdown* edildiğinde *RAVER2* ekspresyonunun arttığı buna karşın akut monositik lösemi hücre serisinde bu etkinin görülmediği gösterilmiştir (44). Si ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada ise lösemik kök hücrelerde miR-99a'nın artmış ekspresyon seviyelerinin AML'de genel sağ kalım ve olaysız sağ kalımı kötü etkilediği gösterilmiştir (45). Bu iki çalışmanın sonucu birlikte değerlendirildiğinde; AML'de kötü prognozla birliktelik gösteren miR-99a artışı, *RAVER2* ifadesinin azalması ile ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda MDS ile karşılaştırıldığında yeni tanı AML hastalarında *RAVER2* ekspresyonunun düşük olması bu araştırma sonuçlarıyla örtüşmektedir. Bununla birlikte *RAVER2* düzeyleri açısından, primer yeni tanı ve remisyon AML hastaları karşılaştırıldığında bu bilgi desteklenmemektedir. Diğer yandan çalışmamızdaki

hastaların lösemik hücre alt tipleri hakkında yeterli değerlendirme yoktur. Bu nedenle *RAVER2* geni ekspresyonu değişikliğini bu açıdan temellendirmek çalışmamız çerçevesinde olanaklı değildir. Shi ve arkadaşları tarafından normal mukoza, kolorektal adenom ve kolorektal kanser dokularında yapılan çalışmada tümörojenik mikroRNA'ların hedefleri arasında yer alan *RAVER2* geninin tümörde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (36). Liu ve arkadaşları, hepatoblastom tümör dokusunda *RAVER2* ekspresyonunun arttığını belirtmişlerdir (35). Bizim çalışmamızda normal doku ile kıyas yapılmamakla birlikte AML remisyon hasta grubu normale en yakın doku olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte bu hastaların kemoterapi geçmişinin gen ekspresyon profillerini etkilemiş olabileceği unutulmamalıdır. Wedler ve arkadaşlarının çalışmasında 33 tümörden elde edilen TCGA verilerinde *RAVER2* ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir (37). Sonuçta *RAVER2* ekspresyonunun arttığı veya azaldığı maligniteler olduğu görülmektedir.

Holt ve arkadaşlarının *RAVER2*'nin sFlt1 (VEGFR1) üretimini artırdığı (38), sFlt1 inhibitörlerinin kanserde anjiogenezi azaltmak için kullanıldığı (39) bilgileri bir arada yorumladığında; *RAVER2* tedavi hedefi olabilir mi, sorusu akla gelmektedir. *RAVER2*'nin insanda tüm yetişkin dokularda eksprese olduğu göz önünde bulundurulursa yan etki potansiyeli de yüksek olacaktır.

Çalışmamızda *RAVER2* ekspresyonun anlamını değerlendirme sürecinde araştırmaya alınan vakaların diğer genetik belirteçleri de dikkate alındı. Öncelikle örneklemimizdeki vakaların diğer genetik belirteçlerini incelediğimizde; daha önce ülkemizden yapılan bir çalışma ile benzer bir şekilde AML hastaları sitogenetik değişiklikler açısından primer ve sekonder alt gruplarına ayrılmadan değerlendirildiğinde; en sık sayısal değişiklik monozomi 7 olarak görülürken bu çalışmadan farklı olarak en sık yapısal değişiklik 5q delesyonu olarak görüldü. Bununla birlikte, primer AML vakalarında bu çalışma ile uyumlu olarak, en sık saptanan yapısal değişikliğin t(8;21) olduğu belirlendi (47). Ülkemizden yapılan başka bir çalışma (%60 normal, %9 kompleks karyotip) ile benzer bir şekilde AML tanılı hastaların bizim çalışmamızda %53'ü normal karyotipe sahipken %7'sinde kompleks karyotip saptandığı görüldü. Aynı çalışmadaki normal FISH sonucu oranları (%69) da bizim çalışmamız (%70) ile benzerken, normal çıkan moleküler testler açısından uyumsuzluk gözlenmektedir (referans çalışma %72, bizim serimiz %60). Ancak bu çalışmada ayrıntı verilmemekle birlikte moleküler testler kapsamında sadece *FLT3*, *NPM1* gen mutasyonları ve inv(16) testlerinin çalışıldığı anlaşılmaktadır. Anormal moleküler sonuçlar karşılaştırıldığında *FLT3* ve *NPM1* mutasyonu oranları bizim çalışmamız ile uyumlu bulundu. Olgularımızda ek olarak saptanan t(8;21) vakaları nedeniyle moleküler sonuçlarda anormal sonuç oranımızın daha yüksek olduğu düşünüldü (48). Türkiye'den yapılan diğer bir çalışmada *FLT3* mutasyon oranı %23 olarak

bizim çalışmamızdan (%17) yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada yöntem olarak yeni nesil dizileme kullanılırken bizim hastalarımızda genellikle *FLT3* ITD mutasyon analizi için PCR sonrası jel elektroforez, TKD mutasyon analizi için ise RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) sonrası jel elektroforez yöntemleri kullanılmıştı. Yeni nesil dizilemenin geleneksel moleküler yöntemlerin saptadığı mutasyon oranından daha düşük varyant alel fraksiyonlarını saptayabilmesi, karşılaştırılan çalışmadaki *FLT3* mutasyon oranı yüksekliğinin nedeni olarak gösterilebilir (49). Bu konvansiyonel moleküler sonuçlardan yola çıkarak yeni tanı primer AML vakalarını *RAVER2* ekspresyonu açısından karşılaştırdığımızda; Normal $\approx$ *NPM1*<t(8;21)<*FLT3*-ITD<inv(16) şeklinde bir sonuca varılmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Çalışmamızdaki MDS ve MDS'ye sekonder AML gruplarında monozomi 7, 5q delesyonu, trizomi 8, *MECOM* yeniden düzenlenmesi, kompleks karyotip ortak olan sitogenetik ve moleküler sitogenetik anomalilerdi. Bu sonuçlardan yola çıkarak, *RAVER2* geni ekspresyonu açısından MDS ve AML-MDS hastaları, uluslararası kabul gören kılavuzlardaki (IPSS-R, ELN 2022) genetik belirteçlere göre daha küçük gruplara ayrılarak karşılaştırıldı. MDS hastalarında IPSS-R sitogenetik parametrelerine göre yapılan karşılaştırmada, iyi grupta çok kötü gruba göre *RAVER2* ekspresyonunun arttığı saptandı, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. MDS hastaları FISH analizine göre kıyaslandığında, 5q delesyonu olan grupta *RAVER2* ekspresyonunun azaldığı görüldü, bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu sonuçlar birbiri ile uyumsuz gibi görünmekle birlikte del(5q), IPSS-R göre iyi skor grubunda yer alır ve bu gruptaki hastalarda, çok kötü gruba göre *RAVER2* ekspresyonu artmıştır. Bu grup içindeki normal karyotip ve del(5q) arasında da bir fark bulunmakla birlikte bu her iki grupta da *RAVER2* ekspresyonu çok kötü gruptan fazladır. *RAVER2* ekspresyonu, alt grup belirlemede değerlendirilmesi gereken bir aday belirteç olarak düşünülebilir. MDS ve AML-MDS hastalarının birlikte 5q delesyonuna ve normal FISH sonuçlarına göre karşılaştırıldığı grupta 5q delesyonu olan grupta *RAVER2* ekspresyonunun azaldığı saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. 5q delesyonuna sahip MDS ve AML-MDS hastaları karşılaştırıldığında MDS grubunda *RAVER2* ekspresyonunun azaldığı saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Her ne kadar istatistiksel bir anlamlılık bu çalışma kapsamında gösterilememiş olsa da, *RAVER2* ekspresyonundaki azalmanın öncelikle del(5q) ve sonrasında MDS ile ilişkilendirilebileceği düşünülmelidir. Daha büyük çalışma gruplarında bakılarak bu sonuç netleştirilebilir. Araştırmamızda diğer küçük gruplarda da *RAVER2* gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Hem ana grubumuzda hem de küçük grupların çoğunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması, örneklem boyutunun küçük olması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda olguların bir bölümünde yapılmış olan yeni nesil dizileme sonuçları değerlendirildiğinde literatür ile uyumlu şekilde *RUNX1* varyantları MDS, AML-MDS ve primer AML’de görüldü (25). *ASXL1* varyantları MDS ve sekonder AML’de sıktır (14). Bu bilgi ile uyumlu olarak sunulan çalışmada da *ASXL1* varyantları MDS ve AML-MDS hastalarında görüldü. *ASXL1*, *TP53*, *RUNX1* ve *U2AF1* gen varyantları MDS/AML-MDS’de, de novo AML’ye göre daha sık görülmektedir (25). Bizim çalışmamızda da bununla uyumlu olarak *ASXL1* ve *TP53* varyantları MDS/AML-MDS’de daha yüksek oranda olsa da *RUNX1* mutasyonlarının de novo AML ile benzer oranda (1/8) bulunduğu görüldü. *U2AF1* geni yalnızca MDS panelinde yer alması nedeniyle değerlendirme yapılamadı. Çalışmamızdaki seri içindeki bir MDS vakasında *ASXL1* varyantına eşlik eden *U2AF1* varyantının olması, literatürde yer alan *ASXL1* ile *U2AF1* kombinasyonunun beklenenden daha yüksek oranda bildirildiği bilgisi ile tutarlıdır (7, 14, 50). Çalışmamızda *FLT3*, *CEBPA* ve *NPM1* genlerindeki varyantlar AML-MDS ve primer AML’de mevcuttu. MDS hastalarında ise konvansiyonel moleküler yöntemler ile çalışılan *FLT3* ve *NPM1* genlerinde mutasyon görülmedi. Bu bilgiler de önceki çalışmalarda *FLT3* ve *NPM1* mutasyonlarının MDS’den AML’ye ilerleme sırasında edinildiği bilgisini desteklemektedir (20, 22, 24). AML paneli istenen üç MDS hastasında yeni nesil dizileme yöntemi ile *CEBPA* geninde mutasyon saptanmamıştı, ancak bu sayı oldukça düşük olduğundan *CEBPA* geni ile ilgili bir yorum yapılamadı. Bizim serimizdeki yeni nesil dizileme ve geleneksel moleküler analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, literatürle uyumlu olarak de novo AML grubunda en sık *FLT3* ITD ve *NPM1* mutasyonlarının saptandığı görüldü (25).

Çalışmamız MDS, MDS’ye sekonder AML, yeni tanı primer AML ve AML remisyon hasta grubunu *RAVER2* ekspresyonu açısından birlikte değerlendiren ilk çalışmadır. Çalışmamıza başlarken hipotezlerimiz; ‘*RAVER2* geninde MDS, AML ve AML-MDS hasta gruplarında ekspresyon farklılığı gözlenebilir’, ‘yeni tanı primer AML ve AML remisyon grubu arasında ekspresyon düzeyleri açısından fark gösterilebilir’, ‘*RAVER2* ekspresyonu prognostik bir belirteç olarak kullanılabilir’ biçimindeydi. Çalışmamız sonunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte AML-MDS hastalarında MDS hastalarından daha düşük *RAVER2* ekspresyonu olduğu görüldü. Remisyon AML grubumuzda yeni tanı primer AML grubuna göre beklediğimiz şekilde farklı, daha düşük bir *RAVER2* ekspresyonu görsek de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Örneklem boyutunun artırıldığı, prospektif olarak yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. MDS hasta grubunun uzun dönem izlemi yapılarak AML dönüşümü olan ve olmayan şeklinde ekspresyon karşılaştırması yapılması uygun olacaktır. Aynı şekilde yeni tanı AML hastaları da izlenerek akut ve remisyon anındaki ekspresyon değerlerinin karşılaştırılmasına ihtiyaç vardır. Ek olarak MDS sınıflandırması içinde alt grup

değerlendirmelerinin de bu gözle yapılması gereklidir. Neoplazilerin heterojen doğası nedeniyle tek bir faktöre indirgenmesi mümkün değildir, tanımlı tüm genetik belirteçler de dikkate alarak yapılacak transkriptom analizi çalışmalarıyla bütüncül bir yaklaşımla MDS, AML geçişinde ve prognozu değerlendirmede doğru profillemeler yapılabilir.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1) MDS, AML-MDS, yeni tanı primer AML ve AML remisyon hastalarının kemik iliği örneklerinde *RAVER2* ekspresyonları karşılaştırıldığında ekspresyon düzeyi; MDS>yeni tanı primer AML>AML remisyon>AML-MDS biçiminde bulunmuştur. Bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak bu çalışma, dört grubun karşılaştırıldığı ilk çalışmadır.
- 2) IPSS-R sitogenetik risk sınıflamasında iyi gruba giren MDS hastalarında *RAVER2* ekspresyonu çok kötü gruba göre yüksek saptanmış olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak daha büyük örneklem grubunda doğrulanmaya ihtiyaç vardır.
- 3) MDS hastaları, 5q delesyonu ve normal FISH sonucuna sahip olan hastalar olarak iki gruba ayrılarak *RAVER2* ekspresyonları karşılaştırıldığında, 5q delesyonuna sahip grupta *RAVER2* ekspresyonunun azaldığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.
- 4) IPSS-R'ye göre iyi grupta yer alan 5q delesyonu hasta grubunda *RAVER2* ekspresyonunun normal karyotip grubuna göre belirgin olarak azalmış olması bir alt grup tanımlamasını düşündürülebilir.
- 5) Prognostik sınıf ve sitogenetik bulgulara göre karşılaştırma yapılan diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hem ana hem de yan karşılaştırma grupları için daha büyük örneklem boyutunda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.
- 6) Bu çalışma ile MDS, AML-MDS ve primer AML hastalarının *RAVER2* ekspresyonlarına ek olarak diğer sitogenetik, moleküler sitogenetik, geleneksel moleküler ve yeni nesil dizilemeye ait genetik belirteçleri de literatür bilgileri ışığında tartışılmıştır.
- 7) Bu çalışma sonucunda *RAVER2* gen ekspresyonu tanımlı hastalıklarla ilişkili olarak prognostik belirteç olarak değerlendirmeyi haketmektedir. Bununla birlikte bu konuda netlik kazanabilmek için hastaların uzun dönem izlendiği ve daha büyük örneklemde yapılacak çalışmalar yol gösterici olacaktır. Multifaktöriyel ve çok aşamalı bir süreç olan MDS ve AML hastalık gruplarında *RAVER2* ilişkili prognostik süreci ve tedavi hedeflerini belirlemede transkriptom analizi, miRNA analizi ya da epigenetik analizler gibi geniş kapsamlı testlerin çalışılmasına ihtiyaç vardır.

9. KAYNAKLAR

1. Dotson JL, Lebowicz Y. Myelodysplastic syndrome. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
2. Valent P, Horny H-P, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia research*. 2007;31(6):727-36.
3. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19.
4. Lee G-T, Chung Y-J. Comparison of the copy-neutral loss of heterozygosity identified from whole-exome sequencing data using three different tools. *Genomics & Informatics*. 2022;20(1).
5. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;120(12):2454-65.
6. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;122(22):3616-27.
7. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241-7.
8. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(26):2496-506.
9. Vakiti A, Mewawalla P, Wood SK. Acute Myeloid Leukemia (Nursing). StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
10. Granfeldt Østgård LS, Medeiros BC, Sengeløv H, Nørgaard M, Andersen MK, Dufva IH, et al. Epidemiology and clinical significance of secondary and therapy-related acute myeloid leukemia: a national population-based cohort study. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(31):3641-9.
11. Jentzsch M, Grimm J, Bill M, Brauer D, Backhaus D, Goldmann K, et al. ELN risk stratification and outcomes in secondary and therapy-related AML patients consolidated with allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2021;56(4):936-45.
12. Hulegårdh E, Nilsson C, Lazarevic V, Garelius H, Antunovic P, Rangert Derolf Å, et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: A report from the Swedish Acute Leukemia Registry. *American journal of hematology*. 2015;90(3):208-14.
13. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2022;140(12):1345-77.
14. Menssen AJ, Walter MJ. Genetics of progression from MDS to secondary leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2020;136(1):50-60.

15. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics*. 2017;49(2):204-12.
16. Saez B, Walter MJ, Graubert TA. Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2017;129(10):1260-9.
17. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(1):5-19.
18. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(26):2488-98.
19. Link D, Walter M. 'CHIP'ping away at clonal hematopoiesis. *Leukemia*. 2016;30(8):1633-5.
20. Shiozawa Y, Malcovati L, Galli A, Pellagatti A, Karimi M, Sato-Otsubo A, et al. Gene expression and risk of leukemic transformation in myelodysplasia. *Blood, the Journal of the American Society of Hematology*. 2017;130(24):2642-53.
21. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(9):1367-76.
22. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(7):2548-53.
23. Kim T, Tyndel M, Kim H, Ahn J, Choi S, Park H, et al. The clonal origins of leukemic progression of myelodysplasia. *Leukemia*. 2017;31(9):1928-35.
24. Takahashi K, Jabbour E, Wang X, Luthra R, Bueso-Ramos C, Patel K, et al. Dynamic acquisition of FLT3 or RAS alterations drive a subset of patients with lower risk MDS to secondary AML. *Leukemia*. 2013;27(10):2081-3.
25. Owattanapanich W, Herzig J, Jahn N, Panina E, Ruchutrakool T, Kungwankiatichai S, et al. Genetic alterations in Thai adult patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome—excess blasts detected by next-generation sequencing technique. *Annals of Hematology*. 2021;100:1983-93.
26. Krecic AM, Swanson MS. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Current opinion in cell biology*. 1999;11(3):363-71.
27. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(3):195-205.
28. Romanelli MG, Diani E, Lievens PM-J. New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(11):22906-32.
29. Saulière J, Sureau A, Expert-Bezançon A, Marie J. The polypyrimidine tract binding protein (PTB) represses splicing of exon 6B from the β -tropomyosin pre-mRNA by directly interfering with the binding of the U2AF65 subunit. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(23):8755-69.
30. Spellman R, Smith CW. Novel modes of splicing repression by PTB. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(2):73-6.

31. Hüttelmaier S, Illenberger S, Grosheva I, Rüdiger M, Singer RH, Jockusch BM. Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *The Journal of cell biology*. 2001;155(5):775-86.
32. Kleinhenz B, Fabienke M, Swiniarski S, Wittenmayer N, Kirsch J, Jockusch BM, et al. Raver2, a new member of the hnRNP family. *FEBS letters*. 2005;579(20):4254-8.
33. Padonou F, Gonzalez V, Provin N, Yayilkan S, Jmari N, Maslovskaja J, et al. Aire-dependent transcripts escape Raver2-induced splice-event inclusion in the thymic epithelium. *EMBO reports*. 2022;23(3):e53576.
34. Romanelli MG, Lorenzi P, Diani E, Filippello A, Avesani F, Morandi C. Transcriptional regulation of the human Raver2 ribonucleoprotein gene. *Gene*. 2012;493(2):243-52.
35. Liu S, Zheng Q, Zhang R, Li T, Zhan J. Construction of a combined random forest and artificial neural network diagnosis model to screening potential biomarker for hepatoblastoma. *Pediatric Surgery International*. 2022;38(12):2023-34.
36. Shi Y, Zhuang Y, Zhang J, Chen M, Wu S. Identification of tumorigenic and prognostic biomarkers in colorectal cancer based on microRNA expression profiles. *BioMed Research International*. 2020;2020.
37. Wedler A, Bley N, Glaß M, Müller S, Rausch A, Lederer M, et al. RAVER1 hinders lethal EMT and modulates miR/RISC activity by the control of alternative splicing. *Nucleic Acids Research*. 2024:gkae046.
38. Holt DG, Das SK, Huang W, Ambati BK. Raver2: A novel regulator Of sFlt1 production. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53(14):2390-.
39. Ramakrishnan S, Anand V, Roy S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology*. 2014;9:142-60.
40. Ruta V, Naro C, Pieraccioli M, Leccese A, Archibugi L, Cesari E, et al. An alternative splicing signature defines the basal-like phenotype and predicts worse clinical outcome in pancreatic cancer. *Cell Reports Medicine*. 2024.
41. Yao C-Y, Chen C-H, Huang H-H, Hou H-A, Lin C-C, Tseng M-H, et al. A 4-lncRNA scoring system for prognostication of adult myelodysplastic syndromes. *Blood advances*. 2017;1(19):1505-16.
42. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, De Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers*. 2021;1(1):59.
43. Lin W-Y, Fordham SE, Hungate E, Sunter NJ, Elstob C, Xu Y, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for acute myeloid leukemia. *Nature Communications*. 2021;12(1):6233.
44. Khalaj M, Woolthuis CM, Hu W, Durham BH, Chu SH, Qamar S, et al. miR-99 regulates normal and malignant hematopoietic stem cell self-renewal. *Journal of Experimental Medicine*. 2017;214(8):2453-70.
45. Si X, Zhang X, Hao X, Li Y, Chen Z, Shi H, et al. Upregulation of miR-99a is associated with poor prognosis of acute myeloid leukemia and promotes myeloid leukemia cell expansion. *Blood*. 2016;128(22):5086.
46. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.
47. Yürür Kutlay N, Tuncalı T, Karabulut H, Sadeghi F, Akalın İ, Sağlam B, ve ark. Akut miyeloid lösemide kromozomal anomaliler: Tek merkezden 417 olgunun sitogenetik sonuçları. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2017; 70 (1).

48. MEDENİ ŞS, SEVİNDİK ÖG, Celal A, TÜRKYILMAZ D, KAYA SY, TUNALI S, ve ark. Akut myeloid lösemi hastalarımızın retrospektif değerlendirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2015;29(2):65-9.
49. AÇAR İH, DİNÇYÜREK HD, SÖNMEZLER Ö, BİŞGİN A, YILDIZ ŞM, GÜVENÇ B. Investigating FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: A Single-Center Real-World Data Study on Patient Outcomes and Treatment Strategies. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2023;37(2):191-8.
50. Alberti MO, Srivatsan SN, Shao J, McNulty SN, Chang GS, Miller CA, et al. Discriminating a common somatic ASXL1 mutation (c. 1934dup; p. G646Wfs* 12) from artifact in myeloid malignancies using NGS. Leukemia. 2018;32(8):1874-8.



10. EKLER

EK-1: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI ANKARA ÜNİV. TIP FAK. GENETİK HASTALIKLAR TANI MERKEZİ POLİKLİNİK ONAM FORMU

AÇIKLAMA:

Bu açıklama metni; sizin veya bakmakla yükümlü olduğunuz 18 yaşından küçük çocuklarınızın ya da anne karnındaki bebeğinizin başta genetik hastalıklar olmak üzere tıbbi genetik anabilim dalının çalışma ve uzmanlık alanına giren tüm durum ve özellikler yönünden incelenmesi, test ve tahlil için vücuttan materyal alınması, bu materyallerin saklanması, incelenmesi, değerlendirilmesi ve sonuçların size aktarımı ile ilgili olarak hazırlanmıştır. Yasal zorunluluk uyarınca, yukarıda belirtilen araştırma ve değerlendirmeler yalnızca onay vermeniz halinde yapılacağından, aşağıda belirtilen aydınlatıcı bilgileri okuyarak, yapılacak tetkik ve çalışmaların sebep ve sonuçlarını bilmeniz ve önceden onay vermeniz gerekmektedir.

Tıbbi genetik kapsamında incelenen hastalıklar; tek gen ya da kromozomlardaki bozukluklardan gelişebileceği gibi birden fazla genin ve çevresel etkenlerin etkisi ile de ortaya çıkabilir. Bu hastalıklar kişiye anne ve/veya babasından aktarılabilir ya da kişide kendiliğinden gelişebilir.

Her hastalığın genetik nedenini açıklayabilmek mümkün değildir. Genetik nedeni tanımlanabilen hastalıkların, seyri, sonuçları kişiden kişiye farklılıklar gösterebilir. İnceleme sonuçlarının kesinliği ve güvenilirliği değişkenlik gösterebilir. Size hangi test(ler)'in yapılacağı ve bu test(ler) ile hangi hastalıkların tanısının koyabileceği açıklanacaktır.

Doğum öncesi tanı testlerinde elde edilen genetik materyalde (kromozom, DNA, RNA) farklı düzeylerde inceleme yapılabilir. Bu testin uygulanmasından önce anne adayına ve eşine genetik danışmanlık verilmesi tıbbi genetik hizmetlerinin bir ilkesidir. Doğum öncesi genetik tanı tıbbi gereklilik olmadığı sürece bebeğin cinsiyetini saptamak amacı ile yapılmaz.

TEST İÇİN ALINAN/GÖNDERİLEN MATERYAL:

Genetik testler, ön tanının gerektirdiği kan, serum, kord kanı, amniyosentez, koryon villus ve diğer doku (kemik iliği, yanak içi mukoza hücresi, deri hücresi, düşük materyali gibi)

materyalleri üzerinde çalışılarak gerçekleştirilir. Genetik testler için kullanılacak materyal kan ise, anabilim dalımızda bir hekim tarafından sizden veya çocuğunuzdan 1 ile 10 ml arasında kan alınır. Kord kanı, amniyosentez ve koryon villus materyalleri uzman kadın doğum hekimi, diğer doku materyalleri ise uygun alanın uzmanı olan hekimleri tarafından alınarak bölümümüze gönderilir. Hatalı materyal alımı, saklanması ve anabilim dalımıza geç ve/veya hatalı şekilde eriştirilmesine bağlı olarak yapılacak test (ler)in sonuçlandırılmaması olasılığı vardır. Anabilim Dalımız dışından gelen materyalin test sonuçlarını olumsuz etkileyecek özellikleri laboratuvar/akademik personelimiz tarafından yazılı olarak belirtilecek ve bu yazının örneğinin getiren şahıs tarafından onaylanması istenecektir. Böyle bir durumda, doğacak zarar ve ziyanda anabilim dalımızın sorumluluğu bulunmamaktadır.

ONAM:

Yukarıda şahsımı aydınlatmak/bilgilendirmek maksatlı olarak yapılan açıklamaları okuduğumu;

A.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bölümüne başvuru nedenim olan; benim veya yakınımın ve/veya doğacak bebeğimin hastalığı/olası hastalığı, hastalığın genel özellikleri, seyri, sonuçları, tekrarlama olasılığı, ailenin diğer bireylerinin riski, bu hastalığın tanısı, öntanısı ve tanının olası sonuçları, yanlış tanı konma olasılıkları ile ilgili olarak;

- Durumumla ilgili yapılacak tıbbi müdahale ve diğer çalışmaları kabul etmeme hakkımın olduğunu, ancak benim ve/veya çocuğumun hastalığı/sağlık durumunun tesbiti açısından bedenden materyal alınması dahil, her türlü tıbbi müdahale, inceleme, uygulamayı hür iradem ve rızam ile peşinen kabul ettiğimi,
- Test(ler)in yapılma amacını bildiğimi,
- Test(ler) için vücuttan materyal alımının benim ve/veya çocuğumun sağlığına zarar verip vermeyeceği konusunda bilgilendirildiğimi,
- Yapılan testlerin bilimsel ve/veya çevresel etkenler nedeniyle olumlu ya da doğru sonuç vermeme olasılığının bulunduğunu, testlerin tanı koymada yeterli sonucu vermemesi halinde tekrarlanabileceğini, tekrar materyal alınabileceğini, bu nedenle olabilecek gecikmeleri kabul ettiğimi ve testlerin tekrarlanmasına rıza gösterdiğimi,
- Test sonuçlarının benim ve/veya ailem üzerinde psikolojik/sosyal/ekonomik ve diğer olumlu/olumsuz etkilerinin olabileceğini,
- Vücuttan materyal alınması sebebiyle, uygulama yapılan bölge ya da vücutta acı, ağrı, enfeksiyon gibi yan etkilerin görülebileceğini, bu tür rahatsızlıkların tıbbi müdahale

sebebiyle doğal olduğunu, bu nedenle doğabilecek sorunlara yönelik olarak herhangi bir yakınmada bulunmayacağımı,

- Test(ler)i yaptırmak veya yaptırmamak kararının tamamen bana ait olduğu, hiçbir baskı ve/veya tehdit altında olmadığını,
- Test sonuçlarını (?) öğrenmeme hakkımın olduğu,
- Kendi sonuçlarımı öğrenmek istemesem de, kalıtsal hastalıklar ve kamu yararının olduğu hallerde, kamu otoritelerinin ve ailenin diğer fertlerinin zamanında müdahale açısından bilgilendirilebileceğini, bu konuda doktora yetki verildiğini,
- Sonuçlarımın tıbbi genetik biliminin geliştirilmesi amacıyla yapılacak bilimsel araştırmalar haricinde hiçbir kişi, kurum ve kuruluş ile rızam olmadan paylaşamayacağı, her koşulda gizli tutulacağını, ancak sonuçlarımın kişisel bilgilerim saklı olmak kaydı ile kullanılabileceğini,
- Test sonuçlarının genetik danışmanlık ile birlikte verilmesinin Tıbbi Genetik bölümünün bir ilkesi olduğunu ve bu danışmanlık sürecinin benim/ailem için yararlı olduğunu,
- Talebim veya iznim halinde, benim ve/veya 18 yaşından küçük çocuklarımın yazılı test sonuçlarının uygun gördüğüm 3. şahıslara verilebileceğini,
- Evli çiftlerin bireysel test sonuçlarını tek başlarına ya da eşleriyle beraber öğrenmelerinin kendi tercihleri olduğunu,

Sonuç olarak;

Yukarıda belirtilen durumlar yanı sıra, tıbbi genetik çalışmaları ile ilgili olarak bilinen tüm hususlar, testler, hastalıklar, tedaviler, yöntemler, sebep ve sonuçlar üzerinde şahsıma tam ve net bilgi verildiğini, tüm şüphelerimin ortadan kaldırıldığını, konuyla ilgili olarak sorduğum tüm sorulara cevap verildiğini, iş bu belgeyi imzaladığım tarih itibarıyla benim ve/veya çocuğum üzerinde yapılacak tüm test ve tahlillere rıza gösterdiğimi, tüm sonuçlarını peşinen kabul ettiğimi, bana veya yasal olarak bakmakla yükümlü olduğum aşağıda ismi yazılı bireylere ve 18 yaşından küçük çocuklarıma ait materyalin yukarıdaki amaçlarla vücuttan alınmasına ve kullanılmasına izin verdiğimi kabul ve beyan ederim.

HASTANIN PARAFI (İMZASI): (Birinci sayfa için)

Test İçin Materyal Alınacak Birey:

Test Sonuçlarını Hakkında Aşağıda İsmi Yazılı Bireylere Bilgi Verilebilir:

İş bu Onam Formu toplam 2 (iki) sayfadan ibaret olup, aşağıda imzası bulunanlar tarafından tüm hüküm ve sonuçlarını ? kabul ve beyan etmek üzere, .../...../..... tarihinde, saat : itibariyle imza altına alınmıştır.

Hastanın	Hastanın velisinin ya da vasisinin	A.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Genetik A D adına
Adı ve soyadı:	Adı ve soyadı:	Hekim/personel:
Adresi:	Adresi:	Ünvanı:
İmzası:	İmzası:	İmzası:

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ANKARA ÜNİV. TIP FAK. GENETİK HASTALIKLAR TANI MERKEZİ

MATERYAL KABUL FORMU

(Materyalin Anabilim Dalımıza ilgili hasta/velisi veya vasisi tarafından getirilmediği durumda yalnızca aşağıdaki kısım doldurulacaktır)

Materyalin Cinsi: Alınış Tarih ve Saati: Teslim Tarih ve Saati:

Materyalin Durumu ile İlgili Açıklamalar:

.....

.....

.....

.....

.....

MATERYALİ GETİRENİN:

MATERYALİ TESLİM ALANIN:

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri

Tanı ve tedavi amaçlı alınmış olan doku/vücut sıvısı örneklerinin bu işlemler sonrasında arşivlenmesi ve araştırmalarda kullanılması konusunda bilgilendirilmiş onam formu

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde, tanı ve tedavi hizmetlerinin bir parçası olarak sizden periferik kan/kemik iliği/..... dokusu/..... örneği alınmıştır. Okuyacağınız bu bilgilendirme sizden alınan bu örnek ya da örneklerin işlemler sonrasında artan kısmı ile ilgili kararınız hakkındaki beyanınızla ilişkilidir.

Öncelikle sizden alınan örnek, amaçlandığı üzere sizin hastalığınızla ilişkili tanı ya da ilgili bir biyokimyasal belirteç ya da genetik tanı/belirteçi saptamak ve buna benzer çalışmalar için kullanılacaktır. Bu uygulamaların ardından sonuçlarınız raporlandıktan sonra izin vermeniz halinde, artan örnekler, araştırmada kullanılmak üzere öngörülen yasal süreden sonra da laboratuvarımız için ilgili düzenlemelerle depolanmaya devam edilecektir. İzin vermemeniz durumunda yasal saklama süresi sona eren örnekler usullere uygun olarak imha edilecektir. Sizden araştırma amacıyla yeni ya da farklı bir örnek alınmayacaktır.

Örneklerin depolanması ve korunması **Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı** sorumluluğunda gerçekleştirilecektir.

Örneklerden üretilecek bilgilerin gizliliği “Kişisel Sağlık Verilerinin İşlenmesi ve Mahremiyetinin Sağlanması Hakkında Yönetmelik” hükümlerine uygun olarak korunacaktır. Depolanan örnekler, kimlik bilgileriniz olmaksızın bir kod numarası ile kodlanarak saklanacaktır. Yapılacak araştırmalar sırasında bu kodlardan sizin kimlik ve klinik bilgilerinize ulaşılabilir. Bu işlem, örneklerin depolandığı birim sorumlularının izni ile gerçekleşebilir. Burada amaç sizin klinik verilerinizle, arşivlenen örneklerden araştırma kapsamında elde edilen verilerin karşılaştırılmasıdır. Bu durumda dahi örneğiniz kimlik bilgileriniz gizli tutularak (anonimleştirilerek) araştırmaya alınır ve siz bu durumun aksini belirtmedikçe de kimlik bilginiz gizli kalır.

Depolanan örnekler ticari amaçla hiçbir firmaya verilemez, kazanç sağlamak amacıyla kullanılamaz.

İzin vermeniz durumunda örneklerin depolanması sürecinde size, sağlık sigortanıza ya da sosyal güvenlik kurumunuza herhangi bir ücret yansıtılmayacaktır. Size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir.

Sizin izninizden bağımsız olarak, depolanan örnekler üzerinde yapılacak her araştırmanın etik kurul onayı alması gerekmektedir.

Depolanan örnekler üzerinde yapılacak araştırmalarda; doğrudan sizin için olası bir risk, yan etki ya da sizi rahatsız edecek bir durum yoktur. Ancak araştırmanın içeriğine bağlı olarak araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi sağlığınız açısından bazı riskleri (yeni bir belirteç bulunması, farklı bir tanı ile ilişkili bilgiye ulaşılması...) ortaya koyabilir. Bu riskleri öğrenmek istemeniz ya da istememeniz doğrudan sizin kararınızla belirlenecektir.

Depolanan örnekler üzerinde yapılacak araştırmalar; doğrudan size yarar sağlamayabilir ancak sizin hastalığınız ya da başka hastalıklarla ilişkili bilgi birikimine katkıda bulunarak toplumsal yarar sağlanabilecektir.

Bu bilgilendirmenin ardından aşamalı olarak sorular sorularak vereceğiniz kararlar sizin beyanınız doğrultusunda kaydedilecektir. Sizden alınan örneklerden tanı ve tedavi süreciniz sonrası artanlar hakkında kararlarınıza uygun olarak hareket edilecektir. Kararlarınız iki nüsha halinde yazılı olarak belgelendirilecek ve bir kopyası size verilecektir. Şimdi onam verseniz de, her hangi bir zaman bu onamınızı geri alabilirsiniz ve bu amaçla ihtiyaç duyacağınız iletişim bilgilerini size verilecek belgede bulabilirsiniz.

Hastanın Beyanı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde, tanı ve tedavi amacıyla tarafımdan dokusu/.....vücut sıvısı alındı. Bu dokusu/.....vücut sıvısı örneğinin gerekli işlemler sonrasında artan kısmının arşivlenmesi ve kullanımı hakkında tarafıma bilgi verildi.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı arşivinde dokusu/.....vücut sıvısı ya da bunlardan edilen genetik materyalin arşivlenmesine izin veriyor musunuz?

- ☐ Evet izin veriyorum.
- ☐ Hayır izin vermiyorum.

Eğer izin veriyorsanız;

- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneklerin yalnızca hastalığım ile ilişkili araştırmalarda kullanımını için izin veriyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneklerin yalnızca hastalığım ile ilişkili araştırmalarda kullanılması için **tekrar bilgilendirilmek ve yeni onam vermek istiyorum.**
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneklerin gelecekte her türlü araştırmada **anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılması için izin veriyorum.**
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneklerin gelecekte de her türlü araştırmada **anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılması için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onam vermek istiyorum.**

Bu seçeneklerden birini seçtiyseniz araştırmanın sonucu ile ilişkili olarak;

- ☐ Olası tüm yeni tanılar/ bulgular ile ilişkili olarak bilgilendirilmek istiyorum.
- ☐ Olası tüm yeni tanılar/ bulgular ile ilişkili olarak bilgilendirilmek istemiyorum.
- ☐ Sadece; tedavi olanağı olan ya da yatkınlıkla ilişkili bulunan ve önleyici girişim için olanak sunabilen yeni tanılar/ bulgular ile ilişkili olarak **bilgilendirilmek istiyorum.**

Bilgilendirilmek istiyorsanız, size ulaşamadığı durumlarda;

- ☐ Tarafımdan alınmış kodlanmış örnek araştırma amacıyla **kullanılabilir.**
- ☐ Tarafımdan alınmış kodlanmış örnek araştırma amacıyla **kesinlikle kullanılamaz.**

Gönüllü Birey:

Tarih ve saati:

Adı Soyadı:

TC kimlik numarası:

Telefon numarası:

İmza

Adres

Görüşmeyi yapan sorumlu doktor:

Adı soyadı:

Telefon numarası:

İmza:

İzin verilmesi halinde arşivlenecek örneklerle ilgili verilmiş olan onamın geri alınması amacı ile kullanılabilecek iletişim bilgileri:

Sorumlu birim:

Telefon numarası:

E-posta:

Adres:

Adı ve Soyadı:

Ünvanı:

Getirdiği tarih ve saat:

İmzası:

İmzası: