

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

LÖSEMİLERDEKİ FÜZYON GENLERİNİN TARANMASINA YÖNELİK
YENİ NESİL DİZİLEME PANELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Sadık Çiğdem

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Emre Keskin

Mayıs

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Sadık Çiğdem

İmzası

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Lösemilerdeki Füzyon Genlerinin Taranmasına Yönelik Yeni Nesil Dizileme Panellerinin
Geliştirilmesi

Sadık Çiğdem

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Emre Keskin

Hematolojik malignitelerin tanısı sitolojik, sitogenetik ve moleküler genetik analizleri içeren multidisipliner yaklaşımlara dayanır. Kanser genomisindeki ilerlemeler çeşitli kanserlerde belirgin prognostik değere sahip tekrarlayan mutasyonların tanımlanmasını sağlamıştır. Şimdiye kadar akut lösemilerde kromozomal yeniden düzenlemeler sonucu oluşan yüzlerce füzyon gen tespit edilmiştir. Lösemilerdeki bu tür mutasyonların test edilmesi kişiselleştirilmiş tedaviler için zorunludur. Geleneksel klinik tanıda kullanılan birçok yöntem füzyon genleri tam olarak saptayamamaktadır. Mevcut teknik sınırlamaların üstesinden gelmek için bu çalışmada hedefe yönelik yeni nesil dizileme yaklaşımı test edildi. Füzyon genlerin birleşme noktalarını içeren bölgelerin multipleks PZR bazlı paneller ile oluşturulan kütüphaneleri Illumina platformu kullanılarak dizilendikten sonra biyoinformatik yaklaşımlarla analiz edildi. 20 adet KMT2A füzyon transkripti için uyarlanmış AmpliSeq (Illumina) füzyon paneli ile bu füzyon transkriptleri taklit eden DNA parçaları kullanılarak yapılan mPZR ile 19 amplikon oluşturulabildi. NGS işlemleri ve biyoinformatik analizlerle 17 amplikon için belirgin bir sonuç alınırken, geriye kalan 3 tanesi için az sayıda füzyon olayını kesin bir şekilde tanımlayan bağlantı okumaları elde edildi. Yapılan titrasyon çalışmalarında, füzyon panelin 1 pg kadar eser miktarlardaki kalıp DNA parçalarını tespit edebildiği gösterildi. Bu sonuçlar, füzyon panelin klinik örnekler üzerinde denendikten sonra, kapsamındaki füzyon transkriptler için klinik tanıda kullanılabileceğini göstermektedir.

2021, 88 sayfa

Anahtar kelimeler: Lösemilerdeki gen füzyonlarının tespiti; multipleks PZR; hedefe yönelik yeni nesil dizileme; biyoinformatik; kişiselleştirilmiş tıp.

ABSTRACT

Master's Thesis

Development of Next Generation Sequencing Panels for Screening Fusion Genes in
Leukemia

Sadık ığdem

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Emre Keskin

Diagnosis of hematologic malignancies is based on multidisciplinary approaches including cytological, cytogenetic, and molecular genetic analyzes. Advances in cancer genomics have enabled the identification of recurrent mutations with the apparent prognostic value for various cancers. To date, hundreds of fusion genes resulting from chromosomal rearrangements have been identified in acute leukemia. Testing such mutations in leukemias is essential for personalized treatments. Many methods used in conventional clinical diagnosis could not fully detect fusion genes. To overcome the limitations of existing techniques, targeted next generation sequencing approach was tested in this study. The libraries of the regions containing the junctions of the fusion genes, formed by multiplex PCR-based panels, was deep-sequenced using Illumina platform, thereafter the results were analyzed by bioinformatics approaches. Using AmpliSeq (Illumina) fusion panel adapted for 20 *KMT2A* fusion transcripts and DNA fragments mimicking these fusion transcripts, 19 amplicons could be obtained with mPZR. With NGS procedures and bioinformatics analyses, significant results were obtained for 17 amplicons, while few junction reads that precisely describe the fusion event were obtained for the remaining 3. In titration studies, it was shown that the fusion panel can detect the template DNA fragments in trace amounts up to 1 pg. These results show that the fusion panel can be used in clinical diagnosis for the fusion transcripts in its scope, after testing on clinical specimens.

2021, 88 pages

Keywords: Detection of gene fusions in leukemia, multiplex PCR, targeted next generation sequencing, bioinformatics, precision medicine.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenme aşamasından, projelendirilip bir teze dönüştürülmesi aşamalarına kadar verdiği destek ve motivasyon için, çalışmalarımın başından sonuna kadar sağladığı her türlü laboratuvar olanakları için, bilgisini, deneyimini, vaktini ve yardımlarını esirgemeden sabırla bu teze çok büyük katkı sağlayan sevgili danışman hocam Doç. Dr. Emre KESKİN'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışmanın proje fikri 'Araştırma Metodolojisi, Proje ve Bilimsel Yayın Hazırlama Teknikleri' dersinden ve diğer derslerden edinilen kazanımlarla oluştuğunu belirterek, bu konudaki emeklerinden dolayı başta Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ olmak üzere tüm Biyoteknoloji Enstitüsü'nün değerli hocalarına çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım, boyunca sağladıkları her türlü deneyim, bilimsel tartışma ve destekleri için sevgili Evrimsel Genetik Laboratuvarı'ndaki (eGL) ekip arkadaşlarım; Esra Mine, Ayşegül, Pelin, Işıl, Metehan, Berkay ve Gizem'e çok teşekkür ederim.

Son olarak her zaman desteklerini esirgemeyen, canım annem ve babama, değerli kardeşlerime, her zaman sevgisi ve desteği ile yanımda olan canım eşime ve neşe kaynağı çocuklarıma sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜSEB'in 4582 numaralı Sistem Biyolojisi ve Biyoinformatik Projesi tarafından desteklenmiştir.

Sadık Çiğdem
Ankara, Mayıs 2021

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	6
2.1. KANSER.....	6
2.2. LÖSEMİ	6
2.3. LÖSEMİLERDEKİ GEN FÜZYONLARI.....	6
2.4. KMT2A/MLL FÜZYON GENLERİ.....	8
2.5. MULTİPLEKS PZR.....	11
2.6. YENİ NESİL DİZİLEME (NGS).....	11
2.6.1. HEDEFE YÖNELİK YENİ NESİL DİZİLEME	11
2.6.2. NGS İLE FÜZYON GEN TESPİTİ	12
2.6.2.1. Tüm Genom Dizileme (WGS)	12
2.6.2.2. Tüm Transkriptom Dizileme (WTS).....	13

2.6.2.3. Hibridizasyon Yakalama Dizilemesi.....	14
2.6.2.4. Multipleks PZR Tabanlı Ampikon Dizileme	15
2.6.2.5. Gelişen Füzyon Gen Tespit Yöntemleri.....	17
2.6.3. FÜZYON GEN TESPİTİ İÇİN BİYOİNFORMATİK ANALİZLER	18
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>20</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM</u>	<u>23</u>
4.1. MATERYAL	23
4.1.1. MULTİPLEKS PRİMERLER	23
4.1.2. KALIP DNA PARÇALARI	23
4.2. YÖNTEM	23
4.2.1. KMT2A FÜZYON GENLERİ İÇİN MULTİPLEKS PRİMER TASARIMI.....	23
4.2.2. KALIP DNA PARÇALARININ TASARIMI VE SENTEZİ	27
4.2.3. MULTİPLEKS PRİMERLER VE KALIP DNA 'LARIN PZR VALİDASYONU.....	28
4.2.4. STOKİYOMETRİK MPZR OPTİMİZASYONLARI	28
4.2.5. MULTİPLEKS PZR TABANLI HEDEFE YÖNELİK NGS	29
4.2.6. NGS VERİLERİNİN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ	31
4.2.7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	31
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	<u>32</u>
5.1. DNA FRAGMANI SENTEZİ	32
5.2. VALİDASYON VE STOKİYOMETRİ ÇALIŞMALARI	36
5.2.1. MULTİPLEKS PRİMERLER VE KALIP DNA 'LARININ PZR VALİDASYONU	36
5.2.2. DNA PARÇALARININ KOPYA SAYISI TİTRASYONU	39
5.3. YENİ NESİL DİZİLEME (NGS).....	41
5.3.1. ILLUMİNA AMPLİSEQ FÜZYON PANELİ İLE YAPILAN NGS	41

5.3.2. ION AMPLİSEQ HD FÜZYON PANELİ İLE YAPILAN NGS	43
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	<u>45</u>
6.1. TARTIŞMA.....	45
6.2. SONUÇ	48
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>51</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>62</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>74</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR</u>	<u>75</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çocuklarda görülen lösemilerdeki spesifik mutasyonların görülme sıklığı.....	2
Şekil 1.2. Myeloid lösemilerdeki gen füzyonları	4
Şekil 2.1. Kromozomal bozukluklar ve gen füzyonlarının işlevsel sonuçları (16).....	7
Şekil 2.2. Normal ve anormal KMT2A/MLL proteinleri (37).....	9
Şekil 2.3. Genomik ve transkriptomik dizileme stratejileri (50).....	13
Şekil 2.4. Multipleks PZR temelli hedefe yönelik NGS (50)	16
Şekil 2.5. Füzyon olayını destekleyen NGS okumaları (76).....	19
Şekil 4.1. Multipleks ve uzun oligonükleotid tasarımları	25
Şekil 5.1. Sentetik DNA parçalarının jel simülasyonu (SnapGene)	32
Şekil 5.2. Uzun primerlerle DNA parçası oluşturma reaksiyonu.....	33
Şekil 5.3. Uzun primerlerle oluşturulan DNA parçalarının jelden geri kazanımı.....	33
Şekil 5.4. DNA parçalarının jel simülasyonu (SnapGene).....	35
Şekil 5.5. Kalıp DNA parçaları	36
Şekil 5.6. Q5 ve GoTaq Flexi DNA polimerazlarla yapılan PZR optimizasyonları.....	37
Şekil 5.7. Füzyon panelleri ve DNA parçalarının kullanıldığı mPZR validasyonu.....	38
Şekil 5.8. GenPart kalıp DNA'ların kullanıldığı mPZR validasyonu	39
Şekil 5.9. Stokiyometrik çalışmalar için DNA fragmanlarının kopya sayısı titrasyonu	40
Şekil 5.10. Stokiyometrik çalışmalar için kalıp DNA miktarlarının titrasyonu.....	40
Şekil 5.11. NGS ön deneme çalışması için kullanılan örnekler	41

Şekil 5.12. NGS ön deneme çalışmasının sonucu.....	42
Şekil 5.13. NGS çalışmasında kullanılan amplikonlar.....	42
Şekil 5.14. NGS sonuçları (20 adet KMT2A füzyon geni için).....	44



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Akut lösemilerde en sık görülen füzyon genler (33, 36).....	8
Çizelge 2.2. KMT2A-AFF1 varyantları.....	10
Çizelge 2.3. Füzyon gen tespitinde kullanılan yeni teknolojiler	17
Çizelge 4.1. Multipleks PZR tabanlı Illumina AmpliSeq füzyon paneli (KMT2A-20).....	24
Çizelge 4.2. Multipleks PZR tabanlı Ion AmpliSeq füzyon paneli (KMT2A-47).....	26
Çizelge 4.3. NGS için örnek kombinasyonlarının hazırlanması	30
Çizelge 4.4. NGS örnek kombinasyonlarının birleştirilme miktarları	30
Çizelge 5.1. Kalıp DNA parçalarının jelden geri kazanım miktarları.....	34
Çizelge 5.2. GoTaq® G2 Flexi PZR.	41

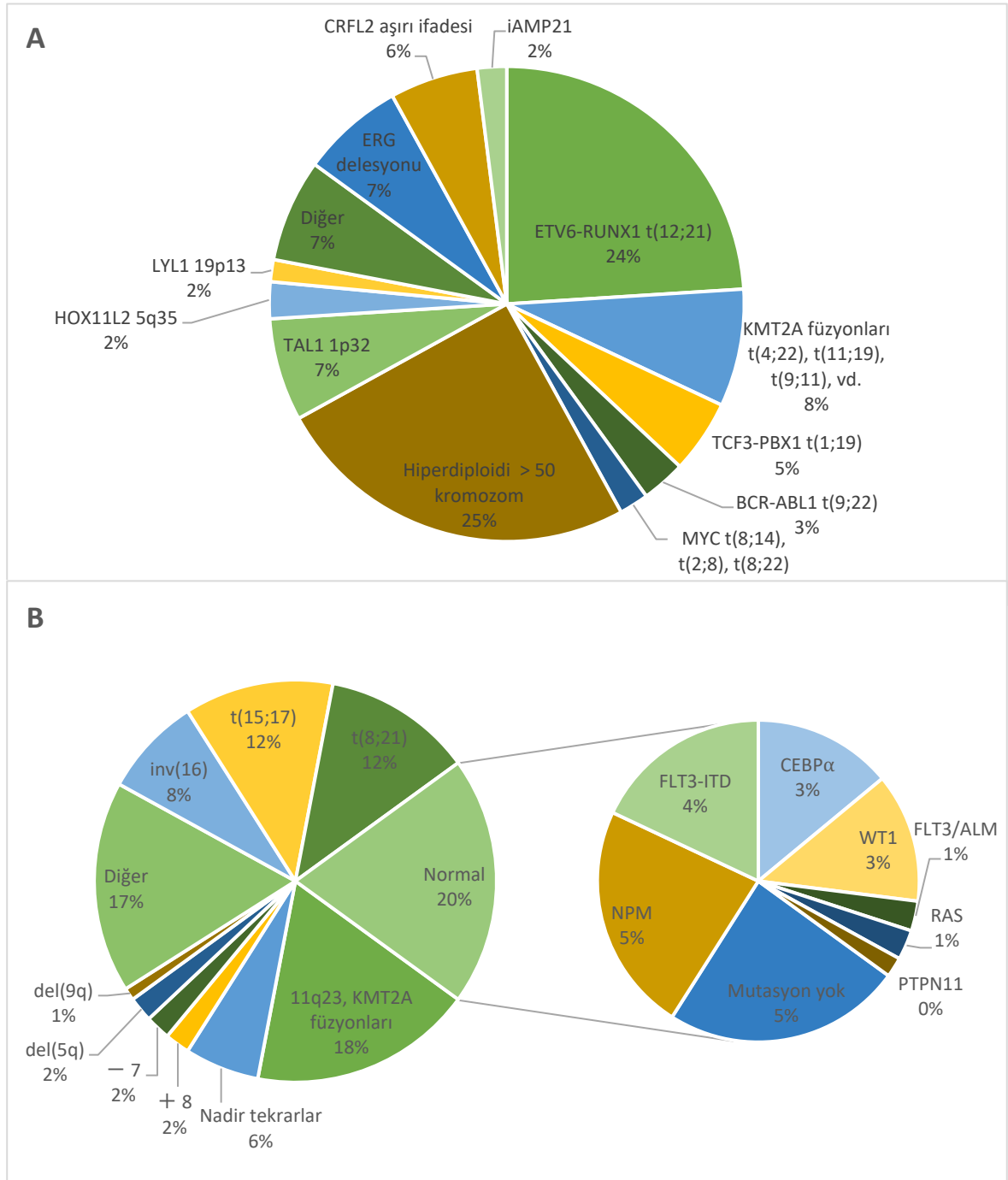
SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut myeloid lösemi
AMP	Bağlantılı mPZR (anchored mPCR)
bç	Baz çifti
cDNA	Tamamlayıcı DNA (complementary DNA)
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
FISH	Floresans in situ hibridizasyon
IHC	İmmünohistokimya
KML	Kronik miyeloid lösemi
mPZR	Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu
ng	Nanogram
NGS	Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing)
pg	Pikogram
pmol	Piko mol
RNA	Ribonükleik asit
RNAseq	RNA dizileme
sn	Saniye
tNGS	Hedefe yönelik yeni dizileme (targeted NGS)
WGS	Tüm genom dizileme (Whole Genome Sequencing)
WTS	Tüm transkriptom dizileme (Whole Transcriptome Sequencing)

1. GİRİŞ

Kanser, hücrel homeostazı değiştirmek ve büyümeyi artırmak için hücrel bilgi akışını değiştiren genetik temelli bir hastalıktır. Kromozomal anomaliler malign hematolojik hastalıkların patogenezi ile yakından ilişkilidir (1, 2). Kromozomal anormalliklerin çoğu, tümör oluşumu ve tümör gelişimi sırasında işlev gösteren füzyon genlerinin oluşumuna yol açar (3). Yeni gelişen teknolojilerde kaydedilen ilerlemeler lösemiler dışındaki diğer kanserlerde daha fazla füzyon geninin keşfedilmesini sağlamakla birlikte, füzyon genlerinin büyük çoğunluğunun hematolojik malignitelerde ortaya çıktığı gösterilmiştir (4). Buna ek olarak, füzyonların bir kısmının spesifik lösemi alt tiplerinde tekrarlı bir şekilde ortaya çıktığı gösterilmiştir (Şekil 1.1.). Yeni nesil DNA dizileme teknolojilerinin gelişmesi kansere sebep olan mutasyonların ve genomik değişikliklerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesinde önemli ilerlemeler sağlamıştır (5, 6). Ayrıca, ekzom dizilemesinin kansere yönelik klinik uygulaması, hedefe yönelik tedaviye uygun birçok protein kodlayıcı mutasyon tespit etmiştir (7-9).

İlk füzyon geninin on yıllar önce keşfedilmesinden bu yana, lösemilerde önemli sayıda füzyon gen tespit edilmiştir. Bunların çoğunluğu kromozomal yeniden düzenleme veya anormal transkripsiyon yoluyla oluşmuştur (1, 2, 4). Yeni nesil dizileme gibi yüksek verimli teknolojilerin gelişmesi, birçok insan kanserlerinde füzyon genlerinin sistematik olarak tespit edilmesini mümkün kılmaktadır (10-12). Biyolojik önemleri ve tümöre özgü ifadeleri nedeniyle bazı füzyon genler en seçkin tanı ve tedavi hedefleri arasında olmuştur. BCR-ABL1 füzyon proteini içeren kronik miyeloid lösemilerin (KML) çığır açan hedefe yönelik tedavisi için tirozin kinaz inhibitörleri yaygın olarak kullanılırken, ATRA'nın PML-RARA füzyon proteinini içeren akut promiyelositik lösemisinin (APL) hedefe yönelik tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, yüksek doz sitarabin ile tedavi, *CBF* mutasyonlarının sebep olduğu akut myeloid lösemi (AML) hastalarının prognozunu önemli ölçüde iyileştirmiştir (13). Bu nedenle, füzyon genler ile ilgili çalışmalar gelecekte daha fazla tanı belirteçleri ve tedavileri sağlayarak lösemili hastalara fayda sağlayabilir (5, 14).



Şekil 1.1. Çocuklarda görülen lösemilerdeki spesifik mutasyonların görülme sıklığı (A) Akut lenfoblastik lösemilerde (ALL) görülen genetik anormallikler. (B) Akut miyeloid lösemilerde (AML) görülen genetik bozukluklar. Solda en yaygın görülen karyotip değişiklikleri gösterilmektedir. Tüm çocukların %80'inde hastalığa bağlı genomik yapısal değişiklikler bulunmaktadır. Sitogenetik anormallikleri olmayanların (normal karyotip) mutasyon profili sağda gösterilmiştir. Normal karyotip popülasyonundakilerin %76'sı bilinen mutasyonlardan birini taşımaktadır. Dolayısıyla, AML'li çocukların %95'inde en az bir genetik bozukluk bulunmaktadır (4).

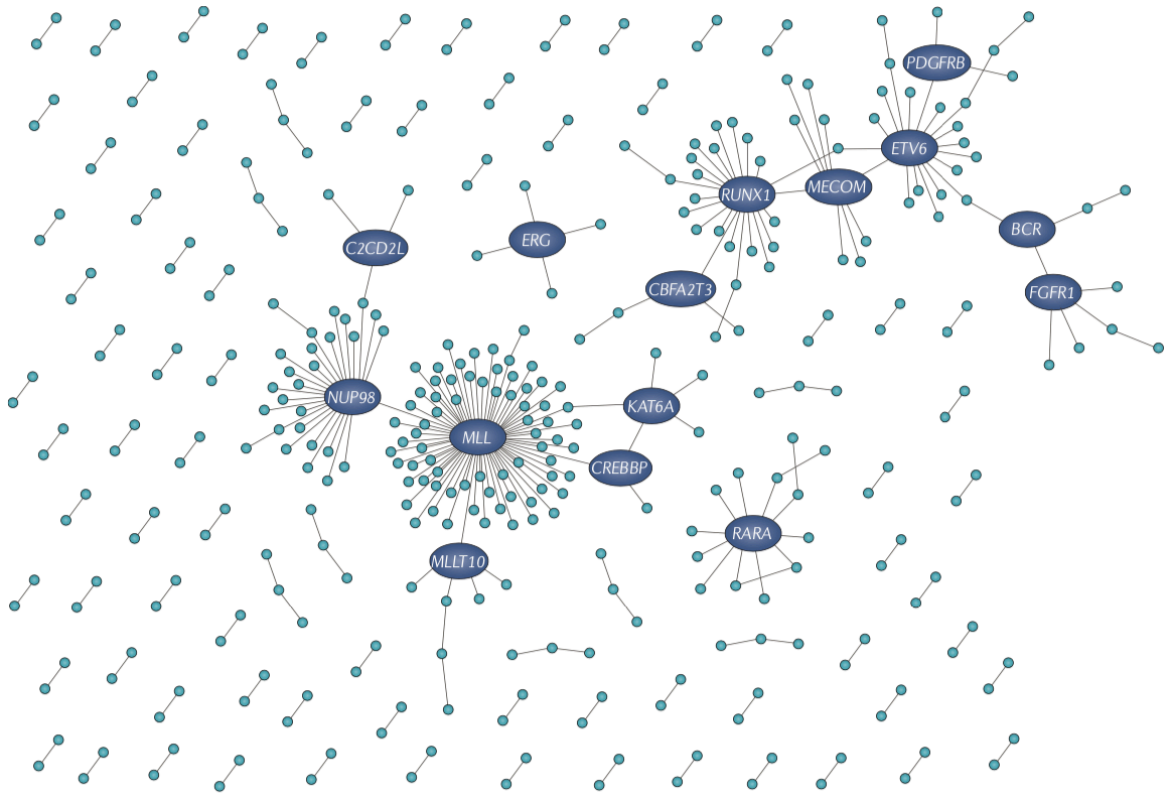
Lösemilerde translokasyonlar sonucu oluşan 500'ün üzerinde füzyon gen tespit edilmiştir (3, 4). Kromozomal yeniden düzenlemeler sonucu oluşan yüzlerce füzyon gen mutasyonlarının test edilmesi hedefe yönelik tedaviler için zorunludur. Geleneksel klinik tanıda kullanılan, karyotipleme, floresans in situ hibridizasyon (FISH) ve immünohistokimya (IHC) gibi hücresel yöntemler füzyon genleri tam olarak saptayacak çözünürlükte değildir. Ayrıca, rutin klinik testlerde sadece sıklıkla rastlanılan az sayıdaki mutasyonun taraması yapılmaktadır, bu taramalardan negatif sonuç alınması durumunda hasta normal karyotip olarak kabul edilip birkaç nokta mutasyonlarına bakılmaktadır. Ancak, bu durumda nadir görülen ve tedavilere farklı yanıtlar veren yüzlerce füzyon gen mutasyonu dışlanamamaktadır. Buna rağmen, herhangi bir mutasyon tespiti yapılmayan hastalarda kişiye özgü tedavi yerine löseminin alt tipine özgü daha genel bir tedavi protokolü oluşturulmaktadır. Birçok mutasyonun tek reaksiyonda analiz edilebildiği ve hedefe yönelik yeni nesil dizileme (tNGS) yaklaşımının, bu alandaki teknik sınırlamaları ortadan kaldırma potansiyeli vardır.

Lösemi hastalarında kromozomal yeniden düzenlemeler sonucu oluşan füzyon genlerin tespit edilmesinde günümüz teknolojilerinin kullanılması, kişiselleştirilmiş tedaviler için hayati önem arz etmektedir. Günümüzde bu tür mutasyonların tespit edilmesinde yüksek duyarlılığa sahip eşzamanlı PZR tekniği de kullanılmaktadır. Ancak, şimdiye kadar lösemilerde görülen yüzlerce füzyon gen mutasyonu arasından, hangi mutasyonun bir bireydeki hastalığa sebep olduğunun tespit edilmesi hem çok zaman alıcıdır hem de maliyet açısından çok külfetlidir.

KMT2A mutasyonları, çeşitli akut lösemi alt tiplerinin en az %10'unda rol oynar. Lösemilerde görülen gen füzyonları arasında en çok *KMT2A* geni farklı genlerle füzyon oluşturur. Solid tümörlerde ve lösemilerde yer alan füzyonlar hakkında bilgi içeren COSMIC veri tabanına girişleri yapılmış 305 füzyon genden 53 çeşidini *KMT2A* geninin farklı genlerle yaptığı füzyonlar oluşturur (15). Ayrıca, bazı KMT2A füzyonları bir füzyon ortağıyla birden fazla füzyon oluşturabilmektedir. Literatürde geçen füzyon genlerin çok büyük bir kısmı bu genin değişik eksonlarıyla birleşerek oluşur (Şekil 1.2.) (16).

Lösemilerdeki KMT2A füzyonlarının tespiti için demirlenmiş (anchored) multipleks PZR ile çalışmanın daha uygun olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (17). Ancak, bu yöntem

ile oluşturulan NGS verisinin önemli bir kısmı füzyon gen sinyalini bastıran normal KMT2A transkriptlerine ait okumaları da içerdiğinden dolayı bu veriden füzyon gen tespitinin yapılması kolay değildir. *KMT2A* genini içeren füzyon genlerin böyle bir çalışma için en zor ve karmaşık adaylar olduğu açıktır. Bu çalışmada, birçok benzer genomik bölgeyi içeren KMT2A füzyonlarının tespitinin multipleks PZR tabanlı NGS yöntemiyle başarılması, herhangi bir lösemi alt tipinde görülebilecek bütün füzyonların benzer yaklaşımlarla çalışılmasının önünü açacaktır.



Şekil 1.2. Myeloid lösemilerdeki gen füzyonları
MLL, NUP98, RUNX1, ETV6, RARA ve MDS1 ve EVI1 kompleks lokusu (MECOM) gibi genler en fazla ortak genle füzyon oluşturur (16).

Literatürdeki benzer çalışmalara özellikle son zamanlarda rastlamak mümkün (17-20). İlk zamanlarda füzyon genlerde multipleks PZR denemeleri yapılmış (21), daha sonra yeni nesil dizileme teknolojisinin gelişmesiyle önce tüm genomdan sonra da hedef DNA bölgelerinde çalışılmıştır (7, 8, 10-12). Günümüzde hedef RNA bölgeleriyle multipleks PZR ve NGS çalışmaları yapılmaktadır.

Mevcut tekniklerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için bu çalışmada hedefe yönelik yeni nesil dizileme (tNGS) yaklaşımı test edildi. Füzyon genlerin birleşme noktalarını

içeren bölgelerin multipleks PZR tabanlı paneller ile oluşturulan kütüphaneleri Illumina platformu kullanılarak dizilendikten sonra biyoinformatik yaklaşımlarla analiz edildi. Öncelikli olarak, birçok farklı genin değişik eksonlarıyla füzyon gen oluşturan *KMT2A* (MLL) geni ve partnerlerinin olduğu füzyon genler çalışıldı. 20 adet *KMT2A* füzyon transkripti için uyarlanmış AmpliSeq (Illumina) füzyon paneli ile bu füzyon transkriptleri taklit eden DNA parçaları kullanılarak yapılan mPZR ile 19 amplikon oluşturulabildi. Bu amplikonlar ile yapılan NGS işlemleri ve biyoinformatik analizlerden sonra 17 tanesi için belirgin bir sonuç alınırken, geriye kalan 3 tanesi için füzyon olayını kesin bir şekilde tanımlayan az sayıda bağlantı okumaları elde edildi. Yapılan titrasyon çalışmalarında, füzyon panelin 1 pg kadar eser miktarlardaki kalıp DNA parçalarını tespit edebildiği gösterildi. Bu sonuçlar, füzyon panelin klinik örnekler üzerinde denendikten sonra, kapsamındaki füzyon transkriptler için klinik tanıda kullanılabileceğini göstermektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KANSER

Kanser, kendiliğinden oluşan veya çevresel faktörlerle uyarılan DNA mutasyonlarının neden olduğu genetik bir hastalıktır (22). Ayrıca, kanserler sıklıkla değiştirilmiş DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik varyasyonlar sergiler ve bu tür modifikasyonları düzenleyen genlerde edinilmiş mutasyonlardan kaynaklanabilir. Bu genetik ve epigenetik değişiklikler, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel süreçleri düzenleyen kritik genlerin ifadesini veya işlevini değiştirir (23). Kanser, dünyadaki başlıca ölüm nedenlerinden biridir (24).

2.2. LÖSEMİ

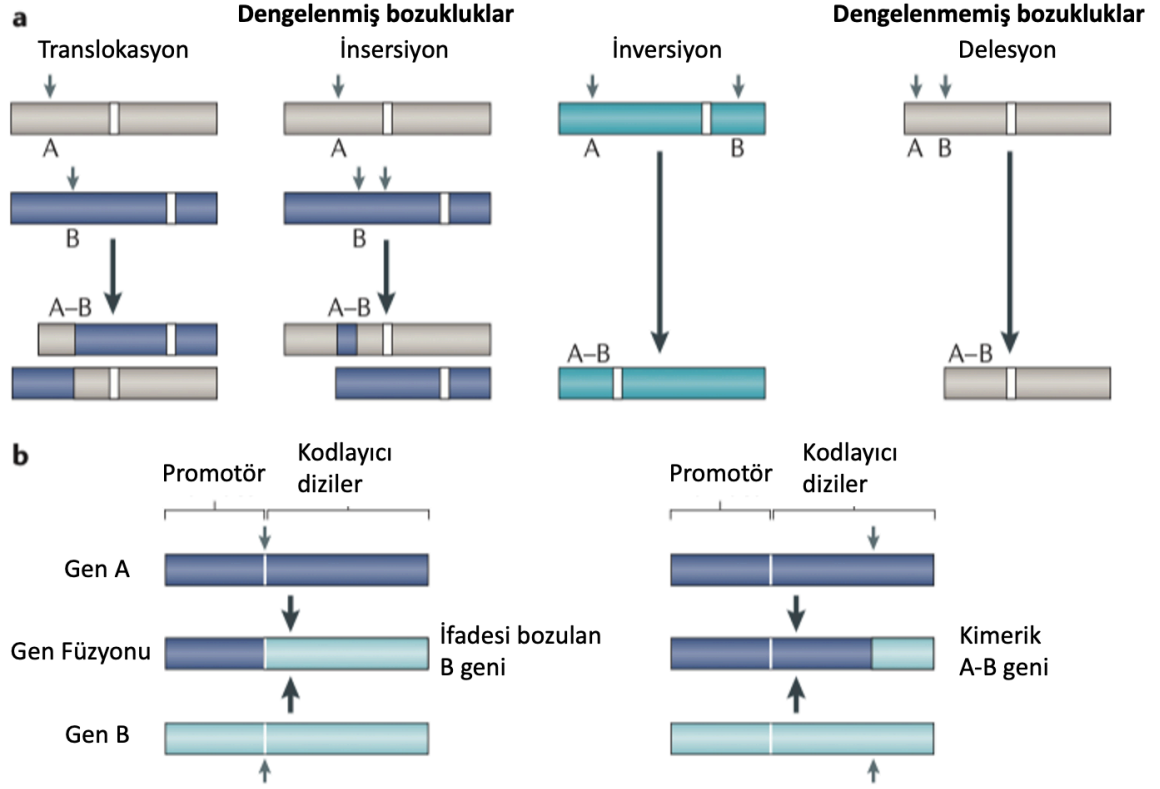
Lösemi, kemik iliğinde başlayan ve çok sayıda olgunlaşmamış kan hücresinin üretilmesine ve kan dolaşımına girmesine neden olan çeşitli kan hücreleri kanseridir. Lösemi, hücresel olgunluğa (akut veya kronik) ve hücre çeşidine (lenfoid veya miyeloid) göre farklı alt tiplere ayrılır (25). Daha agresif bir görünüme sahip olan akut lösemiler, akut miyeloid lösemi (AML) ve akut lenfoid lösemi (ALL) olarak sınıflandırılır. Akut lösemi, hematopoietik progenitör hücrelerin bloke farklılaşması ve kontrolsüz çoğalması ile karakterize, son derece heterojen bir hastalıktır (13, 26).

Akut lösemi, kemik iliğinde biriken ve normal kan hücrelerinin üretimini engelleyen olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinin hızlı çoğalması ile karakterizedir. Lösemiye ilişkin blastların soy özelliklerine dayalı klinik sınıflandırma, akut lösemiye, akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut miyeloid lösemi (AML) olarak ayırır. ALL, bebek ve çocuklarda en sık görülen kanser iken, AML insidansı yaşla birlikte artar (27).

2.3. LÖSEMİLERDEKİ GEN FÜZYONLARI

Füzyon genler, önceden farklı iki gen tek bir oluşum halinde birleştğinde oluşur. Dengeli translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar ve tandem duplikasyonlar gibi füzyon genleri oluşturan birçok kromozomal yeniden düzenleme vardır (16). Bu genomik yeniden düzenlemeleri harekete geçiren mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamış olsa da bunlar temelde bağışıklık hücrelerinde normal somatik V(D)J rekombinasyonunu

yönetenlerden farklıdır (28-31). Kromozomal yeniden düzenlemelerden kaynaklanan gen füzyonları, kodlayıcı dizilerin düzenleyici dizilerle bir araya gelmesiyle ifadesi bozulan bir ortak gen veya yeni özelliklere sahip kimerik bir protein oluşturur (Şekil 2.1.). Füzyon gen çalışmaları lösemi oluşumunda etkili yeni mekanizmaları ortaya çıkarmıştır ve gelecekte de lösemi kavrayışımızı genişletmeye devam edecektir.



Şekil 2.1. Kromozomal bozukluklar ve gen füzyonlarının işlevsel sonuçları (16)

Bir füzyon gen tarafından oluşan tümörler, bir füzyon olayı olmayan kanserlerden daha düşük mutasyon oranları sergiler, bu da ortaya çıkan kimerik ürünlerin hiçbir ek ortak genomik olay gerektirmeyen güçlü onkogenler olarak davrandığını düşündürür (32).

Kanserlerdeki kromozomal bozuklukları gen füzyonlarıyla ilişkilendiren Mitelman veri tabanında en yaygın görülen füzyon genler incelendiğinde, AML ve ALL'de sıklıkla tekrarlanan çok çeşitli füzyon genlere rastlanır (Çizelge 2.1.) (33). Tekrarlayan kromozomal anormalliklerin bazıları, akut lösemilerin belirli bir alt tipiyle ilişkilendirilme eğilimindedir; örneğin PML-RARA ve RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) füzyon proteinlerini oluşturan t(15;17) ve t(8;21) translokasyonları sadece AML'de bulunurken, TCF3-PBX1'i kodlayan t(1;19) yalnızca ALL'de görülür. İlginç biçimde, KMT2A/MLL

(karışık soy lösemi) genini içeren ve hastalık seyri genel olarak çok kötü olan 11q23 kromozom anormallikleri ALL ve AML'de rastgele bulunur (34, 35).

Çizelge 2.1. Akut lösemilerde en sık görülen füzyon genler (33, 36)

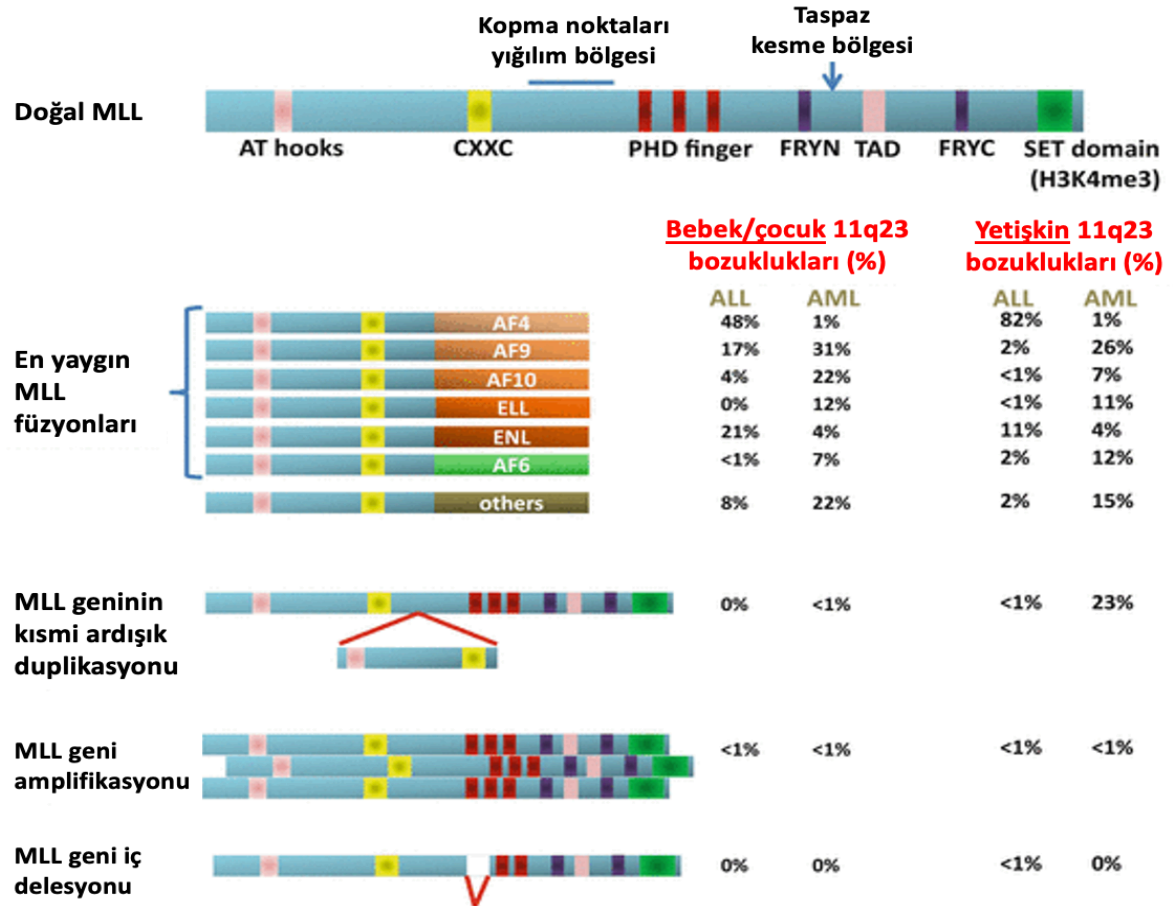
Hastalık	Füzyon Gen	Kromozomal Bozukluk	Sıklık
Akut lenfoblastik lösemi (ALL)	BCR-ABL1	t(9;22)	9,3
	KMT2A-AFF1	t(4;11)	5,3
	TCF3-PBX1	t(1;19)	4,3
	ETV6-RUNX1	t(12;21)	4,1
	KMT2A-ELL	t(11;19)	1,4
	PAX5-JAK2	del(9)(p13)	1,3
	TRD-LMO2	t(11;14)	0,9
	TRD-TLX1	t(10;14)	0,6
Akut myeloid lösemi (AML)	RUNX1- RUNX1T1	t(8;21)	11,2
	PML-RARA	t(15;17)	8,1
	CBFB-MYH11	inv(16)	6,5
	KMT2A-MLLT3	t(9;11)	3,0
	BCR-ABL1	t(9;22)	1,9
	GATA2-MECOM	inv(3)	1,8
	KMT2A-ELL	t(11;19)	1,5
	RPN1-MECOM	inv(3)	1,1
	DEK-NUP214	t(6;9)	0,9

2.4. KMT2A/MLL FÜZYON GENLERİ

11q23'te bulunan KMT2A geni, drosophila trithorax geninin (trx) insan homologudur ve transkripsiyonla pozitif olarak ilişkili histon 3 lizin 4'ü (H3K4me3) tri-metile eden SET histon metiltransferaz (HMT) bölgesini kodlar. Moleküler ağırlığı yaklaşık 430 kDa olan KMT2A proteini, DNA bağlanma bölgeleri (AT-kancaları ve CXXC bölgesi ile PHD parmakları) ve TAD transaktivasyon bölgesini de içerdiği için aynı zamanda transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. KMT2A proteini, PHD parmakları ve transaktivasyon bölgesi arasında proteolitik olarak iki parçaya (MLL-N ve MLL-C) ayrılır. MLL-N ve MLL-C konsensüs etkileşim motifleri yoluyla spesifik olarak bir araya gelerek hematopoez dahil olmak üzere birçok normal gelişim aşamaları için gen ifadesini düzenler (37).

Kromozomal translokasyonlar, kısmi tandem duplikasyon (PTD), amplifikasyon ve dahili delesyon olmak üzere dört çeşit tekrarlayan 11q23 kromozom anomalisi akut lösemilerde tanımlanmıştır (Şekil 2.2.). MLL-PTD, amplifikasyon ve delesyon AML'de görülürken,

MLL translokasyonları tüm farklı akut lösemi alt tiplerinde en çok tekrarlanan 11q23 yapısal kromozom bozukluğudur (34). 11q23 aberasyonlu lösemi tedavisi devasa bir klinik zorluk olmaya devam etmektedir. 11q23 aberasyonu olmayan çocukluk çağı ALL için %80'e varan iyileşme oranları sağlanmasına rağmen, 11q23 anormallikleri olan hastalar için görünüm çok daha kötüdür. Sonuç olarak, 11q23 kromozomal yeniden düzenlemelerin varlığı genellikle kötü prognozu işaret eder (38).



Şekil 2.2. Normal ve anormal KMT2A/MLL proteinleri (37)

Bebeklik veya çocukluk çağı ile yetişkin ALL ve AML'deki tüm 11q23 aberasyonlarının görülme sıklıkları verilmiştir (39). Tüm nadir KMT2A füzyon partnerleri 'diğerleri' olarak sunulmuştur. KMT2A'nın işlevsel protein bölgeleri: AT-kancaları ve CXXC DNA bağlanma bölgeleri; FRYN/FRYC konsensüs etkileşim motifleri; TAD, transaktivasyon bölgesi; SET domain, H3K4me1,2,3 metilasyonuna aracılık eden bölge olarak belirtilmiştir.

Tüm KMT2A translokasyonları, CXXC DNA bağlanma bölgesi ve merkezi PHD parmakları arasındaki 8.3 kb'lık kopma noktalarının kümelendiği bir bölge içinde gerçekleşir. Sonuç olarak, tüm KMT2A füzyonları, DNA bağlanma motiflerini içeren KMT2A amino ucunu korurken, karboksi ucundaki SET bölgesi, başka transkripsiyonel

efektör veya homo-dimerizasyon bölgelerini bulundurabilen füzyon ortağı ile değiştirilir. Şimdiye kadar, nükleer veya sitoplazmik proteinlerden oluşan 94 farklı KMT2A füzyon ortağı tanımlanmış olsa da AFF1/AF4, MLLT3/AF9, MLLT10/AF10, ELL, MLLT1/ENL ve MLLT4/AF6 gibi füzyon ortaklarını da içeren 9 spesifik gen füzyonu vakaların %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. MLLT4/AF6 hariç hepsi nükleer proteinlerdir (34, 37).

Bununla birlikte, KMT2A her bir füzyon ortağıyla birden fazla füzyon gen oluşturabilir (15). ALL'de en sık rastlanılan KMT2A-AFF1 füzyon geni her bir füzyon ortağının farklı ekson kombinasyonlarıyla onlarca füzyon varyantı oluşturur (Çizelge 2.2. ve Ek 1). Hedefe yönelik dizileme yaklaşımlarında bu varyantların dışlanmaması gerekir.

Çizelge 2.2. KMT2A-AFF1 varyantları
KMT2A-AFF1 füzyon geninin birçok varyantı için tasarlanan Illumina panelinin kapsadığı varyantlar yeşil, Ion Torrent panelinin kapsadığı varyantlar ise mavi ile vurgulanmıştır.

Mutasyon No	5' Partner Gen		3' Partner Gen		KMT2A (20)	KMT2A (47)	Mutasyon Sayısı	Mutasyon Sıklığı
	Gen İsmi	Gözlemlenen Son Ekson	Gen İsmi	Gözlemlenen İlk Ekson				
COSF1948	KMT2A	9	AFF1	4			6	1,93%
COSF2066	KMT2A	8	AFF1	5			6	1,93%
COSF1827	KMT2A	8	AFF1	4			4	1,29%
COSF1829	KMT2A	10	AFF1	4			3	0,96%
COSF1831	AFF1	3	KMT2A	9			1	0,32%
COSF1832	AFF1	3	KMT2A	11			1	0,32%
COSF1954	KMT2A	7	AFF1	4			1	0,32%
COSF1955	KMT2A	7	AFF1	6			1	0,32%
COSF1956	KMT2A	7	AFF1	5			1	0,32%
COSF2023	KMT2A	9	AFF1	5			1	0,32%
COSF2068	KMT2A	8	AFF1	6			1	0,32%
COSF2073	KMT2A	10	AFF1	5			1	0,32%
COSF2075	AFF1	4	KMT2A	9			1	0,32%
COSF1830	KMT2A	10	AFF1	4			1	0,32%
COSF1828	KMT2A	8	AFF1	4			1	0,32%
COSF2091	KMT2A	10	AFF1	6			1	0,32%
COSF1799	KMT2A	8	AFF1	11			1	0,32%
COSF1801	KMT2A	8	AFF1	6			1	0,32%
COSF1947	KMT2A	?	AFF1	?			278	89%
Toplam Mutasyonlar							311	100%

2.5. MULTİPLEKS PZR

Multipleks PZR (mPZR), birçok farklı DNA dizisinin polimeraz zincir reaksiyonu ile aynı anda bir karışım içinde çoğaltılmasını ifade eder. Diğer bir deyişle, bir tek reaksiyonda birçok ayrı PZR reaksiyonu yapılmasıdır. Çoklu primer setleriyle bir tek PZR karışımı içinde farklı DNA dizilerine özgü değişen boyutlarda ampliconlar üretilir. Birden çok dizi aynı anda hedeflenerek, tek bir test çalışmasından daha fazla veri elde edilir, başka türlü her bir ampliconun tek tek çoğaltılması daha fazla reaktif ve zaman gerektirir. Primer setlerinin her biri PZR sırasında aynı bağlanma sıcaklığında ve tek bir reaksiyon içinde çalışacak şekilde tasarlanmalı ve optimize edilmelidir (40).

2.6. YENİ NESİL DİZİLEME (NGS)

Yeni Nesil Dizileme (NGS), binlerce ila milyonlarca DNA molekülünü aynı anda dizileyen yüksek verimli bir yöntemdir. NGS, 2005 yılında ilk kez piyasaya sürüldüğünden beri, baskın bir DNA dizileme teknolojisi haline geldi. Bir hastanın tüm genomunun, ekzomunun veya hedeflenen bazı genlerinin dizilenmesiyle ve sonrasında bireysel genetik profillere göre uyarlanmış tedavilerin uygulanabilmesiyle kişiselleştirilmiş tıp gerçeğe dönüşmeye başladı. 1990'dan bu yana DNA dizileme teknolojilerindeki gelişmeler, tek bir insan genomunu dizileme süresinde ve maliyetinde önemli bir düşüş sağladı (41, 42).

Bugüne kadar, tüm kanser alt tiplerinde, 14.000'den fazla gen ortağından oluşan yaklaşık 32700 füzyon gen tanımlandı (33). Bu sayı, bilinen füzyon genlerin %90'ından fazlasının tanımlanmasını sağlayan yeni nesil dizilemenin (NGS) ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır (16). "Derin", "büyük ölçüde paralel" veya "ikinci nesil" sekanslama olarak da bilinen NGS, milyonlarca DNA molekülünü nükleotit düzeyi çözünürlükte eşzamanlı dizileme yaparak yeni hastalık genlerinin saptanmasını hızlandıran ileri bir teknolojidir (43).

2.6.1. Hedefe Yönelik Yeni Nesil Dizileme

Hedefe yönelik yeni nesil dizileme, bütün bir genomun yalnızca bir kısmını veya ilgilenilen bölgeleri dizileme yöntemidir. Bir genomun yalnızca spesifik veya klinik olarak ilgili bölgelerine odaklanmak için, hedef DNA dizileri doğrudan amplifiye edilir (amplicon veya multipleks PZR tabanlı) veya yakalama yapılır (hibrid yakalama tabanlı) ve daha

sonra dizilenir. Hedefe yönelik yeni nesil dizileme, ilgilenilen bölgedeki bilinen ve yeni varyantları tespit etmek için kullanılabilir (44, 45).

2.6.2. NGS ile Füzyon Gen Tespiti

Gen füzyonlarını tespit etmek için kullanılması gereken koşullara göre güçlü ve zayıf yönleriyle birçok sekanslama tabanlı yaklaşım vardır. Gen füzyonları tespiti yapan NGS yaklaşımlarında, girdi materyali olarak DNA veya RNA kullanan kapsamlı tüm genom veya transkriptom dizileme ile sınırlı sayıda geni analiz eden hedefe yönelik paneller kullanılmaktadır. Ayrıca, kullanılan NGS yöntemleri kütüphane hazırlama, hedef zenginleştirme ve dizileme kimyası için de farklılık gösterir (46).

2.6.2.1. Tüm Genom Dizileme (WGS)

Tüm genom dizileme (WGS), bir örneğin tüm DNA dizisinin ortaya çıkarılmasıdır. Bunu başarmak için, genomik DNA parçalanır, seçilen NGS platformuna özgü adaptör dizilerine bağlanır ve kapsamlı genomik karakterizasyon için gerekli derinlikte dizilenir (Şekil 2.3.A). DNA'nın moleküler olarak daha stabil olmasından dolayı kolaylaşan kütüphane oluşturma aşamaları oldukça güvenilirdir ve rutin olarak gerçekleştirilir. Füzyon genlerini tanımlamak için dizileme sonrası spesifik biyoinformatik analizler gereklidir (47).

WGS tüm genomik dizinin profilini çıkardığı için, füzyon gen tespitinde genel bir yaklaşım sağlar ve bir füzyon olayının genomik konumunu kesin olarak tanımlayabilir. Füzyon bağlantılarının çoğu intronlar veya intergenik bölgeler içinde meydana geldiğinden dolayı, RNA tabanlı yaklaşımlar füzyon konumları hakkında yalnızca çıkarımda bulunabilir. Bununla birlikte, WGS'nin füzyon gen tespiti için birincil faydası, gen ekspresyon seviyelerini değiştiren ancak transkript dizilerini değiştirmeyen regülatör element yeniden düzenlemelerini, RNA bazlı yaklaşımlar kullanılarak tanımlanamayan olayları, tanımlayabilmesidir (48).

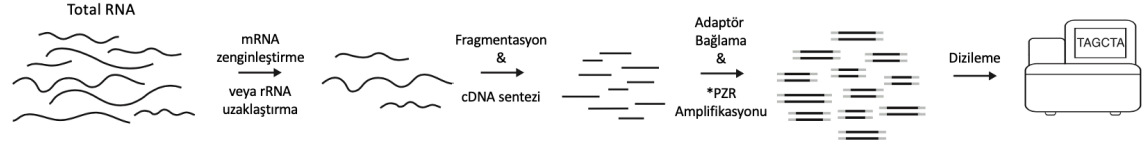
WGS verilerinden yüksek güvenilirlikte füzyon gen tespiti çok fazla okuma gerektirdiği için rutinde maliyet engeline takılabilir. Ayrıca, WGS ile sadece konumu belirlenen bir yeniden düzenleme bölgesinden mutlaka RNA veya protein ifade edilmesi beklenmez. Bu nedenle, füzyonun hastalık gelişiminde veya ilerlemesinde rol oynamaması da mümkündür. Dahası, WGS, herhangi bir genomik değişiklik olmadan, komşu genlerin

transkripsiyonel olarak okunmasıyla meydana gelen füzyon transkriptlerini gözden geçirir (49).

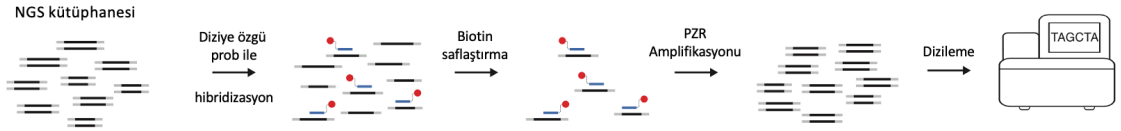
A. Tüm Genom Dizileme (WGS)



B. RNA Dizileme (RNAseq)



C. Hibrid Yakalama Bazlı Dizileme



Şekil 2.3. Genomik ve transkriptomik dizileme stratejileri (50)

2.6.2.2. Tüm Transkriptom Dizileme (WTS)

Transkripsiyonel olarak ifade edilen lokusların tüm transkriptomik profilinin RNA sekanslama (RNAseq) yoluyla ortaya çıkarılmasıdır (51). Ana akım NGS platformları RNA'yı doğrudan dizilemediği için, transkriptler önce tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürülür, iş akışının bir parçası olarak rRNA'lar temizlenir ve NGS platformuna özgü adaptörler eklenerek dizilenir (Şekil 2.3.B) (52, 53). Sekanslama sonrası, füzyon gen tanımlama, kimerik okumaları tanımlayan spesifik biyoinformatik paketler kullanılarak veri işlemeyi gerektirir.

Füzyon gen tespitinde RNAseq kullanmanın birçok faydası vardır. İlk olarak, WGS'ye benzer şekilde, füzyon genlerin tespitinde ifade edilen tüm genler arasında bilinen ve yeni füzyonları kapsayan genel bir yaklaşım sağlar (54). İkincisi, genomun sadece %1-2'si ifade edildiğinden karmaşıklıkta azalma nedeniyle eşdeğer dizileme derinliğinde RNAseq WGS'den daha hassastır. Üçüncüsü, farklı intronik kırılma noktalarına sahip birçok füzyon DNA varyantı aynı onkogenik transkripti kodlayabildiği için, RNAseq işlevsel olarak daha bilgilendiricidir (55). Son olarak, işlenen RNA analiz edilirken, RNAseq verileri, füzyona

dayalı ifade değışikliklerinin tahminini sağlar ve tedavi yanıtını etkileyebilecek füzyon transkript varyantlarının saptanmasına izin verir (56).

RNAseq kullanılarak füzyon gen belirlemenin birçok faydasına rağmen, bazı zayıf yönleri de vardır. Dizileme derinliği sınırlamaları nedeniyle, düşük düzeyde eksprese edilmiş füzyon transkriptlerini ve az miktarda tümör hücresi içeren numunelerdeki füzyonları gözden kaçırabilir. Bu eksiklikler, dizileme derinliğinin artırılmasıyla giderilebilir, ancak bu maliyet açısından uygun olmayabilir. RNAseq ile füzyon gen tespiti, RNA parçalanmaya karşı DNA'dan daha duyarlı olduğundan özellikle formalinle fikse edilmiş doku örneklerinde daha az verimlidir. Son olarak, RNAseq, RNA dizisinde değışiklik oluşturmeyen sadece RNA ekspresyon seviyelerini değıştiren kromozomal yeniden düzenlemeleri tespit edemeyecektir (57).

2.6.2.3. Hibridizasyon Yakalama Dizilemesi

Bir numunenin tüm DNA ve RNA profilini inceleyen WGS ve RNAseq'in aksine, hibridizasyon yakalama dizilemesi, ilgili genleri yakalamak ve dizilemek için NGS kütüphanesi hazırlandıktan sonra bir hibridizasyon adımı eklenir (Şekil 2.3.C). Bu adımda, biyotinli DNA veya RNA probları kullanılarak hedef moleküllerin izolasyonu gerçekleştirilir (58). Hibridizasyon yakalama panellerinin boyutları 20 genden tüm ekzoma kadar değışebilir, ancak yaygın olarak incelenen yolak veya hastalıkla güçlü ilişkileri olan hedef genlerle sınırlandırılır. Bu yöntem ile füzyon gen tespiti yapılırken, DNA tabanlı dizilemede proplar füzyon kırılma noktalarını barındırdığı bilinen spesifik intronik, eksonik ve intergenik bölgeleri yakalayacak şekilde tasarlanır (59, 60). RNA tabanlı dizilemede ise proplar yalnızca eksonik bölgeleri hedefler ve bir genin ya tüm eksonlarını ya da genomik yeniden düzenlemelerin olduğu intronları çevreleyen belirli eksonlar hedeflenir (61, 62).

Füzyon gen tespitinde hibridizasyon yakalama tekniğinin kullanılması birçok fayda sağlar. İlk olarak, gene özgü hedef zenginleştirme sayesinde geleneksel bir dizileme kütüphanesindeki füzyon gen sinyalini baskılayan füzyon olmayan okumaların sayısını azaltır (63). Böylece, düşük düzeyde ifade edilen füzyon genler veya düşük tümör içeriğine sahip numunelerdeki füzyonlar için daha hassas bir saptama sağlanır (64). İkinci olarak, önceden karakterize edilmemiş füzyon ortakları, yakalama paneli tarafından hedeflenen

gen için tanımlanabilir (57). Ayrıca, RNA tabanlı hibridizasyon yakalama yaklaşımları, tüm transkriptom dizileme ile karşılaştırıldığında düşük kaliteli RNA örneklerinden füzyon saptama başarısını iyileştirir (65, 66).

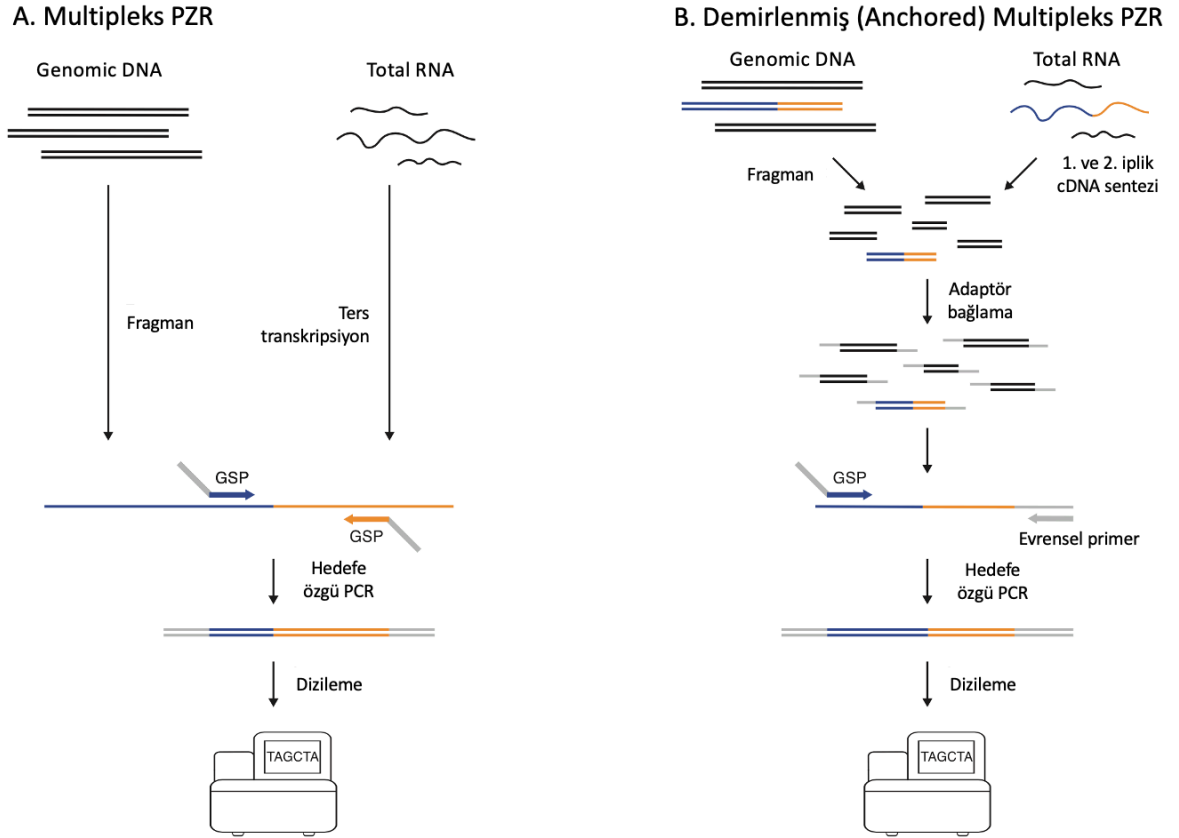
Hibridizasyon yakalama tekniği füzyon gen tespitine yönelik yüksek dizileme derinliği sağlayarak birçok üstünlük sunarken, bu yaklaşımın bazı zayıf yönleri de vardır. Hedef panelde en az bir füzyon ortağı bulunması gerektiğinden dolayı tamamen yeni füzyon genler, oluşturulan dizileme kütüphanesinden hariç tutulacaktır. Benzer şekilde yakalama problemleri, füzyon noktasına yakın genomik bölgeleri hedeflemelidir, bağlantı noktasından uzak gen bölgelerini hedefleyen problemler kullanılarak oluşturulan kütüphanenin kısa okumalı dizilemesi füzyonu kapsamayabilir (63). Çoğu hedefe yönelik yaklaşımlarda olduğu gibi hibridizasyon yakalama iş akışı sırasında kullanılan ekstra PZR döngüleri artefakt ve sapmalara yol açabilir.

2.6.2.4. Multipleks PZR Tabanlı Amplikon Dizileme

Hedef zenginleştirme tabanlı dizilemeye yönelik diğer bir ana yaklaşım, multipleks PZR'dir (mPZR). Multipleks PZR, tek bir reaksiyonda birden fazla hedef bölgeyi eşzamanlı olarak çoğaltmak için karma primer havuzu kullanır. Her amplifiye moleküle ligasyon yoluyla veya PZR sırasında eklenen platforma özgü adaptörler kullanılarak tüm amplifiye edilmiş hedeflerin tanımlanması için örnekler daha sonra NGS'ye tabi tutulur. Çoğaltılan bölgelerin sınırlı sayıda olması nedeniyle ortaya çıkan verilerin biyoinformatik analizi WGS veya RNAseq analizinden tipik olarak daha basittir (55). Füzyon gen tespitinde kullanılan iki çeşit mPZR vardır. Geleneksel mPZR, füzyon kombinasyonlarını kuşatmak için füzyon gen ortaklarına özgü tasarlanan primer çiftleri havuzuna dayanır (Şekil 2.4.A). Buna karşılık, demirlenmiş (anchored) mPZR (AMP) ile füzyon gen tespitinde, bir amplikonu oluşturacak primer çiftlerinden biri füzyon gen ortaklarından birine göre tasarlanır, diğeri için NGS platformuna özgü adaptör dizisine karşılık gelen sabitlenmiş evrensel bir primer kullanılır ve hedeflenen bölgeler çoğaltır (Şekil 2.4.B) (67).

Multipleks PZR ile füzyon gen tespitinin birçok faydası vardır. Hem geleneksel mPZR hem de AMP, yüzlerce gen hedefini sorgularken, DNA ve RNA'dan %98'den fazla duyarlılık ve özgüllükle füzyon genlerini tespit eder (68, 69). Multipleks PZR ile füzyon tespiti yalnızca hedeflenen genler ve kopma noktaları ile sınırlı olsa da AMP yeni füzyon

ortaklarını tespit edebilir ve KMT2A gibi birçok farklı partner gen ile seçici olmadan füzyon oluşturan genler için önemli bir üstünlük sağlar (34). AMP yöntemindeki bu esneklik aynı zamanda yeni alternatif birleştirmelerin (splicing) tanımlanmasını da sağlar (67). Ayrıca, kullanılan yöntem füzyon gen analizini yalnızca panelin kapsamıyla sınırladığından, WGS veya RNAseq ile karşılaştırıldığında mPZR verilerinin hesaplamalı analizi daha kolaydır.



Şekil 2.4. Multipleks PZR temelli hedefe yönelik NGS (50)

A. Multipleks PZR (çalışmalarımızda bu yöntem kullanıldı) B. Demirlenmiş (anchored) multipleks PZR (AMP)

Füzyon gen tespiti için mPZR kullanmanın birincil sakıncası, füzyon genlerin karakterize edilmemiş ve yaygın olmayan varyantlarının, oluşturulan NGS kütüphanesinden dışlanabilmesidir. WGS veya RNAseq'den daha hızlı olmasına rağmen, saptanabilir füzyon genlerin kapsamı önemli ölçüde sınırlanabilir. Ayrıca hem geleneksel mPZR hem de AMP, bir panele daha fazla gen hedefi dahil edildikçe artan hedef dışı primer bağlanmaları ve primer dimerleri gibi PZR'nin ortak teknik sınırlamalarına tabidir (50, 70).

Hali hazırda, yeni teknolojiler kullanılarak füzyon gen tespiti yapan kullanıma hazır birkaç panel mevcuttur (46, 50, 71). Bununla birlikte, AmpliSeq dahil olmak üzere çeşitli teknolojiler kullanılarak tespit edilecek füzyonlara göre uyarlanmış paneller tasarlamak da mümkündür (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. Füzyon gen tespitinde kullanılan yeni teknolojiler

Yaklaşım	Analiz	Füzyon sayısı	Girdi malzemesi (miktar)	Dizileme platformu
Hibridizasyon yakalama	SureSelect (Agilent)	12	DNA (≥ 50 ng)	Illumina
	TruSight (Illumina)	507	RNA (10-100 ng)	Illumina
Multipleks PZR	OncoMine (Ion Torrent)	23-51	RNA & DNA (≥ 1 & ≥ 10)	Ion Torrent
	Ion AmpliSeq (Ion Torrent)	Uyarlanabilir	RNA (20 ng)	Ion Torrent
	AmpliSeq (Illumina)	Uyarlanabilir	RNA (20 ng)	Illumina
Demirlenmiş (Anchored) Multipleks PZR	FusionPlex (ArcherDX)	3–199	RNA (10-250 ng)	Illumina, Ion Torrent
	QuantideX (Asuragen)	11	RNA (≥ 20 ng)	Illumina
	Ovation (NuGEN)	502	RNA (10–200 ng)	Illumina
	QIASeq (QIAGEN)	18–230	RNA (10–250 ng)	Illumina, Ion Torrent
Diziye özgü hibridizasyon	nCounter (NanoString)	18-20	RNA (50–300 ng)	NanoString

Füzyon gen tespiti için güçlü ve zayıf yönleri olan birçok farklı dizileme tabanlı yaklaşım vardır. Dikkate alınacak faktörler şunları içerir: i) füzyon gen partnerlerinin ve kesme noktalarının bilinip bilinmediği; ii) diğer eşlik eden mutasyonları sorgulamanın değeri; iii) gerekli ekipmanın ve laboratuvar veya biyoinformatik uzmanlığının mevcudiyeti; iv) yöntemle ilgili maliyetler ve v) bir sonuç oluşturmak için gereken süre. Hem füzyon gen partnerleri hem de füzyon pozisyonu biliniyorsa mPZR, WGS veya RNAseq'den daha ucuz ve çalışılması daha hızlı olduğu için füzyon gen tespiti için ideal bir yöntemdir.

2.6.2.5. Gelişen Füzyon Gen Tespit Yöntemleri

Yukarıda açıklanan füzyon gen tanımlama yaklaşımları, ağırlıklı olarak şu anda dizileme sektöründe baskın olan "ikinci nesil" NGS platformlarını kullanmaktadır. Bununla birlikte,

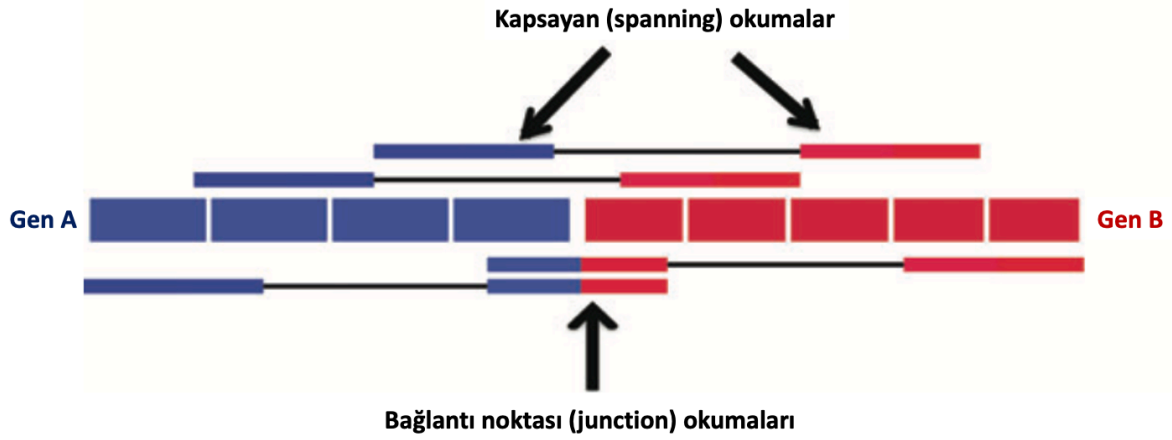
dizileme öncesi nükleik asit fragmentasyonu çok az gerektiren veya hiç gerektirmeyen Pacific Biosciences ve Oxford Nanopore gibi "üçüncü nesil" uzun okuma yapan dizileme platformları aktif bir gelişim göstermektedir. Bu yaklaşımlar, kütüphane oluşturma aşamasında PZR'yi sınırlayan veya ortadan kaldıran numune hazırlama yaklaşımlarını kullanarak, RNA'daki izoformları ve DNA'daki yapısal varyasyonları belirlemek için idealdir (72). Bununla birlikte, yüksek bir hata oranı ve büyük miktarda örnek gereksinimi gibi zayıf yönler uzun okumalı dizilemenin güçlü yönlerini dengelemektedir (73). Klinik örneklerinde materyalin kısıtlı olması uzun-okumalı dizilemenin kullanımını sınırlar, ancak hedefe yönelik yaklaşımların uygulanması bu zayıf yönün üstesinden gelebilir (74).

NanoString platformu, son zamanlarda füzyon gen tespitinde uygulanan yüksek verimli, transkriptom tabanlı alternatif bir teknolojidir. İlişkili nCounter Teknolojisi ile, DNA veya RNA hedef molekülleri, diziye özgü yakalama ve raportör prob çiftlerine hibridize edilir, ardından bu hedef prob kompleksleri saflaştırılır ve bir yüzeyde sabitlenerek görüntülenir. Daha sonra, her bir barkodlu floresan raportör probunun varlığı ve miktarı sayısal olarak analiz edilir. NanoString, floresan yoluyla işlenmiş her bir RNA molekülünü doğrudan tespit ederek, cDNA'ya dönüştürme ve PZR amplifikasyonuna özgü sapmaları ortadan kaldırır (75). Bununla birlikte, prob tasarımı, füzyon gen dizisinin önceden bilinmesini gerektirdiğinden, sadece bilinen ve doğrudan hedeflenen füzyon genler tespit edilebilir. Dolayısıyla, yeni füzyon genlerin keşfedilme olasılığı yoktur.

2.6.3. Füzyon Gen Tespiti için Biyoinformatik Analizler

Burada tartışılan füzyon gen tespiti yapan yaklaşımların çoğu, füzyon olayını destekleyen kanıtlar için işlenmiş NGS okumalarına dayanır. Füzyon tespiti için hem tek yönlü hem de çift yönlü dizileme kullanılabilir, ancak çoğu yaklaşım bir füzyon gen için iki tür destekleyici kanıt sağlayabilen çift yönlü dizileme kullanır. Hem çift yönlü hem de tek yönlü dizileme verileri, iki farklı genden dizi parçalarını içeren ve bir füzyon geni kesin olarak tanımlayan kimerik okumalar olan bağlantı veya bölünmüş (junction/split) okumaları içerir. Bununla birlikte, kapsayan (spanning) okumalar yalnızca çift yönlü dizileme verisinden elde edilir ve ileri okuma bir gene eşlenirken, geri okuma farklı bir gene hizalanarak füzyon olayının tanımlanmasına destek verir (Şekil. 2.5.). Çift yönlü

dizileme verilerinin bu iki şekilde kullanımı nedeniyle, birçok yaklaşım füzyon gen tespiti için çift yönlü dizilemeyi gerektirir (50, 76).



Şekil 2.5. Füzyon olayını destekleyen NGS okumaları (76)

NGS verilerinden bağlantı noktası ve kapsayan okumalarının belirlenmesi, özel biyoinformatik yazılımlar gerektirir. Şimdilerde, füzyon gen tespiti için kullanıma açık 40'tan fazla yazılım paketi bulunmaktadır ve bunların çoğu yalnızca RNA tabanlı verileri analiz etmektedir (76-78). Her bir yazılım paketi birbirinden biraz farklı olsa da temelde iki çözümlemeli yaklaşıma dayanır. 'Mapping-first' yaklaşımı, NGS okumalarını bir genom veya transkriptoma hizalayarak başlar ve birden çok genle eşlenen okumaları kullanarak genomdaki yeniden düzenleme olaylarını tanımlar. Alternatif olarak, 'assembly-first' yaklaşımı, önce birbirine karşılık gelen NGS okumalarını herhangi bir referans diziyeye hizalamadan kendi aralarında birleştirir, bu şekilde oluşturulan nükleotid dizileri daha sonra genom veya transkriptom ile eşleştirilerek uyumsuz olarak haritalanan dizilerden füzyon gen belirlenir.

Füzyon gen tespiti yapan her biyoinformatik iş akışının kendine özgü güçlü ve zayıf yönleri vardır. Benzer şekilde, füzyon gen tespiti yapan her bir yazılım paketi farklı sonuçlar verebilmektedir. Bu farklılıkların üstesinden gelmek için, bazı gruplar birçok biyoinformatik yazılım paketinin çıktısını birleştirir ve füzyon tanımlamasını çoklu yazılım paketleri tarafından bulunanlarla sınırlandırır, böylece daha yüksek güvenilirlikteki füzyon genler belirlenir (68, 77).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Füzyon gen tespiti NGS yaklaşımlarının güçlü yönlerine rağmen, klinik uygulamada geleneksel yöntemler halen baskın bir konumdadır. FISH, IHC ve RT-PZR füzyon gen tespiti için geleneksel klinik tanıda kullanılan yöntemlerdir (79). Yüksek duyarlılık ve özgünlükte hızlı sonuç sağlaması ve ilgili kromozomal bozukluğa sahip hücrelerin oranını vermesi ile füzyon gen tespiti için altın standart olan FISH, sadece en yaygın genomik yeniden düzenlemeleri sınırlı çözünürlükte tespit edebilmektedir ve yüzlerce füzyon genin tespiti için önemli olan multipleks çalışma kapasitesi düşüktür (80, 81). Ayrıca, rutin tanıda çalışılan FISH problemleri, füzyon ortağını tanımlamadan yalnızca kromozomal yeniden düzenlemelerin daha sıklıkla rastlanıldığı diğer ortak gene ait mutasyonları ortaya çıkarır ki bu durum hastalığın alt tipinin belirlenmesini ve hastalık seyrinin tahminini zorlaştırmaktadır (82).

Benzer şekilde, görece basit ve hesaplı bir yöntem olan IHC, füzyon proteinlere spesifik olarak bağlanan ve yüzlerce füzyon proteinden sadece belirli bir kısmı için bulunabilen yüksek afiniteli antikorlar gerektirir. Füzyon transkriptlerinin seviyelerini ölçmede oldukça hassas ve spesifik olan RT-PZR'nin primer tasarımı için hem füzyon ortakları hem de füzyon noktası hakkında kesin bilgi gerekir ve yüzlerce füzyon genin tespitinde son derece önemli olan multipleks çalışmaya uygun değildir (83).

Klinik tanıda kullanılan geleneksel yaklaşımlar, yalnızca uygun olabilen az sayıdaki füzyon genlerin belirlenmesinde kullanılabilir ve bu da tanı kapsamını ciddi bir şekilde sınırlandırır. Ayrıca, rutin klinik tanıda kullanılan tüm yaklaşımlar yoğun işgücü gerektirir ve karakterize edilmemiş füzyon ortaklarının tespitini kısıtlar. Füzyon gen tespiti için NGS yaklaşımlarının klinikte uygulanmasıyla geleneksel yöntemlerdeki zayıf yönlerin çoğunun üstesinden gelinebilir. Bu bakımdan klinik tanıda kullanılabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesine çok ihtiyaç vardır.

NGS tabanlı testlerin etkinliğini ölçmek için, mevcut klinik tanı yöntemleriyle karşılaştırmalı birçok çalışma yapılmıştır. Genel olarak, bu çalışmalarda FISH, IHC, hibridizasyon yakalama ve mPZR yaklaşımları arasında güçlü bir uyum olduğu gösterilmiştir (68, 79, 84-86). Üstelik bazı çalışmalarda NGS yaklaşımlarının füzyon

genleri FISH'den daha güvenilir bir şekilde saptadığı gösterilmiştir (82, 87). Ayrıca, test uyumsuzluğu da FISH, IHC ve NGS tabanlı yaklaşımlar arasında benzer bir sıklıkta görülmüştür (88, 89).

NGS tabanlı klinik tanının birçok avantajına rağmen, klinikte tam olarak uygulanmasının önünde önemli engeller devam etmektedir. Küçük miktarlardaki klinik numunelerden NGS için gerekli başlangıç materyalinin elde edilmesi bu zorluklardan biridir. Ayrıca, dizileme cihazına erişim ve işletim uzmanlığına sahip bir ekibe ek olarak kapsamlı eğitim ve yeni ekipman alımını gerektiren NGS laboratuvar teknikleri, bazı klinik laboratuvarlar için tamamen yeni olabilir. Son olarak, her ne kadar ticari yazılım programları veri yorumlama zorluğunu azaltmaya çalışsa da veri yorumlama, standart bir patoloji laboratuvarında muhtemelen bulunmayan biyoinformatik analiz uzmanlığı gerektirir. Bu zorluklardan dolayı, günümüzde NGS ile tanı yapan gelişmiş ülkelerdeki klinik patoloji laboratuvarların büyük çoğunluğunda füzyon gen tespiti yapılamamaktadır (90).

Numune hazırlama, dizileme, biyoinformatik analiz ve raporlama gibi aşamalardan oluşan tüm NGS süreçlerinin standardizasyonunun NGS tabanlı teknolojilerin klinik uygulamasını hızlandırması muhtemeldir. Klinik patoloji laboratuvarlarının füzyon gen tespitinde karşılaştığı spesifik uygulama zorluklarını, NGS tabanlı yaklaşımlar güçlü yönleri sayesinde önemli ölçüde iyileştirebilir.

Füzyon genlerin kanser gelişimindeki sürücü rolü göz önüne alındığında, bunların tespiti; tanı koymak, hastalığı takip etmek, kanser alt tipi ve risk sınıflandırması bilgilerini sağlamak için kritiktir. Füzyon gen tespiti için güçlü ve zayıf yönler sunan birçok farklı dizileme tabanlı yaklaşım vardır. Hem füzyon gen partnerleri hem de füzyon pozisyonu biliniyorsa multipleks PZR tabanlı ampikon dizileme, daha ekonomik ve çalışılması daha hızlı olduğundan füzyon gen tespiti için ideal bir yöntemdir.

Bu çalışmada lösemiye başlatıcı etkisi olan füzyon genlerin yüksek verimli nükleotid dizileme gibi günümüz teknolojileriyle taranması için hedefe yönelik NGS panellerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışma ile yeni nesil dizilemede kullanılan özgün füzyon gen panellerinin sağlık alanına kazandırılması hedeflenmektedir. Bu paneller sayesinde lösemilerdeki sürücü veya başlatıcı mutasyonların tespitinde kullanılan ve onlarca analizin tek bir testte daha etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi istenmektedir.

Birçok farklı genin değişik eksonlarıyla füzyon gen oluşturan KMT2A (MLL) geni ve partnerlerinin olduğu füzyon genlerin kullanıldığı model çalışma için; multipleks primer tasarımı yapabilen platformların kullanılması, füzyon transkriptleri taklit eden DNA parçalarının gen sentezi yöntemiyle elde edilmesi, multipleks primerler ve kalıp DNA parçaları kullanılarak hedef dizilerin kütüphanelerinin oluşturulması, yüksek verimli nükleotid dizileme için Illumina platformunun kullanılması, oluşan büyük hacimli verinin analizinin biyoinformatik yaklaşımlarla yapılması hedeflenmektedir.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. Multipleks Primerler

DesignStudio multipleks primer tasarım programı kullanılarak 20 adet KMT2A füzyon geni ve 12 adet referans gen olmak üzere toplam 32 amplikonu tek havuzda çoğaltabilecek şekilde tasarlanan AmpliSeq füzyon paneli Illumina'dan sipariş edildi. Toplam 42 adet oligonükleotid içeren bu panelin amplikon uzunluklarının dağılımı: maksimum 174, medyan 149, ortalama 141 ve minimum 91 baz çiftidir.

Ion AmpliSeq Designer multipleks primer tasarım programı kullanılarak 47 adet KMT2A füzyon geni ve 19 adet referans gen olmak üzere toplam 66 amplikonu tek havuzda çoğaltabilecek şekilde tasarlanan AmpliSeq HD füzyon paneli ise Ion Torrent'den sipariş edildi. Toplam 68 adet oligonükleotid içeren bu panelin amplikon uzunluklarının dağılımı: maksimum 175, ortalama 150 ve minimum 125 baz çiftidir.

4.1.2. Kalıp DNA Parçaları

20 adet KMT2A füzyon geninin kalıp DNA parçalarını sentezlemek için uzun primerler Oligomer'den sipariş edildi.

47 adet KMT2A füzyon geni için kalıp DNA fragmanları ise GenScript'den sipariş edildi.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. KMT2A Füzyon Genleri İçin Multipleks Primer Tasarımı

Illumina'nın multipleks primer tasarım programı DesignStudio'da aşağıdaki basamaklar takip edilerek KMT2A füzyon genleri için multipleks primer paneli tasarlandı. Start Design → Select Assay (Assay Type: RNA; Assay Technology: AmpliSeq for Illumina Fusion; Species: Human (hg19); Design Name: KMT2A Fusions) → Manage Targets (Add Fusions → Search Symbol Pair: KMT2A-...) → Submit Design.

Füzyon ortağı genlerin çeşitli eksonlarının birleşmesi sonucunda oluşan KMT2A füzyon transkriptleri tabloda gösterilmiştir (Çizelge 4.1.). Bu panel, 20 KMT2A füzyon transkriptini, birleşme noktalarını da kapsayacak şekilde, çoğaltmayı sağlayan primerler karışımıdır. Bu füzyon panelindeki toplam primer sayısı dikkate alındığında, füzyon ortağı genlerin her farklı eksonu için bir primer tasarlandığı çıkarımında bulunabiliriz.

Çizelge 4.1. Multipleks PZR tabanlı Illumina AmpliSeq füzyon paneli (KMT2A-20)
Illumina ve Ion Torrent panelleri için ortak olan 6 füzyon transkripti yeşil renk ile vurgulanmıştır (KMT2A/MLL için Transkript Id: ENST00000534358).

#	ID	5' Partner Gen	Donör Ekson	3' Partner Gen	3' Partner Gen Transkript Id	Alıcı Ekson
1	KMT2A-AFF1.K8A5	KMT2A	8	AFF1	ENST00000307808	5
2	KMT2A-AFF1.K8A6	KMT2A	8	AFF1	ENST00000307808	6
3	KMT2A-AFF1.K8A7	KMT2A	8	AFF1	ENST00000307808	7
4	KMT2A-AFF1.K9A6	KMT2A	9	AFF1	ENST00000307808	6
5	KMT2A-AFF1.K9A7	KMT2A	9	AFF1	ENST00000307808	7
6	KMT2A-AFF1.K10A5	KMT2A	10	AFF1	ENST00000307808	5
7	KMT2A-AFF1.K10A6	KMT2A	10	AFF1	ENST00000307808	6
8	KMT2A-AFF1.K10A7	KMT2A	10	AFF1	ENST00000307808	7
9	KMT2A-ELL.K7E3	KMT2A	7	ELL	ENST00000262809	3
10	KMT2A-FOXO4.K7F2	KMT2A	7	FOXO4	ENST00000341558	2
11	KMT2A-MLLT1.K7M9	KMT2A	7	MLLT1	ENST00000252674	9
12	KMT2A-MLLT1.K10M2	KMT2A	10	MLLT1	ENST00000252674	2
13	KMT2A-MLLT3.K7M7	KMT2A	7	MLLT3	ENST00000380338	7
14	KMT2A-MLLT3.K8M11	KMT2A	8	MLLT3	ENST00000380338	11
15	KMT2A-MLLT3.K10M5	KMT2A	10	MLLT3	ENST00000380338	5
16	KMT2A-MLLT6.K7M12	KMT2A	7	MLLT6	ENST00000621332	12
17	KMT2A-MLLT10.K7M9	KMT2A	7	MLLT10	ENST00000377072	9
18	KMT2A-MLLT10.K7M13	KMT2A	7	MLLT10	ENST00000377072	13
19	KMT2A-MLLT10.K8M12	KMT2A	8	MLLT10	ENST00000377072	12
20	KMT2A-MLLT10.K9M4	KMT2A	9	MLLT10	ENST00000377072	4

Füzyon transkriptini çoğaltacak primer çifti, füzyon genlerin bağlantı eksonlarının dizisini referans alarak ileri primer donör eksonda geri primer de alıcı eksonda olacak şekilde multipleks primer tasarım programları kullanılarak tasarlanır. Füzyon bağlantı noktalarını içine alan bu primerler karışımı, panelin çoğaltabildiği herhangi bir füzyon transkripti ile PZR yapıldığında sadece ilgili primerlerin bir ampikon oluşturması beklenir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Multipleks ve uzun oligonükleotid tasarımları

Bir füzyon transkriptinin bağlantı noktasındaki iki eksonu kapsayan kalıp DNA parçasını oluşturmak için tasarlanan uzun oligonükleotidler ve multipleks primer havuzu içinde bu kalıp DNA parçasına özgü temsili kısa primerlerin şematik gösterimi.

Ion Torrent platformunun multipleks primer tasarım programı Ion AmpliSeq Designer'da aşağıdaki basamaklar takip edilerek KMT2A füzyon genleri için multipleks primer paneli tasarlandı. Ion AmpliSeq Custom HD panels → Create Custom HD panel (Design Name: MLL Fusions; Application Type: RNA Gene Fusion designs (single-pool); Select genome to use: Human (RefSeq/Ensembl)) → Add Targets (Add Fusion → Symbol Pair: MLL-...) → Submit targets.

Bu panel, 47 KMT2A füzyon transkriptini çoğaltan primerler karışımıdır (Çizelge 4.2.). Bu panel ve ilgili kalıp DNA parçası kullanılarak, füzyon ortağı genlere ait bağlantı eksonlarının birleşme noktalarını içeren ampikonlar oluşturulur. Bu panelde de füzyon ortağı genlerin her farklı eksonu için bir primer tasarlandığı çıkarımında bulunabiliriz (toplam 68 primerden 19 referans genlerin primer çiftleri hariç tutulduğunda geriye kalan 30 primerin 47 füzyon transkriptinin 30 farklı eksonunu temsil ettiği görülür).

Çizelge 4.2. Multipleks PZR tabanlı Ion AmpliSeq füzyon paneli (KMT2A-47)
 Illumina ve Ion Torrent panelleri için ortak olan 6 adet transkript yeşil renk ile vurgulanmıştır (KMT2A/MLL için Transkript Id: ENST00000534358)

#	ID	5' Partner Gen	Donör Ekson	3' Partner Gen	3' Partner Gen Transkript Id	Alıcı Ekson
1	KMT2A-AFF1.K7A7	KMT2A	7	AFF1	ENST00000307808	7
2	KMT2A-AFF1.K8A4	KMT2A	8	AFF1	ENST00000307808	4
3	KMT2A-AFF1.K8A5	KMT2A	8	AFF1	ENST00000307808	5
4	KMT2A-AFF1.K9A4	KMT2A	9	AFF1	ENST00000307808	4
5	KMT2A-AFF1.K9A5	KMT2A	9	AFF1	ENST00000307808	5
6	KMT2A-AFF1.K9A6	KMT2A	9	AFF1	ENST00000307808	6
7	KMT2A-AFF1.K10A4	KMT2A	10	AFF1	ENST00000307808	4
8	KMT2A-AFF1.K10A5	KMT2A	10	AFF1	ENST00000307808	5
9	KMT2A-AFF1.K10A6	KMT2A	10	AFF1	ENST00000307808	6
10	KMT2A-CREBBP.K8C3	KMT2A	8	CREBBP	ENST00000262367	3
11	KMT2A-CREBBP.K8C16	KMT2A	8	CREBBP	ENST00000262367	16
12	KMT2A-CREBBP.K9C3	KMT2A	9	CREBBP	ENST00000262367	3
13	KMT2A-CREBBP.K10C3	KMT2A	10	CREBBP	ENST00000262367	3
14	KMT2A-DAB2IP.K8D5	KMT2A	8	DAB2IP	ENST00000259371	5
15	KMT2A-ELL.K8E2	KMT2A	8	ELL	ENST00000262809	2
16	KMT2A-ELL.K8E6	KMT2A	8	ELL	ENST00000262809	6
17	KMT2A-ELL.K9E2	KMT2A	9	ELL	ENST00000262809	2
18	KMT2A-ELL.K10E2	KMT2A	10	ELL	ENST00000262809	2
19	KMT2A-EPS15.K8E2	KMT2A	8	EPS15	ENST00000371733	2
20	KMT2A-MLLT1.K8M2	KMT2A	8	MLLT1	ENST00000252674	2
21	KMT2A-MLLT1.K8M4	KMT2A	8	MLLT1	ENST00000252674	4
22	KMT2A-MLLT1.K9M2	KMT2A	9	MLLT1	ENST00000252674	2
23	KMT2A-MLLT1.K9M7	KMT2A	9	MLLT1	ENST00000252674	7
24	KMT2A-MLLT1.K10M2	KMT2A	10	MLLT1	ENST00000252674	2
25	KMT2A-MLLT1.K10M7	KMT2A	10	MLLT1	ENST00000252674	7
26	KMT2A-MLLT3.K8M4	KMT2A	8	MLLT3	ENST00000380338	4
27	KMT2A-MLLT3.K8M9	KMT2A	8	MLLT3	ENST00000380338	9

#	ID	5' Partner Gen	Donör Ekson	3' Partner Gen	3' Partner Gen Transkript Id	Alıcı Ekson
28	KMT2A-MLLT3.K9M5	KMT2A	9	MLLT3	ENST00000380338	5
29	KMT2A-MLLT3.K10M5	KMT2A	10	MLLT3	ENST00000380338	5
30	KMT2A-MLLT4.K7M2	KMT2A	7	MLLT4	ENST00000392108	2
31	KMT2A-MLLT4.K8M2	KMT2A	8	MLLT4	ENST00000392108	2
32	KMT2A-MLLT4.K9M2	KMT2A	9	MLLT4	ENST00000392108	2
33	KMT2A-MLLT4.K22M2	KMT2A	22	MLLT4	ENST00000392108	2
34	KMT2A-MLLT10.K6M15	KMT2A	6	MLLT10	ENST00000377072	15
35	KMT2A-MLLT10.K7M15	KMT2A	7	MLLT10	ENST00000377072	15
36	KMT2A-MLLT10.K8M4	KMT2A	8	MLLT10	ENST00000377072	4
37	KMT2A-MLLT10.K8M9	KMT2A	8	MLLT10	ENST00000377072	9
38	KMT2A-MLLT10.K8M10	KMT2A	8	MLLT10	ENST00000377072	10
39	KMT2A-MLLT10.K8M16	KMT2A	8	MLLT10	ENST00000377072	16
40	KMT2A-MLLT10.K9M9	KMT2A	9	MLLT10	ENST00000377072	9
41	KMT2A-MLLT10.K9M10	KMT2A	9	MLLT10	ENST00000377072	10
42	KMT2A-MLLT10.K10M9	KMT2A	10	MLLT10	ENST00000377072	9
43	KMT2A-MLLT10.K10M10	KMT2A	10	MLLT10	ENST00000377072	10
44	KMT2A-MLLT11.K8M2	KMT2A	8	MLLT11	ENST00000368921	2
45	KMT2A-MLLT11.K9M2	KMT2A	9	MLLT11	ENST00000368921	2
46	KMT2A-SEPT6.K10S2	KMT2A	10	SEPT6	ENST00000343984	2
47	KMT2A-SEPT9.K7S2	KMT2A	7	SEPT9	ENST00000329047	2

Çizelge 4.2. (devam)

4.2.2. Kalıp DNA Parçalarının Tasarımı ve Sentezi

Uzun primerler kullanılarak PZR ile sentetik DNA parçaları elde edilebilir. 20 KMT2A füzyon transkriptine ait kalıp DNA fragmanlarını oluşturmak için uzun oligonükleotidler 3' uçları 51-68°C bağlanma sıcaklığıyla birbirine karşılık gelecek şekilde (overlap) ve multipleks primerlerin bağlanabileceği DNA parçasını oluşturacak şekilde tasarlandı (Şekil 4.1.). Çok uzun bağlantı eksonlarına sahip füzyon transkriptler için multipleks primerlerin bağlanma olasılığını artırmak için DNA fragmanları olabildiği kadar uzun tasarlandı. Füzyon panelindeki multipleks primerlerin füzyon transkriptlerini çoğalttığı uzunluk

(ortalama 150 bp) ve oligonükleotidlerin sentezlenebildiği maksimum boyut (100 bp) birlikte değerlendirilince oluşacak DNA parçasının uzunluğu maksimum 180 bp olacak şekilde uzun primerler tasarlandı ve sipariş edildi (Ek 2 ve Ek 3).

İleri ve geri uzun primerlerin her birinden 10 pmol ve Q5 High-Fidelity 2X Master Mix kullanılarak DNA parçası sentezi yapıldı. 98°C’de 30 sn ön denatürasyon basamağından sonradan sonra; ilk 12 döngü 98°C’de 10 sn denatürasyon, 57°C’de 30 sn bağlanma ve 72°C’de 30 sn uzama basamağından sonra; bir sonraki 12 döngüde diğer sıcaklıklar aynı sadece bağlanma sıcaklığı 62°C; ve son 12 döngüde ise diğer sıcaklıklar aynı bağlanma sıcaklığı 67°C; ve son uzama basamağı 72°C’de 2 dk olacak şekilde termal döngü sıcaklıkları optimize edildi.

Ion AmpliSeq HD özel isteğe uyarlanmış (custom) füzyon panelinin kapsadığı 47 KMT2A füzyon transkriptine ait kalıp DNA parçaları GenScript’den sipariş edildi. Tasarımlar, Illumina paneli için kullanılan kalıp DNA parçalarına benzer şekilde yapıldı. Füzyon ortağı genlerin bağlantı noktasındaki eksonları birleştirilerek oluşturulan DNA parçasının uzunluğu minimum 120 bp ve maksimum 300 bp olacak şekilde tasarlandı (Ek 4).

4.2.3. Multipleks Primerler ve Kalıp DNA’ların PZR Validasyonu

Füzyon transkriptini temsil eden her bir kalıp DNA parçası ile multipleks primer paneli kullanılarak PZR kuruldu ve oluşan ürünler agaroz jel elektroforez ile teyit edildi. Farklı PZR kitleri, multipleks primer konsantrasyonları ve bağlanma sıcaklıkları için optimizasyonlar yapıldı. Ayrıca, değişik koşullarda PZR ürünü purifikasyonu yapılmış kalıp DNA parçaları ve GenScript’den sipariş edilen güvenilir saflık değerlerine sahip her iki panel için ortak olan kalıp DNA fragmanları kullanılarak da optimizasyonlar yapıldı. Sadece, Hot-Start Taq polimeraz içeren Promega’nın GoTaq® G2 Flexi PZR kiti ile sonuç elde edildi. 95°C 2 dk ön denatürasyondan sonra 30 döngü 95°C’de 15 sn denatürasyon, 60°C’de 30 sn bağlanma ve 72°C’de 20 sn uzama basamağından sonra 72°C’de 5 dk son uzama basamağı yapılarak termal döngü sıcaklıkları optimize edildi.

4.2.4. Stokiyometrik mPZR Optimizasyonları

Füzyon transkriptleri taklit eden pozitif kontrol kalıp DNA parçalarının, lösemili hasta örneklerinden sağlanabilen füzyon transkriptlere benzer stokiyometrilere mPZR

optimizasyonlarının yapılması için sentezlenen 20 adet KMT2A füzyon genlerin kalıp DNA parçaları %2 agaroz jelden kesilip MN'nin NucleoSpin Gel & PCR Clean-up kiti kullanılarak saflaştırıldı. Multipleks primerler ve 10 katlar halinde seyreltilmiş miktarlardaki sentetik kalıp DNA'lar kullanılarak Promega'nın GoTaq® G2 Flexi kiti ile PZR yapıldı. Termal döngü sıcaklıkları validasyon aşamasında optimize edildiği gibi kullanıldı. Ayrıca, her iki panel için ortak olan kalıp DNA fragmanları 1 ng ile 1 pg arasında 10'ar kat seyreltiler kullanılarak miktar titrasyonları yapıldı (GenScript'den sipariş edilenler arasından).

4.2.5. Multipleks PZR Tabanlı Hedefe Yönelik NGS

Illumina'dan sipariş edilen ve 20 KMT2A füzyon transkriptini çoğaltacak şekilde uyarlanmış (custom) füzyon paneli ile yapılan validasyon ve stokiyometrik çalışmalarından sonra yeni nesil dizileme aşamasına geçildi. Öncelikle, kullanılacak yöntemin beklenildiği gibi çalışabildiğini görmek için birkaç örnek ile ön deneme çalışması yapıldı. Her iki panel için ortak olan 3 adet kalıp DNA parçası ve Illumina AmpliSeq füzyon paneli kullanılarak elde edilen mPZR ürünlerinin Qubit ile konsantrasyon ölçümleri yapıldıktan sonra örnekler eşit miktarlarda birleştirilerek NGS işlemlerine başlandı.

Her bir füzyon DNA parçası ve Illumina'nın füzyon paneli kullanılarak oluşturulan mPZR ürünleri, yeni nesil dizileme işlemlerinde maliyet düşürmek için farklı kombinasyonlarda birleştirildi. NGS işlemlerinin sorunsuz bir şekilde yapılmasını sağlamak için, her bir kombinasyonun farklı eksonlar içerdiğine dikkat edildi. Bu panelde, 7 numaralı donör ekson en fazla tekrarlandığı için (7 kez) ve aynı eksonun aynı kombinasyonda yer almaması için 7 grup oluşturuldu (Çizelge 4.3.).

NGS ön deneme çalışmasında Qubit ölçümlerinin jel görüntülerini tam olarak yansıtmadığını gözlemlediğimiz için 20 örneğin olduğu NGS çalışmasında mPZR ürünleri AMPure XP manyetik boncuklarla saflaştırılıp NanoDrop ile konsantrasyonları ölçüldükten sonra birleştirildi. Her kombinasyondaki mPZR ürünlerini eşit miktarlarda birleştirmek için önce ilgili ürünlere ait ortalama bir konsantrasyon hesaplandı sonra bu ortalama birim miktarın belirli katları şeklinde mPZR ürünleri birleştirildi (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.3. NGS için örnek kombinasyonlarının hazırlanması

#	ID	Donör Gen	Donör Ekson	Alıcı Gen	Alıcı Ekson	1-9-12	2-10-15	3-11	4-8-13	5-14-16	6-17-19	7-18-20
1	KMT2A-AFF1.K8A5	KMT2A	8	AFF1	5							
2	KMT2A-AFF1.K8A6	KMT2A	8	AFF1	6							
3	KMT2A-AFF1.K8A7	KMT2A	8	AFF1	7							
4	KMT2A-AFF1.K9A6	KMT2A	9	AFF1	6							
5	KMT2A-AFF1.K9A7	KMT2A	9	AFF1	7							
6	KMT2A-AFF1.K10A5	KMT2A	10	AFF1	5							
7	KMT2A-AFF1.K10A6	KMT2A	10	AFF1	6							
8	KMT2A-AFF1.K10A7	KMT2A	10	AFF1	7							
9	KMT2A-ELL.K7E3	KMT2A	7	ELL	3							
10	KMT2A-FOXO4.K7F2	KMT2A	7	FOXO4	2							
11	KMT2A-MLLT1.K7M9	KMT2A	7	MLLT1	9							
12	KMT2A-MLLT1.K10M2	KMT2A	10	MLLT1	2							
13	KMT2A-MLLT3.K7M7	KMT2A	7	MLLT3	7							
14	KMT2A-MLLT3.K8M11	KMT2A	8	MLLT3	11							
15	KMT2A-MLLT3.K10M5	KMT2A	10	MLLT3	5							
16	KMT2A-MLLT6.K7M12	KMT2A	7	MLLT6	12							
17	KMT2A-MLLT10.K7M9	KMT2A	7	MLLT10	9							
18	KMT2A-MLLT10.K7M13	KMT2A	7	MLLT10	13							
19	KMT2A-MLLT10.K8M12	KMT2A	8	MLLT10	12							
20	KMT2A-MLLT10.K9M4	KMT2A	9	MLLT10	4							

Çizelge 4.4. NGS örnek kombinasyonlarının birleştirilme miktarları
(Her gruptaki her bir örnek için hesaplanan miktarlar µl cinsindedir)

#	ID	ng/µL	1-9-12	2-10-15	3-11	4-8-13	5-14-16	6-17-19	7-18-20
1	KMT2A-AFF1.K8A5	18,20	11,89						
2	KMT2A-AFF1.K8A6	3,00		17,66					
3	KMT2A-AFF1.K8A7	12,32			16,16				
4	KMT2A-AFF1.K9A6	5,35				19,82			
5	KMT2A-AFF1.K9A7	14,77					9,89		
6	KMT2A-AFF1.K10A5	18,42						8,87	
7	KMT2A-AFF1.K10A6	3,56							18,20
8	KMT2A-AFF1.K10A7	14,40				7,36			
9	KMT2A-ELL.K7E3	25,22	8,58						
10	KMT2A-FOXO4.K7F2	3,41		15,58					
11	KMT2A-MLLT1.K7M9	14,24			13,99				
12	KMT2A-MLLT1.K10M2	21,53	10,06						
13	KMT2A-MLLT3.K7M7	22,64				4,68			
14	KMT2A-MLLT3.K8M11	10,74					13,60		
15	KMT2A-MLLT3.K10M5	25,41		4,18					
16	KMT2A-MLLT6.K7M12	18,29					7,98		
17	KMT2A-MLLT10.K7M9	20,48						7,98	
18	KMT2A-MLLT10.K7M13	13,09							4,95
19	KMT2A-MLLT10.K8M12	10,10						16,17	
20	KMT2A-MLLT10.K9M4	9,26							6,99
Ortalama konsantrasyon			21,65	10,61	13,28	14,13	14,60	16,34	8,64

Kütüphane hazırlık basamağında AmpliSeq kütüphane hazırlama kiti yerine rutinde daha çok kullanılan Nextera kütüphane hazırlama kiti kullanıldı. Nextera kütüphane hazırlama kitinin custom füzyon gen panelleri için uygunluğu NGS ön deneme çalışmasında görüldükten sonra, diğer örneklerin yeni nesil dizileme işlemlerinde de bu kit kullanıldı. Kütüphane hazırlık sürecinde sırasıyla, fragmentasyon, index/barkod dizilerinin eklenmesi, amplifikasyon ve pürifikasyon işlemleri kit kullanım kılavuzu takip edilerek gerçekleştirildi. Dizileme aşamasında Illumina NextSeq 550 yeni nesil dizileme platformu ve uygun reaktifleri kullanıldı. Bu aşamada her bir örnek için çift yönlü (paired-end) 2x150 baz çifti 1000 okuma elde edilmesi hedeflense de NGS çalışmasının gerçekleştiği koşulda fazladan alan olması durumunda okumalar da artırılmıştır.

4.2.6. NGS Verilerinin Biyoinformatik Analizi

Yeni nesil dizileme verilerinin biyoinformatik analizleri için Illumina panelindeki 20 füzyon transkriptinin hedeflenen bölgelerini içeren bir referans dizi SnapGene programıyla oluşturuldu. Bu işlem, Ek 2'deki kalıp DNA parçalarının dizileri uç uca eklenerek gerçekleştirildi. Daha sonra, UniPro UGENE programı kullanılarak NGS okumalarının referans diziye hizalanması yoluyla haritalamalar yapıldı.

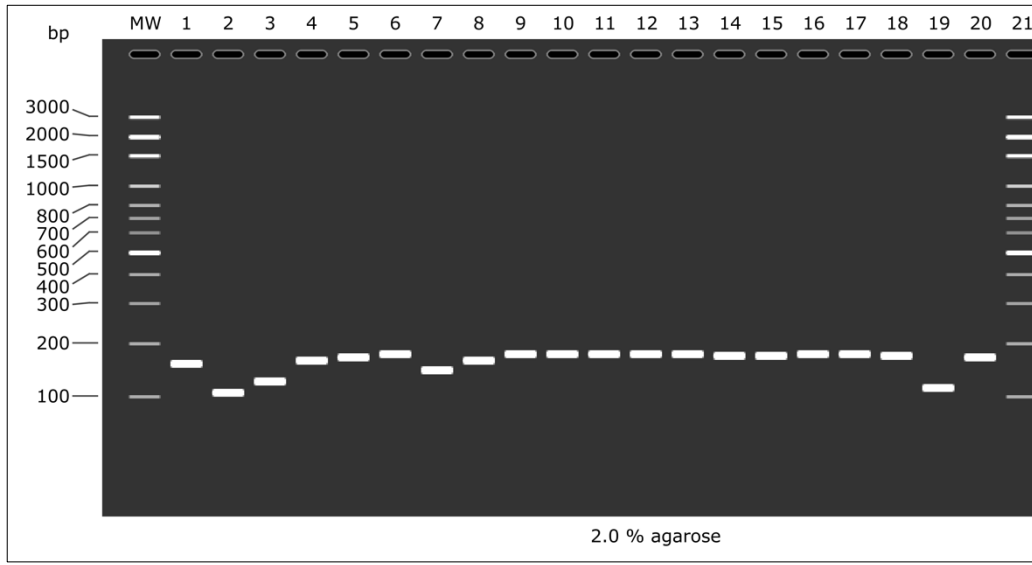
4.2.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar, mPZR tabanlı hedefe yönelik NGS ile başlangıçta belirtilen kombinasyonların doğru bir şekilde tespit edilip edilmediği değerlendirilerek çıkan sonuca göre multipleks primer panelinin başarı ölçütü yapıldı.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DNA FRAGMANI SENTEZİ

Çalışmalarımızda, multipleks primer tasarımlarını farklı platformlarda yaparak hangi platformun füzyon transkriptlerini daha iyi tespit ettiğini karşılaştırmak için bu füzyon transkriptleri taklit eden sentetik DNA parçaları kullandık. Illumina panelinin kapsadığı 20 füzyon DNA parçası uzun oligonükleotidler kullanılarak oluşturulurken (Şekil 5.1. ve 5.2.), Ion Torrent panelinin kapsadığı 47 adet füzyon DNA parçası GenScript’den GenPart Elite olarak sipariş edildi (Şekil 5.4. ve 5.5.).

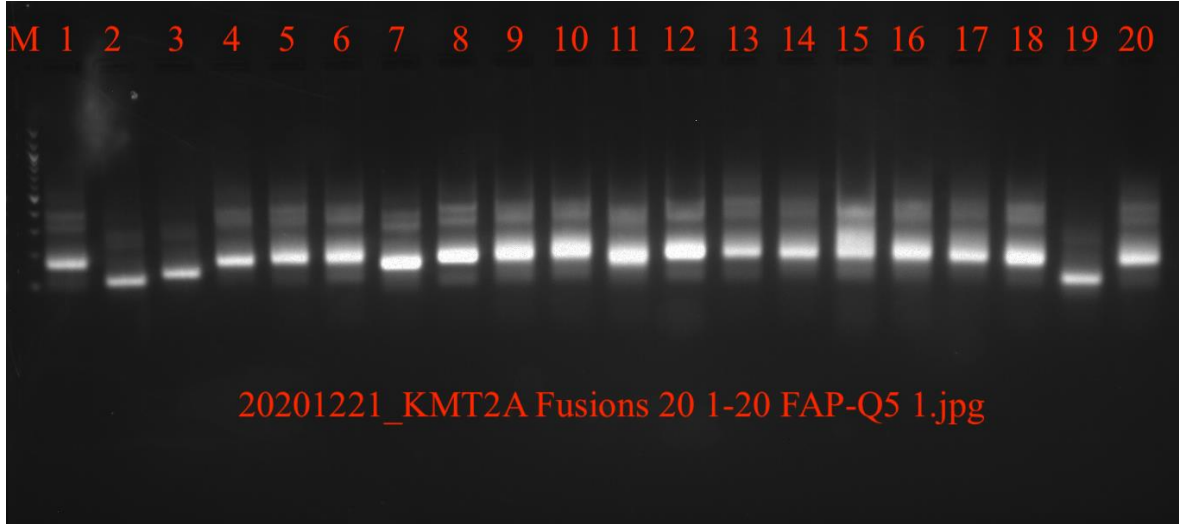


Şekil 5.1. Sentetik DNA parçalarının jel simülasyonu (SnapGene)

MW: 100 bp DNA Ladder

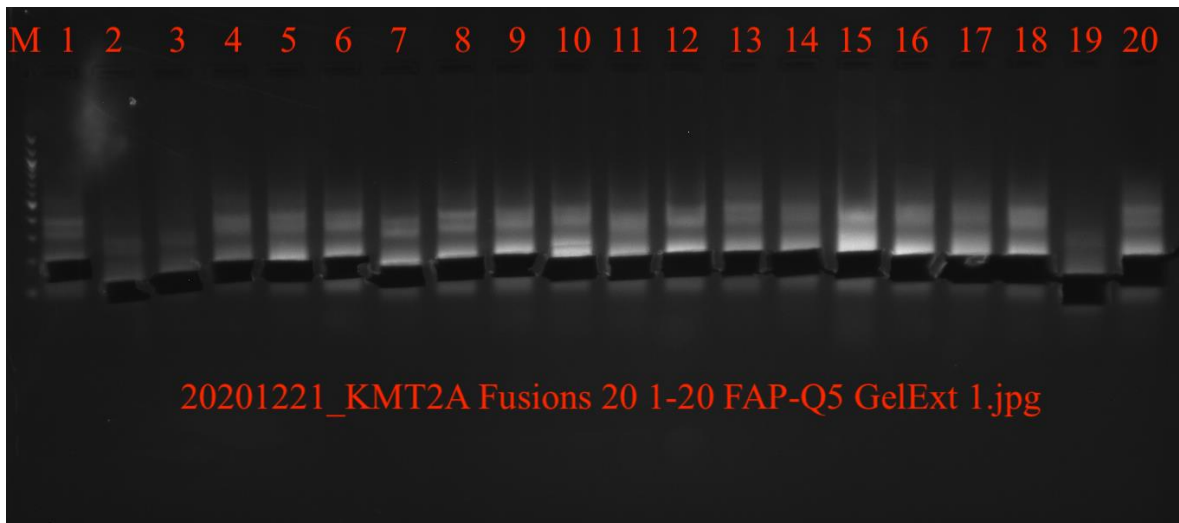
1: KMT2A-AFF1.K8A5	KMT2A-AFF1.K8A5 F + KMT2A-AFF1.K8A5 R	161 bp
2: KMT2A-AFF1.K8A6	KMT2A-AFF1.K8A6 F + KMT2A-AFF1.K8A6 R	111 bp
3: KMT2A-AFF1.K8A7	KMT2A-AFF1.K8A7 F + KMT2A-AFF1.K8A7 R	129 bp
4: KMT2A-AFF1.K9A6	KMT2A-AFF1.K9A6 F + KMT2A-AFF1.K9A6 R	169 bp
5: KMT2A-AFF1.K9A7	KMT2A-AFF1.K9A7 F + KMT2A-AFF1.K9A7 R	175 bp
6: KMT2A-AFF1.K10A5	KMT2A-AFF1.K10A5 F + KMT2A-AFF1.K10A5 R	180 bp
7: KMT2A-AFF1.K10A6	KMT2A-AFF1.K10A6 F + KMT2A-AFF1.K10A6 R	151 bp
8: KMT2A-AFF1.K10A7	KMT2A-AFF1.K10A7 F + KMT2A-AFF1.K10A7 R	169 bp
9: KMT2A-ELL.K7E3	KMT2A-ELL.K7E3 F + KMT2A-ELL.K7E3 R	180 bp
10: KMT2A-FOXO4.K7F2	KMT2A-FOXO4.K7F2 F + KMT2A-FOXO4.K7F2 R	180 bp
11: KMT2A-MLLT1.K7M9	KMT2A-MLLT1.K7M9 F + KMT2A-MLLT1.K7M9 R	180 bp
12: KMT2A-MLLT1.K10M2	KMT2A-MLLT1.K10M2 F + KMT2A-MLLT1.K10M2 R	180 bp
13: KMT2A-MLLT3.K7M7	KMT2A-MLLT3.K7M7 F + KMT2A-MLLT3.K7M7 R	180 bp
14: KMT2A-MLLT3.K8M11	KMT2A-MLLT3.K8M11 F + KMT2A-MLLT3.K8M11 R	179 bp
15: KMT2A-MLLT3.K10M5	KMT2A-MLLT3.K10M5 F + KMT2A-MLLT3.K10M5 R	179 bp
16: KMT2A-MLLT6.K7M12	KMT2A-MLLT6.K7M12 F + KMT2A-MLLT6.K7M12 R	180 bp
17: KMT2A-MLLT10.K7M9	KMT2A-MLLT10.K7M9 F + KMT2A-MLLT10.K7M9 R	180 bp
18: KMT2A-MLLT10.K7M13	KMT2A-MLLT10.K7M13 F + KMT2A-MLLT10.K7M13 R	178 bp
19: KMT2A-MLLT10.K8M12	KMT2A-MLLT10.K8M12 F + KMT2A-MLLT10.K8M12 R	119 bp
20: KMT2A-MLLT10.K9M4	KMT2A-MLLT10.K9M4 F + KMT2A-MLLT10.K9M4 R	174 bp
21: 100 bp DNA Ladder		

DNA parçalarının sentetik olarak üretildiği reaksiyonda herhangi bir kalıp DNA olmadan 3' uçları birbirine karşılıklı gelen uzun primerlerin birbirine bağlanıp geriye kalan kısımların sentezlenmesi amaçlanır. Şekil 5.1. ile karşılaştırıldığında benzer desende bantlar elde edilmekle birlikte sadece 11. örneğin boyu daha kısa görünüyor (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. Uzun primerlerle DNA parçası oluşturma reaksiyonu

Bu aşamalardan sonra sentezlenen kalıp DNA parçaları jelden kesilip saflaştırıldı (Şekil 5.3.).

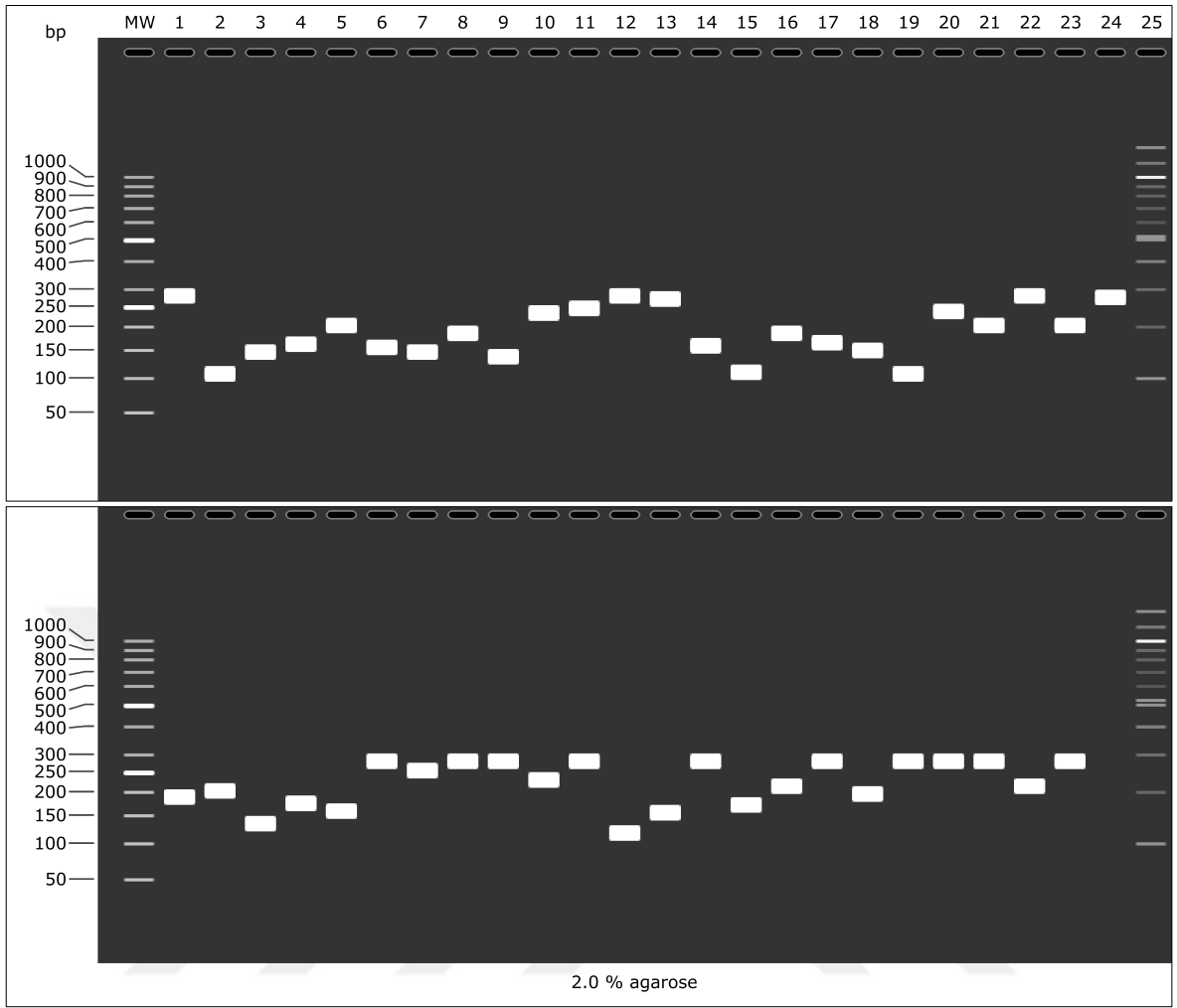


Şekil 5.3. Uzun primerlerle oluşturulan DNA parçalarının jelden geri kazanımı

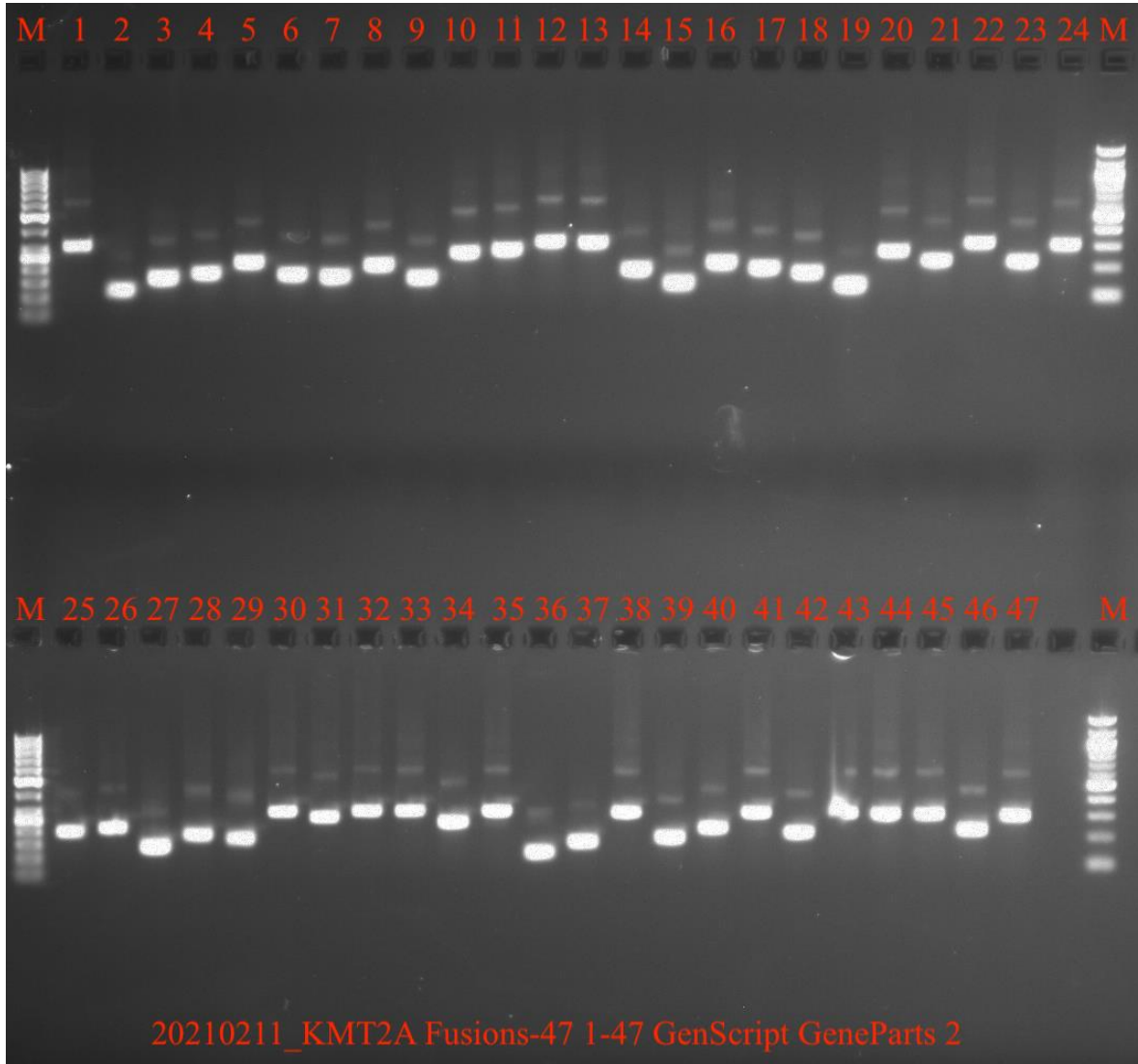
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kiti kullanılarak jelden geri kazanım yapılan DNA fragmanlarının konsantrasyonları ve boyutları kullanılarak pmol/ μ l değerleri $=\text{Conc} \times 10^3 / (\text{Size} \times 660)$ formülüne göre hesaplandı, kopya/ μ l ise $=\text{Conc} \times 6,02214076 \times 10^{23} / (\text{Size} \times 660 \times 10^9)$ formülüne göre hesaplandı. Minimum ve maximum kopya değerlerine göre bir mikro litrede 10^{10} kopya olacak şekilde kopya sayısı eşitleme hesabı yapıldı (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1. Kalıp DNA parçalarının jelden geri kazanım miktarları

#	ID	Size (bp)	ng/ μ l	pmol/ μ l	copies/ μ l	DNA (μ l)	NFW (μ l)
1	KMT2A-AFF1.K8A5	161	7,48	0,070	4,2E+10	4,72	15,28
2	KMT2A-AFF1.K8A6	111	8,68	0,119	7,1E+10	2,80	17,20
3	KMT2A-AFF1.K8A7	129	9,20	0,108	6,5E+10	3,07	16,93
4	KMT2A-AFF1.K9A6	169	10,71	0,096	5,8E+10	3,46	16,54
5	KMT2A-AFF1.K9A7	175	8,10	0,070	4,2E+10	4,74	15,26
6	KMT2A-AFF1.K10A5	180	9,69	0,082	4,9E+10	4,07	15,93
7	KMT2A-AFF1.K10A6	151	11,84	0,119	7,2E+10	2,80	17,20
8	KMT2A-AFF1.K10A7	169	13,50	0,121	7,3E+10	2,74	17,26
9	KMT2A-ELL.K7E3	180	9,99	0,084	5,1E+10	3,95	16,05
10	KMT2A-FOXO4.K7F2	180	7,02	0,059	3,6E+10	5,62	14,38
11	KMT2A-MLLT1.K7M9	180	11,98	0,101	6,1E+10	3,29	16,71
12	KMT2A-MLLT1.K10M2	180	10,82	0,091	5,5E+10	3,65	16,35
13	KMT2A-MLLT3.K7M7	180	7,92	0,067	4E+10	4,98	15,02
14	KMT2A-MLLT3.K8M11	179	11,20	0,095	5,7E+10	3,50	16,50
15	KMT2A-MLLT3.K10M5	179	7,74	0,065	3,9E+10	5,07	14,93
16	KMT2A-MLLT6.K7M12	180	10,61	0,089	5,4E+10	3,72	16,28
17	KMT2A-MLLT10.K7M9	180	9,22	0,078	4,7E+10	4,28	15,72
18	KMT2A-MLLT10.K7M13	178	12,63	0,107	6,5E+10	3,09	16,91
19	KMT2A-MLLT10.K8M12	119	11,62	0,148	8,9E+10	2,25	17,75
20	KMT2A-MLLT10.K9M4	174	13,09	0,114	6,9E+10	2,91	17,09



Şekil 5.4. DNA parçalarının jel simülasyonu (SnapGene)
(47 KMT2A füzyon transkripti için GenScript'den GenPart Elite olarak sipariş edildi)



Şekil 5.5. Kalıp DNA parçaları

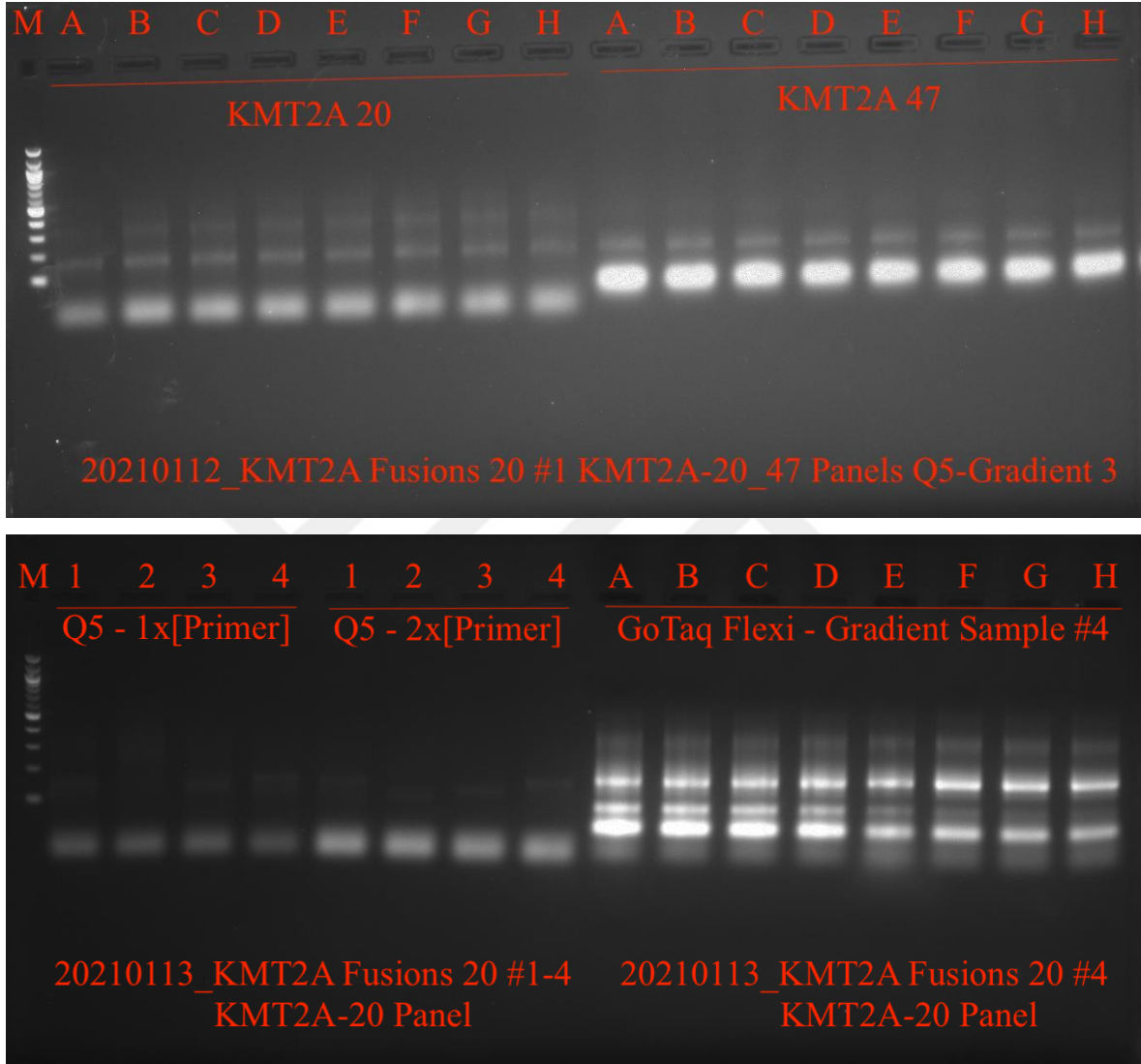
47 adet KMT2A füzyon geni için GenScript’den GenPart Elite olarak sipariş edildi. Şekil 5.4.’deki jel simülasyonu ile karşılaştırıldığında aynı desende bantlar elde edildiği görüldü.

5.2. VALİDASYON VE STOKİYOMETRİ ÇALIŞMALARI

5.2.1. Multipleks Primerler ve Kalıp DNA’larının PZR Validasyonu

Bu aşamalardan sonra KMT2A füzyonları için uyarlanmış paneller ile füzyon transkriptlerini taklit eden DNA parçaları kullanılarak validasyon ve stokiyometri çalışmaları yapıldı. Eser miktardaki her bir kalıp DNA parçası AmpliSeq füzyon panelleriyle PZR yapıldı ve her bir füzyon panelinin bu DNA parçalarını kalıp DNA olarak tanıyıp tanımadığı değerlendirildi.

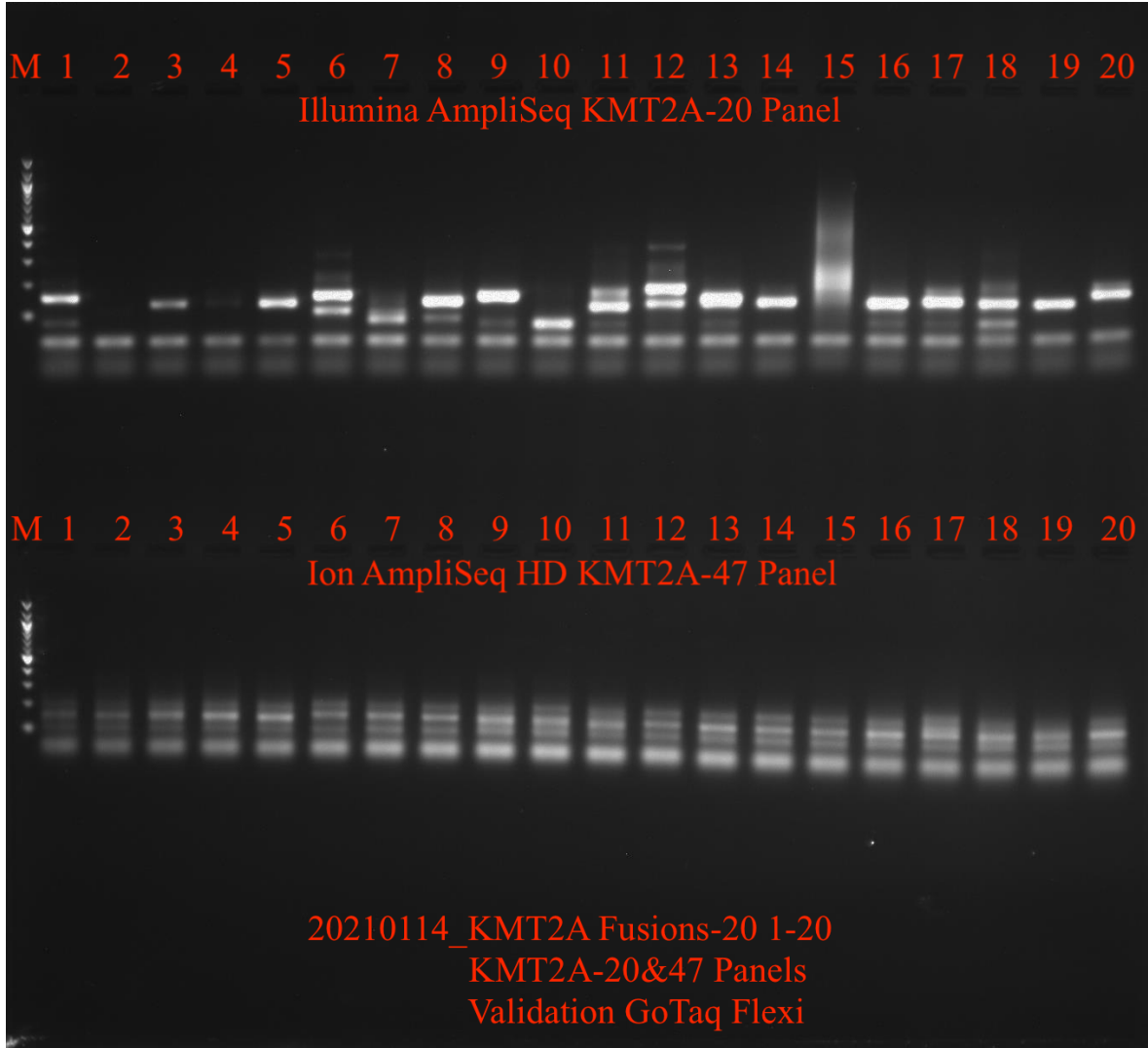
Öncelikle multipleks primerlerle uyumlu çalışabilen PZR koşullarının optimizasyonu yapıldı. NEB'in Q5 High-Fidelity 2X Master Mix PZR kiti ile yapılan ve farklı multipleks primer konsantrasyonları ve değişik bağlanma sıcaklıkları denenmesine rağmen uygun bir sonuç alınamadı (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. Q5 ve GoTaq Flexi DNA polimerazlarla yapılan PZR optimizasyonları (A:64.0, B:63.5, C:62.3, D:60.4, E:57.9, F:56.0, G:54.7, H:54.0)

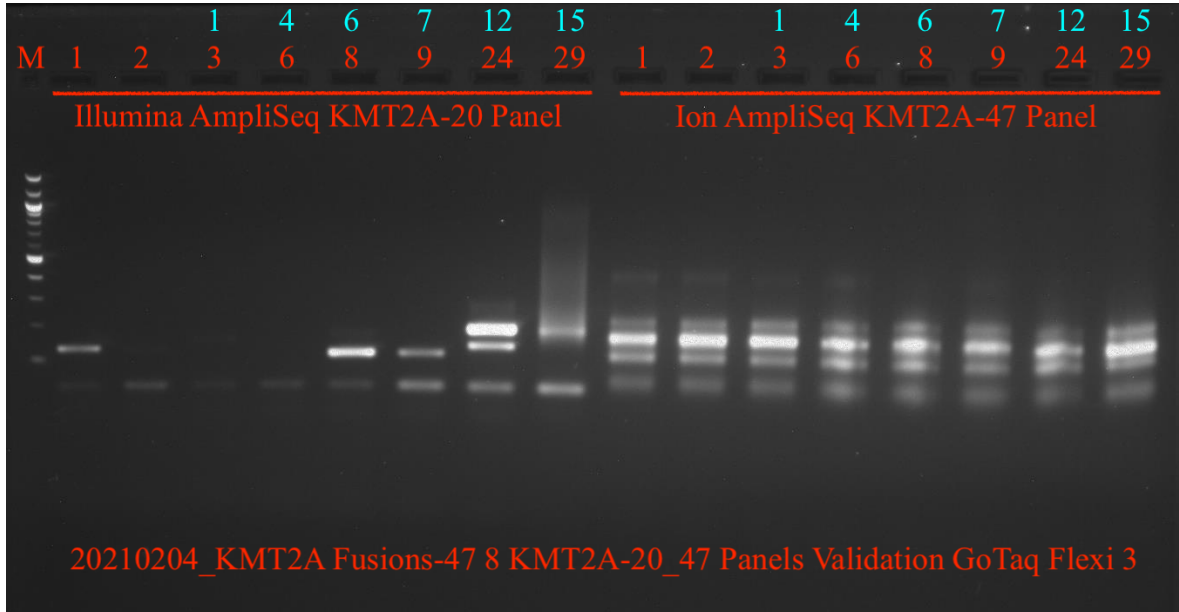
Hot-Start Taq polimerazlar multipleks primerlerle daha verimli çalıştığı için Promega'nın GoTaq® G2 Flexi kiti ile PZR yapıldı ve sonuç elde edildi (Şekil 5.6. ve 5.7.). Illumina ve Ion Torrent multipleks primer panelleri için tasarlanan kalıp DNA parçalarından 6 tanesi ortak olduğundan, Illumina panelinin kapsadığı 20 adet KMT2A füzyon transkriptini hedefleyen DNA fragmanları bu iki panel için kullanıldı, Illumina paneli 2 numaralı örnek

dışında tüm DNA parçalarını çoğaltabildi. Ancak, 6 tanesinin pozitif kontrol, 14 tanesinin ise negatif kontrol olarak kullanıldığı Ion Torrent paneli için uygun bir sonuç elde edilemedi (Şekil 5.7.).



Şekil 5.7. Füzyon panelleri ve DNA parçalarının kullanıldığı mPZR validasyonu

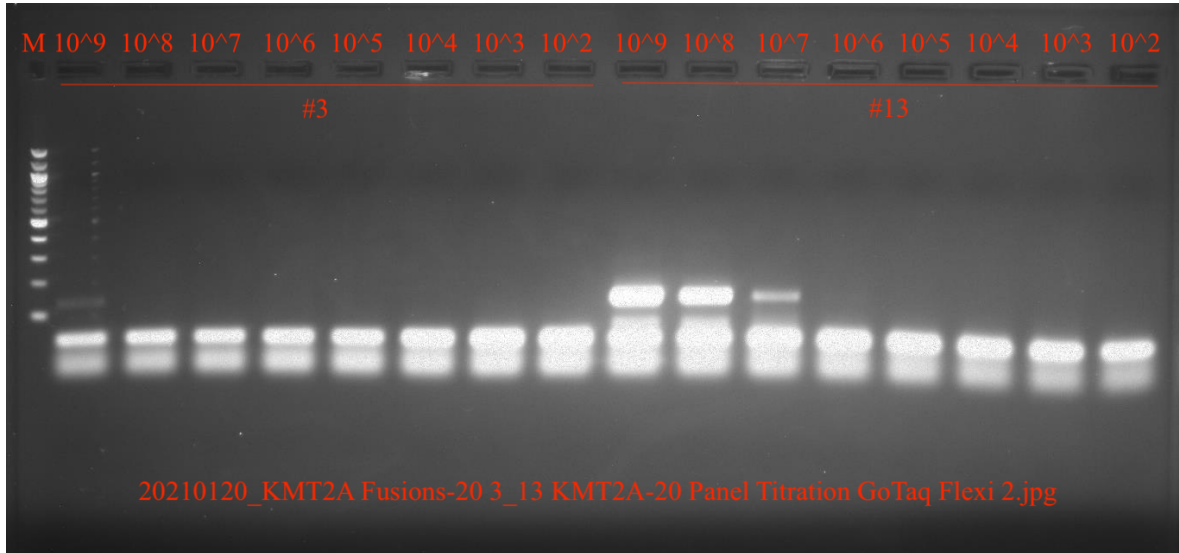
Illumina paneli için 2 tanesi negatif kontrol, 6 tanesi ise pozitif kontrol olan ve Ion Torrent paneli için hepsi pozitif kontrol olan toplam 8 füzyon transkripti taklit eden DNA parçaları bu iki panel ile kullanıldığında, Illumina paneli Şekil 5.7 ile benzer olumlu sonuçlar verdi; Ion Torrent paneli ise örnekler arasında farklılık göstermeyen ancak belirgin bir şekilde çoğalmış olduğu gözlemlenen mPCR ürünleri oluşturdu (Şekil 5.8.). Bu ampliconların ilgili DNA parçalarına spesifik olup olmadığı ancak NGS ile anlaşılabilir.



Şekil 5.8. GenPart kalıp DNA'ların kullanıldığı mPZR validasyonu

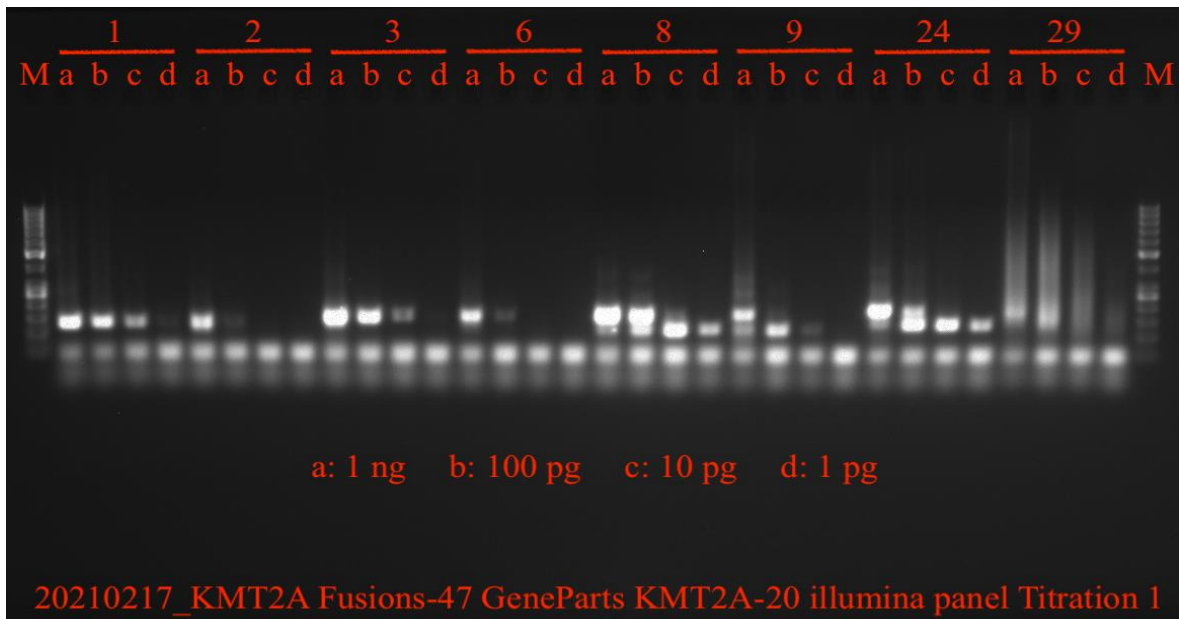
5.2.2. DNA Parçalarının Kopya Sayısı Titrasyonu

Bu aşamalardan sonra KMT2A füzyon panelleri ile saflaştırılmış eser miktarlardaki her bir kalıp DNA parçası kullanılarak titrasyon çalışmaları yapıldı. Pozitif kontrol kalıp DNA parçalarının, lösemi hücrelerinden sağlanan füzyon transkriptlere benzer stokiyometrilere PZR optimizasyonları yapmak için panellerin en az kaç kopya DNA'yı tespit edebildiğini göstermek amacıyla 10 katlar halinde seyreltilmiş miktarlardaki sentetik kalıp DNA'lar kullanılarak Promega'nın GoTaq® G2 Flexi kiti ile PZR yapıldı. Validasyon çalışmasında en zayıf ve en güçlü sonucu veren kalıp DNA örnekleri tercih edildi (3. ve 13. örnekler). Validasyon çalışmasında en zayıf sonucu veren örnek ile 10^8 DNA kopyası tespit edilebiliyorken, en güçlü sonucu veren örnek ile 10^6 kopya tespit edildi (Şekil 5.9.). Eş zamanlı kantitatif PZR (RT-qPCR) yöntemiyle daha düşük kopya sayısındaki DNA tespit edilebilir, ancak BioRad'ın SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix kiti ile yapılan RT-qPCR muhtemelen multipleks primerlerden dolayı çalışmadı.



Şekil 5.9. Stokiyometrik çalışmalar için DNA fragmanlarının kopya sayısı titrasyonu

AmpliSeq panel çalışmalarında yaklaşık 20 ng total nükleik asit miktarları ile başlandığından kopya sayısı titrasyonuna ek olarak miktar titrasyonu da yapıldı. Bu kapsamda, her iki panel için ortak olan 6 adet KMT2A füzyon transkriptini taklit eden kalıp DNA parçalarının farklı konsantrasyonları kullanıldı (Şekil 5.10.). Çıkan sonuçlar, Illumina panelinin 1 piko gram GenPart kalıp DNA parçasını bile belirgin bir şekilde çoğaltabildiğini göstermiştir. Illumina paneline göre negatif kontrol olan 1 ve 2 numaralı DNA parçalarının da çoğaltılması, panelin içeriğinde bu DNA'lara bağlanacak benzer dizilere sahip primerlerin varlığı ile açıklanabilir.



Şekil 5.10. Stokiyometrik çalışmalar için kalıp DNA miktarlarının titrasyonu

5.3. YENİ NESİL DİZİLEME (NGS)

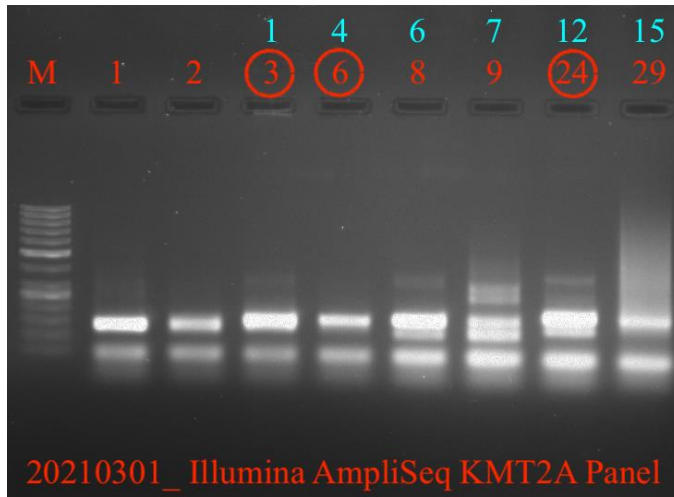
5.3.1. Illumina AmpliSeq Füzyon Paneli ile Yapılan NGS

Nextera DNA kütüphane kiti ile uyumlu bir şekilde yeni nesil dizilemenin yapılabildiğini anlamak için belirli bir kombinasyondaki bir örnek ile ön bir deneme yapıldı. Bu çalışmada, her iki panelin çoğaltabildiği GenPart kalıp DNA parçaları ve Illumina paneli kullanıldı (Çizelge 5.2. ve Şekil 5.11).

Çizelge 5.2. GoTaq® G2 Flexi PZR.

Her bir örnek için 1 ng DNA fragmanı ve Illumina paneli kullanıldı.

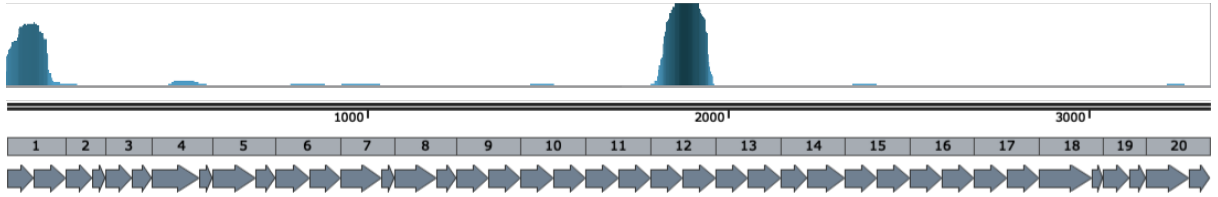
5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	2 µl
MgCl ₂ Solution, 25mM	1,2 µl
dNTP mixture (2,5 mM each)	0,8 µl
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	0,05 µl
AmpliSeq Fusion Panel (5X) - KMT2A-20	2 µl
KMT2A-47 GenParts Elite (0.5 ng/µl)	2 µl
Nuclease-Free Water	2 µl



Şekil 5.11. NGS ön deneme çalışması için kullanılan örnekler KMT2A-20 için 1, 4 ve 12 (KMT2A-47 için 3, 6 ve 24)

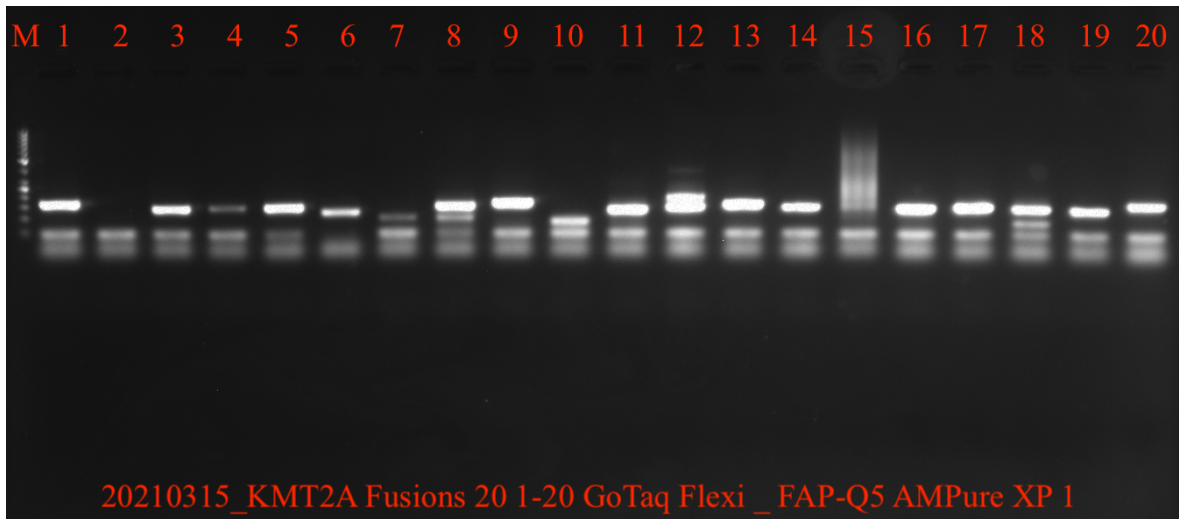
NGS ön deneme çalışmasında kullanılan 1, 4 ve 12 örneklerinin okumaları Illumina panelindeki 20 füzyon transkriptinin hedeflenen bölgelerini içeren referans dizi ile hizalandığında doğru bir şekilde 1, 4 ve 12 bölgeleriyle hizalandı. Sadece, 4 numaralı

örnek için daha az okuma elde edildi (Şekil 5.12.). Her ne kadar çok az bazı okumalar hedef dışı bölgelere hizalanmış olsa da bu durumun kullanılan Nextera kütüphane hazırlama protokolünden dolayı normal olduğu ve referans dizi çok benzer dizileri içerdiğinden dolayı her bir füzyon transkriptinin birleşme bölgelerindeki belirli sayıda nükleotidi içeren bağlantı okumaları filtrelenerek daha net sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.



Şekil 5.12. NGS ön deneme çalışmasının sonucu
KMT2A-20 için 1-4-12 (KMT2A-47 için 3-6-24)

NGS ön çalışmasından olumlu sonuçlar alındıktan sonra, Illumina panelinin kapsadığı diğer füzyon genlerin de NGS çalışmalarına başlandı. Bu kez, uzun primerlerle oluşturulan 20 DNA parçası için saflaştırma işlemi olarak GenScript'in DNA parçalarını saflaştırma işleminde kullandığı yöntem olan manyetik boncuklarla saflaştırma yöntemi kullanıldı (AMPure XP). Illumina paneli ve kapsamındaki 20 adet DNA parçaları kullanılarak yapılan mPZR sonucunda Şekil 5.7'deki daha önceki sonuçlarla karşılaştırıldığında benzer ancak daha belirgin bantlar oluştuğu görüldü (Şekil 5.13.).

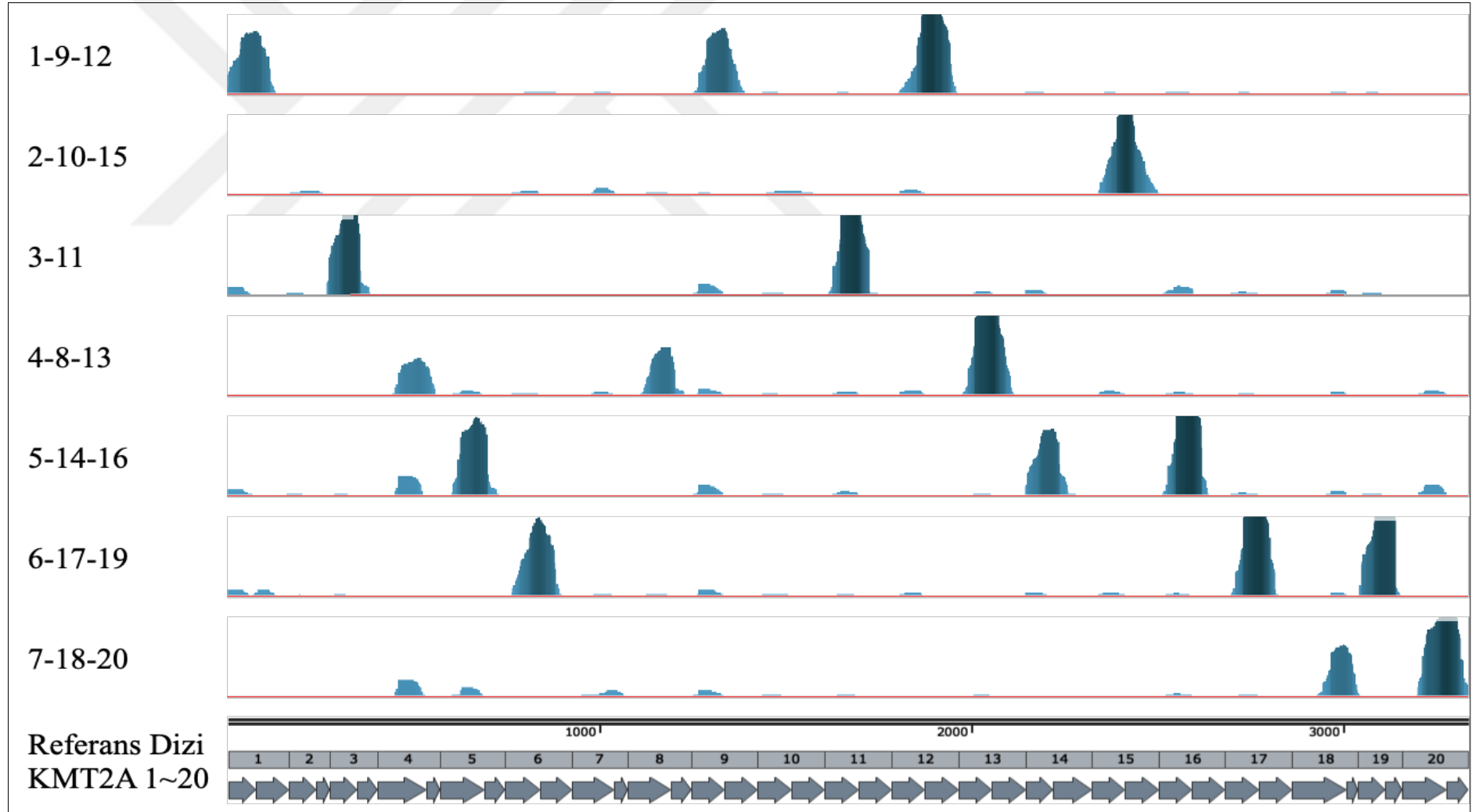


Şekil 5.13. NGS çalışmasında kullanılan ampikonlar

NGS maliyetlerini düşürmek için çakışmayan eksonlara sahip KMT2A füzyonları bir arada çalışıldı (Çizelge 4.3), bu yaklaşım NGS ön çalışmasında da uygulandı. 1-4-12 numaralı ön deneme örneğinde 4 numaralı örnekten yeterli miktarda okuma alınmadığı için DNA miktarı ölçüm yöntemi değiştirildi. Diğer örnekler, AMPure XP manyetik boncuk yöntemiyle temizlendikten sonra NanoDrop ile miktarları ölçüldü, sonra 20 örnek belirli kombinasyonlarda birleştirilip NGS için 7 örnek hazırlandı. NGS sonuçları değerlendirildiğinde, 20 füzyon gen örneğinden 17'si için yeterli ve belirgin sayıda okuma alındı. Multipleks PZR'de belirgin bir bant elde edilmeyen 2 numaralı örnek, çok zayıf bantlar elde edilen 7 ve 10 numaralı örnekler için çok az sayıda okuma alındı (Şekil 5.14.). Ayrıca, bazı hedef dışı hizalanan okumalar da bulunmakla birlikte, bu durum referans dizideki bazı bölgelerin benzer olmasıyla açıklanabileceği gibi füzyon genlerin iki farklı genden dizi parçalarını kapsayan ve kopma noktasını kesin olarak tanımlayan kimerik okumalar olan bağlantı veya bölünmüş okumalar (junction or split reads) filtrelenerek daha pürüzsüz bir sonuç da elde edilebileceği düşünülmektedir. Her bir örnek için en çok elde edilen okuma sayısı Ek 5'te gösterilmiştir.

5.3.2. Ion AmpliSeq HD Füzyon Paneli ile Yapılan NGS

Ion Torrent'den sipariş edilen 47 adet KMT2A füzyon transkripti için multipleks primerlerden oluşan AmpliSeq HD isteğe göre uyarlanmış (custom) RNA füzyon paneli ile validasyon ve stokiyometri çalışmaları için, GenScript'den sipariş edilen kalıp DNA fragmanlarıyla optimizasyonlar farklı PZR kitleri de kullanılarak devam edecektir. Şekil 5.8'deki çok net olmayan sonuçlar için bir NGS ön çalışmanın da yapılması hedeflenmektedir. Uygun sonuçlar alınmazsa, kütüphane oluşturma aşamasında AmpliSeq HD paneller için önerilen Ion AmpliSeq HD Library Kit kullanılarak yeni nesil dizileme için bir ön çalışma yapılması planlanabilecektir.



Şekil 5.14. NGS sonuçları (20 adet KMT2A füzyon geni için)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Füzyon gen tespiti için NGS temelli birçok farklı yaklaşım vardır ve en uygun yönteme karar vermek oldukça önemlidir. Deneysel yaklaşımın ötesinde, uygulama kolaylığı, işlem süresi, ilgili maliyetler ve veri analizi için gereken uzmanlık düzeyi gibi faktörler de dikkate alınmalıdır (50).

Hedefe yönelik yeni nesil dizileme yöntemiyle füzyon gen tespiti, Ek 6'daki grafikte de görüldüğü gibi son yıllarda üzerinde çokça çalışılan bir konudur. Bu çalışmalar sonucunda klinik tanıdaki kısıtlamaları ortadan kaldıracabilecek uygulamalara çok ihtiyaç duyulmaktadır (17, 18, 44, 84, 91-106).

Rutin klinik uygulamada FISH füzyon gen tespitinde altın standartlarda bir analiz olmaya devam etmektedir. Ancak, FISH yöntemiyle mutasyon içerikleri tanımlanan örneklerdeki füzyonların, mPZR tabanlı NGS ile daha kolay tespit edilebildiği gösterilmiştir (107), KMT2A füzyon geni için yapılan FISH çalışması partner geni tam olarak saptamayabilir, bu durumda görece iyi prognoz gösteren KMT2A gen füzyonları belirlenemeyecektir.

Yakın zamanda Heydt ve arkadaşları tarafından yapılan, ticari olarak temin edilebilen beş hedefe yönelik yeni nesil dizileme platformlarında füzyon gen tespiti yapan karşılaştırmalı bir çalışmada, bilinen çeşitli gen füzyonlarını taşıyan sekiz hücre hattı ve 18 FFPE doku örneğindeki gen füzyonlarını saptama yeterlikleri açısından değerlendirildiğinde, özellikle RNA tabanlı dizileme yaklaşımlarının hedeflenebilir gen füzyonlarının güvenilir tespiti için klinik tanıda güçlü araçlar olduğu gösterilmiştir (71). Füzyon tespiti için aralarında Illumina AmpliSeq platformunun da bulunduğu dört yeni nesil dizileme platformunda 24 prostat kanseri örneğinin karşılaştırıldığı son zamanlardaki başka bir çalışmada ise, tüm platformların bilinen gen füzyonlarını belirleyebildiği gösterilmiştir (108). Hedefe yönelik mPZR ampliconlarını dizileme çalışmamızda, 20 adet KMT2A füzyon geni için uyarlanmış (custom) Illumina AmpliSeq panelinin 17 füzyon geni çok belirgin bir şekilde tespit edebilmesi son zamanlarda yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Multipleks PZR aşamasında 7 ve 10 numaralı örnekler için daha küçük boyutlarda bantlar elde edilmesine rağmen, NGS aşamasında belirgin sayıda okuma alınmaması ve elde

edilen okumaların çoğu ilgili füzyon genler için bağlantı okumaları olduğu için füzyon olayını kesin olarak açıklamaktadır. Multipleks panel bilgisinde minimum ampikon boyutunun 91 bp olduğu düşünüldüğünde, 7 ve 10 numaralı füzyon genlerin minimum boyuttaki ampikonlar olabileceği ihtimalinden dolayı multipleks PZR aşamasının çalışmadığı düşünülmemektedir. Ancak, az miktarlarda okuma alınmasının sebebinin kütüphane aşamasında kullanılan Nextera kitinin küçük boyutlarda olan DNA parçalarını daha da küçük parçalara ayırdığı için bu boyutların sentez ile dizileme teknolojisinin tespit eşiklerinin altında olması ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Başlangıçta mPZR ile oluşturulan ampikona adaptör dizilerini bağlama yöntemi değiştirilerek bu probleme çözüm getirilebilir. Nextera kitindeki etiketleme (Tagmentation, fragmentation by transposome) aşaması yerine AmpliSeq kütüphane kitinde olduğu gibi ligasyon ile adaptörlerin bağlanması problemini ortadan kaldırabilir.

Minimal rezidüel hastalık (MRD), kanser tedavisinden sonra vücutta geriye kalan az sayıdaki kanser hücrelerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. MRD pozitif sonuç, hastalığın tedaviden sonra halen tespit edilebildiği anlamına gelir. MRD negatif sonuç ise tedaviden sonra hiçbir hastalık göstergesinin tespit edilemediği anlamına gelir. MRD analizlerinde ilgili kansere sebep olan gen mutasyonlarına genellikle qPCR ile bakılmaktadır. Ancak, MRD testi negatif olup sonradan kanserin tekrarlandığı birçok vaka olduğundan, literatürde de bu konuda etkili bir yöntem olduğu bahsedilen hedefe yönelik yeni nesil dizilemenin MRD analizlerinde kullanılması daha etkin bir negatif MRD testi verebilir (109, 110). Çalışmamızda, mPZR aşamasında herhangi bir ampikon oluşturmayıp şaşırtıcı bir şekilde NGS aşamasında yeterli sayıda olmasa da füzyon olayını kesin bir şekilde açıklayan bağlantı okumaları oluşan 2 numaralı örnek bu bağlamda değerlendirilebilir.

Ayrıca, bazı hedef dışı hizalanan okumalar da bulunmakla birlikte, bu durum referans dizideki bazı bölgelerin benzer olmasıyla açıklanabileceği gibi füzyon genlerin iki farklı genden dizi parçalarını içeren ve bir füzyon olayını kesin olarak tanımlayan kimerik okumalar olan bağlantı veya bölünmüş (junction/split) okumalar filtrelenerek daha pürüzsüz bir sonuç da elde edilebilir (50, 76).

Kanserin klonal olma özelliğinden dolayı sürücü KMT2A füzyon mutasyonuna sahip her bir lösemi hastası bu mutasyonlardan sadece birini taşıdığı düşünüldüğünde Illumina panelinin kapsadığı 20 füzyon transkripti taklit eden 20 DNA parçası için en az o kadar NGS örneğinin olması beklenir. Yine de bir insanda iki adet KMT2A alleli olduğu için lösemili hastalarda pratikte pek görülmesi de teorikte iki ayrı KMT2A füzyonu mümkündür.

47 adet KMT2A füzyon genlerine özgü Ion AmpliSeq HD paneli kullanılarak yapılan çalışmalardan net bir sonucun elde edilememesi, füzyon gen sayısı artıkcı bir sonuç elde etmenin zorluğu ihtimalini de düşündürmektedir.

Biyoinformatik iş akışlarının duyarlılıklarının ölçülmesine olanak sağlamak için bilinen füzyonları içeren kanser örnekleri yerine füzyon transkriptini taklit eden DNA parçası kullanılarak biyoinformatik iş akışlarını test etmek, füzyon genlerin dizileri ve birleşme noktaları bilineceğinden kolaylık sağlayabilir. Bu paneller için örneğin bağlantı bölgelerinin filtrelenmesini sağlayacak biyoinformatik yazılım paketleri (iş akışları) bu çalışma ve benzeri çalışmalar üzerinden kolayca geliştirilebilir.

DesignStudio veya Ion AmpliSeq Designer gibi multipleks primer paneli tasarlama programları belirli sayıdaki füzyon gen kombinasyonlarının kullanılmasına izin verebilmektedir. DesignStudio’da oluşturduğumuz multipleks primer panelinin kapsadığı KMT2A füzyon gen kombinasyonlarının mutasyon sıklıklarına COSMIC veritabanında baktığımızda moleküler tanımlaması yapılmamış birçok füzyon transkript kombinasyonu gördük (15, 111). Tasarlanan panelimizin de kapsamadığı birçok füzyon transkript kombinasyonu da gözlemledik (Ek 1, Çizelge 2.2. ve 4.1.).

Füzyon gen kombinasyonlarının birçoğunu içerecek şekilde farklı stratejiler geliştirmek mümkündür; daha az primer ile daha uzun bölgeler veya daha çok primerle daha kısa bölgeler gibi. Projemizde, multipleks primer panellerinin validasyonlarını yapmak istediğimizden doğrudan yeni nesil dizileme aşamasına geçebilmeyi sağlayan daha kısa ampikonlarla çalışmayı benimsedik.

Bu çalışmadan edinilen tecrübeler sonrasında yeni gelişen teknolojilere uygun panellerin hazırlanması, kromozomal yeniden düzenlemeleri tanımlamak için uzun okumalara olan

ihhtiyaçtan dolayı özellikle Pacific Biosciences ve Oxford Nanopore gibi yeni gelişen dizileme teknolojileri ile uzun ampikon oluşturan geleneksel multipleks PZR veya bağlantılı mPZR (AMP) birlikte kullanılarak daha etkin füzyon gen tespiti yöntemleri geliştirmek mümkün görünmektedir.

6.2. SONUÇ

Multipleks primer panellerinin ampikon oluşturabilme yeterlikleri kıyaslandığında Illumina'nın özel isteğe uyarlanmış AmpliSeq panelinin daha net sonuçlar verdiği görüldü. Birbiriyle uyumlu çalışabilen primer karışımlarından oluşan bu panelin nerdeyse beklenen bütün ampikonları doğru bir şekilde oluşturabilmesi multipleks primerlerle yapılan çalışmaların zorluğu düşünüldüğünde AmpliSeq teknolojisinin bu konuda çok iyi olduğu açıkça görülmektedir. Bundan dolayı, gen füzyonlarının tespitinde bu teknolojinin kullanılması yararlı olacaktır.

KMT2A füzyon gen parçalarının 20 tanesi sentetik biyoloji yöntemleri kullanılarak sentezlendi. KMT2A füzyon transkriptlerini taklit eden ve multipleks PZR ile ortalama 150 baz çifti ampikonları oluşturan füzyon panellerindeki primerlerin bağlanabileceği sentetik DNA parçaları iki adet 3' uçları birbirine karşılıklı gelen uzun primerlerle basit bir PZR işlemiyle başarılı bir şekilde üretildi. İlk kez kullanılacak olan ve özel isteğe uyarlanmış (custom) panellerin başarı oranları değerlendirilirken, mutasyon bilgileri önceden belirlenmiş elde edilmesi oldukça zor olan klinik örnekleri veya hangi mutasyonları içerdiği tam olarak belirlenemeyen ticari pozitif kontroller yerine bu çalışmadaki gibi sentetik DNA parçalarının kullanılması oldukça kolay olacaktır.

Multipleks PZR aşaması, önerilen yüksek maliyetli kütüphane oluşturma kitleri yerine rutinde sıkça kullanılan Hot-Start Taq polimeraz içeren normal bir PZR kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Yüksek doğruluklu (High Fidelity) DNA polimerazların aksine Taq polimerazın çok daha iyi sonuç verdiği görüldü. Füzyon gen paneli validasyon çalışmalarında PZR işleminin sıkça kullanıldığı düşünüldüğünde önerilen yüksek maliyetli kütüphane hazırlama kitlerinin yerine daha az maliyetli yöntemlerin kullanılması çok önemlidir. Öyle ki, bu alanda enzim geliştiren bilindik biyoteknoloji şirketlerinde ve akademik kurumlarda önerilen yüksek maliyetli kütüphane oluşturma kitleri yerine daha farklı çözüm arayışları mevcuttur.

Illumina'nın özel isteğe uyarlanmış (custom) 20 adet KMT2A füzyon geni için tasarlanan AmpliSeq füzyon paneli kullanılarak mPZR ile yapılan validasyon çalışmasında 2 numaralı füzyon DNA parçası dışında geriye kalan 19 füzyon DNA parçasının hepsi için belirgin bir sonuç alındı. Ayrıca, füzyon panelleri normal olarak ifade olunan kontrol genlerine ait primerler de içerdiğinden dolayı klinik örnekleri ile yapılan validasyon çalışmaları mPZR aşamasında bariz bir sonuç veremeyecektir, ancak NGS ve biyoinformatik basamaklarından sonra sonuçlar anlaşılabilir. Şimdilik, 47 adet KMT2A füzyon geni için tasarlanan özel isteğe uyarlanmış (custom) Ion AmpliSeq HD füzyon paneli kullanılarak yapılan çalışmalardan net bir sonuç elde edilemedi, ancak belirli bazı optimizasyonlar sonrasında olumlu sonuçlar elde edilebileceği gözlemlendi.

Stokiyometri veya titrasyon çalışmalarında, multipleks primer panelinin kalıp DNA parçasını 1 piko grama kadar tespit edebildiği gözlemlendi, bu oranların NGS seviyesinde daha az miktarlara inebilme ihtimali de var. Her ne kadar, klinik örnekler için önerilen 10-20 nano gram gibi total nükleik asit içerisindeki ilgili füzyon genler için bir hesaplama yapamamış olsak da bu kadar az miktarların tespiti de kayda değerdir. Kanseri biyopsi dokuları çoğunlukla düşük tümör içeriğine sahiptir (mosaicizm) veya analiz edilmek üzere elde edilen doku çok az miktarlarda olabilir; farklı şekilde füzyon gen çok düşük düzeyde ifade ediliyor olabilir. Bu sebeple, kanser örnekleri için yapılan yeni nesil dizilemelerde çok fazla sayıda okuma gerekiyor. Bu durumlarda, multipleks primer panelinin eser miktarlardaki füzyon transkriptlerin tespitini yapabiliyor olması çok önemlidir. Multipleks paneller için belirleme sınırı (limit of detection, LOD) olarak bilinen bu oran, kullanıma hazır panellerde ortalama %5-20, bu konuda çok iyi olan HD panellerde ise %0,1 aralığındadır.

Multipleks PZR tabanlı hedefe yönelik NGS sonuçları incelendiğinde, 20 adet KMT2A füzyon genine özgü uyarlanmış Illumina AmpliSeq füzyon paneli füzyon genleri taklit eden 20 DNA parçasından 17'sini belirgin bir şekilde doğru tespit edebildi. Multipleks PZR'de belirgin bir bant elde edilmeyen 2 numaralı örnek, küçük boyutta bantlar elde edilen 7 ve 10 numaralı örnekler için belirgin sayıda okuma alınmadı, ancak elde edilen okumaların çoğu ilgili füzyon genler için füzyon olayını kesin olarak açıklayan bağlantı okumaları olduğu görüldü. Sonuç olarak, füzyon paneli kullanılarak mPZR ile oluşturulan ampliconlar için yapılan NGS çalışmasında %100'e yakın bir başarı oranı yakalandı.

NGS verilerinden biyoinformatik analizlerle füzyon gen tespiti yapmak için bağlantı ve kapsayan (junction & spanning) okumalarının belirlenmesini gerektiren özel biyoinformatik yazılımlar kullanılır. Bu tür NGS çalışmalarının biyoinformatik analiz basamakları çoğu zaman laboratuvar aşamalarından daha zordur. Bu çalışmada, multipleks primer panelinin kapsadığı bir referans dizinin biyoinformatik analizlerde kullanımının büyük kolaylık sağladığı görüldü.

Genel olarak, NGS teknolojisi için gelişen yaklaşımlar göz önünde tutulduğunda, NGS kullanılarak füzyon gen tespitinin yakın gelecekte daha kolay ve daha hızlı bir şekilde uygulanması, araştırma bağlamında kullanışlılığını artıracaktır. Bu durum aynı zamanda, klinik tanıdaki fizibilitesini de artıracak ve rutin klinik uygulamaya daha doğru füzyon gen tespiti yapan teknikler getirecektir.

KAYNAKLAR

1. Bohlander SK. Fusion genes in leukemia: An emerging network. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 2000;91(1-4):52-6.
2. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(3):164-72. doi: 10.1056/NEJM199907153410306.
3. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. 2010.
4. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):551-65. Epub 2011/01/12. doi: 10.1200/JCO.2010.30.7405. PubMed PMID: 21220611; PubMed Central PMCID: PMC3071256.
5. Oberg JA, Glade Bender JL, Sulis ML, Pendrick D, Sireci AN, Hsiao SJ, et al. Implementation of next generation sequencing into pediatric hematology-oncology practice: Moving beyond actionable alterations. *Genome Medicine*. 2016;8(1). doi: 10.1186/s13073-016-0389-6.
6. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13(1). doi: 10.1186/1471-2164-13-341.
7. Levin JZ, Berger MF, Adiconis X, Rogov P, Melnikov A, Fennell T, et al. Targeted next-generation sequencing of a cancer transcriptome enhances detection of sequence variants and novel fusion transcripts. *Genome Biology*. 2009;10(10). doi: 10.1186/gb-2009-10-10-r115.
8. Welch JS, Westervelt P, Ding L, Larson DE, Klco JM, Kulkarni S, et al. Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2011;305(15):1577-84. doi: 10.1001/jama.2011.497.
9. Scolnick JA, Dimon M, Wang IC, Huelga SC, Amorese DA. An efficient method for identifying gene fusions by targeted RNA sequencing from fresh frozen and FFPE samples. *PLoS ONE*. 2015;10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0128916.
10. Duncavage EJ, Abel HJ, Szankasi P, Kelley TW, Pfeifer JD. Targeted next generation sequencing of clinically significant gene mutations and translocations in leukemia. *Modern Pathology*. 2012;25(6):795-804. doi: 10.1038/modpathol.2012.29.
11. Shaffer LG, Schultz RA, Ballif BC. The use of new technologies in the detection of balanced translocations in hematologic disorders. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2012;22(3):264-71. doi: 10.1016/j.gde.2012.01.005.

12. Abel HJ, Al-Kateb H, Cottrell CE, Bredemeyer AJ, Pritchard CC, Grossmann AH, et al. Detection of gene rearrangements in targeted clinical next-generation sequencing. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2014;16(4):405-17. doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.03.006.
13. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341(14):1051-62. doi: 10.1056/NEJM199909303411407. PubMed PMID: 10502596.
14. Chung C, Ma H. Driving Toward Precision Medicine for Acute Leukemias: Are We There Yet? *Pharmacotherapy*. 2017;37(9):1052-72. doi: 10.1002/phar.1977.
15. COSMIC: the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [Internet]. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/fusion>.
16. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):371-81. doi: 10.1038/nrc3947. PubMed PMID: 25998716.
17. Afrin S, Zhang CRC, Meyer C, Stinson CL, Pham T, Bruxner TJC, et al. Targeted Next-Generation Sequencing for Detecting MLL Gene Fusions in Leukemia. *Molecular Cancer Research*. 2018;16(2):279-85. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0569.
18. Hiemenz MC, Ostrow DG, Busse TM, Buckley J, Maglinte DT, Bootwalla M, et al. OncoKids: A Comprehensive Next-Generation Sequencing Panel for Pediatric Malignancies. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2018;20(6):765-76. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.06.009.
19. Alimohamed MZ, Johansson LF, De Boer EN, Splinter E, Klous P, Yilmaz M, et al. Genetic screening test to detect translocations in acute leukemias by use of targeted locus amplification. *Clinical Chemistry*. 2018;64(7):1096-103. doi: 10.1373/clinchem.2017.286047.
20. Han X, Li W, He N, Feng P, Pang Y, Ji C, et al. Gene mutation patterns of Chinese acute myeloid leukemia patients by targeted next-generation sequencing and bioinformatic analysis. *Clinica Chimica Acta*. 2018;479:25-37. doi: 10.1016/j.cca.2018.01.006.
21. Salto-Tellez M, Shelat SG, Benoit B, Rennert H, Carroll M, Leonard DGB, et al. Multiplex RT-PCR for the detection of leukemia-associated translocations: Validation and application to routine molecular diagnostic practice. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2003;5(4):231-6. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60479-5.
22. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PubMed PMID: 21376230.
23. Chen J, Odenike O, Rowley JD. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):23-36. doi: 10.1038/nrc2765. PubMed PMID: 20029422; PubMed Central PMCID: PMC2972637.
24. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49. Epub 2021/02/05. doi: 10.3322/caac.21660. PubMed PMID: 33538338.

25. Nature Portfolio: Springer Nature Limited; 2021. Available from: <https://www.nature.com/subjects/leukaemia>.

26. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1535-48. doi: 10.1056/NEJMra023001. PubMed PMID: 15071128.

27. National Cancer Institute, National Institutes of Health 2021. Available from: <https://www.cancer.gov/types/leukemia>.

28. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(9):639-49. doi: 10.1038/nrc1164. PubMed PMID: 12951583.

29. Aplan PD. Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends Genet.* 2006;22(1):46-55. doi: 10.1016/j.tig.2005.10.002. PubMed PMID: 16257470; PubMed Central PMCID: PMC1762911.

30. Nickoloff JA, De Haro LP, Wray J, Hromas R. Mechanisms of leukemia translocations. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(4):338-45. doi: 10.1097/MOH.0b013e328302f711. PubMed PMID: 18536572; PubMed Central PMCID: PMC1762911.

31. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):251-63. Epub 2011/03/12. doi: 10.1038/nri2941. PubMed PMID: 21394103.

32. Gao Q, Liang WW, Foltz SM, Mutharasu G, Jayasinghe RG, Cao S, et al. Driver Fusions and Their Implications in the Development and Treatment of Human Cancers. *Cell Rep.* 2018;23(1):227-38 e3. Epub 2018/04/05. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.050. PubMed PMID: 29617662; PubMed Central PMCID: PMC5916809.

33. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer [Internet]. 2021. Available from: <https://mitelmandatabase.isb-cgc.org>.

34. Meyer C, Burmeister T, Groger D, Tsaur G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinoome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018;32(2):273-84. Epub 2017/07/14. doi: 10.1038/leu.2017.213. PubMed PMID: 28701730; PubMed Central PMCID: PMC5808070.

35. Zeisig BB, Kulasekararaj AG, Mufti GJ, So CW. SnapShot: Acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2012;22(5):698- e1. Epub 2012/11/17. doi: 10.1016/j.ccr.2012.10.017. PubMed PMID: 23153541.

36. Wang Y, Wu N, Liu D, Jin Y. Recurrent Fusion Genes in Leukemia: An Attractive Target for Diagnosis and Treatment. *Curr Genomics.* 2017;18(5):378-84. Epub 2017/10/31. doi: 10.2174/1389202918666170329110349. PubMed PMID: 29081694; PubMed Central PMCID: PMC5635644.

37. Zeisig BB, So CWE. Cellular and Molecular Basis of KMT2A/MLL Leukaemias: From Transformation Mechanisms to Novel Therapeutic Strategies. In: Rowley JD, Le Beau MM, Rabbitts TH, editors. Chromosomal Translocations and Genome Rearrangements in Cancer. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 223-50.
38. Tamai H, Inokuchi K. 11q23/MLL acute leukemia : update of clinical aspects. *J Clin Exp Hematop.* 2010;50(2):91-8. Epub 2010/12/03. doi: 10.3960/jslrt.50.91. PubMed PMID: 21123966.
39. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia.* 2013;27(11):2165-76. doi: 10.1038/leu.2013.135.
40. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(1):47-51. Epub 2002/02/09. doi: 10.1002/jcla.2058. PubMed PMID: 11835531; PubMed Central PMCID: PMC6808141.
41. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46. Epub 2009/12/10. doi: 10.1038/nrg2626. PubMed PMID: 19997069.
42. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:387-402. Epub 2008/06/26. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359. PubMed PMID: 18576944.
43. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods.* 2008;5(1):16-8. Epub 2008/01/01. doi: 10.1038/nmeth1156. PubMed PMID: 18165802.
44. Grossmann V, Kohlmann A, Klein HU, Schindela S, Schnittger S, Dicker F, et al. Targeted next-generation sequencing detects point mutations, insertions, deletions and balanced chromosomal rearrangements as well as identifies novel leukemia-specific fusion genes in a single procedure. *Leukemia.* 2011;25(4):671-80. doi: 10.1038/leu.2010.309.
45. Tachon G, Cortes U, Richard S, Martin S, Milin S, Evrard C, et al. Targeted RNA-sequencing assays: a step forward compared to FISH and IHC techniques? *Cancer Medicine.* 2019;8(18):7556-66. doi: 10.1002/cam4.2599. PubMed Central PMCID: PMC31651105.
46. Bruno R, Fontanini G. Next Generation Sequencing for Gene Fusion Analysis in Lung Cancer: A Literature Review. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(8). Epub 2020/07/31. doi: 10.3390/diagnostics10080521. PubMed PMID: 32726941; PubMed Central PMCID: PMC7460167.
47. Mack EKM, Marquardt A, Langer D, Ross P, Ultsch A, Kiehl MG, et al. Comprehensive genetic diagnosis of acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. *Haematologica.* 2019;104(2):277-87. doi: 10.3324/haematol.2018.194258. PubMed Central PMCID: PMC30190345.
48. Annala MJ, Parker BC, Zhang W, Nykter M. Fusion genes and their discovery using high throughput sequencing. *Cancer Lett.* 2013;340(2):192-200. Epub 2013/02/05.

doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.011. PubMed PMID: 23376639; PubMed Central PMCID: PMC3675181.

49. Qin F, Zhang Y, Liu J, Li H. SLC45A3-ELK4 functions as a long non-coding chimeric RNA. *Cancer Lett.* 2017;404:53-61. Epub 2017/07/19. doi: 10.1016/j.canlet.2017.07.007. PubMed PMID: 28716526.

50. Heyer EE, Blackburn J. Sequencing Strategies for Fusion Gene Detection. *BioEssays.* 2020;42(7):e2000016. Epub 2020/04/21. doi: 10.1002/bies.202000016. PubMed PMID: 32307742.

51. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods.* 2008;5(7):621-8. Epub 2008/06/03. doi: 10.1038/nmeth.1226. PubMed PMID: 18516045.

52. Kumar A, Kankainen M, Parsons A, Kallioniemi O, Mattila P, Heckman CA. The impact of RNA sequence library construction protocols on transcriptomic profiling of leukemia. *BMC Genomics.* 2017;18(1):629. Epub 2017/08/19. doi: 10.1186/s12864-017-4039-1. PubMed PMID: 28818039; PubMed Central PMCID: PMC5561555.

53. Levin JZ, Yassour M, Adiconis X, Nusbaum C, Thompson DA, Friedman N, et al. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nat Methods.* 2010;7(9):709-15. Epub 2010/08/17. doi: 10.1038/nmeth.1491. PubMed PMID: 20711195; PubMed Central PMCID: PMC3005310.

54. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature.* 2009;458(7234):97-101. Epub 2009/01/13. doi: 10.1038/nature07638. PubMed PMID: 19136943; PubMed Central PMCID: PMC2725402.

55. Haynes BC, Blidner RA, Cardwell RD, Zeigler R, Gokul S, Thibert JR, et al. An Integrated Next-Generation Sequencing System for Analyzing DNA Mutations, Gene Fusions, and RNA Expression in Lung Cancer. *Transl Oncol.* 2019;12(6):836-45. Epub 2019/04/15. doi: 10.1016/j.tranon.2019.02.012. PubMed PMID: 30981944; PubMed Central PMCID: PMC6463765.

56. Buzdin A, Sorokin M, Garazha A, Sekacheva M, Kim E, Zhukov N, et al. Molecular pathway activation - New type of biomarkers for tumor morphology and personalized selection of target drugs. *Seminars in cancer biology.* 2018;53:110-24. Epub 2018/06/24. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.06.003. PubMed PMID: 29935311.

57. Heyer EE, Deveson IW, Wooi D, Selinger CI, Lyons RJ, Hayes VM, et al. Diagnosis of fusion genes using targeted RNA sequencing. *Nat Commun.* 2019;10(1):1388. Epub 2019/03/29. doi: 10.1038/s41467-019-09374-9. PubMed PMID: 30918253; PubMed Central PMCID: PMC6437215.

58. Mercer TR, Gerhardt DJ, Dinger ME, Crawford J, Trapnell C, Jeddloh JA, et al. Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nat*

Biotechnol. 2011;30(1):99-104. Epub 2011/11/15. doi: 10.1038/nbt.2024. PubMed PMID: 22081020; PubMed Central PMCID: PMCPMC3710462.

59. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn.* 2015;17(3):251-64. Epub 2015/03/25. doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.12.006. PubMed PMID: 25801821; PubMed Central PMCID: PMCPMC5808190.

60. Prieto-Conde MI, Corchete LA, Garcia-Alvarez M, Jimenez C, Medina A, Balanzategui A, et al. A New Next-Generation Sequencing Strategy for the Simultaneous Analysis of Mutations and Chromosomal Rearrangements at DNA Level in Acute Myeloid Leukemia Patients. *J Mol Diagn.* 2020;22(1):60-71. Epub 2019/10/13. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.08.002. PubMed PMID: 31605801.

61. Reeser JW, Martin D, Miya J, Kautto EA, Lyon E, Zhu E, et al. Validation of a Targeted RNA Sequencing Assay for Kinase Fusion Detection in Solid Tumors. *J Mol Diagn.* 2017;19(5):682-96. Epub 2017/08/15. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.05.006. PubMed PMID: 28802831; PubMed Central PMCID: PMCPMC5975628.

62. Qadir MA, Zhan SH, Kwok B, Bruestle J, Drees B, Popescu OE, et al. ChildSeq-RNA: A next-generation sequencing-based diagnostic assay to identify known fusion transcripts in childhood sarcomas. *J Mol Diagn.* 2014;16(3):361-70. Epub 2014/02/13. doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.01.002. PubMed PMID: 24517889.

63. Schroder J, Kumar A, Wong SQ. Overview of Fusion Detection Strategies Using Next-Generation Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2019;1908:125-38. Epub 2019/01/17. doi: 10.1007/978-1-4939-9004-7_9. PubMed PMID: 30649725.

64. Bewicke-Copley F, Arjun Kumar E, Palladino G, Korfi K, Wang J. Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:1348-59. Epub 2019/11/26. doi: 10.1016/j.csbj.2019.10.004. PubMed PMID: 31762958; PubMed Central PMCID: PMCPMC6861594.

65. Roychowdhury S, Iyer MK, Robinson DR, Lonigro RJ, Wu YM, Cao X, et al. Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. *Sci Transl Med.* 2011;3(111):111ra21. Epub 2011/12/03. doi: 10.1126/scitranslmed.3003161. PubMed PMID: 22133722; PubMed Central PMCID: PMCPMC3476478.

66. Cieslik M, Chugh R, Wu YM, Wu M, Brennan C, Lonigro R, et al. The use of exome capture RNA-seq for highly degraded RNA with application to clinical cancer sequencing. *Genome Res.* 2015;25(9):1372-81. Epub 2015/08/09. doi: 10.1101/gr.189621.115. PubMed PMID: 26253700; PubMed Central PMCID: PMCPMC4561495.

67. Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, Cao Y, Panditi D, Lynch KD, et al. Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med.* 2014;20(12):1479-84. Epub 2014/11/11. doi: 10.1038/nm.3729. PubMed PMID: 25384085.

68. Williams HL, Walsh K, Diamond A, Oniscu A, Deans ZC. Validation of the Oncomine() focus panel for next-generation sequencing of clinical tumour samples. *Virchows Arch.* 2018;473(4):489-503. Epub 2018/08/15. doi: 10.1007/s00428-018-2411-4. PubMed PMID: 30105577; PubMed Central PMCID: PMC6182325.
69. Mantilla JG, Ricciotti RW, Chen E, Hoch BL, Liu YJ. Detecting disease-defining gene fusions in unclassified round cell sarcomas using anchored multiplex PCR/targeted RNA next-generation sequencing-Molecular and clinicopathological characterization of 16 cases. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58(10):713-22. Epub 2019/04/30. doi: 10.1002/gcc.22763. PubMed PMID: 31033080.
70. Vaughn CP, Costa JL, Feilotter HE, Petraroli R, Bagai V, Rachiglio AM, et al. Simultaneous detection of lung fusions using a multiplex RT-PCR next generation sequencing-based approach: a multi-institutional research study. *BMC Cancer.* 2018;18(1):828. Epub 2018/08/18. doi: 10.1186/s12885-018-4736-4. PubMed PMID: 30115026; PubMed Central PMCID: PMC6097211.
71. Heydt C, Wolwer CB, Velazquez Camacho O, Wagener-Ryczek S, Pappesch R, Siemanowski J, et al. Detection of gene fusions using targeted next-generation sequencing: a comparative evaluation. *BMC Med Genomics.* 2021;14(1):62. Epub 2021/03/01. doi: 10.1186/s12920-021-00909-y. PubMed PMID: 33639937; PubMed Central PMCID: PMC67912891.
72. Pollard MO, Gurdasani D, Mentzer AJ, Porter T, Sandhu MS. Long reads: their purpose and place. *Hum Mol Genet.* 2018;27(R2):R234-R41. Epub 2018/05/17. doi: 10.1093/hmg/ddy177. PubMed PMID: 29767702; PubMed Central PMCID: PMC6061690.
73. Anvar SY, Allard G, Tseng E, Sheynkman GM, de Klerk E, Vermaat M, et al. Full-length mRNA sequencing uncovers a widespread coupling between transcription initiation and mRNA processing. *Genome Biol.* 2018;19(1):46. Epub 2018/03/31. doi: 10.1186/s13059-018-1418-0. PubMed PMID: 29598823; PubMed Central PMCID: PMC65877393.
74. Mantere T, Kersten S, Hoischen A. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet.* 2019;10:426. Epub 2019/05/28. doi: 10.3389/fgene.2019.00426. PubMed PMID: 31134132; PubMed Central PMCID: PMC6514244.
75. Tsang HF, Xue VW, Koh SP, Chiu YM, Ng LP, Wong SC. NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(1):95-103. Epub 2016/12/06. doi: 10.1080/14737159.2017.1268533. PubMed PMID: 27917695.
76. Kumar S, Razzaq SK, Vo AD, Gautam M, Li H. Identifying fusion transcripts using next generation sequencing. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2016;7(6):811-23. Epub 2016/08/04. doi: 10.1002/wrna.1382. PubMed PMID: 27485475; PubMed Central PMCID: PMC65065767.

77. Liu S, Tsai WH, Ding Y, Chen R, Fang Z, Huo Z, et al. Comprehensive evaluation of fusion transcript detection algorithms and a meta-caller to combine top performing methods in paired-end RNA-seq data. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(5):e47. Epub 2015/11/20. doi: 10.1093/nar/gkv1234. PubMed PMID: 26582927; PubMed Central PMCID: PMC4797269.
78. Haas BJ, Dobin A, Li B, Stransky N, Pochet N, Regev A. Accuracy assessment of fusion transcript detection via read-mapping and de novo fusion transcript assembly-based methods. *Genome Biol.* 2019;20(1):213. Epub 2019/10/23. doi: 10.1186/s13059-019-1842-9. PubMed PMID: 31639029; PubMed Central PMCID: PMC6802306.
79. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 2013;8(7):823-59. Epub 2013/04/05. doi: 10.1097/JTO.0b013e318290868f. PubMed PMID: 23552377; PubMed Central PMCID: PMC4159960.
80. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research.* 2010;3(1):85-95. doi: 10.1093/biohorizons/hzq009.
81. O'Connor C. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) *Nature Education* 1(1):1712008. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327/>.
82. Krystel-Whittemore M, Taylor MS, Rivera M, Lennerz JK, Le LP, Dias-Santagata D, et al. Novel and established EWSR1 gene fusions and associations identified by next-generation sequencing and fluorescence in-situ hybridization. *Hum Pathol.* 2019;93:65-73. Epub 2019/08/21. doi: 10.1016/j.humpath.2019.08.006. PubMed PMID: 31430493.
83. Peter M, Gilbert E, Delattre O. A multiplex real-time pcr assay for the detection of gene fusions observed in solid tumors. *Lab Invest.* 2001;81(6):905-12. Epub 2001/06/15. doi: 10.1038/labinvest.3780299. PubMed PMID: 11406651.
84. Blidner RA, Haynes BC, Hyter S, Schmitt S, Pessetto ZY, Godwin AK, et al. Design, Optimization, and Multisite Evaluation of a Targeted Next-Generation Sequencing Assay System for Chimeric RNAs from Gene Fusions and Exon-Skipping Events in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2019;21(2):352-65. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.10.003. PubMed Central PMCID: PMC30529127.
85. Heydt C, Ruessler V, Pappesch R, Wagener S, Haak A, Siebolts U, et al. Comparison of in Situ and Extraction-Based Methods for the Detection of ROS1 Rearrangements in Solid Tumors. *J Mol Diagn.* 2019;21(6):971-84. Epub 2019/08/06. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.06.006. PubMed PMID: 31382035.
86. Sakai K, Ohira T, Matsubayashi J, Yoneshige A, Ito A, Mitsudomi T, et al. Performance of Oncomine Fusion Transcript kit for formalin-fixed, paraffin-embedded

lung cancer specimens. *Cancer Sci.* 2019;110(6):2044-9. Epub 2019/04/12. doi: 10.1111/cas.14016. PubMed PMID: 30972901; PubMed Central PMCID: PMC6549924.

87. Tachon G, Cortes U, Richard S, Martin S, Milin S, Evrard C, et al. Targeted RNA-sequencing assays: a step forward compared to FISH and IHC techniques? *Cancer Med.* 2019;8(18):7556-66. Epub 2019/10/28. doi: 10.1002/cam4.2599. PubMed PMID: 31651105; PubMed Central PMCID: PMC6912030.

88. Vollbrecht C, Lenze D, Hummel M, Lehmann A, Moebs M, Frost N, et al. RNA-based analysis of ALK fusions in non-small cell lung cancer cases showing IHC/FISH discordance. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1158. Epub 2018/11/24. doi: 10.1186/s12885-018-5070-6. PubMed PMID: 30466405; PubMed Central PMCID: PMC6251223.

89. Yatabe Y. ALK FISH and IHC: you cannot have one without the other. *J Thorac Oncol.* 2015;10(4):548-50. Epub 2015/03/20. doi: 10.1097/JTO.0000000000000461. PubMed PMID: 25789831.

90. Finucane S, Haridas S, Handley L, Clark J, Jack A, Munksted S. Known and unknown gene fusion detection capabilities of solid tumour laboratories conducting next generation sequencing in 6 countries. *Ann Oncol.* 2019;30:v575.

91. Heydt C, Wölwer CB, Velazquez Camacho O, Wagener-Rydzek S, Pappesch R, Siemanowski J, et al. Detection of gene fusions using targeted next-generation sequencing: a comparative evaluation. *BMC Med Genomics.* 2021;14(1). doi: 10.1186/s12920-021-00909-y. PubMed Central PMCID: PMC33639937.

92. De Luca C, Pepe F, Iaccarino A, Pisapia P, Righi L, Listì A, et al. RNA-based assay for next-generation sequencing of clinically relevant gene fusions in non-small cell lung cancer. *Cancers.* 2021;13(1):1-14. doi: 10.3390/cancers13010139.

93. Atli EI, Gurkan H, Atli E, Kirkizlar HO, Yalcintepe S, Demir S, et al. The importance of targeted next-generation sequencing usage in cytogenetically normal myeloid malignancies. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2021;13(1). doi: 10.4084/MJHID.2021.013.

94. Prieto-Conde MI, Corchete LA, García-Álvarez M, Jiménez C, Medina A, Balanzategui A, et al. A New Next-Generation Sequencing Strategy for the Simultaneous Analysis of Mutations and Chromosomal Rearrangements at DNA Level in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2020;22(1):60-71. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.08.002. PubMed Central PMCID: PMC31605801.

95. Brisudova A, Skarda J. Gene rearrangement detection by next-generation sequencing in patients with non-small cell lung carcinoma. *Biomed Pap.* 2020;164(2):127-32. doi: 10.5507/bp.2020.015. PubMed Central PMCID: PMC32284620.

96. Barua S, Wang G, Mansukhani M, Hsiao S, Fernandes H. Key considerations for comprehensive validation of an RNA fusion NGS panel. *Prac Lab Med.* 2020;21. doi: 10.1016/j.plabm.2020.e00173.

97. Schröder J, Kumar A, Wong SQ. Overview of fusion detection strategies using next-generation sequencing. *Methods in Molecular Biology*: Humana Press Inc.; 2019. p. 125-38.
98. Beaubier N, Tell R, Lau D, Parsons JR, Bush S, Perera J, et al. Clinical validation of the tempus xT next-generation targeted oncology sequencing assay. *Oncotarget*. 2019;10(24):2384-96. doi: 10.18632/oncotarget.26797.
99. Velizheva NP, Rechsteiner MP, Valtcheva N, Freiburger SN, Wong CE, Vrugt B, et al. Targeted next-generation-sequencing for reliable detection of targetable rearrangements in lung adenocarcinoma—a single center retrospective study. *Pathol Res Pract*. 2018;214(4):572-8. doi: 10.1016/j.prp.2018.02.001. PubMed Central PMCID: PMC29580750.
100. Stengel A, Nadarajah N, Haferlach T, Dicker F, Kern W, Meggendorfer M, et al. Detection of recurrent and of novel fusion transcripts in myeloid malignancies by targeted RNA sequencing. *Leukemia*. 2018;32(5):1229-38. doi: 10.1038/s41375-017-0002-z. PubMed Central PMCID: PMC29479069.
101. Lam SW, Cleton-Jansen AM, Cleven AHG, Ruano D, van Wezel T, Szuhai K, et al. Molecular Analysis of Gene Fusions in Bone and Soft Tissue Tumors by Anchored Multiplex PCR–Based Targeted Next-Generation Sequencing. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2018;20(5):653-63. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.05.007. PubMed Central PMCID: PMC30139549.
102. Tsoulos N, Papadopoulou E, Metaxa-Mariatou V, Tsaousis G, Efstathiadou C, Tounta G, et al. Tumor molecular profiling of NSCLC patients using next generation sequencing. *Oncol Rep*. 2017;38(6):3419-29. doi: 10.3892/or.2017.6051. PubMed Central PMCID: PMC29130105.
103. Su D, Zhang D, Chen K, Lu J, Wu J, Cao X, et al. High performance of targeted next generation sequencing on variance detection in clinical tumor specimens in comparison with current conventional methods. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1). doi: 10.1186/s13046-017-0591-4. PubMed Central PMCID: PMC28882180.
104. Luthra R, Patel KP, Routbort MJ, Broaddus RR, Yau J, Simien C, et al. A Targeted High-Throughput Next-Generation Sequencing Panel for Clinical Screening of Mutations, Gene Amplifications, and Fusions in Solid Tumors. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2017;19(2):255-64. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.09.011. PubMed Central PMCID: PMC28017569.
105. Deeb KK, Hohman CM, Risch NF, Metzger DJ, Starostik P. Routine clinical mutation profiling of non-small cell lung cancer using next-generation sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(7):913-21. doi: 10.5858/arpa.2014-0095-OA. PubMed Central PMCID: PMC26125431.
106. Tuononen K, Sarhadi VK, Wirtanen A, Rönty M, Salmenkivi K, Knuuttila A, et al. Targeted resequencing reveals ALK fusions in non-small cell lung carcinomas detected by FISH, immunohistochemistry, and real-time RT-PCR: A comparison of four methods.

BioMed Res Int. 2013;2013. doi: 10.1155/2013/757490. PubMed Central PMCID: PMC23484153.

107. Kirchner M, Glade J, Lehmann U, Merkelbach-Bruse S, Hummel M, Lehmann A, et al. NTRK testing: First results of the QuiP-EQA scheme and a comprehensive map of NTRK fusion variants and their diagnostic coverage by targeted RNA-based NGS assays. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2020;59(8):445-53. doi: 10.1002/gcc.22853. PubMed Central PMCID: PMC32319699.

108. Qu X, Yeung C, Coleman I, Nelson PS, Fang M. Comparison of four next generation sequencing platforms for fusion detection: OncoPrint by ThermoFisher, AmpliSeq by illumina, FusionPlex by ArcherDX, and QIAseq by QIAGEN. *Cancer Genet*. 2020;243:11-8. Epub 2020/03/21. doi: 10.1016/j.cancergen.2020.02.007. PubMed PMID: 32197218.

109. Crowgey EL, Mahajan N, Wong WH, Gopalakrishnapillai A, Barwe SP, Kolb EA, et al. Error-corrected sequencing strategies enable comprehensive detection of leukemic mutations relevant for diagnosis and minimal residual disease monitoring. *BMC Med Genomics*. 2020;13(1):32. Epub 2020/03/07. doi: 10.1186/s12920-020-0671-8. PubMed PMID: 32131829; PubMed Central PMCID: PMC7057603.

110. Zerkalenskova E, Panfyorova A, Kazakova A, Baryshev P, Shelihova L, Kalinina I, et al. Molecular characteristic of acute leukemias with t(16;21)/FUS-ERG. *Ann Hematol*. 2018;97(6):977-88. doi: 10.1007/s00277-018-3267-z. PubMed Central PMCID: PMC29427188.

111. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941-D7. Epub 2018/10/30. doi: 10.1093/nar/gky1015. PubMed PMID: 30371878; PubMed Central PMCID: PMC6323903.

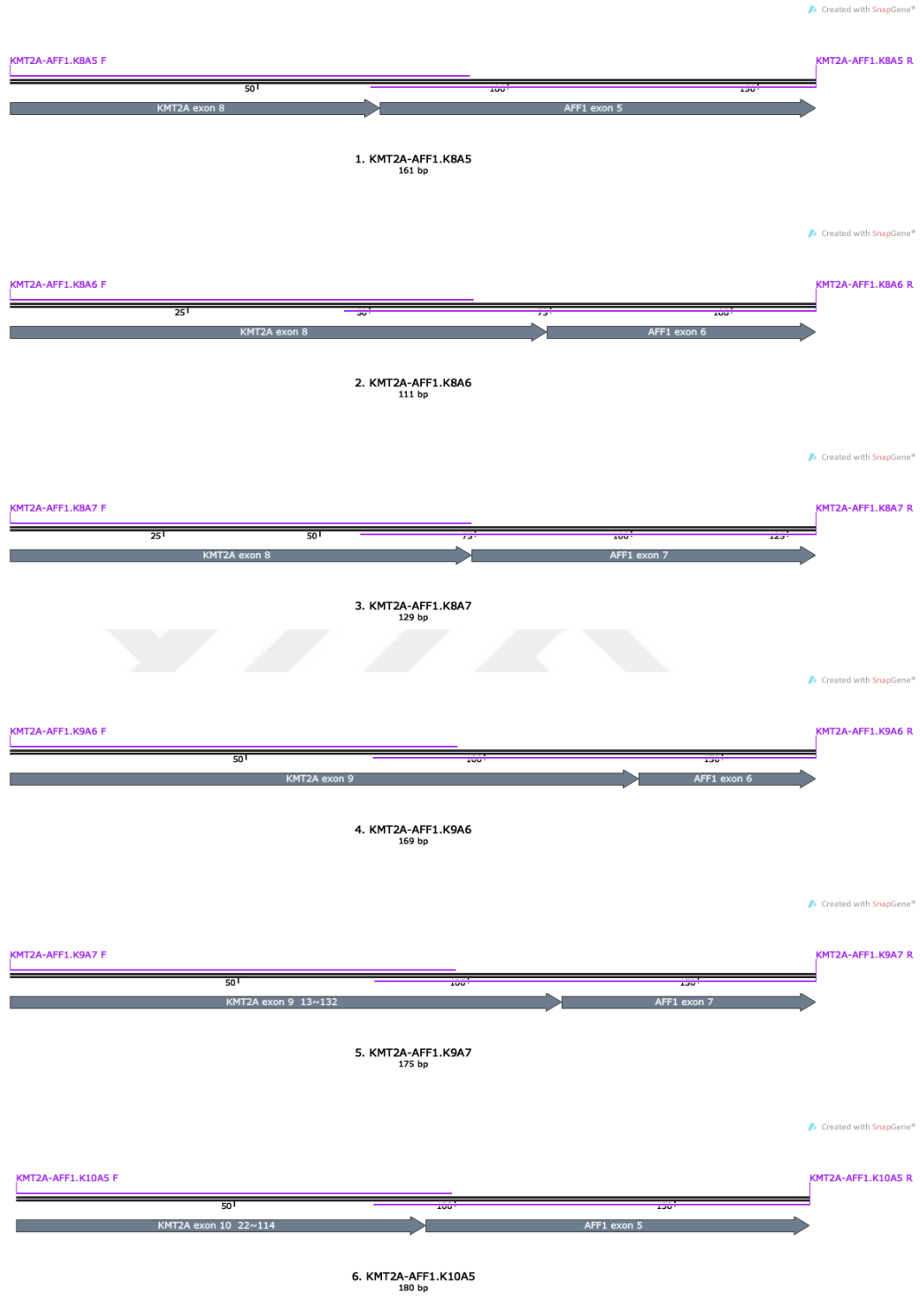
EKLER

EK 1: COSMIC Veri Tabanındaki İlgili KMT2A Füzyonlarının Görülme Sıklıkları

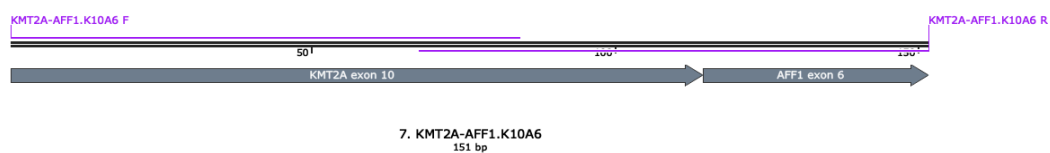
Bu tabloda KMT2A geninin hangi eksonunun füzyonun diğer partner geninin hangi eksonu ile birleştiği görülüyor. Translokasyonların doğal sonucu olarak ‘reciprocal’ füzyonlar da oluşabilmektedir. İlginç bir şekilde, en sık görülen füzyon genlerin hangi eksonlarının birleştiği birçok örnekte tanımlanamamıştır, büyük çoğunluğu karyotipleme ve FISH gibi sitogenetik yöntemlerle translokasyon belirlenmiştir. Oysa, daha nadir görülen füzyon genlerin moleküler karakterizasyonu son yıllarda gelişen transkriptom dizileme gibi NGS çalışmaları sayesinde daha net bir şekilde yapılmıştır.

Füzyon Genler	Test Edilen Örnekler	Mutasyonlu Örnekler	Düzenlenmiş Yayınlar	Mutasyon No	Gen İsmi	5' Partner Gen		3' Partner Gen		Mutasyon Sayısı	Mutasyon Sıklığı	
						Gözlemlenen Son Ekson	Sonuçlanmış Kopma Noktası	Gen İsmi	Gözlemlenen İlk Ekson			Sonuçlanmış Kopma Noktası
KMT2A-AFF1	2465	308	38	COSF1948	KMT2A	9	1_4241	AFF1	4	1459_9390	6	1,93%
				COSF2066	KMT2A	8	1_4109	AFF1	5	1504_9390	6	1,93%
				COSF1827	KMT2A	8	1_4109	AFF1	4	1459_9390	4	1,29%
				COSF1829	KMT2A	10	1_4355	AFF1	4	1459_9390	3	0,96%
				COSF1831	AFF1	3	1_1458+23319	KMT2A	9	4110-	1	0,32%
				COSF1832	AFF1	3	1_1458+27470	KMT2A	11	4356-	1	0,32%
				COSF1954	KMT2A	7	1_4035	AFF1	4	1459_9390	1	0,32%
				COSF1955	KMT2A	7	1_4035	AFF1	6	1591_9390	1	0,32%
				COSF1956	KMT2A	7	1_4035	AFF1	5	1504_9390	1	0,32%
				COSF2023	KMT2A	9	1_4241	AFF1	5	1504_9390	1	0,32%
				COSF2068	KMT2A	8	1_4109+1554	AFF1	6	1591-	1	0,32%
				COSF2073	KMT2A	10	1_4355	AFF1	5	1504_9390	1	0,32%
				COSF2075	AFF1	4	1_1503	KMT2A	9	4110_16602	1	0,32%
				COSF1830	KMT2A	10	1_4355+3441	AFF1	4	1459-	1	0,32%
				COSF1828	KMT2A	8	1_4109+1073	AFF1	4	1459-	1	0,32%
				COSF2091	KMT2A	10	1_4355	AFF1	6	1591_9390	1	0,32%
				COSF1799	KMT2A	8	1_4109	AFF1	11	1933_9390	1	0,32%
				COSF1801	KMT2A	8	1_4109	AFF1	6	1591_9390	1	0,32%
				COSF1947	KMT2A	?	?	AFF1	?	?	278	89%
				Toplam Mutasyonlar						311	100%	
KMT2A-ELL	43	17	8	COSF1988	KMT2A	9	1_4241	ELL	2	208_4027	7	41,18%
				COSF1990	KMT2A	9	1_4241	ELL	3	256_4027	2	11,76%
				COSF1994	KMT2A	11	1_4502	ELL	2	208_4027	1	5,88%
				COSF1997	KMT2A	8	1_4109+159	ELL	3	256-4877_4027	1	5,88%
				COSF1992	KMT2A	10	1_4355	ELL	2	208_4027	1	5,88%
				COSF1996	KMT2A	?	?	ELL	?	?	5	29%
				Toplam Mutasyonlar						17	100%	
KMT2A-FOXO4	1	1	1	COSF1976	KMT2A	10	1_4355+1753	FOXO4	2	786-791_3301	1	100%
				Toplam Mutasyonlar						1	100%	
KMT2A-MLLT1	667	86	14	COSF1803	KMT2A	9	1_4241	MLLT1	2	177_4507	10	11,49%
				COSF1804	KMT2A	10	1_4355	MLLT1	2	177_4507	4	4,60%
				COSF2017	KMT2A	9	1_4241	MLLT1	6	711_4507	2	2,30%
				COSF2080	MLLT1	3	1_440+17547	KMT2A	10	4342_16602	1	1,15%
				COSF2015	KMT2A	8	1_4109	MLLT1	4	441_4507	1	1,15%
				COSF2019	KMT2A	10	1_4355	MLLT1	6	711_4507	1	1,15%
				COSF2021	KMT2A	10	1_4355	MLLT1	7	1275_4507	1	1,15%
				COSF2078	KMT2A	10	1_4341	MLLT1	4	441-	1	1,15%
				COSF1823	KMT2A	10	1_4355+857	MLLT1	2	177-?_4507	1	1,15%
				COSF1822	KMT2A	10	1_4355+1282	MLLT1	2	177-?_4507	1	1,15%
				COSF1786	KMT2A	8	1_4109	MLLT1	6	711_4507	1	1,15%
				COSF1961	KMT2A	8	1_4109	MLLT1	7	1275_4507	1	1,15%
				COSF1959	KMT2A	?	?	MLLT1	?	?	62	71%
				Toplam Mutasyonlar						87	100%	
KMT2A-MLLT3	399	75	17	COSF1856	KMT2A	10	1_4355	MLLT3	6	1413_6772	20	26,32%
				COSF2081	KMT2A	8	1_4109	MLLT3	6	1413_6772	11	14,47%
				COSF2083	KMT2A	8	1_4109	MLLT3	9	1719_6772	7	9,21%
				COSF2087	KMT2A	10	1_4355	MLLT3	5	708_6772	3	3,95%
				COSF2085	KMT2A	8	1_4109	MLLT3	10	1791_6772	2	2,63%
				COSF1857	KMT2A	9	1_4241	MLLT3	6	1413_6772	2	2,63%
				COSF1984	MLLT3	5	1_1412+12829	KMT2A	10	4242-	1	1,32%
				COSF1983	KMT2A	10	1_4293	MLLT3	6	1413-	1	1,32%
				COSF1986	KMT2A	7	1_4035+106	MLLT3	7	1489-270_6772	1	1,32%
				COSF1861	KMT2A	?	?	MLLT3	?	?	28	37%
				Toplam Mutasyonlar						76	100%	
KMT2A-MLLT6	2	2	2	COSF1941	KMT2A	7	1_4035	MLLT6	11	1743_7578	1	50%
				COSF1883	KMT2A	8	1_4109+416	MLLT6	9	911-2281_7578	1	50%
				Toplam Mutasyonlar						2	100%	
KMT2A-MLLT10	145	23	15	COSF2045	KMT2A	8	1_4109	MLLT10	10	1144_5126	4	17,39%
				COSF2049	KMT2A	9	1_4241	MLLT10	9	1048_5126	3	13,04%
				COSF2040	KMT2A	7	1_4035	MLLT10	15	2096_5126	3	13,04%
				COSF2033	KMT2A	8	1_4109	MLLT10	16	2275_5126	2	8,70%
				COSF2047	KMT2A	8	1_4109	MLLT10	8	952_5126	1	4,35%
				COSF2044	KMT2A	7	1_4035+176	MLLT10	17	2387-	1	4,35%
				COSF2051	KMT2A	10	1_4355	MLLT10	9	1048_5126	1	4,35%
				COSF2037	KMT2A	7	1_4035	MLLT10	9	1048_5126	1	4,35%
				COSF2036	KMT2A	6	1_3657+216	MLLT10	15	2096-	1	4,35%
				COSF2043	KMT2A	8	1_4109+?	MLLT10	9	1048-?.5126	1	4,35%
				COSF2039	KMT2A	?	?	MLLT10	?	?	5	22%
				Toplam Mutasyonlar						23	100%	

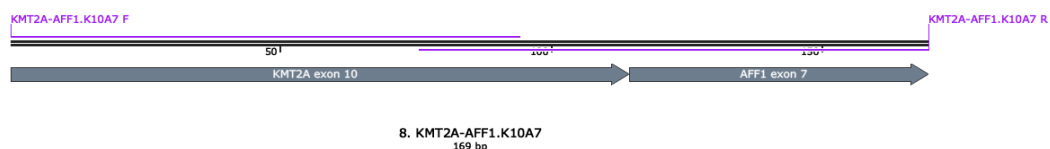
EK 2: 20 KMT2A Füzyonun Bağlantı Eksonları ve Uzun Primerlerinin Tasarımı



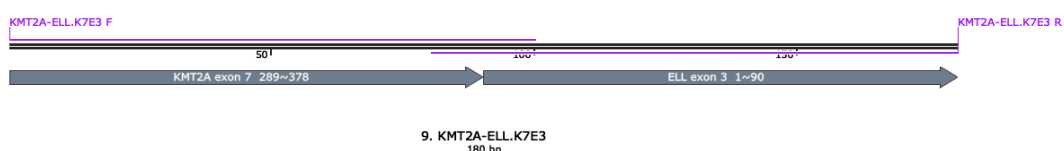
Created with SnapGene®



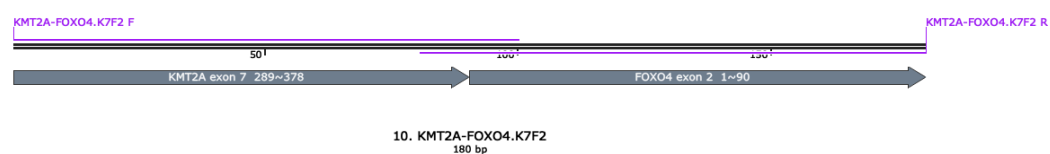
Created with SnapGene®



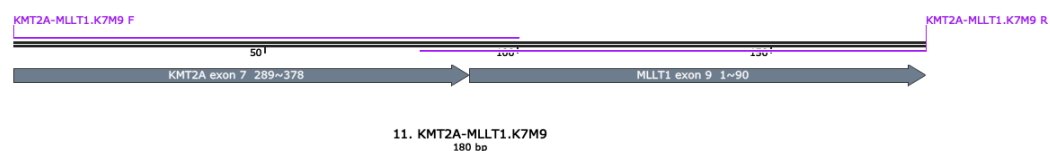
Created with SnapGene®



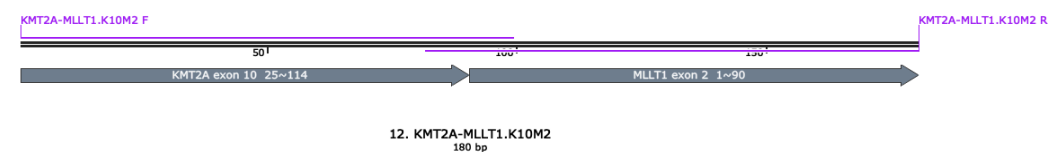
Created with SnapGene®



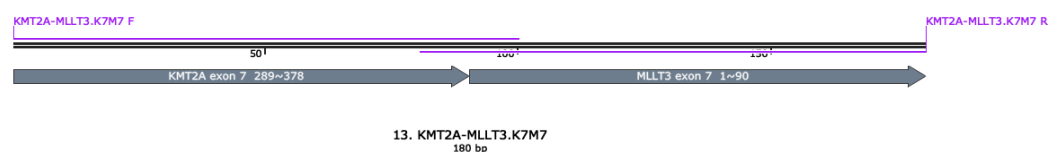
Created with SnapGene®



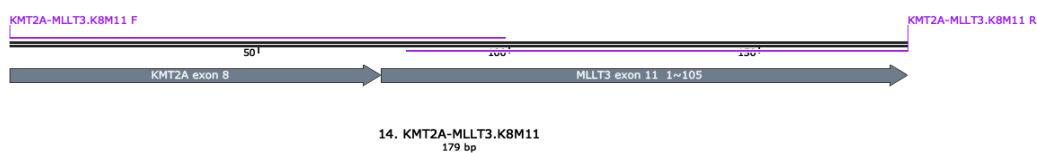
Created with SnapGene®



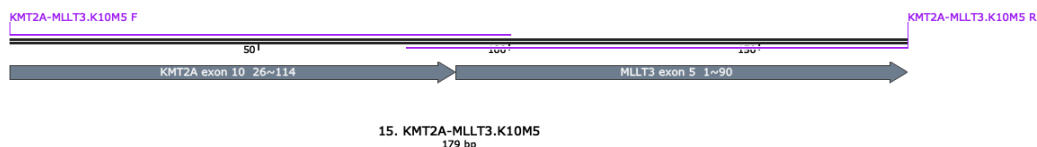
Created with SnapGene®



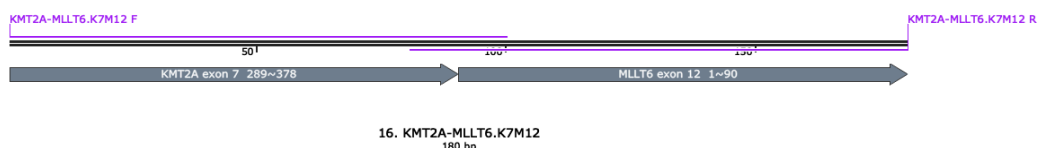
Created with SnapGene®



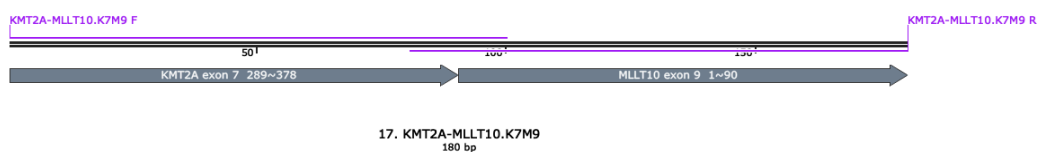
Created with SnapGene®



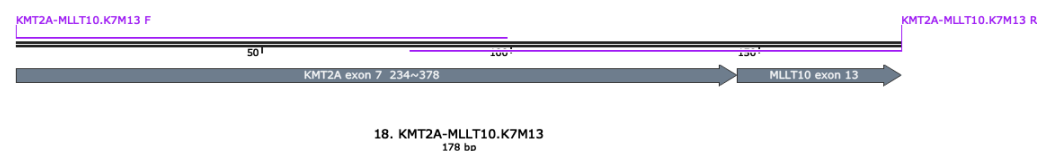
Created with SnapGene®



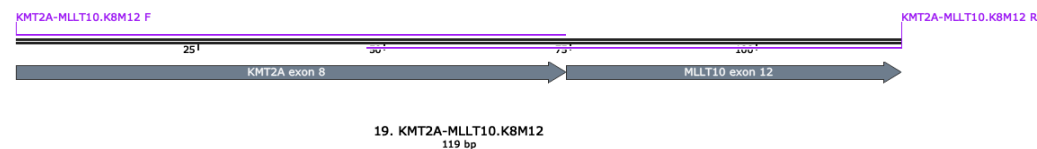
Created with SnapGene®



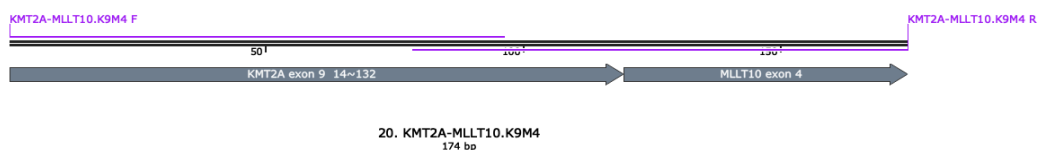
Created with SnapGene®



Created with SnapGene®



Created with SnapGene®



EK 3: Kalıp DNA Parçalarını Oluşturmak İçin Tasarlanan Uzun Primer Dizileri

(Illumina füzyon panelinin kapsadığı 20 KMT2A füzyon geni için)

Primer adı	Primer dizisi (5' --> 3')
KMT2A-AFF1.K8A5 F	GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAA ACAAAAACCAAAGAAAAAGGAAATGACCCATTCATGG
KMT2A-AFF1.K8A5 R	CTTTGTAGGGAAAGGAAACTTGGATGGCTCAGCTGTACTAGGCGTATGTATTGCTG TCAAAGGAGCGGCCATGAATGGGTCATTCTCT
KMT2A-AFF1.K8A6 F	GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAA ACAAAAACC
KMT2A-AFF1.K8A6 R	TTTGGTTTGGGTTACAGAACTGACATGCTGAGAGTCCTTTCTTTTGGTTTTTGT TACAGGG
KMT2A-AFF1.K8A7 F	GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAA ACAAAAACCAAAGAAAAAG
KMT2A-AFF1.K8A7 R	GATGACGTTCCCTTGCTGAGAAATTGAGTGAGTTTTTGAAGATGTATCATATTGTTCT TTTCTTTTGGTTTTTG
KMT2A-AFF1.K9A6 F	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTTGAACATCCTCA GCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCT
KMT2A-AFF1.K9A6 R	TTTGGTTTTGGGTTACAGAACTGACATGCTGAGAGTCCTTAAAGTCCACTCTGATCC TGTGGACTCCATCTGCTGGAATTTTTGCTTAGAAC
KMT2A-AFF1.K9A7 F	CCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTTGAACATCCTCAGCACTCTCTCAA TGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCAGATGGAGTCC
KMT2A-AFF1.K9A7 R	GATGACGTTCCCTTGCTGAGAAATTGAGTGAGTTTTTGAAGATGTATCATATTGTTCT TAAAGTCCACTCTGATCCTGTGGACTCCATCTGCTGGAA
KMT2A-AFF1.K10A5 F	GTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCTTGACTTCTGTTTCTATAACACCCAGGGT GGTTTGGTTCTCTCTGTGCCAGTAGGGGCATGTAGAGGAAATG
KMT2A-AFF1.K10A5 R	CTTTGTAGGGAAGGAAACTTGGATGGCTCAGCTGTACTAGGCGTATGTATTGCTG TCAAAGGAGGCGGCCATGAATGGGTCATTCTCTACATGCCC
KMT2A-AFF1.K10A6 F	GAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCTTGACTT CTGTTCTTATAACACCCAGGGTGGTTTTGC
KMT2A-AFF1.K10A6 R	TTTGGTTTTGGGTTACAGAACTGACATGCTGAGAGTCCTTACATGCCACTACTGG CACAGAGAAAGCAAACACCCTGGGTG
KMT2A-AFF1.K10A7 F	GAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCTTGACTT CTGTTCTTATAACACCCAGGGTGGTTTGTCTTCTCTG
KMT2A-AFF1.K10A7 R	GATGACGTTCCCTTGCTGAGAAATTGAGTGAGTTTTTGAAGATGTATCATATTGTTCT CTACATGCCCACTACTGGCACAGAGAGAAAGCAAAACCAC
KMT2A-ELL.K7E3 F	AGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAGTTCCCAAAACCACTCCTAGTGA GCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAATCAGCACATCTCCA
KMT2A-ELL.K7E3 R	GCCCTGGGGGTTGTGCGGGCCGATGTTGGAGAGGTAGAAGGAGAACGTCGCGGCC TTCGCGGGCAGTCAGGCTGGGGATGGAGATGTGCTGATTCTGG
KMT2A-FOXO4.K7F2 F	AGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAGTTCCCAAAACCACTCCTAGTGA GCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAATCAGAACTCGATCC
KMT2A-FOXO4.K7F2 R	GTTCAGACTCCACCAAGAGCTTTTGCCGGTGGCCTCGTTGTGAACCTTGATGAACCT GCTGTGCAGGGACAGGTTGTGGCGGATCGAGTTCTGATTCTGG
KMT2A-MLLT1.K7M9 F	AGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAGTTCCCAAAACCACTCCTAGTGA GCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAATCAGGTTGAGCTTC
KMT2A-MLLT1.K7M9 R	GGCGGGGGTGGCTTCTGGGGGGTGGGGGCTCACGGCTGGGCAGGGAGGAGTCGG CGCTGTTGTCACCTCTCGCTGTGCTGAAGCTCAACCTGATTCTGG
KMT2A-MLLT1.K10M2 F	TGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCTTGACTTCTGTTCTTATAACACCCAGGGTGGT TTGCTTTCTGTGCCAGTAGTGGGCATGTAGAGTCACCGTC
KMT2A-MLLT1.K10M2 R	CACCATCCAGTCGTGAGTGAACCCCTCCGTGGTGGGCTTCTTGCGCAGTTGGGCGC GATGCCCCAGCTCTAACCTCACTGGACGGTGCACCTCTACATG
KMT2A-MLLT3.K7M7 F	AGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAGTTCCCAAAACCACTCCTAGTGA GCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAATCAGGTCCTTTGAG
KMT2A-MLLT3.K7M7 R	TTTCAGAGTCATTGTGCTTATCCTCCACTTCATCTGATTCTCTCTCATTGTCATCAGA ATGCAGATCTTTCATTATAGACCTCAAAGGACCTGATTCTGG
KMT2A-MLLT3.K8M11 F	GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAA ACAAAAACCAAAGAAAAAGATCGTGAACCTATAGAAGAACTG
KMT2A-MLLT3.K8M11 R	ACTCTGATGTTTACGGACTGTGGTTTTGTCCAGCAGCAAGATCAAAATCAAATG TTGTGTTTGTGATATGAAAGTGCCAGTTTCTTCTATAAGGTTCT
KMT2A-MLLT3.K10M5 F	GGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCTTGACTTCTGTTCTTATAACACCCAGGGTGGTT TGCTTTCTCTGTGCCAGTAGTGGGCATGTAGAGGACCCTAATAG
KMT2A-MLLT3.K10M5 R	GCTGCTGCTACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GCTGCTGCTGGTATGAATACTCCTATTAGGGTCTCTACATGC
KMT2A-MLLT6.K7M12 F	AGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAGTTCCCAAAACCACTCCTAGTGA GCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAATCAGGTGTTTTCTC
KMT2A-MLLT6.K7M12 R	TTGGGAGAGGAGGGGATTAACGCGACCCATGGGGGTTCCAAAGATGTGGGTAGAA GGGAGGCTAAAGGTAGAGCCAGCAGAGAGAAACCTGATTCTGG
KMT2A-MLLT10.K7M9 F	AGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAGTTCCCAAAACCACTCCTAGTGA

Primer adi	Primer dizisi (5' --> 3')
	GCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAATCAGAAATATAAAG
KMT2A-MLLT10.K7M9 R	TGTAGTAACAGTCAAGGATGGAACCAATGCAGGTGATGGTTCTGGCTGCTTCTGT GTTTCTGTTTGTGTTTGTCTTCTCTTTATATTTCTGATTCTGG
KMT2A-MLLT10.K7M13 F	GCTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGGTCTCCAGCCAGCACTGGTCATCCCGCCTCA GCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAGTTCCCAAAACC
KMT2A-MLLT10.K7M13 R	CGTTGTGTATTGCATTTCAGCAACTCTGAGAACGCTGATTCTGGTGGTGGAGGCTGC TTTTCTTGGGCTCACTAGGAGTGGTTTGGGAACTTCTTTTC
KMT2A-MLLT10.K8M12 F	GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCAAGTATCCCTGTAAA ACAAAAACCAAAAGAAAAG
KMT2A-MLLT10.K8M12 R	TAGTTGTTGGGCAAGCTCCATCATGCCGATACTGCATGGAAATTTCTTTTCTTTGG TTTTGTTTTACAGG
KMT2A-MLLT10.K9M4 F	CGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACATCCTCAGCACTCTCTCCAAT GGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCAGATGGAGTCC
KMT2A-MLLT10.K9M4 R	CCCCATTATCTGTTCTTTTAAAGCTCCATCCTTATGGGGACAAAGTTCACATCTCT TAAAGTCCACTCTGATCCTGTGGACTCCATCTGCTGGAA



EK 4: Kalıp DNA parçalarının dizileri (47 KMT2A füzyonu için)

GenScript tarafından sentezlenemeyecek dizilere sahip bazı kalıp DNA parçalarında füzyon panelindeki primerlerin bağlanmasını etkilemeyecek şekilde küçük modifikasyonlar yapıldı, değişiklik yapılan füzyon gen parçalarının boyutları sarı renk ile vurgulanmıştır.

DNA parçası adı	DNA dizisi (5' --> 3')	Boyut (bp)
KMT2A-AFF1.K7A7	AAGCAGTAGTGAGCCTCCTCCACGAAAGCCCGTCGAGGAAAGAGTGA AGAAGGGAATGTCTCGGCCCTGGGCCTGAATCCAAACAGGCCACCACT CCAGCTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGGTCTCCAGCCAGCACTGGTCA TCCCGCCTCAGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAAGTTCCCAA AACCCTCCTAGTGAGCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAATCA GAACAATATGATACATCTTCAAAAACCTCACTCAAATTCTCAGCAAGGAA CGTCATC	300
KMT2A-AFF1.K8A4	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACAAACAAAAACCAAAAGAAAAGCAGACCTACTCCAATGAAGTCCAT TGTGTTGAAGAGATTCTGAAGg	120
KMT2A-AFF1.K8A5	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACAAACAAAAACCAAAAGAAAAGGAAATGACCCATTTCATGGCCGCT CCTTTGACAGCAATACATACGCCTAGTACAGCTGAGCCATCCAAGTTTC TTCCCTACAAAG	161
KMT2A-AFF1.K9A4	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGCAGACCTACTCCAATG AAGTCCATTGTGTTGAAGAGATTCTGAAG	177
KMT2A-AFF1.K9A5	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGGAAATGACCCATTTCAT GGCCGCTCCTTTGACAGCAATACATACGCCTAGTACAGCTGAGCCATCC AAGTTTCCTTTCCCTACAAAG	219
KMT2A-AFF1.K9A6	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGGACTCTCAGCATGTCA GTTCTGTAACCCAAAACCAAA	169
KMT2A-AFF1.K10A4	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGCAGACCTACTCCAATGAAGTCCATTGTGTGAAGA GATTCTGAAG	159
KMT2A-AFF1.K10A5	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGGAAATGACCCATTTCATGGCCGCTCCTTTGACAGC AATACATACGCCTAGTACAGCTGAGCCATCCAAGTTTCCTTTCCCTACAA AG	201
KMT2A-AFF1.K10A6	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGGACTCTCAGCATGTCAGTTCTGTAACCCAAAACCA AA	151
KMT2A-CREBBP.K8C3	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACAAACAAAAACCAAAAGAAAAGATGGGAATAACTGGGAACACAAG TCCATTGGACAGCCCTTAGTCAAGCTGGAGGGCAGCCAATGGGAGCC ACTGGAGTGAACCCCAAGTTAGCCAGCAAAACAGAGCATGGTCAACAGTT TGCCACCTTCCCTACAGATATCAAGAATACTTCAGTCACCAACGTGCCA AATATG	251
KMT2A-CREBBP.K8C16	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACAAACAAAAACCAAAAGAAAAGATGATGGAGGAGGATTTGCAAGG AGCTTCCCAAGTTAAAGAAGAAACAGACATAGCAGAGCAGAAATCAGA ACCAATGGAAGTGGATGAAAAGAAACCTGAAGTGAAAGTAGAAGTTAA AGAGGAAGAAGAGAGTAGCAGTAACGGCACAGCCTCTCAGTCAACATCT CCTTCGACGCCGCGCAAAAAA	264
KMT2A-CREBBP.K9C3	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGATGGGAATAACTGGGA ACACAAGTCCATTGGACAGCCCTTAGTCAAGCTGGAGGGCAGCCAAT GGGAGCCACTGGAGTGAACCCCAAGTTAGCCAGCAAAACAGAGCATGGTC AACAGTTTGCCACCTTCCCTACAGATATCAAGAATACTTCAGTCACCAA CGTG	300
KMT2A-CREBBP.K10C3	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGATGGGAATAACTGGGAACACAAGTCCATTGGACA	291

DNA parçası adı	DNA dizisi (5' --> 3')	Boyut (bp)
	GCCCTTTAGTCAAGCTGGAGGGCAGCCAATGGGAGCCACTGGAGTGAAC CCCCAGTTAGCCAGCAAAACAGAGCATGGTCAACAGTTTGCCACCTTCC CTACAGATATCAAGAATACTTCAGTCAACCAACGTGCCAAATATG	
KMT2A-DAB2IP.K8D5	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTA AAAACAAAAACCAAAAAGAAAAGGTGACGACGTCATCAGGAAGCAA GTGCTTTTCTGCGGTCTGCAGCTGAGCGGGATAAGTGGATGGAGAAC CTCCGGCGAGCGGTGCATCCCAACAAG	173
KMT2A-ELL.K8E2	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTA AAAACAAAAACCAAAAAGAAAAGGATTCTGTTTCACTGAGGCCATCT ATCCGATTTCAGGAAGCCAAGGG	122
KMT2A-ELL.K8E6	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTA AAAACAAAAACCAAAAAGAAAAGGTGGCCAACATGAGTGCTAAGGA CGGCACGTGTACACTGCAGGACTGCATGTACAAGGATGTGCAGAAGGAC TGGCCTGGCTACTCGGAGGGGGACCAGCAGCTGTGAAGCGGGTGCTCG TCCG	199
KMT2A-ELL.K9E2	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGGATTCTGTTTCACTGA GGCCATCTATCCGATTTCAGGAAGCCAAGGG	180
KMT2A-ELL.K10E2	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGGATTCTGTTTCACTGAGGCCATCTATCCGATTTCAA GGAAGCCAAGGG	162
KMT2A-EPS15.K8E2	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTA AAAACAAAAACCAAAAAGAAAAGTTATCAAGTGGGAATCCTGTATAT GAAAAATACTATAGACAGgttg	120
KMT2A-MLLT1.K8M2	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTA AAAACAAAAACCAAAAAGAAAAGTGCACCGTCCAGGTGAGGTTAGA GCTGGGGCATCGCGCCCAACTGCGCAAGAAGCCACCACGGAGGGGTTT ACTCAGACTGGATGGTGTGTGTCGCGGGCCCCGAGCAATGTGACATCC AGCACTTCGTGGAGAAGGTGGTCTTCTGGCTGCACGACAGCTTCCCCAA GCCAGACGCG	255
KMT2A-MLLT1.K8M4	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTA AAAACAAAAACCAAAAAGAAAAGGAGGAGCCGAGGAAGGTCTGCTT CACCTACGACCTGTTCTGAACCTGGAAGGCAACCCGCCCGTGAACCAC CTGCGCTGCGAGAAGCTCACCTTCAACAACCCACCACGGAGTCCGGT ACAAGCTCCTGCGGGCCGCGGG	218
KMT2A-MLLT1.K9M2	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGTGCACCGTCCAGGTGA GGTTAGAGCTGGGGCATCGCGCCCAACTGCGCAAGAAGCCACCACGGA GGGGTTCACTCAGACTGGATGGTGTGTGTCGCGGGCCCCGAGCAATGT GACATCCAGCACTTCGTGGAGAAGGTGGTCTTCTGGCTGCACGACAGCT TCCCC	300
KMT2A-MLLT1.K9M7	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGTCTGCCAGTCAAGCC CGTCCAACTCCAGCTCCAGCTCAGACTCCAGCTCAGACTCAGACTTCGAG CCATCCAGAACCACAGCCAAG	220
KMT2A-MLLT1.K10M2	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGTGCACCGTCCAGGTGAGGTTAGAGCTGGGGCATCG CGCCCAACTGCGCAAGAAGCCACCACGGAGGGGTTCACTCAGACTGG ATGGTGTGTGTCGCGGGCCCCGAGCAATGTGACATCCAGCACTTCGTGGA GAAGGTGGTCTTCTGGCTGCACGACGCTTCCCCAAGCCCAGACGCG	295
KMT2A-MLLT1.K10M7	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGTCTGCCAGTCAAGCCCGTCCAACTCCAGCTCCAG CTCAGACTCCAGCTCAGACTCAGACTTCGAGCCATCCCAGAACCACAGC CAAG	202
KMT2A-MLLT3.K8M4	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTA AAAACAAAAACCAAAAAGAAAAGGAAGAACCTAGGAAAGTCCGCTT TGATTATGACTTATCTCTGCATCTTGAAGGCCATCCACCAAGTGAATCACC TCCGCTGTGAAAAGCTAACTTTCAACAACCCACAGAGGACTTTAGGAG AAAGTTGCTGAAGGCAGGAGGG	218
KMT2A-MLLT3.K8M9	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTA AAAACAAAAACCAAAAAGAAAAGATTCTTGAAGTGAAGAAGTCCAAT AAAGCAAAGCAAATCAGATAAGCAAATAAAGAATGGTGAATGTGACAA G	146
KMT2A-MLLT3.K9M5	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA	190

DNA parçası adı	DNA dizisi (5' --> 3')	Boyut (bp)
	TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGGACCCTAATAGGAGTA TTCATACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTAGCAGCAGCA	
KMT2A-MLLT3.K10M5	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGGACCCTAATAGGAGTATTCATACCAGCAGCAGCAG CAGCAGCAGCAGTAGCAGCAGCA	172
KMT2A-MLLT4.K7M2	CTCCAGCTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGGTCTCCAGCCAGCACTGGT CATCCCGCTCAGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAAGAAGTCCC AAAACCACTCCTAGTGAGCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAAT CAGGATTGGAGTTCCATGGAGTGATGAGATTTATTTTCAAGATAAAGC TGCTGGAAAACCTTGCACAAAAATGTATTCCGGTCTCTAGTACTGCCACCA CTCAAGATGTAATCGAAACGCTCGCGGAGAAATTCGACCTGATATGCG AATG	300
KMT2A-MLLT4.K8M2	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACCAAAAAACCAAAAGAAAAGGATTGGAGTTCCATGGAGTGATG AGATTTTATTTTCAAGATAAAGCTGCTGGAAAACCTTGCACAAAAATGTAT TCGGGTCTCTAGTACTGCCACCCTCAAGATGTAATCGAAACGCTCGCG GAGAAATTCGACCTGATATGCGAATGCTGTCTCTCCCAAGTATTCCT CTATGAAGTGCATGTCAGCGGAG	270
KMT2A-MLLT4.K9M2	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGGATTGGAGTTCCATG GAGTGATGAGATTTTATTTTCAAGATAAAGCTGCTGGAAAACCTTGCACAA AAATGTATTCCGGTCTCTAGTACTGCCACCCTCAAGATGTAATCGAAAC GCTCGCGGAGAAATTCGACCTGATATGCGAATGCTGTCTCTCCCAAGT AT	300
KMT2A-MLLT4.K22M2	TTCTGCCAAAAGCCAGGAGCCACCGTGGGTTGCTGTCTCACATCCTGCAC CAGCAACTATCACTTCATGTGTTCCTCCGAGCCAAGAACTGTGCTTTCTGG ATGATAAAAAAGTATATTGCCAACGACATCGGGATTGATCAAAGGCGA AGATTTGGAGTTCCATGGAGTGATGAGATTTATTTTCAAGATAAAGCTG CTGGAAAACCTTGCACAAAAATGTATTCCGGTCTCTAGTACTGCCACCCT CAAGATGTAATCGAAACGCTCGCGGAGAAATTCGACCTGATATGCGAA TG	300
KMT2A-MLLT10.K6M15	GATGAGAAAAATGTCAGAATCTACAATGGATGCCTTCCAAAGCCTACCTG CAGAAGCAAGCTAAAGGTATTTATAACAGCAATGATGTAGCAGTATCGT TTCCAAATGTAGTATCTGGCTCGGGATCTAGTACTCCTGTCTCCAGCTCT CACTTACCTCAGCAGTCTTCTGGGCATTGCAACAAGTAGGAGCGCTCTC TCCCTCAGCTGTGTCATCTGCAGCCCTGCTGTTGCTACAACCTCAG	244
KMT2A-MLLT10.K7M15	CTCCAGCTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGGTCTCCAGCCAGCACTGGT CATCCCGCTCAGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAAGAAGTCCC AAAACCACTCCTAGTGAGCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACGAAT CAGGTATTTATAACAGCAATGATGTAGCAGTATCGTTTCCAAATGTAGTA TCTGGCTCGGGATCTAGTACTCCTGTCTCCAGCTCTCACTTACCTCAGCA GTCTTCTGGGCATTGCAACAAGTAGGAGCGCTCTCTCCCTCAGCTGTGT CAT	300
KMT2A-MLLT10.K8M4	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACCAAAAAACCAAAAGAAAAGAGATGTGAACCTTTGTCCCCATAAG GATGGAGCTTTAAAAAGAACAGATAATGGGG	129
KMT2A-MLLT10.K8M9	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACCAAAAAACCAAAAGAAAAGAAATATAAAGAGAAGGACAAACA CAAACAGAAACACAAGAAGCAGCCAGAACCATCACCTGCATTGGTTCCA TCCTTGACTGTTACTACAGAAAAA	170
KMT2A-MLLT10.K8M10	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACCAAAAAACCAAAAGAAAAGACTTATACAAGCACTAGCAACAA CTCTATATCTGGATCATTGAAGCGCTTGGAAAGATACTACTGCACGATTTA CAAATGCAAAATTTCCAGGAAGTCTCTGCACACACCTCTAGTGAAAAAGA TGTTTCAGAGACTAGAGGGTCAGAGGGCAAGGGAAGAAATCTTCAGCT CACAGCTCAGGTCAAAGGGGAAGAAAGCCTGGTGGTGAAGAAATCCA GGAACAA	300
KMT2A-MLLT10.K8M16	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACCAAAAAACCAAAAGAAAAGGCAAACTCTATCTGGATCTTCT CTCAGTCAGGCACCATCTCATATGTATGGCAATAGATCAAATTCATCAAT GGCAGCTCTTATAGCTCAGTCTGAAAACAATCAACAG	186
KMT2A-MLLT10.K9M9	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGAAATATAAGAGAAG GACAAACACAAACAGAAACACAAGAAGCAGCCAGAACCATCACCTGCA TTGGTTCCATCCTTGACTGTTACTACAGAAAAA	228
KMT2A-MLLT10.K9M10	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTGAACA	300

DNA parçası adı	DNA dizisi (5' --> 3')	Boyut (bp)
	TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGACTTATACAAGCACTA GCAACAACCTCTATATCTGGATCATTGAAGCGCTTGGAAAGATACTACTGC ACGATTTACAAATGCAAAATTTCCAGGAAGTCTCTGCACACACCTCTAGTG GAAAAGATGTTTCAGAGACTAGAGGGTCAGAGGGCAAAGGGAAGAAAT CTTCA	
KMT2A-MLLT10.K10M9	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGAAATATAAAGAGAAGGACAAACACAAACAGAAAC ACAAGAAGCAGCCAGAACCATCACCTGCATTGGTTCCATCCTTGACTGTT ACTACAGAAAAA	210
KMT2A-MLLT10.K10M10	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGACTTATACAAGCACTAGCAACAACCTCTATATCTGG ATCATTGAAGCGCTTGGAAAGATACTACTGCACGATTTACAAATGCAAAAT TTCCAGGAAGTCTCTGCACACACCTCTAGTGGAAGAAAGATGTTTCAGAGA CTAGAGGGTCAGAGGGCAAAGGGAAGAAATCTTCAGCTCACAGCTCAG GTCAA	300
KMT2A-MLLT11.K8M2	GTCCAGAGCAGAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCC TGTAACAAACAAAAACCAAAAGAAAAAGGAAGCTATGAGGGACCCTGTGAG TAGCCAGTACAGTTCCTTTCTTTTCTGGAGGATGCCCATCCAGAACTGG ATCTGTGCGGAGCTGGAAGGCCTGGGTCTGTGATACAGCCACCTACAA GGTCAAAGACAGCAGCGTTGGCAAAATGATCGGGCAAGCAACTGCAGC AGACCAGGAGAAAAACCCTGAAGGTGATGGCCTCCTTGAGTACAGCACC TTCAACT	300
KMT2A-MLLT11.K9M2	GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACCTTTGAACA TCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAAATTCAGCA GATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGGAAGCTATGAGGGACC CTGTGAGTAGCCAGTACAGTTCCTTTCTTTTCTGGAGGATGCCCATCCCA GAACTGGATCTGTGCGGAGCTGGAAGGCCTGGGTCTGTGATACAGCCA CCTACAAGGTCAAAGACAGCAGCGTTGGCAAAATGATCGGGCAAGCAA CTGCA	300
KMT2A-SEPT6.K10S2	GAGGATTGTGAAGCAGAAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT TGACTTCTGTTCTTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCCAGTA GTGGGCATGTAGAGGGTGAAGGTTGCCGAAGTGTCCCCTGGCTGGACA TGTGGGGTTTGACAGCTTGCTGACCAGCTGGTGAATAAGTCCGTCAGCC AGGGCTTCTGCTTCAACATCCTGTGCGTGG	229
KMT2A-SEPT9.K7S2	CTCCAGCTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGGTCTCCAGCCAGCACTGGT CATCCCGCCTCAGCCACCTACTACAGGACCGCCAAGAAAAGAAGTTCCC AAAACCACTCCTAGTGAGCCCAAGAAAAAGCAGCCTCCACCACCAGAAT CAGCCTTGAAAAGATCTTTTGAGGTCGAGGAGGTCGAGACACCCAACTC CACCCACCCCGGAGGGTCCAGACTCCCCTACTCCGAGCCACTGTGGCC AGCTCCACCCAGAAATTCAGGACCTGGGCGTGAAGAACTCAGAACCCT CGGCC	300

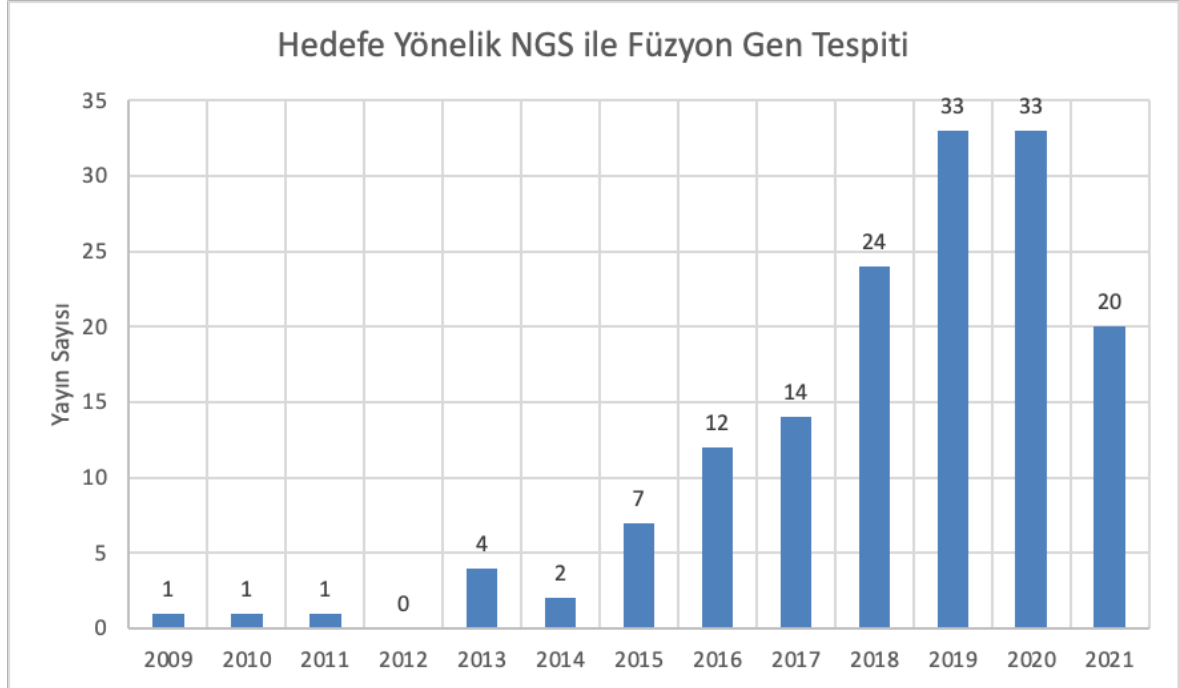
EK 5: NGS Okuma Sayıları (Coverage)

Illumina AmpliSeq Füzyon paneli kapsamındaki füzyon transkriptleri taklit eden her bir kalıp DNA parçasının referans dizideki konumları ve ilgili konum içerisindeki en fazla okuma sayıları

#	ID	Referans Dizideki Konumu	Okuma Sayısı (Coverage)
1	KMT2A-AFF1.K8A5	1 - 161	110963
2	KMT2A-AFF1.K8A6	162 - 272	5026
3	KMT2A-AFF1.K8A7	273 - 401	248402
4	KMT2A-AFF1.K9A6	402 - 570	102128
5	KMT2A-AFF1.K9A7	571 - 745	166258
6	KMT2A-AFF1.K10A5	746 - 925	160830
7	KMT2A-AFF1.K10A6	926 - 1076	16841
8	KMT2A-AFF1.K10A7	1077 - 1245	130030
9	KMT2A-ELL.K7E3	1246 - 1425	114921
10	KMT2A-FOXO4.K7F2	1426 - 1605	4965
11	KMT2A-MLLT1.K7M9	1606 - 1785	287294
12	KMT2A-MLLT1.K10M2	1786 - 1965	183262
13	KMT2A-MLLT3.K7M7	1966 - 2145	280910
14	KMT2A-MLLT3.K8M11	2146 - 2324	140186
15	KMT2A-MLLT3.K10M5	2325 - 2503	153408
16	KMT2A-MLLT6.K7M12	2504 - 2683	219136
17	KMT2A-MLLT10.K7M9	2684 - 2863	212839
18	KMT2A-MLLT10.K7M13	2864 - 3041	147768
19	KMT2A-MLLT10.K8M12	3042 - 3160	191206
20	KMT2A-MLLT10.K9M4	3161 - 3334	298824

EK 6: Hedefe Yönelik NGS ile Füzyon Gen Tespiti – Yıllara göre Yayın Sayısı

Bu grafik, Scopus veri tabanında ‘Fusion gene detection & targeted next generation sequencing’ yazıldığında çıkan yayınlar esas alınarak hazırlanmıştır. NGS teknolojisinin geliştiği ilk yıllardan itibaren bu konu üzerinde çalışmalar başlamıştır. Bu yılın ilk 5 ayında çıkan yayınlar bir önceki yıl çıkan yayınlara nerdeyse yaklaşmak üzere (23 Mayıs 2021).



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sadık Çiğdem

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Japonca (başlangıç seviyesi)

Eğitim Durumu

Lise: Iğdır Anadolu Lisesi (1997-2001)

Lisans: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (2001-2007)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Temel Biyoteknoloji (2018-2021)

Doktora: Kitasato Üniversitesi, Farmakolojik Bilimler (2020-devam ediyor)

Yayınlar ve Bildiriler

Cigdem S, Saito S, Nishikata D, Nagata K, Okuwaki M. SET-NUP214 and MLL cooperatively regulate the promoter activity of the HoxA10 gene. Genes Cells. 2021. Epub 2021/07/29. doi: 10.1111/gtc.12886. PubMed PMID: 34320268.

Saito S, Yokokawa T, Iizuka G, **Cigdem S**, Okuwaki M, Nagata K. Function of Nup98 subtypes and their fusion proteins, Nup98-TopIIbeta and Nup98-SETBP1 in nuclear-cytoplasmic transport. Biochem Biophys Res Commun. 2017;487(1):96-102. Epub 2017/04/11. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.024. PubMed PMID: 28392395.

Saito S, **Cigdem S**, Okuwaki M, Nagata K. Leukemia-Associated Nup214 Fusion Proteins Disturb the XPO1-Mediated Nuclear-Cytoplasmic Transport Pathway and Thereby the NF-kappaB Signaling Pathway. Mol Cell Biol. 2016;36(13):1820-35. Epub 2016/04/27. doi: 10.1128/MCB.00158-16. PubMed PMID: 27114368; PubMed Central PMCID: PMCPMC4911740.

İş Tecrübesi

Kurumu: TÜSEB 2019-TA-01 4582 “Lösemilerdeki Füzyon Genlerinin Taranmasına Yönelik Yeni Nesil Dizileme Panellerinin Geliştirilmesi”

Görevi: Yardımcı Personel

Yılları: 2020-2022

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

