

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE SF3B1 VE MYD88 GENLERİNDEKİ
VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

GÖZDE CİMŞİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

EDİRNE-2019

GÖZDE CİMŞİT'in hazırladığı "KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE SF3B1 VE MYD88 GENLERİNDEKİ VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK Anabilim Dalında bir Yüksek lisans olarak kabul edilmiştir.

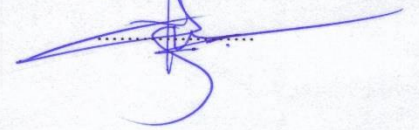
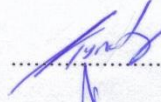
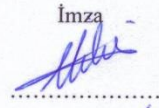
Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

Doç.Dr. Hilmi TOZKIR

Prof.Dr. Matem TUNÇDEMİR

Prof. Dr. İlker DİBİRDİK

İmza



Tez Savunma Tarihi: 22/02/2019

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

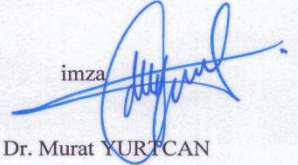
Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

imza



imza



Prof. Dr. Murat YURTCAN

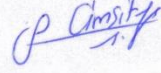
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

22/02/2019

GÖZDE CİMŞİT



Yüksek Lisans Tezi

Kronik Lenfositik Lösemide SF3B1 Ve MYD88 Genlerindeki Varyasyonların
Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), yetişkinlerde en sık görülen lösemi tipidir. KLL'nin nedeni hala tam olarak bilinmemektedir. *SF3B1* geninde p.K700E(rs559063155) varyasyonu ve *MYD88* geninde ki p.L265P(rs387907272) varyasyonu KLL hastalığının kötü seyri ile ilişkilidir. *SF3B1* ve *MYD88* genlerinin KLL riski ile genetik ilişkisini incelemek için 58 KLL hastası ve 100 sağlıklı kontrol ile Real Time-PCR çalışması yapıldı. Çalışmamızda sadece bir hastada *SF3B1* p.K700E varyasyonu gözlemlendi, *MYD88* p.L265P varyasyonu gözlenmemiş olup tüm hasta ve sağlıklı kontrollerde wild type olduğu saptandı. Çalışmamızın sonucu, KLL hastalarının sayısının az olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Yıl : 2019

Sayfa Sayısı : 56

Anahtar Kelimeler : MYD88, SF3B1, KLL, Real-Time (Gerçek Zamanlı) PCR

Master's Thesis

Investigation of SF3B1 and MYD88 Genes Variations in Chronic Lymphocytic Leukemia

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most frequent leukemia in adults. The causes of CLL is still clearly unknown. p.K700E(rs559063155) mutation in *SF3B1* gene and p.L265P(rs387907272) mutation in *MYD88* gene have been associated with poor prognosis in CLL. To refine the genetic association *SF3B1* and *MYD88* genes with CLL risk, we conducted Real Time-PCR of in CLL 58 cases and 100 controls. In our study, *SF3B1* p.K700E variation was observed in only one patient. No variation of *MYD88* p.L265P was observed and wild type was detected in all patient and healthy controls. The results of our study were not statistically significant because of the small number of patients with CLL.

Year : 2019

Number of Pages : 56

Keywords : MYD88, SF3B1, CLL, Real-Time PCR

TEŞEKKÜR

Bu proje Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından PO-078 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım, saygı değer hocam Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'a,

Öğrenciliğimden beri, her zaman benim eğitimime ve gelişimime çok önemli katkıda bulunan değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız saygı değer hocam Doç. Dr. Hakan GÜRKAN'a, Verilerin istatistiksel analizi, tez yazımında ki katkıları ve eğitimim boyunca bana destek olan değerli hocam Doç. Dr. Jülide TOZKIR'a,

Öğrenciliğim boyunca bana destek olan ve laboratuvarında kendimi geliştirmeme katkıda bulunan çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Emine İkbâl ATLI'ya, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım boyunca destek ve ilgisini benden esirgemeyen, Öğr. Gör. Engin ATLI'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Selma DEMİR'e,

Çalışma arkadaşlarım Bio. Elif TUNALI ÖZEN'e, Uzm. Bio. Çisem AKURUT MAİL'e ve Bio. Beril KARABACAK'a, ve tez çalışmamda bana yardımcı olan değerli arkadaşım Uzm. Bio. Damla EKER'e,

Ayrıca bu süreçte desteğini sürekli yanımda hissettiğim, varlıkları ile hayatı bana daha değerli kılan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Gözde CİMŞİT

Edirne, Şubat 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	iv
1.Giriş ve Amaç.....	1
2.Genel Bilgiler.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Hematolojik Kanserler.....	4
2.3. Hematolojik Kanserlerde Tanı Yöntemleri.....	6
2.4. KLL Epidemiyolojisi.....	10
2.5. KLL Etiyogenezi.....	11

2.6. KLL Tanı, Evre ve Prognozu.....	12
2.7. KLL Tedavi.....	16
2.8. KLL ve Genetik.....	18
2.8.1. SF3B1.....	20
2.8.2. MYD88.....	26
2.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-Polymerase Chain Reaction – RT-PCR).....	29
3. Materyal ve Yöntem.....	30
3.1. Hasta ve Kontrol Çalışma Grupları.....	30
3.2. DNA İzolasyonu.....	31
3.3. Real Time-PCR Yöntemi.....	31
3.4. İstatistiksel Analiz.....	33
4. Sonuçlar.....	34
5. Tartışma.....	39
Kaynaklar.....	44
Ek.....	55
Özgeçmiş.....	56

KISALTMALAR DİZİNİ

AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
B-2 M	: Beta-2 Mikroglobulin
CD	: Farklılaşma Kümeleri (Cluster of Diffentiation)
del	: Delesyon
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
Ig	: İmmünglobülin
IGHV	: İmmünglobülin ağır zincir değişken bölgesi
IL-1R	: İnterlökin-1 reseptör
IWCLL	:Kronik Lenfositik Lösemide Uluslararası Çalıştay (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia)
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi

MYD88 : Miyeloid farklılaşma primer cevap 88 (Myeloid differentiation primary response 88)

mm³ : milimetre küp

NCI-WG : “National Cancer Institute-sponsored Working Group”

NGS : Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing)

P : Kromozomun kısa kolu

RNA : Ribonükleik asit

RT – PCR :Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction)

SF3B1 : “Splicing Factor 3b, subunit 1”

SNP : Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

snRNP : Küçük nükleer ribonükleoprotein (Small nuclear Ribonucleoprotein)

TLR : Toll-benzeri (like) reseptör

q : Kromozomun uzun kolu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. KLL hastasına ait akım sitometrisi analiz görüntüsü.....	7
Şekil 2.2. KLL hastasına ait Karyotip Analizi [Erkek birey (46,XY)].....	9
Şekil 2.3. FISH Tekniği.....	9
Şekil 2.4. Splaysing Mekanizması.....	24
Şekil 2.5. TLR Sinyal Yolağı.....	28
Şekil 4.1. KLL hastalarının tanı sırasındaki yaşlarının histogram grafiği.....	35
Şekil 4.2. KLL hastalarının Rai evreleme sistemine göre yüzde dağılımı.....	36
Şekil 4.3. SF3B1 geni varyasyon analizi sonucu.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. KLL Tanı Kriterleri.....	13
Çizelge 2.2. KLL Rai Evreleme Sistemi.....	14
Çizelge 2.3. KLL Binet Evreleme Sistemi.....	14
Çizelge 2.4. KLL’de Prognoz Parametreleri.....	16
Çizelge 2.5. Kromozom Anomalilerinin Görülme Oranı.....	20
Çizelge 3.1. Real-Time PCR Bileşenlerinin Hacmi.....	33
Çizelge 3.2. Real-Time PCR Sıcaklık Koşulları.....	33
Çizelge 4.1. KLL hastaları ve Sağlıklı Kontrol grubu bireylerinin cinsiyete göre dağılımı.....	35
Çizelge 4.2. KLL hastalarının Rai evreleme sistemine göre sıklığı.....	36
Çizelge 4.3. SF3B1 ve MYD88 genlerinin genotiplendirmesi	38

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), olgun görünümlü CD5⁺ B lenfositlerin periferik kan, kemik iliği ve lenfoid organlarda birikimi ile karakterize hematolojik bir kanser türüdür (Kipps, 2017). KLL erişkinlerde en sık rastlanan lösemidir. Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde 3-5/100.000 insidans ile tüm lösemilerin %30'unu oluşturmaktadır (Shahjahani, 2015). Asya ve Pasifik Adalılarında ise daha nadir görülmektedir. Öyle ki bu ülkelerden batıya göç eden kişilerde dahi KLL hastalığı daha seyrek görülmektedir. Bu genetik faktörlerin KLL gelişimine katkıda bulunduğunu ve/veya KLL gelişimine genetik yatkınlığı ifade eder (Brown, 2008; Kipps, 2017). Bu nedenlerden ötürü çalışmamızda KLL hasta grubunu tercih ettik.

Tüm ekzom dizileme tekniği (whole exom sequencing) ile yapılan çalışmalarda KLL'nin yüksek derecede genetik değişkenlik özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda mRNA işlenmesinde görev alan *splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1)* ve inflamatuvar yollaklarda görev alan *myeloid differentiation primary response 88 (MYD88)* gibi çok sayıda tekrarlayan somatik mutasyonlar (varyasyonlar) olduğu tespit edilmiştir (Hallek, 2017; Kipps, 2017). KLL de *SF3B1* varyasyonları anormal RNA kırılması (splicing) ve değiştirilmiş DNA hasar yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (Raa vd., 2015). *SF3B1* varyasyonu bir çalışmada daha agresif hastalık seyri ve daha kısa sağ kalım süresi ile ilişkilendirilirken (Wan & Wu, 2013), başka bir çalışmada *SF3B1* varyasyonlarının

KLL hastaları üzerinde prognostik etkisinin az veya hiç olmadığı belirtilmektedir (Xia vd., 2014). *MYD88* varyasyonları KLL hastalarının %2-5'ini etkilemektedir. *MYD88* varyasyonları Nuclear factor kappa B (NF- κ B) yolağının aktivasyonuna neden olur ve böylece varyasyonlu KLL hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasına olanak sağlar (Alsagaby, Brennan & Pepper, 2016). Bir çalışmada *MYD88* gen varyasyonu bulunan KLL hastalarının daha genç bir popülasyonda görüldüğü, genel sağ kalımın varyasyon bulunmayanlara oranla daha iyi olduğu belirtilmiştir (Martinez-Trillos vd., 2014). Başka bir çalışmada *MYD88* gen varyasyonu bulunan hastaların varyasyon bulunmayan ve daha ileri klinik evrede bulunan hastalara göre daha genç yaşta tanı konulmasına rağmen bu iki grup arasında hastalığın ilerlemesi ve sağ kalım oranları bakımından herhangi bir fark gözlenmediği ifade edilmektedir (Puente vd., 2012). KLL hasta grupları için Mitsui ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *SF3B1* ve Martinez-Trillos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *MYD88* genlerinde ki varyasyonların prognostik öneme sahip olduğu belirtilirken (Martinez-Trillos vd., 2014; Mitsui vd., 2016), Xia ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada bu varyasyonların hastalığın prognozu ve genel sağ kalım süresi bakımından varyasyon bulunmayan olgulara oranla önemli bir fark gözlenmediği ifade edilmektedir (Xia vd., 2014). Bu nedenle çalışmamızda *SF3B1* ve *MYD88* genlerinde ki varyasyonların KLL hastalığının prognozu ve genel sağ kalım süresi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser tek başına bir hastalık değildir. Daha çok kitle veya tümör oluşumuna yol açtığı bilinen kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize edilen neoplazi durumudur. Neoplazinin kanser olabilmesi için malign özellik göstermesi gerekir. Başka bir deyişle hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyüp, komşu dokuları istila edebilmesi veya uzak ya da yakın diğer dokulara yayılabilme (metastaz) özelliğine sahip olması gerekmektedir. Tümörlerin her biri yerleşim yerine, doku tipine, histolojik yapısına ve malignensilerin derecelerine göre sınıflandırılır. Genel olarak kanserin üç tipi vardır. Bunlar kemik, kas ya da bağ doku gibi mezenşimal dokulardan kaynaklanan **sarkomalar**, barsak mukozası, bronşlar veya meme duktusları gibi epitelyal dokudan kaynaklanan **karsinomalar**, kemik iliği, lenfatik sistem ve periferik kan boyunca yayılan **lösemi** ve **lenfoma** gibi hematopoetik ve lenfoid malignitelerdir (Nusbaum, McInnes & Willard, 2005, s. 311).

2.2. Hematolojik Kanserler

Hematolojik maligniteler, kan, kemik iliği ve lenf düğümlerini etkileyen kanser türleridir. Bu dokular doğal olarak bağışıklık sistemi ile bağlantılı olduğundan, bu dokulardan birini etkileyen bir hastalık genellikle diğer dokuları da etkiler. Hematolojik maligniteler; akut ve kronik lösemi, lenfoma ve multiple miyeloma gibi hastalıkları içerir (Mirzaei vd., 2017). Lenfomalar malign lenfositlerin neden olduğu, lenf düğümlerinde ve diğer lenfoid dokularda biriken ve lenfadenopatinin karakteristik klinik özelliğine neden olan bir hastalık grubudur (Hoffbrand & Moss, 2016, s.206). Lenfomanın; Hodgkin lenfoma ve non-Hodgkin lenfoma olmak üzere başlıca iki alt formu vardır (Hoffbrand, 2016; Torkaman, Charkari & Aghaeipour, 2011). Bu iki grubun ayrımı temelde Hodgkin lenfomadaki Reed-Sternberg (RS) hücrelerinin varlığına dayanır (Hoffbrand, 2016). Lösemi en yaygın kanserlerden biridir. Lösemi özellikle kanın yapıldığı kemik iliğinde başlayan ciddi bir malignitedir, akut ve kronik olmak üzere iki gruba ayrılır (Torkaman, 2011).

Akut lösemi, olgunlaşmamış lenfoid veya miyeloid progenitör hücrelerin kontrolsüz genişlemesi ve farklılaşması ile karakterizedir. Akut lösemi, lösemik hücre popülasyonunun (blastların) kökenine ve morfolojisine bağlı olarak iki gruba ayrılır: temelde miyeloid öncül hücreden köken alan akut miyeloid lösemi (AML) ve lenfoblastik kökenli akut lenfoblastik lösemi (ALL) (Xu vd., 2014).

AML kemik iliğindeki agresif bir malignitedir ve erişkinlerde görülen en yaygın akut lösemi türüdür. Ancak tüm lösemilerin en düşük hayatta kalma oranına sahiptir. Genç yaşta ki hasta grubunda bu oranda dikkate değer bir gelişme olmasına rağmen daha yaşlı hasta grubunda ise çok daha kötüdür (Deschler & Lübbert, 2006; Jan & Majeti, 2013). Her yıl tanı konulan lösemilerin yaklaşık olarak %20'sini AML oluşturur. Çocukluk çağında daha az görülürken ergenlik döneminde ve erişkin dönemlerinde de AML oranı artmaya başlar. Gelişmiş ülkelerde AML lösemilerin %15'ini oluştururken, Türkiye ve diğer gelişmekte olan ülkelerde bu oran 1:1'dir (Anak & Uysalol, 2012).

ALL kemik iliğinin prekürsör lenfoblastlarındaki değişikliğe bağlı olarak ortaya çıkan ve nadir görülen bir hematolojik malignitedir. ALL, prekürsör lenfoblastların kemik iliğinde farklılaşmanın erken evresinde bloke edilmesi, hızla çoğalarak normal

hematopoetik hücrelerin yerini almasıyla gelişir. ALL yetişkin kanserlerinin %1'inden azını oluşturur, fakat çocukluk çağında görülen en yaygın malignitedir. (Katz, Chia, Schoonen & Kelsh, 2015). Amerika Birleşik Devletlerinde 0-15 yaş grubunda ALL görülme sıklığı 3-4/100.000'tür. Ülkemizde ise 14 yaşından küçük çocuklarda 41,4/1000000 sıklığında görüldüğü bildirilmektedir (Uzunhan & Karakaş, 2012).

Multiple miyelom, kemik iliği plazma hücrelerinin anormal çoğalması ve immünglobulin veya hafif zincir aşırı üretimi ile karakterize, uç organ hasarının kanıtı olan hematolojik bir hastalıktır. 1997'den önce, yeni teşhis edilen multiple miyelom hastalarının ortalama sağ kalım süresi yaklaşık 2,5 yıldır (Landgren & Morgan, 2013). Kronik lösemi, tüm dünyadaki vakaların %43'ünü oluşturur ve nadiren anormal, çoğunlukla olgunlaşmış kan hücrelerinin birikmesi ile karakterizedir (Elert, 2013).

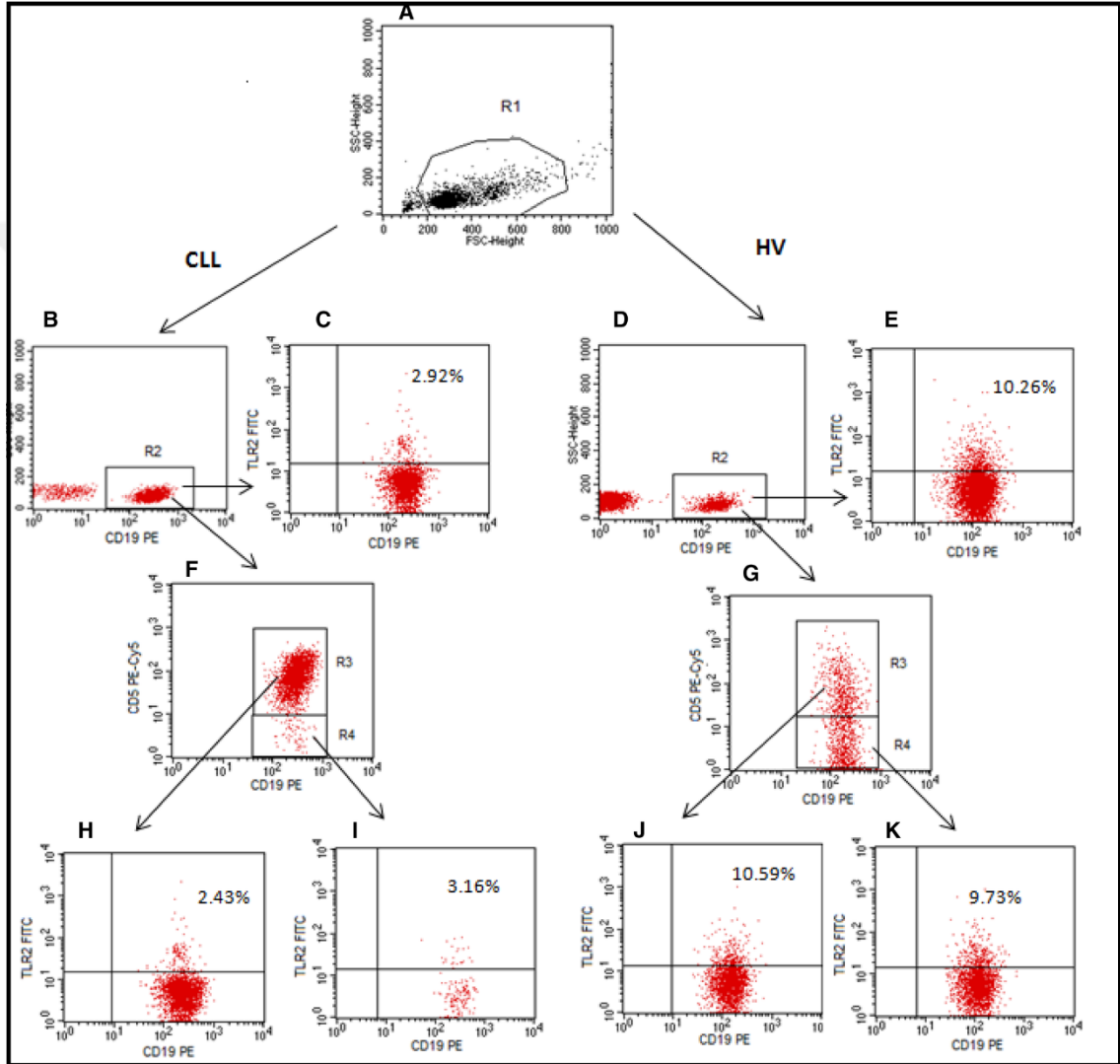
Kronik lösemiler temel olarak kronik miyeloid lösemi (KML) ve kronik lenfositik lösemi olmak üzere ikiye ayrılır. KML ve KLL batı dünyasında yetişkin bireylerde en yaygın görülen lösemi tipleridir (Payandeh, Sadeghi, Khodarahmi & Sadeghi, 2014). KML malign bir hematopoetik kök kücre hastalığıdır. Karşılıklı translokasyon t(9; 22) (q34; q11) (Philadelphia kromozomu) sonucunda BCR-ABL füzyonu onkogenine bağlı olarak ortaya çıkan miyeloid serinin sınırsız çoğalması ile karakterize edilen bir kök hücre bozukluğudur. Philadelphia kromozomu hastaların %90'ında görülmektedir ve KML için kesin bir tanı işareti olarak kabul edilir. (Kaleem, Shahab, Ahmed & Shamsi, 2015; Xu & Zhou, 2015). KLL, erişkinlerde ve Batılı ülkelerde en sık görülen lösemi türüdür ve bu popülasyon grubundaki tüm lösemilerin yaklaşık olarak %30'unu oluşturur. Ülkemizde KLL hastalığının insidansı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde KLL'nin yıllık insidansı 4.6/100.000 kişidir (Rodrigues vd., 2016; Shanshal & Haddad, 2012).

2.3. Hematolojik Kanserlerde Tanı Yöntemler

Hematolojik kanserlerin tanısında tam kan sayımı, periferik yayma, kemik iliği bulguları gibi tanı yöntemleri kullanılmaktadır (Torkaman, 2011). Bunların yanı sıra ilk defa 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization/WHO) tarafından tüm hematolojik maligniteleri immünofenotip, genetik anomaliler ve klinik özellikler açısından tanımlayan bir sınıflandırma sistemi oluşturulup yayınlanmıştır. Sonrasında bu sınıflandırma sistemi "Uluslararası Onkolojik Hastalıkların Sınıflandırma" sistemine dahil edilmiştir. WHO tarafından yapılan bu sınıflandırma sistemi 2008 ve 2016 yıllarında revize edilmiştir (Arber vd., 2016; Smith, Howell, Patmore, Jack & Roman, 2011). WHO sınıflandırmasında klinik özellikler, morfoloji, immünofenotip ve genetik verilerin tümü kullanıldığı için hastalığı tanımlamaya yönelik çok parametrelili bir yaklaşım benimsemiştir. Genetik veriler hastalığın teşhisi için hematolojik malignitelerin klinikopatolojik sınıflandırmasında; teşhis kriterleri, prognostik faktör, tahmini faktör ve hastalık tanımlayan lezyonlar gibi farklı seviyelere entegre edilmiştir (Arber vd., 2016).

İmmünofenotipleme, klinik örneklerde hücresel antijenleri tespit etmek için antikorların kullanıldığı yöntemdir. Hematolojik malignitelerin tanı ve sınıflandırmasında önemli rol oynar. İmmünofenotipleme, hastalık evreleme ve izlemede, genetik anomalilerin yerine geçebilecek belirteçleri tespit etmek, potansiyel immün terapötik hedefleri belirlemek ve prognostik tahmine yardımcı olmak için yaygın şekilde kullanılmaktadır. İmmüno floresan işaretleme, aynı anda birden fazla antijenin değerlendirilmesini ve bunların alt hücresel lokalizasyonunu belirlemeyi mümkün kılmıştır. Bu hematolojik malignitelerin analizi için akım sitometrisinin (flow cytometry) kullanılmasına yol açmıştır. Prensip olarak akım sitometrisi, hızla akan bir sıvının içinden geçen hücrelerin birden fazla özelliğini aynı anda ve tek hücre bazında ölçen bir tekniktir. Tipik olarak, hücreler floresanla konjüge edilmiş monoklonal antikorlarla etiketlenir. Hücreler lazer ışını boyunca geçtikçe florokrom etkinleştirme dalga boyunda aktive olur. Yayılan floresans cihazdaki çeşitli dedektörler tarafından ölçülür (Heel vd., 2013; Pati & Jain, 2013). Akım sitometrisi için küçük bir numune hacmi yeterlidir ve aynı anda birçok hücresel parametrenin değerlendirilmesine izin verir. Bu yolla hem yüzeysel hem de hücre içi antijenler değerlendirilebilir ve değerlendirme hem niceliksel hem de duyarlıdır. Bu teknik hematolojik malignitelerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında önemli rol

oynar. WHO tarafından yapılan sınıflandırma sisteminde akım sitometrisi tekniğinin kullanılması desteklenmektedir (Heel vd., 2013; Pati, 2013). KLL hastasının TLR2 ekspresyonu yapan B hücrelerinin tanımlanması amacıyla yapılmış bir akım sitometrisi analiz görüntüsü Şekil 2.1 de gösterilmektedir (Szymanska vd., 2018).



Şekil 2.1: KLL hastasının TLR2 ekspresyonu yapan B hücrelerinin tanımlanması amacıyla yapılmış bir akım sitometrisi analiz görüntüsü (Szymanska vd., 2018).

Hematolojik malignitelerde, klasik sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler teknikler gibi genetik tanı yöntemlerinin kullanılması hastalığın tanısı, alt tiplere sınıflandırılması ve tedavisi açısından çok önemlidir. (Arber vd., 2016; Macheta, Chocholska & Podhorecka, 2015). Konvansiyonel sitogenetik bir yöntem olan karyotip analizi ile moleküler sitogenetik bir yöntem olan floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği hematolojik maligniteleri olan hastaların tanısı, prognozu ve tedavisi için halen birlikte kullanılmaktadır (Simons vd., 2012; Sreekantaiah, 2007).

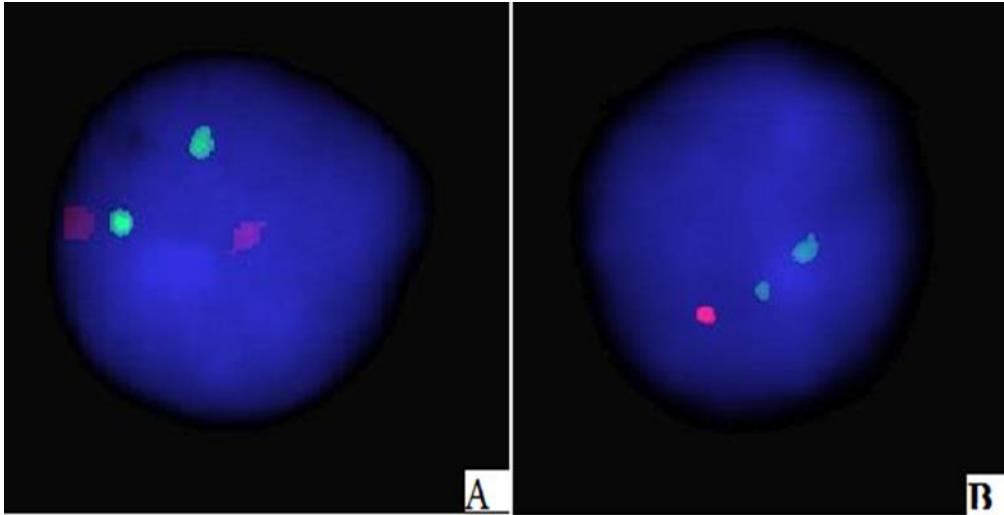
Sitogenetik lösemi ve lenfoma patogeneğinde yer alan genlerin tanımlanması, tekrarlayan kromozom anomalilerinin belirlenmesi, hastalığın tanısı ve klinik tedavisinde önemli rol alır (Kearney & Horsley, 2005; Sreekantaiah, 2007). Konvansiyonel sitogenetikte karyotip analizi, tek bir hücre seviyesinde sayısal ve yapısal anomalilerin tespit edilmesini sağlayan rutin bir işlemdir (Kolialexi, Tsangaris, Kitsiou, Kanavakis & Mavrou, 2005). Sitogenetik analizin doğruluğu, kültür metodolojisi ve bantlama teknikleriyle ilgili gelişmeler nedeniyle son 30 yılda önemli ölçüde iyileşmiştir (Kearney, 2005; Kolialexi, 2005). Yunis tarafından 1976'da tanıtılan yüksek çözünürlüklü kromozom analizi, profaz veya prometafazdaki bölünen hücrelerin senkronize edilmesini içerir ve çoklu bantlarla daha uzun kromozomlar oluşturulur. Bu çözünürlük sayesinde DNA'da 3-5 Mb'a kadar olan yapısal anomaliler tespit edilebilirken 3 Mb'dan küçük olanların tespit edilmesi zordur (Kolialexi, 2005). Karyotip analizinde, hastalığa bağlı olarak hücrelerin düşük *in vitro* mitotik aktivitesi, metafazların kalitesizliği ve kötü kromozom morfolojisi gibi nedenlerden ötürü her zaman istenilen sonuç elde edilemeyebilir (Kolialexi, 2005; Sreekantaiah, 2007). Şekil 2.2'de bir KLL hastasına ait normal bir karyotip analizi gösterilmektedir.

Karyotip analizinin aksine FISH analizi hem mitotik hem de interfaz hücrelerinde spesifik anomalilerin belirlenmesi ve daha fazla sayıda hücre analiz edilmesi nedeniyle hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (Kwon vd., 2010; Sreekantaiah, 2007). FISH tekniğinin en büyük avantajlarından biri bölünmeyen interfaz hücrelerinde dahi sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin tespit edilmesidir. FISH tekniğinde kromozom üzerindeki hedef bölgeye özgü probalar kullanılır. Prob, plazmidler ve kozmidler gibi çeşitli vektörlerle çoğaltılan insan DNA'larının florokrom boyalarla etiketlenmesi ile elde edilir. Probun, kromozoma özgü sentromerik probalar, tüm kromozom boyayan probalar (paint),

Lokus spesifik problar, telomerik ve subtelomerik problar gibi çeşitleri vardır (Kolialexi, 2005). Şekil 2.3'te normal sonuca sahip bir hematoloji hastası ile delesyon bulunduğu tespit edilen bir hematoloji hastasının FISH analizi görüntüleri gösterilmektedir.



Şekil 2.2: KLL hastasına ait Karyotip Analizi (Erkek birey (46,XY)). (Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarı).



Şekil 2.3: FISH tekniği A) p53 geninin normal olduğu bir örneğe ait FISH görüntüsü. B) p53 geninde delesyon bulunan bir örneğe ait FISH görüntüsü. (Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarı)

30 yılı aşkın bir süre önce elektroforeze dayalı DNA dizilimi kavramı tanıtıldı. Yıllar geçtikçe Sanger dizileme (Sanger sequencing) olarak bilinen bu teknik bugüne kadar DNA dizilimi için altın standart olarak kullanıldı. 2005 yılında, döngüsel dizi tabanlı yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing-NGS) tekniği geliştirilmiştir. NGS ile tek bir deneyde milyarlarca baz dizisi ile ilgili bilgi üretebildiği için genetik ve epigenetik araştırmalar için devrim niteliğinde bir gelişme olmuştur. NGS sadece genomik DNA'nın araştırılması ile sınırlı değildir. Aynı zamanda tüm transkriptomları [messenger RNA (mRNA), non-coding RNA (ncRNA), mikroRNA'lar] ve epigenomları (DNA metilasyonu, protein-RNA etkileşimi) incelemek için değerli bir araç haline gelmiştir (Chapman, Warren & Wu, 2012; Haas, Katus & Meder, 2011). Günümüze bu teknik kanser araştırmalarında özellikle hematolojik malignitelerin araştırmasında ön planda yerini almıştır.

2.4. KLL Epidemiyolojisi

KLL dünya çapında en yaygın görülen hematolojik malignitedir. KLL, kemik iliğinde lenfositlerden başlayan lösemi tipidir. Tüm lösemilerin yaklaşık olarak % 30'unu oluşturur (Mirzaei vd., 2017). Batı ülkelerinde KLL 4.2/100.000 kişi insidansı ile en sık rastlanan lösemi hastalığıdır. Hastalığın 80 yaşın üzerindeki bireylerde insidansı 30:100.000/yıl olarak görülür. Tanıda medyan yaş 72'dir. KLL hastalarının % 10'unun 55 yaşından küçük olduğu belirtilmiştir (Eichhorst vd., 2015).

Batı ülkelerinin aksine Asya ülkelerinde KLL hastalığı çok nadir olarak görülmektedir. Asyalı hastalar Avrupa kökenli KLL hastalarından farklı özelliklere sahiptir. Asyalı hastalar daha gençtir, atipik morfoloji ve immünolojik özelliklere sahiptir. Bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Büyük Britanya da yaşayan Hintliler, Pakistanlılar ve Bangladeşliler gibi güney Asyalılarda, 70 yaşındaki Avrupa kökenli vatandaşlara göre ortalama tanı yaşı 60 yaş ve üzeri olarak belirtilmektedir. Asyalı ve Avrupa kökenli KLL hastalarında cinsiyete göre insidans oranında erkek cinsiyetin daha baskın olması benzerdir. (Yang, Li, Gale & Huang, 2015). Amerika'da ki beyaz ırka göre Afrika kökenli Amerikalılarda ve Japonya da dahil olmak üzere Asya ülkelerinden Amerika'ya göç eden bireylerde KLL insidansının düşük olduğu belirtilmiştir (Gragert

vd., 2014; Kawamata vd., 2013). Bu durum hastalığın coğrafik bölgelerdeki farklılıktan değil de, hastalığın etnik kökenle ilgili olması olasılığını akıllara getirmektedir. Singapur'da Doğu (Çin), Güneydoğu (Malay) ve Güney Asya (Hint) gibi üç farklı etnik grubu içeren Asyalı hastalarla yapılan bir çalışmada KLL hastaları da dahil olmak üzere tüm lenfoid neoplazilerin insidansında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Malay'ların en yüksek insidansa sahip olduğu ve her üç grubun hastaları içinde erkeklerin kadınlara göre daha yüksek insidansa sahip olduğu belirtilmiştir (Lim vd., 2015).

2.5. KLL Etiyogenezi

KLL etiyojisi tam olarak bilinmeyen yaygın bir hastalıktır. KLL hastalığının gelişim riskini arttırabileceği düşünülen benzen, petrol, formaldehit gibi çeşitli kimyasallara maruz kalan kişilerle çalışmalar yapılmıştır. Benzene maruz kalan kişilerle yapılan çalışmalarda benzenin AML, Multiple Miyeloma gibi hastalıklar için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiş, fakat KLL için bu kimyasalın hastalık gelişimindeki etkisi tam olarak belirlenememiştir (Stenehjem vd., 2015). Benzenin yanı sıra petrol, formaldehit, dioksin, etilen oksit gibi çeşitli kimyasallarında KLL ile ilişkisi belirlenememiştir. Sonuç olarak kimyasalların KLL ile ilişkisi net değildir. KLL ve diğer lenfoid neoplazilerin gelişiminin altında yatan merkezi faktörün bağışıklık sistemindeki düzensizlikler olduğu düşünülmektedir (Blair, Purdue, Weisenburger & Baris, 2007).

Mesleki veya çevresel iyonizer radyasyona maruz kalma ile KLL arasında da belirgin bir ilişki bulunmamıştır (Linnet vd., 2005; Vrijheid vd., 2014). İyonizer radyasyona maruz kalmanın KLL dışındaki lösemi tipleri ile aralarında güçlü kanıtlar olduğu belirtilirken, KLL'nin iyonizer radyasyondan kaynaklanmadığı belirtilmektedir (Vrijheid vd., 2014). 1940'lı yılların sonuna doğru meydana gelen Hiroşima ve Nagazaki atom bombası saldırıları sonunda hayatta kalanlar arasında yapılan çalışmalarda AML, ALL, KML gibi lösemi tiplerinde artış gözlenirken KLL hastalığında bir artış gözlenmemiştir. Bu sonucun Japon popülasyonunda KLL olgularının az olmasından kaynaklanabileceği de belirtilmiştir. (Preston vd., 1994). Radyasyona maruziyetin lösemiler ile ilişkisini ortaya koyan bir başka olay da 26 Nisan 1986'da meydana gelen Çernobil nükleer reaktör kazasıdır. Bu kaza sonrasında Belarus, Ukrayna ve Rusya

Federasyonunda milyonlarca insan farklı doz oranlarında radyasyona maruz kalmıştır. Çernobil kazası sonrasında KLL dışındaki tüm lösemi hastalıklarının artışı bildirilmiş ve bu hastalıkların insidansında ki artışlar radyasyona maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir (Kesminiene vd., 2010). Bu bulgular toplamında KLL ile iyonizer radyasyona maruziyet arasında anlamlı bir ilişki bulunamamış, hastalığın patogenezinde genetik faktörlerin önemli olduğunu destekleyen görüş daha da kuvvetlenmiştir.

Apoptoz, gelişimin düzenlenmesi, homeostazinin korunması ve tümör oluşumunun önlenmesi için gerekli olan fizyolojik bir hücre intihar programıdır. Apoptotik programdan kaçınmak, kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden biridir ve tedavilere karşı klinik dirençte önemli bir mekanizmayı temsil eder. KLL, apoptozisin başlangıç evresinde intrinsik (mitokondriyal) yolda meydana gelen bir bozuklukla karakterizedir. Bu durum, KLL hücrelerinin apoptotik makinelerindeki kusurlar ve mikro çevrenin sağladığı aşırı sağ kalım sinyalleri gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır (Billard, 2013). KLL hücre proliferasyonunun artmasına karşılık, başarısız programlanmış hücre ölümünün neden olduğu bir neoplastik bozukluğu temsil eder (Kitada vd., 1998).

2.6. KLL Tanı, Evre ve Prognozu

KLL batı ülkelerinde en yaygın görülen lösemi tipidir. KLL tipik olarak yaşlı hastalarda ortaya çıkan ve oldukça değişken bir klinik seyir gösteren bir hastalıktır (Hallek, 2017). KLL hastalarında tanı koyarken Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından desteklenen Çalışma Grubu (National Cancer Institute–sponsored Working Group/NCI-WG) tanı kriterleri kullanılmaktadır. Tanı; kan sayımları, kan yaymaları ve B hücresi belirteçleriyle birlikte CD5 antijenini taşıyan bir klonal B hücresi popülasyonunun immünofenotiplendirmesi ile konur (Hallek, 2017; Hallek vd., 2008). KLL tanısı, periferik kanda en az üç ay boyunca 5000 ve üzerinde B lenfosit hücrelerinin varlığını gerektirir. Dolaşımdaki B lenfositlerinin klonalitesinin akım sitometrisi ile doğrulanması gerekir. Akım sitometrisinde hücreleri birbirinden ayırt etmek için kullanılan hücresel işaretler farklılaşma kümesi (cluster of differentiation-CD) ile ifade edilir. KLL hücreleri, CD19, CD20 ve CD23 gibi B hücresi yüzey antijenleriyle

birlikte, T hücresi gelişim antijenlerinden biri olan CD5'i birlikte eksprese eder. KLL de CD20 ve CD79b, yüzey immünglobulinlerinin (Ig) seviyeleri, normal B hücrelerinde bulunanlara göre karakteristik olarak düşüktür. KLL de her bir hücre klonu kappa veya lambda immünglobulin hafif zincirlerinin ekspresyonu ile sınırlıdır (Hallek, 2017; Hallek vd., 2008). KLL tanı kriterleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge2.1: KLL Tanı Kriterleri

Parametreler	Kriterler
B- Lenfosit	> 5000/mm ³ (en az 3 aydan beri)
İmmünfenotipleme	En az bir adet B hücre işareti (CD19, CD20, CD23), CD5 ⁺ ve yüzey Ig hafif zincir klonalitesi (kappa veya lambda)
Kemik iliğinde lenfositoz	≥ % 30
Atipik hücre oranı	< % 55

KLL hastalığının klinik evrelemesinde yaygın olarak kabul görmüş, Rai ve Binet olmak üzere iki temel sınıflandırma sistemi bulunmaktadır. Bu haliyle, her iki sistem de şimdi, farklı klinik sonuçlara sahip üç ana alt grubu tanımlamaktadır. Orijinal Rai sınıflandırma sistemi, prognostik grupların sayısını 5'ten 3'e düşürmek için değiştirilmiştir. Modifiye edilmiş Rai evrelemesinde; lenfadenomegalinin yaygın olup olmadığı, splenomegali ve hepatomegalinin varlığı, anemi ve trombositopeni'nin olup olmadığı gibi bulgular dikkate alınırken, Binet evreleme sisteminde; tutulum olan lenfoid alanların sayısı, hemoglobin ve trombosit değerleri dikkate alınmaktadır (Binet vd., 1981; Hallek, 2017; Hallek vd., 2008; Rai vd., 1975). Rai evrelendirme sisteminin kriterleri Çizelge 2.2'de, Binet evrelendirme sisteminin kriterleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.2: KLL Rai Evreleme Sistemi

Risk	Evre	Klinik Özellikler
Düşük	0	Lenfositoz ($> 5000/\text{mm}^3$)
Orta	1	Evre 0 + Lenfadenomegali
Orta	2	Evre 0-1 + Splenomegali ve/veya Hepatomegali
Yüksek	3	Evre 0-2 + Anemi ($\text{Hb} < 11\text{g/dl}$)
Yüksek	4	Evre 0-3 + Trombositopeni ($\text{Plt} < 100.000/\text{mm}^3$)

Çizelge 2.3: KLL Binet Evreleme Sistemi

Evre	Klinik Özellikler
A	$\text{Hb} \geq 10 \text{ g/dl}$, $\text{Plt} \geq 100.000/\text{mm}^3$, < 3 lenf düğüm bölgesinde tutulum
B	$\text{Hb} \geq 10 \text{ g/dl}$, $\text{Plt} \geq 100.000/\text{mm}^3$, ≥ 3 lenf düğüm bölgesinde tutulum
C	$\text{Hb} < 10 \text{ g/dl}$, $\text{Plt} < 100.000/\text{mm}^3$, tutulum olan bölge sayısının önemi yoktur.

KLL klinik olarak heterojen bir hastalıktır, çünkü bazı hastalarda klinik seyir hızla ilerlerken, diğerleri tedaviye ihtiyaç duymadan uzun bir süre hayatta kalmaktadırlar. Son yıllarda, erken hastalık dönemlerinden itibaren hastalık progresyonunu işaret edebilen KLL B hücrelerinin genetik, fenotipik veya moleküler özelliklerine dayanan birçok prognostik belirteç ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, belirli bir hastada sadece KLL'nin ilerleme derecesini ölçebilen klasik Binet veya Rai evreleme sisteminin yanında farklı belirteçlerde kullanılabilir (Chiorazzi, 2012; Ferrarini, Cutrona, Neri & Morabito, 2012).

Prognoz değerlendirmesinde klinik evre, periferik kanda lenfosit sayısı, periferik kandaki lenfosit morfolojisi, lenfosit sayısı ikiye katlanma süresi (LDT) gibi klasik prognostik belirteçler kullanılmaktadır. Bu klasik belirteçlerin yanı sıra laktat dehidrogenaz (LDH), beta-2 mikroglobulin (β -2 M), timidin kinaz (TK), immünglobülin ağır zincir değişken bölgesi (immunoglobulin heavy-chain variable-region/IGHV) gen

varyasyon durumu, CD38, T hücre reseptörü zeta zincir-ilişkili protein kinaz 70 (zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70/ZAP70), kromozomal translokasyonlar, FISH tekniği ile elde edilen sitogenetik bulguları gibi yeni biyolojik prognostik belirteçler dikkate alınmaktadır (Chiorazzi, 2012; Montserrat, 2006; Montserrat, 2002). Hastalığın prognozunu belirlemeye yardımcı olabilecek klasik ve yeni biyolojik prognostik belirteçler Çizelge 2.4'te gösterilmektedir.

IGHV gen varyasyon durumu KLL de önemli bir prognostik belirteçtir. Varyasyona uğrayan *IGHV* olguları, varyasyona uğramayan *IGHV* olgularına göre daha uzun sağ kalım gösterir (Tobin vd., 2003). B-KLL de hem ZAP-70 hem de CD38 ekspresyonları bağımsız birer prognostik belirteçlerdir. CD38 ekspresyonu *IGHV* varyasyon durumu için bir vekil belirteç olarak da önerilmektedir (Assem, Hamid, Kohla & Arsanyos, 2009). B-KLL de artmış CD38 ekspresyonu olumsuz bir prognostik faktör olarak önerilmektedir (Boonstra vd., 2006). KLL hücrelerinde ZAP-70 ekspresyonu KLL hastalarında kısa genel sağ kalımla ilişkilendirilmektedir (Dielschneider vd., 2014).

Çizelge 2.4: KLL de Prognoz Parametreleri

Parametre	İyi prognoz	Kötü prognoz
Cinsiyet	Kadın	Erkek
Binet Evresi	A	B ve C
Rai Evresi	0,1	2, 3, 4
Periferik kanda lenfosit sayısı	$< 50.000/ \text{mm}^3$	$> 50.000/ \text{mm}^3$
Kemik iliği tutulum şekli	Non-diffüz	Diffüz
Kemik iliğinde lenfosit oranı	$\leq \% 80$	> 80
LDT	≤ 12	> 12
LDH/ β -2 M	Normal	Artmış
Timidin kinaz ve sCD23	Normal	Artmış
Sitogenetik	N veya izole del 13q	Del 11q ve 17p, trisomi12
CD38	$\leq \% 30$	$> \% 30$
IGVH varyasyon durumu	Mutant	Non-mutant
P53 varyasyon durumu	Non-mutant	Mutant
Zap 70	Negatif	Pozitif

2.7. KLL Tedavi

KLL, monoklonal olgun B hücrelerinin birikmesiyle karakterize bir hastalık olduğundan, lösemi hücrelerinin dönüşümü, çok özel mikro-RNA genlerinin delesyonu ve B hücrelerinin apoptoza karşı direncinin artmasına neden olan genomik değişikliklerle başladığı düşünülmektedir (Messmer vd., 2015; Podhorecka vd., 2015). KLL'nin biyolojisi ve patogenezinin anlaşılmasındaki ilerleme, tedavi için birçok yeni potansiyel hedefi ortaya çıkarmıştır. Daha yüksek tedavi etkinliği için B hücre reseptör yolağı (BCR)

gibi sinyal yollarını ya da CD20 hedefleyen modifiye olmuş antikorlar gibi farklı yaklaşımlar oluşturulmuştur (Al-Sawaf, Fischer, Eichhorst & Hallek, 2016).

Kemoimmünterapi KLL hastaları için standart olarak birinci basamak tedavidir. Bunun yanı sıra KLL biyolojisinin anlaşılmasıyla CD20 monoklonal antikorları; Bruton tirozin kinaz (BTK), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) inhibitörleri ve Bcl-2 inhibitörlerini hedefleyen tedavi yöntemleri geliştirilmiştir (Al-Sawaf, 2016; Jain & O'Brien, 2015). CD20 esas olarak B lenfositlerin üzerinde eksprese edilen bir transmembran proteindir. CD20'nin doğal ligandı henüz bilinmemektedir ve fizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak B hücresi aktivasyonunun ve çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Rituksimab ve ofatumumab olmak üzere iki tip CD20 antikoru vardır (Al-Sawaf, 2016).

B hücre malignitelerinin çoğu için ve özellikle KLL de BCR, B hücrelerinin çoğalmasını, apoptozunu ve farklılaşmasını indükleyen ve destekleyen bir anahtar sağ kalım molekülüdür. BCR yolağının deregülasyonu KLL hücresi sağ kalımını ve klonal genişlemesini destekler, bu nedenle B hücreli malignitelerin gelişimi için kritiktir. BTK'nın kendisi, fosfolipaz Cgamma2 (PLCγ2) ve aktive B hücrelerinin NFκB gibi bir faktörler dizisini hedeflemektedir. İbrutinib, BTK'nın oral olarak satılan ilk küçük moleküllü inhibitörüdür (Al-Sawaf, 2016). İbrutinib, erken evreli çalışmalarda, kronik lenfositik lösemide yüksek yanıt oranları ve uzun süreli ilerleme olmayan sağ kalım göstermiştir (Byrd vd., 2015). İkinci nesil bir BTK inhibitörü olan Acalabrutinib, son zamanlarda klinik testlere girmiştir. Bu küçük molekül, BTK'nın Cys481 bölgesine kovalent olarak bağlanır. Bu ilaç İbrutinib'den daha yüksek hedef kapsamının yanı sıra gelişmiş bir seçiciliğe sahiptir. Böylece hedef dışı etkiler ve sonraki olumsuz olaylar önlenir (Al-Sawaf, 2016).

Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolu, çoğalma, hayatta kalma ve farklılaşma gibi hemen hemen tüm temel hücresel işlevlerde önemli bir rol oynar. CD19 aktivasyonu ile doğrudan bağlantılıdır. İdelalisib, birinci sınıf bir oral PI3K inhibitörüdür. İdelalisib *in vitro* B hücrelerinin apoptozunu indükleyen BCR sinyal yolunun aşağı doğru düzenlenmesine yol açar (Al-Sawaf, 2016). Bir başka umut verici ilaç, lösemik hücrelerde apoptozu indükleyen BCL-2 protein antagonistleridir (Podhorecka vd., 2015).

Hematolojide, özellikle KLL de apoptozun intrinsik yolunun karışıklığı, CD5⁺ ve CD19 lenfositlerinin birikmesine yol açan Bcl-2'nin yukarı regülasyonu yoluyla çok yaygındır (Al-Sawaf, 2016).

KLL de 40 yılı aşkın bir süredir, Fiziksel muayene ve kan sayımına dayanan Rai ve Binet klinik evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Son yıllarda KLL'nin genetik ve moleküler patogeneze dair öngörüler klinik evreleme sistemini tamamlayıcı prognostik bilgi sağlayan *IGHV* gen varyasyon durumu, sitegenetik, *TP53* (Tümör Protein 53-TP53), *NOTCH1* (Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1- *NOTCH1*), *SF3B1*, *BIRC3* (Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein 3) gen varyasyonları gibi yeni belirteçlerin tanımlanmasına yol açmıştır. Fakat günümüzde rutin klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmamaktadır. Avrupa ve ABD'de uluslararası bir araştırma grubu sekiz ayrı randomize çalışmadan elde edilen veriye göre, yaygın olarak bulunan klinik, biyolojik ve genetik parametreleri kullanan KLL uluslararası prognostik indeks (CLL International Prognostic Index /CLL-IPI) oluşturmuştur. CLL-IPI indeksi ile başlangıçta KLL hastalarının sağkalım sürelerinin öngörülmesi amaçlanmıştır. Fakat yeni tanı almış hastalarda ilk tedaviye başlama süresinin öngörüldüğü de belirtilmiştir (Molica vd., 2017).

2.8. KLL ve Genetik

KLL Batı dünyasında en sık görülen lösemi tipidir. KLL hastalığının nedeni uzun zamandır yapılan araştırmalara rağmen bulunamamıştır. Asyalılarda KLL hastalığının sıklığı; Kafkas, Avrupa ve Amerikalı bireylere göre daha düşüktür ve daha da önemlisi Amerika'ya göç edenlerde bile bu oranın korunması hastalığın çevresel faktörlerden ziyade genetik öneme sahip olduğunu vurgulamaktadır (Brown, 2008). İleri yaş, erkek cinsiyet, beyaz ırk ve KLL aile öyküsü veya diğer lenfoproliferatif bozukluklar KLL gelişimi için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (Coombs vd., 2012).

KLL hastalığının nedeni tam olarak bilinmemekle beraber aile öyküsü en iyi karakterize edilen risk faktörüdür (Brown, 2008; Coombs vd., 2012). KLL hastalarının %8-10'u aile öyküsüne sahiptir, bu da hastalığın kalıtsal yatkınlığa sahip olduğuna işaret

etmektedir. KLL hastalarının birinci dereceden akrabaları arasında hastalığın görülme riski daha yüksektir (Coombs vd., 2012). Sporadik olarak gelişen KLL olguları ve ailesel KLL olgularının karşılaştırıldığı bir çalışmada, ailesel olgularda kadın insidansının ve varyasyon geçirmiş *IGHV* geninin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Goldin, Slager & Caporaso, 2010). Ayrıca KLL hastalarının birinci derece akrabalarında %13-18'inde Monoklonal B hücreli lenfositoz (Monoclonal B-cell lymphocytosis-MBL) olduğu belirtilmektedir (Slager, Caporaso, Sanjose & Goldin, 2013). MBL'nin KLL için öncü bir lezyon olduğu ve KLL hastası olan ailelerde daha sık ortaya çıktığı belirtilmektedir (Goldin, 2010; Slager, 2013). Kromozom 16q24.1 lokusu üzerinde bulunan Interferon Düzenleyici Faktör 8 (Interferon regulatory factor 8-*IRF8*) geni ve İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen-HLA) genlerini barındıran kromozom 6p21.3 lokusunun, ailesel KLL'ye yatkınlık ile ilişkili olduğu tanımlanmıştır (Wiernik, 2015). KLL için kalıtsal riskin yaklaşık olarak %10'u; tek nükleotid polimorfizimlerine (single nucleotide polymorphisms-SNPs) dayandırılabilir (Coombs, 2012). Bu SNP'ler *genome wide association (GWA)* çalışmalarında tanımlanmış ve tek başına göreceli olarak küçük bir hastalık riski sunmaktadır. KLL GWA çalışmaları neredeyse tamamen beyaz ırk popülasyonlarında gerçekleştirildiği için, bu SNP'lerin diğer ırksal gruplardaki önemi belirsizdir (Coombs, 2012). NGS tekniğinin gelişimi ile birlikte KLL hastalığının moleküler temelini anlaşılmaya başlandı ve elde edilen bilgide de logaritmik bir artış sağlanmıştır. Bu teknik ile KLL patofizyolojisinde önemli rol oynayabileceği düşünülen yaygın olarak görülen yeni gen varyasyonları belirlenmiştir. KLL ile ilişkisi daha önceden tespit edilen *TP53* ve *ATM* gibi varyasyonların yanı sıra, KLL ile ilişkisi önceden bilinmeyen tekrarlayan somatik varyasyonlarda tespit edilmiştir. Bu somatik değişiklikler, DNA hasarı ve hücre döngüsünün kontrolü [*TP53*, *ATM*, *POT1* (Protection Of Telomeres 1-POT1), *BIRC3*], mRNA işlenmesi [*XPO1* (*Exportin 1-XPO1*), *SF3B1*], NOTCH sinyali (*NOTCH1*), enflamatuar yollar (*MYD88*) ve kromatin modifikasyonunu [*CHD2* (chromodomain helicase DNA binding protein 2-CHD2)] içeren birçok hücresel yolağın kritik bileşenidir (Gruber & Wu, 2015).

KLL de geleneksel sitogenetik yöntemlerin kullanımı, tekrarlayan ve prognostik öneme sahip genetik anomalilerin tespitinde büyük öneme sahiptir (Schweighofer vd., 2013). Kromozom anomalileri önemli prognostik belirteçlerdir. Döhner ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre KLL olgularında en sık görülen sitogenetik anomaliler; 6,

11, 12, 13, 14 ve 17. kromozomlarda bulunmaktadır (Döhner, 2000). Bu anomalilerin görülme oranı Çizelge 2.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.5: Kromozomal Anomalilerin Görülme Oranı

Anomali	Görülme oranı (%)
13q14	55
11q22-23	18
Trisomi 12	16
Del (17p)	7
Del (6q)	6
Trisomi 8q	5
Normal Karyotip	18
Trisomi 3q	3
t(14q32)	4

2.8.1. SF3B1 (Splicing Factor 3b Subunit 1)

SF3B1 gen varyasyonu *myelodysplastic syndrome (MDS)*, AML, KML gibi hematolojik malignitelerde ve uveal melonoma gibi solid tümörlerde de görülebilir (Alsafadi vd., 2016; Cazzola, Rossi & Malcovati, 2013). *MDS* de *SF3B1* varyasyonları genetik lezyonlar oluşturuyor gibi görünmektedir ve lösemik evrim riski düşüktür. *SF3B1* varyasyonları KLL'nin erken evrelerinde daha düşük bir insidansa sahiptir. İlerlemiş hastalıklarda daha yaygındır ve kötü prognozla ilişkili olma eğilimi gösterir. Bu da hastalığın klonal evrimi sırasında ortaya çıktığını göstermektedir (Cazzola, 2013).

Öncü haberci RNA (precursor messenger RNA - pre-mRNA), proteinler ile ilişkili küçük nükleer RNA'lardan (small nuclear RNAs - snRNAs) oluşan bir makromolekül olan splisozom (spliceosome) tarafından işlenir. *SF3B1* geni, splisozomun pre-mRNA'ya bağlanması için önemli olan splayising (splicing – kırılma) faktörü 3b'nin 1. alt birimini kodlar (Cazzola, 2013). *SF3B1*, 2q33.1 bölgesinde bulunur ve 27 ekzondan oluşmaktadır. Splayising faktörü 3b, splayising faktörü 3a ve bir 12S RNA birimi ile birlikte U2 küçük nükleer ribonükleoprotein kompleksini (U2 snRNP) oluşturur. U2 snRNP'yi pre-

mRNA'ya bağlayabilir. Splaysing faktörü 3b aynı zamanda minör U12 tipi splisozom'un da bir bileşenidir (SF3B1, 2019). *SF3B1* geninin varyasyona uğraması splaysing yolağında bozulmaya neden olduğu için hatalı protein oluşumuna yol açabilir.

Hücrede genetik bilgi akışı DNA, mRNA ve protein şeklinde olmaktadır (Briggs, Morgan, Sanderson, Schulting & Wieseman, 2016). Gen ifadesinin anormal düzenlenmesi kanser hücrelerinin bilinen bir özelliğidir, bu nedenle genetik bilgi akışının doğru bir şekilde ilerlemesi gen ifadesinin düzenlenmesi için önemlidir. Genetik bilginin DNA'dan mRNA'ya çevrilmesi için ilk olarak pre-mRNA'dan intronların uzaklaştırılması ve sonrasında ekzonların birleştirilmesi gerekmektedir. İtronların pre-mRNA'dan uzaklaştırılması ve ekzonların birleştirilmesi RNA splaysing mekanizması ile gerçekleşmektedir (Yoshimi & Abdel-Wahab, 2016).

RNA splaysing mekanizması gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik bir adımı temsil eder (Yoshimi, 2016). İtronların pre-mRNA'dan çıkarılması, ökaryotik gen ifadesinde önemli bir adımdır (Turunen, Niemela, Verma & Frilander, 2013). İtronlar; 5' *splice site* (5' SS; intronun 5' ucunda bulunur), 3' SS (3' SS; intronun 3' ucunda bulunur), dallanma noktası dizisi (branch point sequence – BPS; 3' SS upstream bölgesinde bulunur) ve polipirimidin yolu (polypyrimidine tract; 3' SS ile BPS arasında bulunur) olmak üzere dört ögeyi içerir. İtronların çoğunluğu için, 5' SS bir GU dinükleotit ile karakterize edilirken, 3' SS bir AG dinükleotidi içerir (Yoshimi, 2016). Belirli bir bölgede splaysing olasılığı çekirdek splisozomunun dışındaki proteinler tarafından etkilenir. Örneğin, serin/arginin (SR) protein ailesinin üyeleri genellikle, ekzonik ve intronik splaysing arttırıcıları olarak adlandırılan pre-mRNA'daki spesifik dizileri tanıyarak, splaysing işlemini destekler (Yoshimi, 2016).

Splaysing, RNA'dan intronların çıkarılıp ekzonların birleştirilmesidir. mRNA splaysing çekirdeğin içinde bulunan splisozom olarak bilinen enzimatik bir kompleks ile gerçekleştirilir (Yoshimi, 2016; Uçbirleştirme, 2019). Splisozom'un intronları tanınması ve ekzonlardan ayırt etmesi kritik bir öneme sahiptir (Yoshimi, 2016). U2 tip introna bağlı splisozom (majör-esas splisozom) ve U12 tip introna bağlı splisozom (minör-ikincil splisozom) olmak üzere iki tip splisozom kompleksi vardır. U12 tipi intronlar, U2 tipi intronlardan farklı küçük bir intron alt grubudur. U12 tipi intronlar çoğu ökaryotta

bulunur, ancak sadece belirli bir genomdaki tüm intronların %0.5'inden daha azını oluştururlar. U12 tipi intronlar, majör intronlardan biraz daha az etkin bir şekilde kırılır, bu nedenle bu tür intronları ihtiva eden genlerin ekspresyonunu sınırlandırdığına inanılır (Turunen, 2013). Majör splisozom kompleksleri 5' ucunda GU ile 3' ucunda AG dinükleotid'lerinin bulunduğu intronların kırılmasından sorumludur (Uçbirleştirme, 2019). Majör splisozom beş tane U2 tipi snRNP (U1, U2, U4, U5 ve U6) ve bunlara ek olarak non-snRNP'lerden oluşur (Turunen, 2013). Splaysing işleminin %99'undan fazlası majör splisozom kompleksi tarafından gerçekleştirilmekte olup bu işlem "Standart splaysing (Canonical splicing)" ya da "kement yolu (Lariat pathway)" olarak adlandırılmaktadır. Minör splisozom majör splisozoma çok benzer, ancak kırılma dizileri farklı olan ender intronları çıkartır (Uçbirleştirme, 2019). Minör splisozom kompleksi U11, U12, U4atac ve U6atac gibi dört tane spesifik snRNP'lerden oluşmaktadır. U5 snRNP her iki splisozomda da bulunmaktadır (Turunen, 2013).

Splisozomal splaysing mekanizması; sırasıyla snRNP'lerin belirli bir sıraya göre bir araya gelmesi ve ayrılmalarıyla gerçekleşmektedir. RNA splicing işleminin gerçekleşmesi için splisozom kompleksinin oluşması gerekmektedir. Splisozom kompleksi intronlarda bulunan 5' SS, 3' SS, BPS ve polipirimidin yolunu içeren dört element sayesinde intronları ekzonlardan ayırt eder (Yoshimi, 2016). Splisozomal splaysing iki aşamalı biyokimyasal bir süreçtir. Splaysing, ardışık iki transesterifikasyon aşamasından oluşur. Splisozomal splaysing snRNP'lerin belirli bir sıraya göre bir araya gelmesi ve birbirinden ayrılmaları ile gerçekleşir (Yoshimi, 2016; Uçbirleştirme, 2019).

Splaysing mekanizması şu şekilde gerçekleşmektedir:

1. U1 snRNP; 5' ucunu ve BPS'yi tanıyan diziler içerir. Bu nedenle ilk olarak U1 snRNP intronun 5' ucuna bağlanır.
2. Ardından SF3B1 U2 snRNP'ye bağlanır, U2 snRNP'nin BPS'ye bağlanmasını sağlar. U1 ve U2 snRNP'ler kompleks üzerinde ilk olarak bir araya gelen snRNP'lerdir.
3. Her ne kadar U4 ve U6 snRNP'lerin işlevleri bilinmese de ikisi bir araya gelerek çok kararlı bir kompleks oluşturur. Daha sonra bu kompleks U5 snRNP ile etkileşerek tek bir

kompleks halinde 5' ucu ile BPS arasına bağlanarak bir köprü oluşturur. U5 snRNP intronun iki yanında da bulunan ekzonların uçlarını birleştirir.

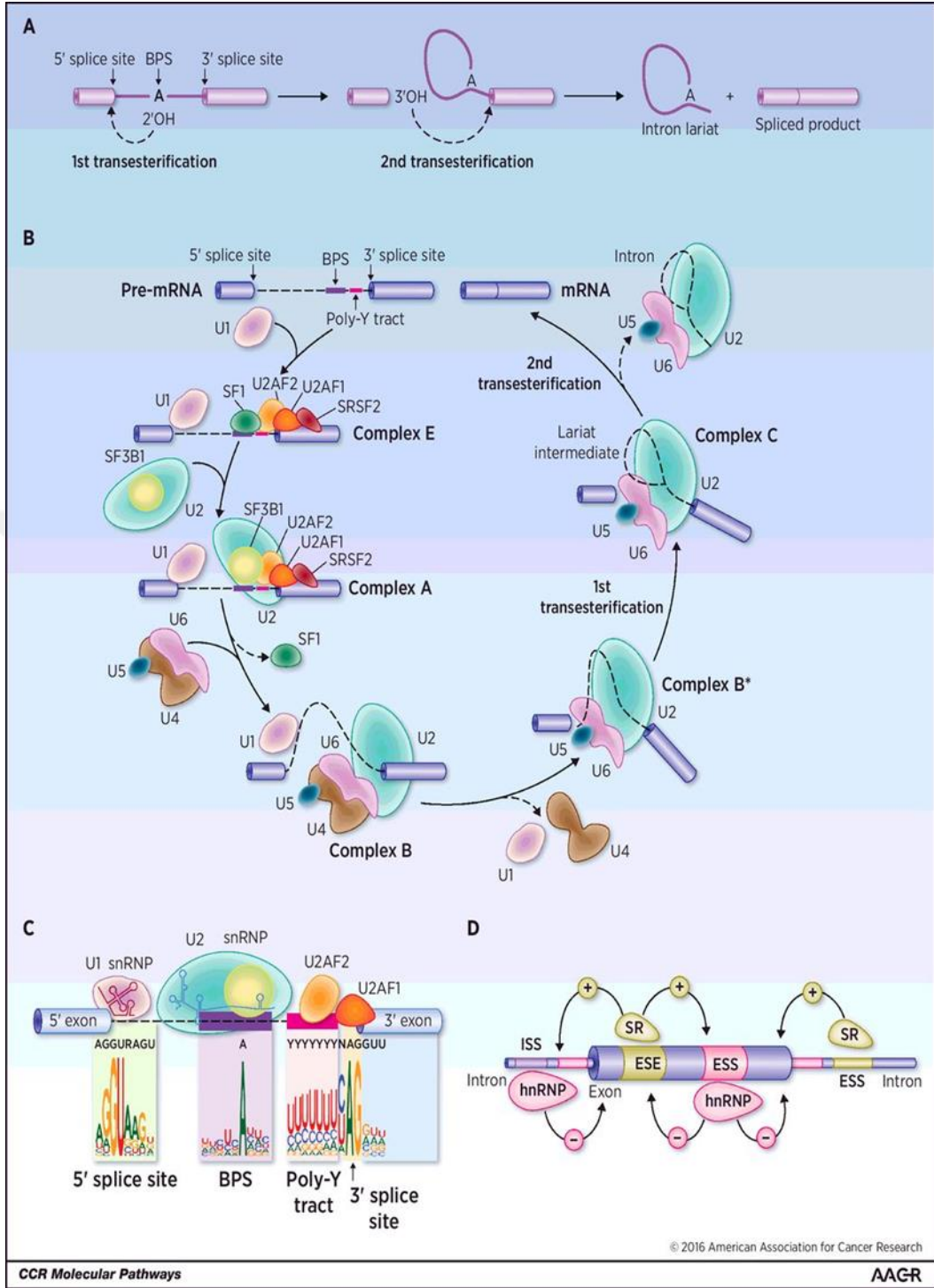
4. U4 snRNP fonksiyonel splisozomda bulunmadığı için, U1 snRNP ile birlikte splice oluşmadan serbest bırakılırlar.

5. Daha sonra BPS'de bulunan adenozinin 2'OH grubu intronun 5' ucunu keser.

6. Diğer taraftanda intronun yukarı tarafında bulunan ekzonun 3' ucunda bulunan 3'OH grubu intronun diğer ucunu keser.

7. Böylece kement şeklini alan intronik yapı çıkarılır, ekzonlar birleştirilir.

Bu işlemler sonucunda çıkarılan kement yapıdaki intronlar yıkıma uğrar, oluşan olgun mRNA transkripsiyon işlemi için hazır hale gelmiş olur (Björn, Soltyk, Beggs & Friesen, 1989; Yoshimi, 2016; Uçbirleştirme, 2019). Splisozomal splaysing mekanizması Şekil 2.4'te gösterilmektedir. SnRNP'lerin RNA'ya bağlanması tümleyici nükleotit dizileri arasında baz eşleşmeleriyle gerçekleşir. Örneğin, snRNA U1, intronun 5' tarafındaki ekzon-intron eklemünde bulunan konsensus dizisini tümleyici bir diziye sahiptir, bunun sayesinde RNA'nın o bölgesine bağlanabilir. Ayrıca farklı snRNA'ların birbirlerine bağlanmalarını sağlayan RNA-RNA birleşme yerleri de mevcuttur (Uçbirleştirme, 2019).



Şekil 2.4: Spleysing Mekanizması; Spleysing katalizi, splisozom montaj yolu ve Bağlantı yeri (Splice Site) seçim mekanizmaları (Yoshimi, 2016). A) Spleysing esnasında intron uzaklaştırılmasında önemli olan katalitik adımları temsil eden iki ardışık transesterifikasyon reaksiyonunun şeması. BPS'nin bir adenin nükleotidi ("değişmez adenin" olarak adlandırılır), ilk transesterifikasyonu aşamasını başlatır ve bir serbest 5'

ekzonu ve bir intron-3' ekzon kement oluşturur. 3' ucunun sonundaki hidroksil ekzonun serbest 5' ucuna daha sonra intron-3' ekzon birleşimine saldırır, splay tamamlanır ve bir kement RNA intronu salınır. **B)** Pre-mRNA splaying, birkaç farklı splisozomal kompleks içeren dinamik bir süreçtir. En erken E kompleksi i) U1 snRNP'nin 5' SS ucuna, ii) splaying faktör 1'in (SF1) BPS'ye, iii) U2AF2'nin (U2AF65 olarak da bilinir) polipirimidin yoluna ve iv) U2AF1'in (U2AF35 olarak da bilinir) 3' SS ucuna bağlanmasıyla oluşturulur. E kompleksinin oluşumu, U2 snRNP'nin BPS'ye alınmasını artırır ve A kompleksinin oluşumuna yol açar. U2 snRNP'nin bir bileşeni olan SF3B1, BPS'ye bağlanmaya dahil edilir. Önceden birleşmiş U4 / U6.U5 tri-snRNP komplekse katılır, ve U1 / U4 snRNP'leri katalitik olarak aktif B kompleksini (B kompleksi) oluşturmak üzere serbest bırakılır, ardından daha fazla konformasyonel yeniden düzenlemeler tarafından C kompleksinin oluşumu ile sonuçlanır. B ve C kompleksleri, sırasıyla birinci ve ikinci esterifikasyon reaksiyonlarını katalize eder ve intronun eksizyonuna ve olgun mRNA'yı sentezlemek için proksimal ve distal eksonun ligasyonuna aracılık eder. **C)** A Kompleks E üzerinde odaklanma, U1 ve U2 snRNP'lerin yanı sıra U2AF kompleksi tarafından tanınan konsensus dizisi unsurlarını vurgulamaktadır. Bir intron (i) 5' SS, (ii) 3' SS, (iii) BPS ve (iv) polypyrimidine (Poly-Y) yolu ile tanımlanır. Bir intronun tanımı, sırasıyla U1 ve U2 snRNP'leri tarafından 5' SS ve BPS'nin tanınmasına bağlıdır. Gösterilen DNA üzerinde kodlanmayan dizileri, intronların >% 95'ini işleyen (burada gösterilenlerden farklı olarak DNA üzerinde kodlanmayan dizileri tanıyan minör U12'ye bağımlı spliceozomun aksine) majör U2'ye bağımlı splisozom tarafından tanınanlardır. **D)** Çekirdek splisozom ve U2AF kompleksi tarafından tanımlanan mRNA'daki dizilere ek olarak, aksesuar splaying düzenleyici proteinler, *splice site* kullanımını desteklemek veya bastırmak için gereklidir. Serin / Arginin (SR) ailesinin üyeleri olan proteinler, pre-mRNA'da ekzonik ve intronik splaying arttırıcılar (ESE ve ISE) olarak adlandırılan spesifik sekansları tanıyarak alternatif splaying modelini kontrol eder. SR proteinleri, genellikle, ESE ve ISE ile etkileşime girerek, yakındaki splay yerlerinden splayingin arttırıcıları olarak hareket ederlerken, heterojen nükleer ribonükleoproteinler (hnRNP) ekzonik ve intronik splaying susturucuları (ESS ve ISS) ile etkileşime girerek splayingi bastırır.

Son zamanlarda yapılan tüm genom dizilimi ve tüm ekzon dizilimi çalışmalarıyla KLL olgularında yüksek sıklıkta tekrarlayan somatik varyasyonlar saptanmıştır. Bu çalışmalar sonucu en sık varyasyona uğradığı belirlenen genlerden biride *SF3B1* genidir. *SF3B1* proteini, splisozom makinesinin bir parçasıdır ve RNA splayingde önemli bir etkiye sahiptir. *SF3B1* geni KLL de sürücü genlere aday olarak gösterilmektedir. Saptanan varyasyonların büyük çoğunluğu 22 Huntington Uzama Faktörü 3 PR65/A TOR (Huntington Elongation Factor 3 PR65/A TOR - HEAT) tekrarlarını içeren yüksek ölçüde korunmuş C terminal alanında bulunmaktadır. *SF3B1* de 14. ile 16. ekzonlar arasındaki HEAT tekrarları arasında K700E (%50) en sık varyasyon geçiren bölgedir (Wan, 2013). Bu nokta aynı zamanda KLL de de en sık varyasyon geçiren bölgedir ve bu tezin çalışma konusudur.

Batı ülkelerinde yeni tanı konulan KLL hastalarının yaklaşık %5-18' inde *SF3B1* varyasyonu saptanmıştır. Wang ve arkadaşlarının (Wang vd., 2011) ve Jeromin ile arkadaşlarının (Jeromin vd., 2014) yapmış olduğu çalışmada *SF3B1* varyasyonunun KLL de kötü bir prognozla ilişkili olduğu belirtilirken, Xia ve arkadaşlarının KLL hastaları ile yapmış oldukları bir çalışmada *SF3B1* varyasyonunun sınırlı bir etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (Xia vd., 2014). Dünya Sağlık Örgütü tarafından *SF3B1* gen varyasyonunun olumsuz prognostik sonuçları olsa da güncel bir genetik risk profiline entegre edilebilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği belirtilmektedir (Arber vd., 2016).

2.8.2. MYD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88)

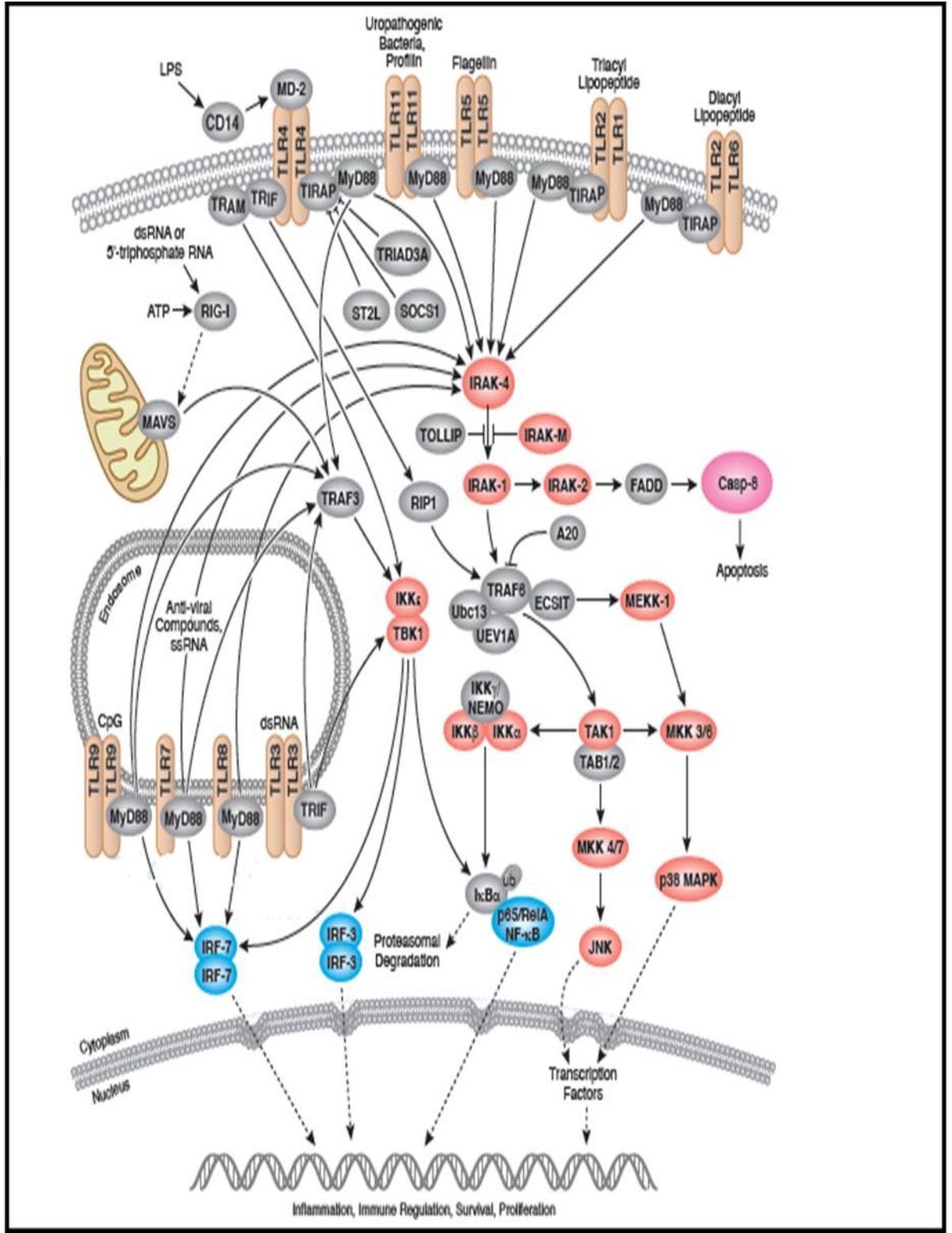
MYD88 geni; üçüncü kromozomun kısa kolu üzerinde 22. pozisyonda (3p22.2) bulunmaktadır. Bu gen, doğuştan gelen ve kazanılmış immün yanıtta merkezi bir rol oynayan bir sitosolik adaptör proteinini kodlar (Amaya-Chanaga & Rassenti, 2016). Bu protein, interleukin-1 (IL-1R1) ve TLR (Toll-benzeri reseptör/Toll-like receptor/TLR) sinyal yollarında önemli bir sinyal dönüştürücü olarak işlev görür (Amaya-Chanaga, 2016). TLR sinyal iletim yolağı Şekil 2.5'te gösterilmektedir. TLR3 haricinde tüm TLR'ler ve IL-1R'ler, *MYD88* adaptör molekülüne bağlı olan ortak bir sinyal yolunu paylaşırlar (Drexler, Kong, Wales & Foxwell, 2008).

MYD88 geni, N-terminal ölüm alanı (N-terminal death domain), bir bağlayıcı bölge ve sinyalleme aktivasyonu üzerine TLR'ler (Toll-benzeri reseptör/Toll-like receptors/TLRs) ile temasa geçebilen bir C-terminal Toll-interlökin1 reseptörü (Toll-interleukin1 receptor-TIR) alanından oluşan bir sitozolik adaptör proteinini kodlar (Rossi, Ciardullo, Spina & Gaidano, 2013).

MYD88, asıl olarak miyeloid farklılaşma sırasında oluşan bir proteindir. Ancak IL-1R'lere ve çoğu TLR'lere karboksil terminal TIR (Toll-interleukin1 receptor-TIR) alanı aracılığıyla dahil edilir. Ayrıca *MYD88* içerdği amino terminal ölüm alanı ile reseptör kompleksine IL-1R ile ilişkili kinaz (IL-1R associated kinase-IRAK) -1, IRAK4 ve TNF (tumour necrosis factor) reseptörü ile ilişkili faktör (TNF receptor associated factor -TRAF) 6'yı içeren aşağı yönlü (down stream) sinyal aracılarının alınmasından sorumludur. Bu mitojen aktive edici protein kinazların (mitogen activated protein kinases-MAPKs) yanı sıra NFκB'nin aktivasyonuna ve TNFα gibi inflamatuvar aracılardan transkripsiyonuna ve AU açısından zengin 3' ucunun translasyona uğramayan bölgesinde protein mRNA'lar aracılığıyla inflamatuvar yanıtın stabilizasyonuna yol açar (Drexler, 2008).

MYD88 geninde L265P varyasyonu, Waldenström Makroglobulinemisi (WM) (Poulain vd., 2012), Lenfoplazmositik Lenfoma (LPL), marjinal zon lenfoma (MZL) gibi (Beltran, Gale, Wilson, Foucar & Czuchlewski, 2015) B hücreli tümörlerde bulunmakla birlikte KLL de en yaygın varyasyon olup yaklaşık olarak %3 gibi düşük bir sıklıkta görülmektedir. *MYD88* L265P missense varyasyonu, B hücrelerinde TIR alanının evrimsel olarak korunan B-B döngüsünü ve NFκB sinyalinin kurucu aktivasyonu tarafından hücre sağ kalımını artırır (Rossi, 2013).

MYD88 varyasyonu, sitogenetik anomali olan 13q14, varyasyon geçirmiş IGHV geni (Rossi, 2013), düşük ZAP-70 ve CD38 ekspresyonu seviyeleri ve normal β-2 M seviyeleri ile ilişkilidir (Amaya-Chanaga, 2016). Klinik evrelerinden bağımsız olarak daha genç hastalarda (medyan yaşı 47 yıl) daha sık görülür (Amaya-Chanaga, 2016).



Şekil 2.5: TLR Sinyal Yolağı (Toll-like Receptors (TLRs) Interactive Pathway, 2019).

2.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-Polymerase Chain Reaction – RT-PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); *in vitro* ortamda DNA dizilerinin çoğaltılmasıdır. PCR tekniği, basit, hassas ve spesifik bir tekniktir (Mullis, 1990; Saiki vd., 1988). PCR tekniği temelde; DNA zincirlerinin açılması (denaturation-denatürasyon), primerlerin bağlanması (Annealing) ve primerlerin uzaması (Primer Extension) olmak üzere üç aşamadan oluşur (Mullis, 1990; Saiki vd., 1988). PCR, genomik dizilerin yüksek verimli bir şekilde klonlanması, mitokondriyal ve genomik DNA'ların doğrudan dizilenmesi ve viral patojenlerin saptanması için nükleotit dizi varyasyonlarının ve kromozomal yeniden düzenlemelerin incelenmesinde kullanılmıştır (Saiki vd., 1988).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-Polymerase Chain Reaction/RT-PCR) 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilmiş bir tekniktir (Valasek & Repa, 2005). RT - PCR metodu ilk kez Roche Moleküler sistemleri ve Chirona bağlı olarak çalışan Higuchi ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Valasek, 2005). Patojen saptama, gen ekspresyon analizi, SNP analizi, kromozom anormalliklerinin analizi ve son zamanlarda da gerçek zamanlı immün PCR ile protein tespiti RT-PCR'ın tipik kullanımları arasında yer alır (Kubista vd., 2006). RT-PCR, PCR tabanlı bir tekniktir (Jensen, 2012). Reaksiyon ilerledikçe "gerçek zaman" da çoğaltılan ürünün tespit edilmesi bu teknik için anahtar özelliktir (Jensen, 2012). Higuchi ilk çalışmasında etidyum bromür (EtBr) kullanmıştır (Higuchi, Dollinger, Walsh & Griffith, 1992). PCR'de etidyum bromür (EtBr) olarak adlandırılan ortak bir floresan boya dahil edilerek, EtBr'nin floresansına neden olan ultraviyole ışık altında reaksiyonu yürütürken bir video kamera ile DNA'nın birikimi görüntülenebilir ve kaydedilebilir (Jensen, 2012). RT-PCR de EtBr ve Syber green I gibi DNA bağlayıcı problemlerin yanı sıra hidroliz problemleri (5'-nükleaz problemleri), hibridizasyon problemleri ve "molecular beacon" gibi çeşitli floresan işaretli problemler kullanılmaktadır. Her prob türünün kendine özgü özellikleri vardır, ancak her birinin stratejisi basittir. DNA'nın amplifikasyonu için floresandaki bir değişikliği bağlamalıdır (Valasek, 2005).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Çalışma Grupları

Kronik Lenfositik Lösemi hastalarında *SF3B1* ve *MYD88* gen varyasyonlarının araştırılması için planlanan çalışmamızın uygulaması için Trakya Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan onay alındı (Ek de). Çalışmaya 2000–2017 yıllarında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Polikliniğinde tanı koyulan, takibi yapılan, Trakya Bölgesinde ikamet eden ve çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden 28 erkek ve 30 kadın olmak üzere 58 hasta dahil edildi. Sağlıklı kontrol grubu için çalışmaya Trakya bölgesinde ikamet eden, 55 yaş ve üzeri olan, çalışmamıza gönüllü katılmayı kabul eden, herhangi bir hastalığı bulunmayan 50 kadın ve 50 erkek olmak üzere 100 sağlıklı birey dahil edildi. Tüm hasta ve sağlıklı kontrol grubu bireyleri çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra onam formları imzalatılarak çalışmada kullanılmak üzere periferik kan örnekleri mor kapaklı EDTA'lı tüplere alındı. Çalışma finansal bakımdan, TÜBAP (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi) tarafından 2016-289 numaralı proje çalışması kapsamında desteklendi.

3.2. DNA İzolasyonu

Hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki her bir bireyden 2 ml olacak şekilde, EDTA'lı mor kapaklı 1 tüp periferik kan örneği alındı. DNA izolasyonu bu periferik kan örneklerinde EZ1 DNA Blood 200 µl Kit izolasyon kitleri (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak, EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hilden, Almanya) nükleik asit izolasyon cihazında, son DNA hacmi 100 µl olacak şekilde yapıldı. DNA örneklerinin konsantrasyon (20-60 ng/µl) ve saflık değerleri (1.8-2.0 ng) NanoDrop cihazında ölçüldü [Nanodrop 2000C, Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri]. Konsantrasyon ve saflık kontrolünden geçen DNA'lar bir sonraki deneysel aşamalarda çalışılmak üzere -20°C de saklandı.

3.3. Real Time-PCR Yöntemi

Hasta ve kontrol gruplarından alınan periferik kandan DNA izolasyonları tamamlandıktan sonra, Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay kiti kullanılarak, RT-PCR işlemiyle *SF3B1* geni p.K700E ve *MYD88* geni p.L265P SNP'lerinin (Single Nucleotide Polymorphism) allelik tanımlamaları yapıldı. *SF3B1* geni p.K700E (rs559063155) ve *MYD88* geni p.L265P (rs387907272) bölgelerindeki varyasyonları saptamak için özgün primerler Thermo Fisher firmasına sentezletildi. Hasta ve sağlıklı kontrol grupları için reaksiyon hacimleri üretici firmanın önerdiği protokole göre belirlendi. Çalışma 7500 Fast Real-Time PCR System cihazında yapıldı.

Real – Time PCR metodu;

1. Dondurulmuş Custom TaqMan® assays + 4 °C de çözündürüldü, sonra kısa bir süre vortekslendi. Ardından kısa bir süre santrifüj edildi. Böylece tüpün içindeki prob sıvısının tüpün alt kısmında kalması ve varsa hava kabarcıklarının yok edilmesi sağlandı.
2. PCR için belirtilen reaksiyon hacmi aşağıdaki a ve b maddeleri dikkate alınarak uygulandı.
 - a. Öncelikle tek bir örnek için gerekli karışımın hacmi belirlendi,

- b. Daha sonra örnek başına belirlenen karışım hacmi ile deney için planlanan örnek sayısı çarpılarak reaksiyon için gerekli toplam hacim belirlendi. Çizelge 3.1’de verilen şablon kullanıldı.
3. Çalışmada bir reaksiyon için gerekli olan hacim 10 µL olarak belirlendi.
 - a. Her iki gen içinde; hasta ve kontrol gruplarının sayısının toplamından 10 reaksiyon hacmi fazla olacak şekilde total sayı saptandı.
 - b. Genomik DNA miktarı haricinde bir reaksiyon için gerekli olan karışım hacmi total sayı ile çarpılıp, toplam karışım hacminin miktarı belirlendi.
4. İlk olarak *SF3B1* geni için genomik DNA haricindeki belirlediğimiz reaksiyon hacmi için floresan ışık olmadan güvenlik kabini içerisinde “TaqMan® Universal Master Mix II, TaqMan® genotyping assay Mix (40X) ve DNase-free water” belirlenen miktarlarda bir eppendorf tüpü içerisine eklenerek karışım hazırlandı. Daha sonra karışım kullanılacağı zamana kadar eppendorf tüpler alüminyum folyo ile kaplandı ve +4°C de bekletildi.
5. Daha sonra bu işlem *MYD88* geni için aynı şekilde uygulandı.
6. PCR için 96 kuyulu plaklar kullanıldı. Hasta ve sağlıklı kontrol grubu birey sayısı dikkate alınarak her iki gen içinde gerekli olan plak sayısı belirlendi.
7. İlk olarak *SF3B1* geni için hazırladığımız karışımdan plaklardaki her bir kuyuya 9 µL karışım eklendi.
8. Sonrasında plaklardaki kuyulara önceden belirlediğimiz plana göre genomik DNA örnekleri eklendi ve plakların üzeri AB Applied Biosystems MicroAmp™ Optical Adhesive film ile kapatıldı ardından bir süre özel plak adaptörü üzerinde santrifüj edildi, böylece kuyulardaki karışımın aşağıda toplanması sağlandı ve eğer varsa hava kabarcıkları yok edildi.
9. *MYD88* geni için hazırladığımız karışımdan plaklardaki her bir kuyuya 9 µL karışım eklendi.
10. Daha sonra plaklardaki kuyulara önceden belirlediğimiz plana göre genomik DNA örnekleri eklendi ve plakların üzeri AB Applied Biosystems MicroAmp™ Optical Adhesive film ile kapatıldı ardından bir süre özel plak adaptörü üzerinde santrifüj edildi, böylece kuyulardaki karışımın aşağıda toplanması sağlandı ve eğer varsa hava kabarcıkları yok edildi.

11. Her iki gen içinde hazırlanan plaklar sırasıyla 7500 Fast Real-Time PCR System cihazına yerleştirildi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu Çizelge 3.2 de belirtilen sıcaklık koşullarında gerçekleştirildi.
12. PCR amplifikasyonu tamamlandıktan sonra elde edilen veriler 7500 Fast Real-Time PCR System cihazının yazılımında değerlendirilmesi yapıldı.

Çizelge 3.1. Real-Time PCR Bileşenlerinin Hacmi

PCR reaksiyon karışımı bileşeni	Reaksiyon başına hacim (μL) 20-μL	Son reaksiyon hacmi (μL) 10-MI
“TaqMan® Universal Master Mix II”	10	5
“TaqMan® genotyping assay Mix(40X)”	0.5	0.25
cDNA/ DNA	1	1
“DNase- free water”	8.5	3.75

Çizelge 3.2. Real-Time PCR Sıcaklık Koşulları

Enzim Aktivasyonu	1 x Döngü	60°C’de 1 dk
İlk Denatürasyon	1 x Döngü	95°C’de 10 dk
Denatürasyon	40 x Döngü	92°C’de 15 sn
Uzama		60°C’de 1 dk
Veri Toplama	1 x Döngü	60oC’de 1 dk

3.4. İstatistiksel Analiz

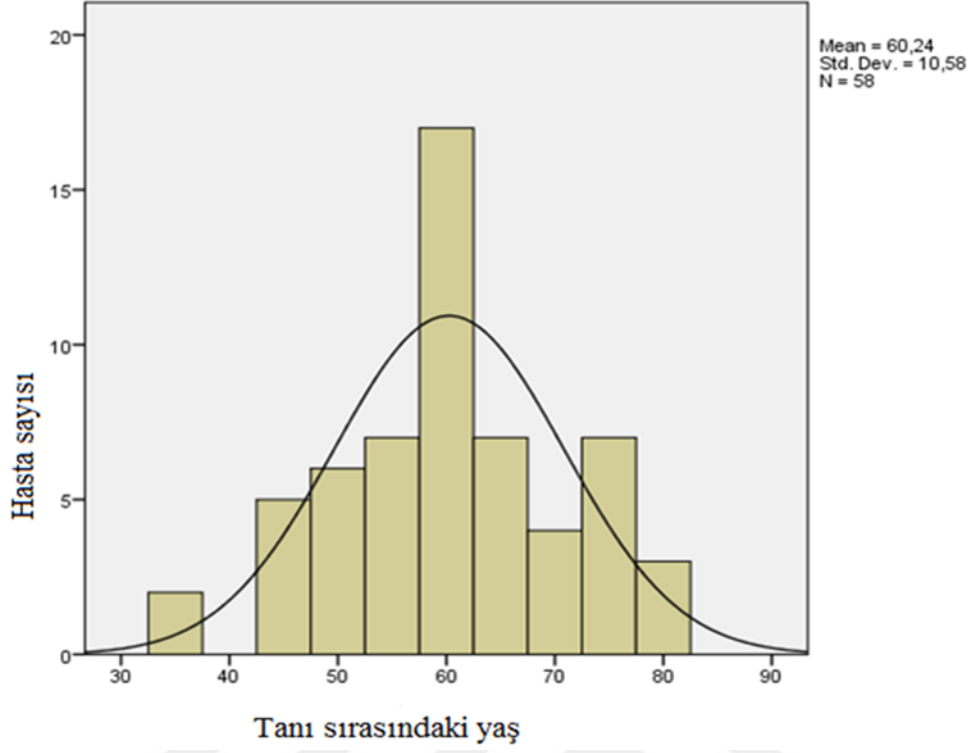
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 24.0 (Statistical Package Social Science) programında bilgisayar ortamında yapıldı. Kategorik değişkenlerin (*SF3B1*, *MYD88*) analizi için Ki kare (Chi-Square) testi yapıldı.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Çalışmaya 2000–2017 yıllarında tanı koyulan ve takibi yapılan 58 hasta ile gönüllü olarak 100 sağlıklı erişkin birey alındı. Çalışmamıza gönüllü katılan KLL hastalarının ortalama yaşı 64 (35-81) ve sağlıklı kontrol grubu bireylerinin ortalama yaşı 63 (55-82) olarak bulundu. KLL hastalarının tanı sırasındaki yaş ortalaması 60 (35-81) olarak bulundu. (Şekil 4.1’de KLL hastalarının tanı sırasındaki yaşları histogram grafiği ile gösterilmektedir). Çalışmamızdaki KLL hastaları ile sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete göre dağılımı Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çalışmamızdaki KLL hastalarının hastalık evresi Hematoloji Bilim Dalı polikliniği tarafından Rai evreleme sistemine göre yapılmıştır. KLL hastalarının Rai evreleme sistemine göre sıklığı Çizelge 4.2’de gösterilmektedir. Modifiye Rai evreleme sistemine göre; evre 0 olan 8 hasta (%13,8) düşük risk grubunda, evre I ve II olan 37 hasta (%63,8) orta risk grubunda, evre III ve IV olan 13 hasta (%22,4) yüksek risk grubundaydı. KLL hastalarının Rai evreleme sistemine göre yüzde dağılımı Şekil 4.2’de gösterilmektedir.



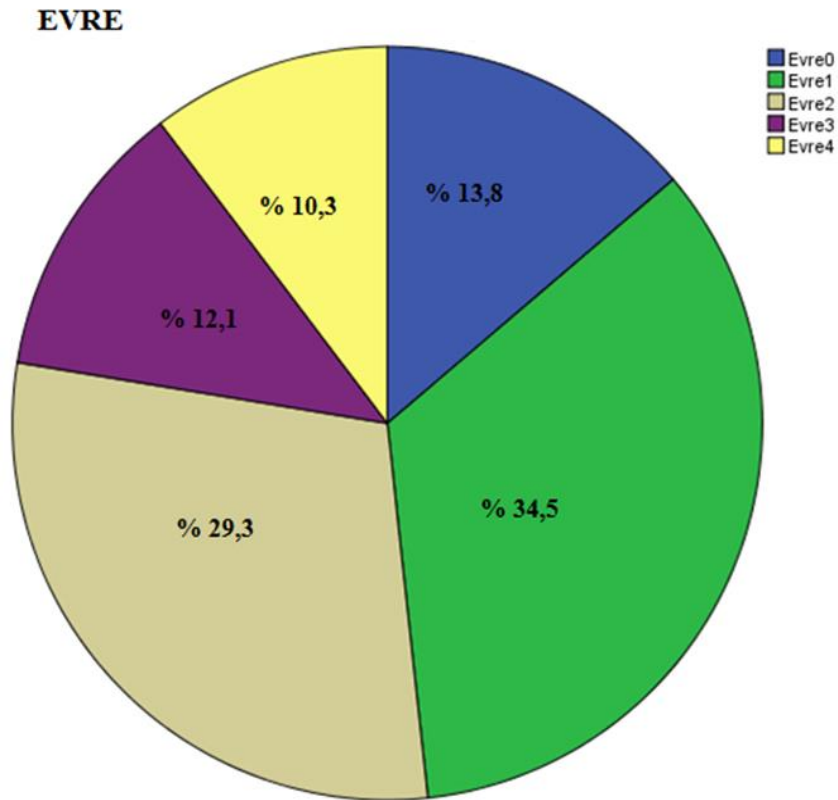
Şekil 4.1. KLL hastalarının tanı sırasındaki yaşlarının histogram grafiği

Çizelge 4.1. KLL hastaları ve Sağlıklı kontrol grubu bireylerinin cinsiyete göre dağılımı

	Cinsiyet	Sayı	%
Hasta	Kadın	28	48,3
	Erkek	30	51,7
Sağlıklı Kontrol grubu	Kadın	50	50
	Erkek	50	50

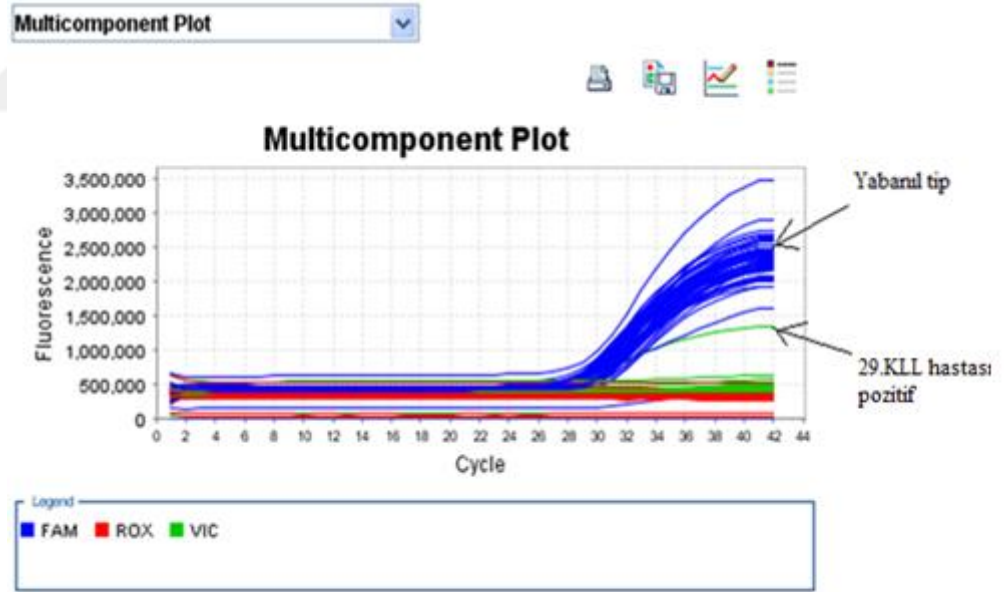
Çizelge 4.2. KLL hastalarının Rai evreleme sistemine göre sıklığı

Evre	N	%
Evre 0	8	13,8
Evre I	20	34,5
Evre II	17	29,3
Evre III	7	12,1
Evre IV	6	10,3
Toplam	58	100



Şekil 4.2. KLL hastalarının Rai evreleme sistemine göre yüzde dağılımı

Çalışmaya alınan 58 KLL'li hasta ile 100 sağlıklı kontrol grubu bireyleri arasında *SF3B1* ve *MYD88* genlerinin SNP genotiplendirme analizleri yapıldı. Çalışmamızda *SF3B1* geni p.K700E varyasyonuna bakıldı. *SF3B1* geni 58 hastanın 57'sinde yabancı-Wild tip (normal) olarak tespit edildi. KLL hastalarının sadece birinde *SF3B1* geninde 700. pozisyonda adenin (A) bazının guanin (G) bazına değiştiği belirlendi. Bu değişiklik 15. ekzona denk gelmekte ve lizin (K) amino asidinden glutamat (E) amino asidine dönüşmesine neden olan bir varyasyondur. Daha önce KLL hastalarıyla yapılan farklı çalışmalarda da tespit edilmiştir. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak değerlendirildi. *SF3B1* geninin sağlıklı kontrol grubu bireylerinin tamamında yabancı tip olduğu belirlendi. Çalışma sonucunda KLL hastalarında *SF3B1* geni için elde edilen pozitif varyasyon durumu şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3. *SF3B1* geni varyasyon analizi sonucu. Çalışmada yabancı tip olan adenin (A) bazı FAM olarak işaretlendi ve mavi renkte boyandı. Adenin bazının değiştiği guanin (G) bazı VIC olarak işaretlendi ve yeşil renk olarak boyandı ve pozitif varyasyon durumunu göstermektedir.

Çalışmamızda KLL hastaları ve sağlıklı kontrol grubu bireyleri için *MYD88* geni p.L265P SNP analizi yapıldı. Çalışmaya alınan 58 hasta ve sağlıklı kontrol grubu bireylerinde *MYD88* geni için yapılan SNP tanımlama analizi sonucunda tüm hasta ve sağlıklı bireylerin yabanıl tip (normal) allele sahip olduğu tespit edildi. KLL hastaları ve sağlıklı kontrol grubu bireylerinin *SF3B1* ve *MYD88* genlerinin SNP analiz sonucuna göre genotiplendirmesi Çizelge 4.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. *SF3B1* ve *MYD88* genlerinin genotiplendirmesi

Gen	Allel tipi	Genotipi	Hasta (58)	Sağlıklı Kontrol grubu (100)
SF3B1 (p.K700E)	Yabanıl tip	AAA	57	100
	Varyasyonlu	G AA	1	0
MYD88 (p.L265P)	Yabanıl tip	CTG	58	100
	Varyasyonlu	CC G	0	0

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

B hücreli KLL hastalığı Batı ülkelerinde ve 50 yaş üzerindeki bireylerde en sık görülen lösemi tipidir. Hastalık, olgun görünümlü monoklonal B hücrelerinin periferik kan, kemik iliği ve lenfoid organlarda birikimi ile karakterizedir (Vicente, Diaz & Rivas, 2013). Aynı zamanda KLL hastalığı B-KLL hücrelerinin aşırı miktarda çoğalmasından değil de G0/G1 evresindeki apoptoz mekanizmasının durması sonucu hücrelerin birikimiyle karakterize edilmektedir (Kitada vd., 1998). Klinik heterojenlik, KLL'nin belirleyici özelliği olup, bazı hastalar tedaviye ihtiyaç duymadan on yıllarca hayatta kalırken, diğerleri ise tedavi edilmediği takdirde erken ilerleme ve kısa bir genel sağ kalım gösterirler (Bagacean vd., 2017). KLL'nin klinik seyri geniş çapta değiştiğinden, sağ kalım durumunu tahmin etmek için hastaları farklı risk gruplarına ayırmayı sağlayan evreleme sistemleri geliştirilmiştir. Evrelemede yaygın olarak Rai ve Binet evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Her iki sistem klinik muayene ve standart laboratuvar testleri ile elde edilen parametrelerden oluşur ve bu nedenle elde edilmesi kolaydır (Clanahan & Dreger, 2011).

KLL'nin etiyolojisi hala bilinmemektedir. KLL hastalığının etiyolojisi için yapılan araştırmalarda kimyasallara ve radyasyona maruz kalma, çevresel faktörlerin KLL ile ilişkisi tam olarak belirlenememiştir (Blair, 2007). Doğu kökenli bireylerde düşük KLL sıklığı ve aile üyelerinde diğer olgun B hücreli neoplazilerden daha yüksek insidansa

sahip olması (%5-10) genetik faktörün önemini yansıtmaktadır (Rodrigues vd., 2016). KLL hastalığının prognozu için klinik evreleme, ZAP-70 ekspresyonu, CD38 ekspresyonu, *IGHV* ve *TP53* genlerinin varyasyon durumu ve sitogenetik anomaliler önem arz etmektedir (Montserrat, 2006). Son yıllarda NGS tekniğinin gelişimiyle yapılan çalışmalarda *SF3B1* ve *MYD88* genleri KLL de en sık tekrar eden somatik varyasyonlar arasında gösterilmektedir (Guieze vd., 2015).

2011 yılında 91 KLL hastasıyla yapılan bir çalışmada *SF3B1* ve *MYD88* genlerinin yüksek sıklıkta varyasyon geçirdiği, tüm *SF3B1* varyasyonlarının del (11q) olan hastalarda, tüm *MYD88* varyasyonlarının ise del (13q) ve varyasyon geçirmiş *IGHV* geninin olduğu hastalarda gördüklerini belirtmişlerdir. Aynı zamanda *SF3B1* geninde varyasyon olan tümör örneklerinde pre-mRNA splayling mekanizmasında değişiklikler olduğunu keşfetmiş ve kötü prognozla ilişkilendirilen hastalarda görülmüştür (Wang vd., 2011). Jeromin ve arkadaşlarının, tedavi başlanmamış 1160 KLL hastasıyla yaptıkları çalışmada *SF3B1* K700E varyasyonu ile *MYD88* L265P varyasyonunun KLL hastalarında yüksek sıklıkta görüldüğü belirtilmektedir. *SF3B1* varyasyonu, *IGHV* varyasyonu olmayan ve del (11q) olan olgular ile güçlü bir birliktelik içindedir. *MYD88* varyasyonunun ise *IGHV* varyasyonu ve del (13q) olan olgularda sık bulunduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada *SF3B1* varyasyonunun, erkek cinsiyette daha yüksek olduğu, ilerleyen klinik gidiş sırasında da meydana gelebileceği ve kısa tedavi zamanı ile genel sağ kalımla ilişkilendirilmiştir. *MYD88* varyasyonunun ise prognoz üzerinde etkisinin olmadığı belirtilmektedir (Jeromin vd., 2014). Xia ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *SF3B1* ve *MYD88* genlerinde varyasyonların düşük sıklıkta olduğunu belirtmiştir. *SF3B1* varyasyonlarının KLL sağ kalımı üzerinde sınırlı bir etkisi olmasına karşın *MYD88* varyasyonlarının sağ kalım üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı ve her iki gen varyasyonlarının tedavi zamanı ile arasında önemli bir ilişki olmadığı bildirilmektedir (Xia vd., 2014). Vollbrecht ve arkadaşlarının 136 KLL hastasıyla yaptıkları çalışmada *SF3B1* geninin yüksek sıklıkta varyasyon geçirdiği belirtilmiştir. *SF3B1* geninin varyasyon geçirmemiş *IGHV* geni, CD38 pozitifliği ile anlamlı bir ilişki olduğu ve erkek cinsiyette yüksek sıklıkta bulunduğunu, *MYD88* geninin ise daha düşük sıklıkta görüldüğü belirtilmiştir (Vollbrecht vd., 2015). Baliakas ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada KLL olgularında *SF3B1* K700E varyasyonunun diğer *SF3B1* varyasyonlu olgulara kıyasla varyasyon geçirmemiş *IGHV*

ve trizomi 12 bulunan olgularda daha sık bulunduğu ve daha kısa ilk tedavi zamanı ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir. *MYD88* L265P varyasyonu KLL de en sık görülen varyasyondur ve varyasyonlu IGHV geni ile del (13q) olan olgularda görüldüğü ve ilk tedavi zamanı üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı belirtilmektedir (Baliakas vd., 2015). Polonya’da 370 yeni tanı almış olan KLL hastasıyla yapılan bir çalışmada *SF3B1* ve *MYD88* varyasyonları bulunan olgularda KLL için önemli prognostik belirteçler olan CD38 ve ZAP-70 ekspresyon seviyelerinde önemli bir farklılık olmadığı belirtilmektedir. Ayrıca bu çalışmada *MYD88* varyasyonu olan ve olmayan olguların tedaviye başlama zamanı için aralarında bir fark bulunmazken, *SF3B1* varyasyonu bulunan olguların varyasyon bulunmayan olgulara kıyasla önemli ölçüde daha kısa tedaviye başlama süresinin olduğu gösterilmiştir ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda *SF3B1* gen varyasyonunun, yüksek riskli KLL hastalarının tanımlanmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Putowski vd., 2017).

SF3B1 geni; öncül mRNA’dan intronların uzaklaştırılmasını katalize eder, RNA splaying yolağında ve RNA metabolizmasında görev almaktadır. Klinik olarak, *SF3B1* varyasyonları bilinen diğer KLL prognostik belirteçlerinden bağımsız prognostik bilgi sağlar. *SF3B1* varyasyonları çoğunlukla KLL de subklonal olaylardır ve bu nedenle muhtemelen hastalık progresyonunda rol oynarlar (Xargay-Torrent vd., 2015). Daha önceden yapılan çalışmalarda *SF3B1* geninin, KLL hastalarında %5-18 oranında varyasyona uğradığı rapor edilmiştir (Wan, 2013). Wan ve Wu yapmış oldukları bir çalışmada *SF3B1* varyasyonunun KLL hastalarında, daha agresif hastalık seyri ve daha kısa genel sağ kalım süresi ile ilişkili olduğunu aynı zamanda *SF3B1* varyasyonunun KLL hastalığının başlatıcı varyasyonlarından değil de daha çok hastalık ilerlemesinin ilerleticisi olduğunu bildirmişlerdir (Wan, 2013). Raa ve arkadaşları, *SF3B1* gen varyasyonunun DNA hasar yanıtına olan etkisini araştıran bir çalışma yapmışlar. Çalışmada *SF3B1* varyasyonunun, *TP53* ve *ATM* gibi DNA tamir mekanizmasında etkili olan genlerle ilişkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada *SF3B1* varyasyonunun, bozulmamış *ATM* kinaz aktivasyonunda bile hatalı DNA hasarı yanıtına yol açtığı önerilmektedir. Ayrıca *SF3B1* varyasyonunun artmış DNA hasarı ve/veya DNA hasar yanıtına yol açtığı belirtilmektedir (Raa vd., 2015). Japonya da KLL olguları ile yapılan bir çalışmada *SF3B1* geninde K700E varyasyonunun en sık görülen varyasyon olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada *SF3B1* varyasyonlu olguların genel sağ kalım süresinin daha kısa olduğu

ve hastalığın kötü prognozunu öngörmede önemli olduğu belirtilmektedir (Mitsui vd., 2016). Biz de çalışmamızda sadece bir hastada *SF3B1* p.K700E varyasyonunu saptadık. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler diğer literatürler ile uyumlu bir şekilde değerlendirildi. Yapmış olduğumuz çalışmada hasta sayısının yetersiz olması nedeniyle elde ettiğimiz verilerin sonucunda çalışmamız istatistiksel olarak anlamlı ($P = 0,188$) kabul edilmedi.

MYD88 geni doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtında görev alan önemli bir gendir. *MYD88*, TLR ve IL-1R yolaklarında önemli bir sinyal dönüştürücü olarak görev alır (Amaya-Chanaga, 2016). *MYD88* L265P missense varyasyonu, KLL olgularında düşük sıklıkta görülüyor olsa da en sık görülen varyasyonlardan biridir (Rossi, 2013). Bu varyasyonlar, varyasyona uğramış *IGHV*, düşük ZAP-70 ve CD38 ekspresyonu seviyeleri ve normal $\beta 2M$ seviyeleri ile ilişkilidir ve klinik evreden bağımsız bir şekilde genç hastalarda görülmektedir (Amaya-Chanaga, 2016). Puente ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada *MYD88* L265P gen varyasyonunun ileri klinik evre ve genel sağ kalım üzerinde etkisinin olmadığı belirtilmektedir. Ayrıca *MYD88* varyasyonların, yabani tip olan *MYD88* olgularına kıyasla daha genç hastalarda ve tüm varyasyonların *IGHV* varyasyonu bulunan olgularda görüldüğü belirtilmektedir (Puente vd., 2012). 587 KLL hastasından alınan örneklerle yapılan bir çalışmada, *MYD88* L265P en sık görülen varyasyondur. *MYD88* varyasyonları, çoğunlukla varyasyon geçiren *IGHV* geni, del (13q), CD38 ve ZAP-70 faktörlerinin düşük eksprese olduğu olgularda görülmüş. Bu çalışmada *MYD88* varyasyonu olan hastaların varyasyon bulunmayan hastalardan anlamlı olarak daha genç olduğu ve *MYD88* varyasyonunun genç KLL hastalarında olumlu sonuç veren bir popülasyonu temsil ettiği belirtilmiştir (Martinez-Trillos vd., 2014). Bizim çalışmamızda ise KLL hastalarında *MYD88* p.L265P varyasyonu saptanmamıştır. Bunun nedeni de hasta sayısının yetersiz olmasıdır. Bu nedenle çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

Sonuç olarak biz bu çalışma ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniğine başvuran KLL hastaları arasında *SF3B1* ve *MYD88* genlerinin ne sıklıkla varyasyona uğradığını, tedavi ve genel sağ kalım süresi ile ilişkilerini aydınlatmayı amaçladık. Çalışmamıza katılmayı kabul eden uygun hastaların medyan yaşı literatürle uyumlu olup 64 olarak tespit edildi, hastaların 28'i (%48,3) erkek ve 30'u (%51,7) kadındır. Hastaların 8'i (%13,8) Rai 0, 20'si (%34,5) Rai I, 17'si (%29,3) Rai II, 7'si (%12,1) Rai III, 6'sı (%10,3) Rai IV evresindeydi. Hastaların %58,6'sının tedavi almadan takibi yapılırken, %5,17'sine tanıdan hemen sonra tedavi başlanmıştı. *SF3B1* ve *MYD88* genlerinin varyasyon durumunu inceledik, çalışmamızın sonucunda sadece bir hastada *SF3B1* geninde p.K700E varyasyonunun olduğunu saptadık. Varyasyon saptadığımız hasta Rai evrelendirme sistemine göre Rai evre IV hastasıydı ve tanı aldıktan hemen sonra tedavi başlanmıştı. Bu tez çalışması kapsamında araştırılan varyasyonlar çalışmaya dahil edilen KLL olguları için prognoz ve tedavi açısından anlamlı bulunmamıştır. Genetik olarak başka verilerin incelenmesi ve diğer varyasyonların araştırılması öngörülmüştür.

KAYNAKLAR

- Alsafadi, H. B.-N.-R. (2016). Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage. *Nature Comunucations*, 7, 1-12.
- Alsagaby, B. P. (2016). Key Molecular Drivers of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 16(1), 593-606.
- Al-Sawaf, F. E. (2016). Targeted Therapy of CLL. *Oncology Research and Treatment*, 39, 768-778.
- Amaya-Chanaga, R. (2016). Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 29, 79-89.
- Anak, U. (2012). Akut Miyeloid Lösemi (AML). *Çocuk Dergisi*, 12(4), 153-158. doi:10.5222/j.child.2012.153.
- Arber, O. H. (2016). Introduction to a review series: the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood*, 127(20), 2361-2364.
- Assem, H. K. (2009). The Prognostic Significance of Combined Expression of ZAP-70 and CD38 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* 21(4), 287-297.

- Bagacean, D. B.-G. (2017). Combining cytogenetic and epigenetic approaches in chronic lymphocytic leukemia improves prognosis prediction for patients with isolated 13q deletion. *Clinical Epigenetics*, 9(122), 1-11.
- Baliakas, H. S.-Z. (2015). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 29, 329–336. doi:10.1038/leu.2014.196.
- Beltran, G. W. (2015). Significance of MYD88 L265P Mutation Status in the Subclassification of Low-Grade B-Cell Lymphoma/Leukemia. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 139, 1135-1141.
- Billard. (2013). Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 5(2), 309-325.
- Binet, A. D. (1981). A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis. *Cancer*, 48, 198-206.
- Bjorn, S. B. (1989). PRP4 (RNA4) from *Saccharomyces cerevisiae*: Its Gene Product Is. *Molecular and Cellular Biology*, 9(9), 3698-3709.
- Blair, P. W. B. (2007). Chemical exposures and risk of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 139, 753-761.
- Boonstra, L. L. (2006). CD38 as a Prognostic Factor in B Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia (B-CLL): Comparison of Three Approaches to Analyze Its Expression. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 70B, 136-141.
- Briggs, M. S. (2016). Tracking the Resolution of Student Misconceptions about the Central Dogma of Molecular Biology. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 17(3), 339-350.
- Brown. (2008). Inherited predisposition to chronic lymphocytic leukemia. *Expert Review of Hematology*. 1(1): 51–61. doi:10.1586/17474086.1.1.51.
- Byrd, F. C. (2015). Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*, 125(16), 2497-2506.

- Cazzola. (2013). Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*, 121(2), 260-269.
- Chapman, W. W. (2012). Applications of Next-Generation Sequencing to Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 18, 151-160.
- Chiorazzi. (2012). Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *American Society of Hematology*, 2012, 76-87. doi:10.1182/asheducation-2012.1.76
- Clanahan. (2011). Current strategies for the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia (CLL), with a focus on poor-risk CLL: A review. *Turkish Journal of Hematology*, 28, 86-96.
- Coombs, R. F. (2012). Single nucleotide polymorphisms and inherited risk of chronic lymphocytic leukemia among African Americans. *Blood*, 120(8), 1687-1690.
- Deschler, L. (2006). Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer*, 107(9), 2099-2107.
- Dielschneider, X. Y. (2014). Gefitinib targets ZAP-70-expressing chronic lymphocytic leukemia cells and inhibits B-cell receptor signaling. *Cell Death and Disease*, 5, 1-9.
- Döhner, S. B. (2000). Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 343, 1910-1916.
- Drexler, K. W. (2008). Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 10(5), 1-12.
- Eichhorst, R. M. (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26, 78-84.
- Elert. (2013). Living With Leukemia. *Nature*, 498, 2-3.
- Ferrarini, C. N. (2012). Prognostic factors in CLL. *Leukemia Supplements*, 1, 29-30. doi:10.1038/leusup.2012.17.

- Goldin, S. C. (2010). Familial Chronic Lymphocytic Leukemia. *Current Opinion in Hematology*, 17(4), 350–355. doi:10.1097/MOH.0b013e328338cd99.
- Gragert, F. A. (2014). Fine-mapping of HLA associations with chronic lymphocytic leukemia in US populations. *Blood*, 124(17), 2657-2665.
- Guieze, R. C.-K.-B. (2015). Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood*, 126(18), 2110-7. doi: 10.1182/blood-2015-05-647578.
- Gruber, C. J. W. (2014). Evolving Understanding of the CLL Genome. *Semin Hematol.* Author manuscript, 51(3),177-187.
- Haas, K. M. (2011). Next-generation sequencing entering the clinical arena. *Molecular and Cellular Probes*, 25, 206-211.
- Haddad, S. (2012). Chronic Lymphocytic Leukemia. *Dis Mon - Elsevier*, 58, 153-167.
- Hallek. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology*, 92(9), 946-965. doi:10.1002/ajh.24826.
- Hallek, C. C. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111, 5446-5456.
- Heel, T. R. (2013). Developments in the immunophenotypic analysis of haematological malignancies. *Blood Reviews*, 27, 193-207.
- Higuchi, D. W. (1992). Simultaneous Amplification and Detections of spesific DNA sequencies. *Biotechnology*, 10, 413-417.
- Hoffbrand, M. (2016). Hodgkin Lymphoma. *Hoffbrand's Essential Haematology* (7. bs.). London: Wiley Blackwel.

- Horsley, K. (2005). Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma*, 114, 286-294.
- Jain, O. (2015). Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood*, 126(4), 463-470.
- Jan, M. (2013). Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*, 32, 135-140. doi:10.1038/onc.2012.48
- Jensen. (2012). Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Measure mRNA: Use, Limitations, and Presentation of Results. *The Anatomical Record*, 295, 1-3.
- Jeromin, W. H. (2014). SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*, 28, 108–117. doi:10.1038/leu.2013.263.
- Kaleem, S. A. (2015). Chronic Myeloid Leukemia - Prognostic Value of Mutations. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(17), 7415-7423.
- Katz, C. S. (2015). Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. *Cancer Causes Control*, 26, 1627-1642.
- Kawamata, M. S.-O. (2013). Genetic differences between Asian and Caucasian chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Oncology*, 43, 561-565. doi:10.3892/ijo.2013.1966.
- Kesminiene, E. I. (2010). Risk of hematological malignancies among Chernobyl liquidators. *Radiat Res. Author manuscript*, 170(6), 721-735.
- Kipps, S. W. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*. 3, 1-53. doi:10.1038/nrdp.2016.96.
- Kitada, A. A. (1998). Expression of Apoptosis-Regulating Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia: Correlations With In Vitro and In Vivo Chemoresponses. *Blood*, 91(9), 3379-3389.

- Kolialexi, T. K. (2005). Impact of Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Studies on Hematologic Malignancies. *Anticancer Research*, 25, 2979-2984.
- Kubista, A. B. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
- Kwon, L. M. (2010). Clinical utility of FISH analysis in addition to G-banded karyotype in hematologic malignancies and proposal of a practical approach. *The Korean Journal of Hematology*, 45(3), 171-176.
- Landgren, M. (2014). Biologic Frontiers in Multiple Myeloma: From Biomarker Identification to Clinical Practice. *Clinical Cancer Research*, 20(4), 804–13.
- Lim, L. L. (2015). Gender and ethnic differences in incidence and survival of lymphoid neoplasm subtypes in an Asian population: Secular trends of a population-based cancer registry from 1998 to 2012. *International Journal of Cancer*, 137, 2674-2687.
- Linnet, F. M. (2005). Incidence of haematopoietic malignancies in US radiologic technologists. *Occupational and Environmental Medicine*, 62, 861–867. doi:10.1136/oem.2005.020826.
- Macheta, C. (2015). Genetic methods in diagnosis of hematooncological. *Postepy Hig Med Dosw* (online), 69, 475-487.
- Martinez-Trillos, P. N. (2014). Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*, 123(24), 3790-3796.
- Messmer, L. S. (2015). A Selective Novel Peroxisome Proliferator–Activated Receptor (PPAR)- α Antagonist Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of CLL Cells In Vitro and In Vivo. *Molecular Medicine*, 21, 410-419.
- Mirzaei, F. K. (2017). State of the art in microRNA as diagnostic and therapeutic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 888–900. doi: 10.1002/jcp.25799.

Mitsui, K. N. (2016). SF3B1 and IGHV gene mutation status predict poor prognosis in Japanese CLL patients. *International Journal of Hematology*, 103, 219–226. doi:10.1007/s12185-015-1912-z.

Molica, S. G. (2016). The chronic lymphocytic leukemia international prognostic index (CLL-IPI) predicts time to first treatment in early CLL: Independent Validation in a Prospective Cohort of Early Stage Patients. *American Journal of Hematology*, 91(11), 1090–1095. doi:10.1002/ajh.24493.

Montserrat. (2006). New Prognostic Markers in CLL. *American Society of Hematology*, 2006(1), 279-284. doi:10.1182/asheducation-2006.1.279.

Montserrat. (2002). Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: Where to now? *The Hematology Journal*, 3, 7-9. doi: 10.1038/sj/thj/6200139.

Mullis. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de biologie clinique*, 48(8), 579-82.

Nussbaum, M. W. (2005). Genetik ve Kanser. *Thompson & Thompson Tıbbi Genetik* (6. bs.). ANKARA: Güneş Kitabevi Ltd. Şti.

Pati, Jain (2013). Flow Cytometry in Hematological Disorders. *Indian Journal of Pediatrics*, 80(9), 772-778.

Payandeh, S. K. (2014). Appearance and Disappearance of Chronic Myeloid Leukemia (CML) in Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *International Journal of Hematology- Oncology and Stem Cell Research*, 8(4), 49-53.

Podhorecka, K. C. (2015). The rate of in vitro fludarabine-induced peripheral blood and bone marrow cell apoptosis may predict the chemotherapy outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71, 1121-1127.

Poulain, R. D.-Z.-L. (2013). MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 121(22), 4504-4511.

- Preston, K. T. (1994). Cancer Incidence in Atomic Bomb Survivors. Part Ill: Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma, 1950–1987. *Radiation Research*, 137, 68-97.
- Puente, P. Q.-G.-F. (2012). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475, 101–105. doi:10.1038/nature10113.
- Putowski, P. P. (2017). Prognostic impact of NOTCH1, MYD88 and SF3B1 mutations in Polish patients with chronic lymphocytic leukemia. *Polish Archives of Internal Medicine*, 127(4), 237-244.
- Raa, D. N. (2015). The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage. *Leukemia*, 29, 1133–1142 doi:10.1038/leu.2014.318.
- Rai, S. C. (1975). Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 46(2), 219-234.
- Repa, V. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29, 151-159.
- Rodrigues, G. k.-M. (2016). Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Revista Brasileira de Hematologiae Hemoterapia*, 38(4), 346-357.
- Rossi, C. S. (2013). Molecular bases of chronic lymphocytic leukemia in light of new treatments. *Immunology Letters*, 155, 51-55.
- Saiki, G. S. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- Schwartz, P. a. (2002). Leukemias. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 45(3), 866-878.
- Schweighofer, C. M. (2013). Genomic Variation by Whole-Genome SNP Mapping Arrays Predicts Time-to-Event Outcome in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia A Comparison of CLL and HapMap Genotypes. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 15(2), 196-209.

SF3B1. (2019). SF3B1 Gene. 20 Ocak 2019 tarihinde www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23451 adresinden erişildi.

Uçbirleştirme. (2019). *Wikiwand*, içinde. 20 Ocak 2019 tarihinde [http://www.wikiwand.com/tr/U%C3%A7birle%C5%9Firme_\(genetik\)](http://www.wikiwand.com/tr/U%C3%A7birle%C5%9Firme_(genetik)) adresinden erişildi.

Shahjahani, M. N. (2015). Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia. *Cellular Oncology*, 38, 93–109. doi: 10.1007/s13402-014-0215-3.

Simons, S.-R. L. (2012). Genome-Wide Arrays in Routine Diagnostics of Hematological Malignancies. *Human Mutation*, 33(6), 941-948.

Slager, C. S. (2013). Genetic Susceptibility to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Seminars in Hematology*, 50(4), 296-302.

Smith, H. P. (2011). Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *British Journal of Cancer*, 105, 1684-1692.

Sreekantaiah. (2007). FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Research*, 118, 284-296. doi:10.1159/000108312.

Stenehjem, K. B.-A. (2015). Benzene exposure and risk of lymphohaematopoietic cancers in 25 000 offshore oil industry workers. *British Journal of Cancer*, 112, 1603–1612. doi:10.1038/bjc.2015.108.

Szymańska, B.-J. D. (2018). TLR2 Expression on Leukemic B Cells from Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 1-11. doi.org/10.1007/s00005-018-0523-9.

Tobin, T. J. (2003). Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted V2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*, 101, 4952-4957.

Torkaman, C. A. (2011). An approach for leukemia classification based on cooperative game theory. *Analytical Cellular Pathology*, 34(2011), 235-246.

Toll-like Receptors (TLRs) Interactive Pathway (2019). *Cell Signaling Technology, Immunology and Inflammation* içinde. 20 Ocak 2019 tarihinde [www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-immunology-and-inflammation/toll-like-receptors-\(tlrs\)-interactive-pathway/pathways-tlr](http://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-immunology-and-inflammation/toll-like-receptors-(tlrs)-interactive-pathway/pathways-tlr) adresinden erişildi.

Turunen, N. V. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *WIREs RNA*, 4, 61-76.

Uzunhan, K. (2012). Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. *Çocuk Dergisi*, 12(1): 6-15. doi:10.5222/j.child.2012.006.

Vicente, D. R. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. *Cancer Genetics*, 206, 49-62.

Vollbrecht, M. K. (2015). Comprehensive Analysis of Disease-Related Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia by Multiplex PCR-Based Next Generation Sequencing. *Plos One*, 10(6), 1-17.

Vrijheid, C. A. (2008). Ionizing Radiation and Risk of Chronic Lymphocytic Leukemia in the 15-Country Study of Nuclear Industry Workers. *Radiation Research*, 170(5), 661–665. doi:10.1667/RR1443.1.

Wan, Wu (2013). SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121(23), 4627-4634. doi. 10.1182/blood-2013-02-427641.

Wang, L. W. (2011). SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 365, 2497-2506.

Wiernik. (2015). Familial Leukemias. *Current Treatment Options in Oncology*, 16(8), 1-11.

Xargay-Torrent, L.-G. R.-O. (2015). The splicing modulator sudemycin induces a specific antitumor response and cooperates with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 6(26), 22734-22749.

Xia, F. W. (2014). Frequencies of SF3B1, NOTCH1, MYD88, BIRC3 and IGHV mutations and TP53 disruptions in Chinese with chronic lymphocytic leukemia: disparities with Europeans. *Oncotarget*, 6(7), 5426-5434.

Xu, Z. D. (2014). Construction of protein profile classification model and screening of proteomic signature of acute leukemia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(9), 5569-5581.

Yang, L. G. (2015). The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology? *Blood Reviews*, 29, 205–213.

Yoshimi, A-W. (2016). Molecular Pathways: Understanding and Targeting Mutant Spliceosomal Proteins. *Clinical Cancer Research*, 23(2), 336-342.

Zhou, X. (2015). Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*, 6(6), 403-412.

EK

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2016/266	
	PROTOKOL ADI	Kronik Lenfositik Lösemide SF3BR ve MYD88 Genlerindeki Varyasyonların Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 19/17	Tarih: 23.11.2016	
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Gözde CİMSİT'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllü ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödendiği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi			

UYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Rıdvan KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Öğretim. Gör. Uzm. Dr. Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan
Dekan Yrd.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gözde CİMŞİT
Doğum Yeri ve Tarihi	İstanbul – 08.04.1991
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	Düzce Üniversitesi - Biyoloji
Yüksek Lisans Öğrenimi	Trakya Üniversitesi – Biyoteknoloji ve Genetik ABD
Bildiği Yabancı Diller	İngilizce
İş Deneyimi	
Stajlar	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD. (2012, 1 ay) DÜZCE Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD. (2013, 4 ay) TRAKYA Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD. Laboratuvarı (2015-2017, 2 yıl)
Çalıştığı Kurumlar	Nesiller Genetik Laboratuvarı (2018-...)
İletişim	
E posta	gzdcimsit@gmail.com