

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**B HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLERDE
PAX5 GENİNİN ARAŞTIRILMASI**

SİNEM ÖZDEMİRLİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. UĞUR ÖZBEK**

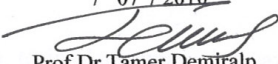
**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI / İMMÜNOLOJİ
PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI


Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


/ 07 / 2010



Prof. Dr. Tamer Demiralp
Enstitü Müdürü

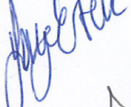
Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : İmmünoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans (×) Doktora ()
Anabilim Dalı : İmmünoloji
Tez Sahibi : Sinem Özdemirli
Tez Başlığı : B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemilerde *PAX5* Geninin Araştırılması
Sınav Yeri : Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Sınav Tarihi : 08.07.2010 saat 09:30


Tez Sınav Jürisi

1. Prof. Dr. Uğur Özbek (Tez Danışmanı), İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik ABD. 

2. Prof. Dr. Günnur Deniz, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji ABD. 

3. Doç. Dr. Ali Osman Gürol, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji ABD. 

4. Doç. Dr. Gaye Erten, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji ABD. 

5. Prof. Dr. Zafer Başlar, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları ABD. 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sinem Özdemirli



İTHAF

Tüm sevdiklerime...

TEŞEKKÜR

Beni genetik bölümünün bir öğrencisi olarak kabul edip bütün imkânlarını sonuna kadar önüme sunduğu ve yüksek lisans dönemim boyunca benden hiç bir zaman desteğini esirgemediği için tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Uğur Özbek'e

Tezimin her sayfasında en az benim kadar emeği olan, hata yapsam da hep yanımda olduğunu bana hissettiren, bilgisi, sonsuz sabrı ve sıcak kişiliği ile hep minnettar kalacağım Sayın Dr. Müge Aydın Sayitoğlu'na,

Hem bilgi birikimi hem de imkânları ile hep yanımda olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Günnur Deniz'e

Geldiğim ilk günden itibaren bilgisine ve dostluğuna ihtiyacım olduğu her anda başvurabildiğim, tezimin her aşamasında çok büyük emekleri olan, bana iş arkadaşından çok bir 'abla' gibi davranan Özden Hatırnaz'a

Hocalığı ve sıcak dostluğu ile hep yanımda olan Sayın Doç. Dr. Burçak Vural'a

Yardıma ihtiyacım olduğu zamanlarda Hollanda'da da olsa desteğini, Türkiye'ye geldiği kısıtlı zamanlarda yardımlarını ve bilgisini benimle paylaşan Dr. Peter Ng'ye

Beni hiç yalnız bırakmayan iş arkadaşlığından öte iyi dostum olan Yücel Erbilgin'e

Lisans döneminden bu yana aynı yolu paylaştığım arkadaşım Özkan Özdemir'e

Yeni yeni öğrenmeye başladığım akım sitometri deneylerimde bilgi ve birikimleri ile her zaman yanımda olan Dr. Suzan Çınar ve teknik destek konusunda yardımlarını esirgemeyen Abdullah Yılmaz'a

Çalıştığım laboratuvarı neşeleri ve sıcak dostluklarıyla bir eve dönüştüren arkadaşlarım Nurhan Mavi, Suzin Çatal, Emran Yücesan, Elif uğurel, Filiz Çavuş, Aydın Karabulut, Ceren Öztunç, İsmail Can ve tüm genetik bölümüne,

Maddi manevi her zaman yanımda olduklarını bildiğim annem Arzu Özdemirli, babam Ermil Özdemirli, kardeşim Selçuk Özdemirli ve tüm aileme,

İyi ve kötü günlerimde benimle beraber sevinip, benimle üzülen arkadaşlıktan öte ailem gibi gördüğüm Harun Fırtına, Seda Kılıç, Özden Doruköz, Tuğba Aktepe ve tüm arkadaşlarıma

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İmmün Sistem.....	3
2.2. Hematopoez.....	3
2.3. B Hücre Gelişimi	5
2.3.1. B hücre gelişiminde etkili olan yazılım faktörleri	7
2.4. PAX gen ailesi ve PAX5 geni özellikleri	8
2.4.1.1. PAX5 geninin B hücre gelişimindeki rolü	10
2.5. KANSER.....	13
2.5.1. Lösemilerin Tanımı ve Sınıflandırılması	14
2.5.2. Akut Lenfoblastik Lösemi	14
2.5.2.1. B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (B-ALL)	15
2.5.3. PAX5'in onkogenezdaki önemi	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. GEREÇ.....	18
3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu	18
3.1.2. B-ALL Hastalarına ait klinik parametreler.....	18
3.1.3. Kimyasallar.....	20
3.1.4. PZR Materyali.....	20
3.1.5. cDNA Sentez Materyali	21

3.1.6. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	21
3.1.7. Kullanılan Cihazlar	22
3.2. YÖNTEMLER	23
3.2.1. Lökosit İzolasyonu	23
3.2.2. RNA Eldesi	24
3.2.3. cDNA Sentezi	24
3.2.4. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	25
3.2.4.1. Referans genlerin belirlenmesi.....	27
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27
3.2.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi	29
3.2.6. DHPLC	29
3.2.7. Dizileme Analizi	30
3.2.8. Akan hücre ölçer (Akım sitometri) ile hücre ayırıştırma	30
3.2.8.1. Mononükleer hücrelerden olgun B hücre ayrılması.....	31
3.2.8.2. B hücre gelişiminde görülen B hücre alt gruplarının ayrılması.....	32
3.2.9. Western Blot	35
3.2.9.1. Protein Lizatın hazırlanması	35
3.2.9.2. SDS-PAGE Jel elektroforezi ve Blotting	35
3.2.10. Hücre kültürü	36
3.2.11. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	38
4.1. B-ALL hastalarında <i>PAX5</i> mRNA ve protein anlatımı	38
4.2. B-ALL hastalarında <i>PAX5</i> mutasyon ve delesyonların tespiti.....	41
4.3. <i>PAX5</i> Bulgularının B-ALL hastalarının klinik özellikleri ile ilişkisi	45
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	54
ETİK KURUL KARARI.....	58
FORMLAR	589
ÖZGEÇMİŞ	61

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1: Hastaların Klinik Parametreleri	19
Tablo 3-2: cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımının kondüsyonu.....	25
Tablo 3-3: <i>PAX5</i> geni delesyon ve mutasyonları tespit etmede kullanılan primerler	28
Tablo 3-4:PZR kondüsyonları.....	28
Tablo 3-5: PZR Koşulları	29
Tablo 4-1:Klinik bulgular ile <i>PAX5</i> anlatımı ilişkisi	46
Tablo 4-2: Klinik bulgular ile delesyon varlığı ilişkisi	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2–1: Hematopoez ve kanın şekilli elemanları.....	4
Şekil 2–2: B hücre gelişimi ve hücrelerin farklı yüzey proteinleri [15].....	6
Şekil 2–3: B hücre gelişimi sürecinde PAX5 anlatımının rolü [3]	7
Şekil 2–4: PAX5 Geni yapısı; PD; Paired Domain, O; Oktapeptid bölgesi, H; Homeodomain, TD-A; Transaktivasyon bölgesi, I; Baskılayıcı (Inhibitory) bölge[4]....	9
Şekil 2–5: PAX5 geninde görülen delesyonlar [5]	10
Şekil 2–6: B hücre reseptör yolağı; kırmızı ile gösterilen genler PAX5 tarafından etkilenen genlerdir [3].	11
Şekil 2–7: PAX5 ^{-/-} Hücrelerin Diğer hücre serilerine dönüşebilme yeteneği [12].....	12
Şekil 2–8: PAX5 inaktivasyonu sonucu meydana gelen karşı farklılaşma ve geri farklılaşma	13
Şekil 3–1: Fikol yöntemi kullanılarak tam kandan mononükleer hücre izolasyonu	24
Şekil 3–2: Hidroliz probunun çalışma prensibi	26
Şekil 3–3: PAX5 genine uygun primer ve prob çifti	26
Şekil 3–4: Tasarlanan primer çiftlerinin PAX5 geni üzerindeki yerleşimi	28
Şekil 3–5: Çoklu boyama ile akan hücre ölçerde birden fazla hücrenin ayrılması.....	31
Şekil 3–6: Olgun B lenfosit izolasyonu.....	32
Şekil 3–7: Önden-saçılım / Yandan saçılım grafiğinde alınan lenfosit kapısı.....	33
Şekil 3–8: FITC floresan şiddetine göre CD19+ ve CD19- hücrelerin ayrı ayrı kapılanması	33
Şekil 3–9: CD34 / CD20 grafiğinde B hücre alt gruplarının kapılanması	34
Şekil 3–10: Olgun ve olgunlaşmamış B hücrelerini ayırt etmek için IgM boyaması yapıldı. M1 ile işaretli hücreler yüzey IgM pozitif olgun B hücrelerdir.	35
Şekil 4–1: B-ALL hastalarının ve sağlıklı kontrollerin relatif PAX5 mRNA düzeyleri (%).....	38
Şekil 4–2: Relatif PAX5 mRNA düzeyinin alt gruplar seviyesinde incelenmesi	39
Şekil 4–3: Hasta alt gruplarının özgün dönem kontrolleri ile karşılaştırılması	40
Şekil 4–4: Lösemi hücre serilerinde PAX5 mRNA ve protein anlatımları.....	40
Şekil 4–5: B-ALL hastalarında PAX5 proteini varlığı	41

Şekil 4–6: B-ALL hastalarında <i>PAX5</i> delesyonlarının proteine yansması: (NALM6 pozitif kontrol, H68, H103, H58, H70, H96 Pax5 proteini pozitif hastalar, H21 ve H53 Δ8 hastalar ve H40 Pax5 proteini negatif hasta)	41
Şekil 4–7: rs3780135 (T>C) ve rs35469494 (G>A) değişimi gösterilmesi	42
Şekil 4–8: Yabanıl tip ve SNP içeren hastaların <i>PAX5</i> anlatımı yönünden karşılaştırılması	42
Şekil 4–9: Delesyon 7/8/9'un tanımlanması	43
Şekil 4–10: Sağlıklı kontrollerde delesyon tespiti	43
Şekil 4–11: B-ALL hastalarında <i>PAX5</i> geni transaktivatör bölgesinde görülen delesyonlar	44
Şekil 4–12: A) Yabanıl tip ve herhangi bir delesyon içeren hastaların anlatım düzeylerine göre karşılaştırılması B) Delesyon 7 varlığı ve <i>PAX5</i> anlatımı ilişkisi	45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- TCR : T Hücre reseptörü
- BCR: B hücre reseptörü
- MPP: Multipotent öncül hücreler
- CLP: Öncül lenfoid hücreler
- CMP: Öncül myeloid hücreler
- CD: Ayırım kümesi - “Cluster of differentiation”
- VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü
- PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
- PAX5: Paried box gene 5
- TSAP: Tissue spesific activator protein
- BSAP: B cell spesific activator protein
- EBF: Erken B hücre faktörü
- FLT3: Fms benzeri tirozin kinaz 3
- RAG1: Rekombinaz aktive edici gen 1
- RAG2: Rekombinaz aktive edici gen 2
- ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activator protein
- Blimp1 : B lymphocyte induced maturation protein 1
- XBP1: X box binding protein 1
- BLNK: B cell linker protein
- MCSF-R : Makrofaj koloni stimüle edici faktör-reseptör
- AID: Activation induced cytidine
- TD: Transaktivatör domain
- ELN: Elastin
- SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

dHPLC: Denatüre edici yüksek performans sıvı kromatografisi

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

B-ALL: B hücreli akut lenfoblastik lösemi

DLBCL: Yaygın büyük B hücreleri Lenfoma

BTK: Bruton Tirozin Kinaz

ÖZET

Özdemirli, S. (2010). B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemilerde *PAX5* Geninin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji A.D. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

B-hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), B lenfosit gelişiminin erken safhasında meydana gelen somatik genetik değişiklikler sonucu aşırı çoğalma ile ortaya çıkan ve çocukluk çağında yaygın olarak görülen bir lösemi tipidir. *PAX5*; B hücre gelişim ve farklılaşmasında önemli bir rol oynar. Bu çalışmada, eş zamanlı kantitatif PZR kullanılarak çocukluk çağı B-ALL hastaları (n=134) ve sağlıklı kemik iliği (n=10) örnekleri *PAX5* mRNA düzeyleri açısından analiz edilmiş ve hastaların kontollere göre anlamlı şekilde artış gösterdiği bulunmuştur ($p<0,0001$). Hastalar immünofenotiplerine göre 5 alt gruba (pro B, pre B, pre B büyük, Pre B küçük, olgunlaşmamış B) ayrılarak mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında erken dönemde *PAX5* mRNA düzeyinin fazla olduğu daha sonra giderek azaldığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda akan hücre ölçer ile sağlıklı pro B, pre B ve olgunlaşmamış B hücreleri ayrıştırılmış ve *PAX5*'in normal B hücre gelişimindeki anlatımı incelenmiştir. Hastalar özgün dönem hücreleri ile karşılaştırıldığında pro B ($p = 0,009$) ve pre B hastalarında ($p=0,04$) *PAX5* anlatımı anlamlı bir şekilde artmışken, olgunlaşmamış B hastalarındaki anlatım farklılığının anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=1,00$). Hastalarda PZR yöntemi ile *PAX5*'in delesyonları incelendiğinde, hastaların %41'in de ekzon 7,8 ve 9'u kapsayan büyük delesyonlar tespit edilmiştir. B-ALL Hastaları (n=15) ve B-ALL,T-ALL ve AML hücre serileri *PAX5* protein varlığı yönünden incelenmiş, anormal *PAX5* anlatımının ve bazı delesyonların proteine dönüştüğü gösterilmiştir. Hastalarda TA bölgesini kapsayan gen mutasyonları direk dizileme ile tarandığında, hastalarda herhangi bir mutasyon saptanmazken, %90'ında rs3780135, %3,8'inde ise rs35469494 polimorfizmi tespit edilmiştir. Yüksek *PAX5* anlatımı ya da bu gende bulunan delesyon/mutasyonlar hastalık alt guruplarının moleküler ayrımı ve özellikle pre B-ALL patogenezi ve prognozu için önemli bir belirteç olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: B lenfositleri, akut lösemi, delesyon, polimorfizm, *PAX5*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3349

ABSTRACT

Ozdemirli, S. (2010). Analysis of *PAX5* gene in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia, Istanbul University, Institute of Health Science, Institute of Experimental Medicine Research, Msc thesis. Istanbul.

B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), is a common subtype of acute leukemia in children. *PAX5*, plays a central role in B-cell development and differentiation. In this study, we analyzed *PAX5* mRNA expression levels in B-ALL patients (n=134) and healthy bone marrow samples (n=10). Relative *PAX5* mRNA levels were significantly increased in B-ALL patients, compared to controls ($p < 0,0001$). *PAX5* expression was also evaluated in five different B-ALL subgroups (pro, pre B, pre B II large, Pre B II small, immature) and showed stage specific expression levels. We have sorted pro B, pre B and immature B cells from healthy bone marrow samples by flow cytometry and patients subgroups were compared with their specific controls. We found that pro B ($p=0,009$) and pre B ($p=0,004$) patients have significantly high *PAX5* mRNA levels. Relative *PAX5* mRNA levels of immature B ALL patients were also high, but not significantly different from healthy controls ($p=1,00$). We analyzed spliced variants of *PAX5* and %41 of B-ALL patients showed several multiple variants while none of healthy controls showed deletions. Ectopic expressions of *PAX5* in B-ALL patients and cell lines, also confirmed by western blot analyses. Mutations in 5'UTR and transactivator domain of *PAX5* were analyzed and none of our patients showed *PAX5* mutations, but two previously identified SNPs were detected. %90 of patients had rs3780135 and %3,8 had rs35469494 SNPs in protein coding parts of *PAX5*. Our results supported the abnormal *PAX5* expression or deletions/mutations can be used both for molecular analyses of B-ALL sup-groups and a characteristic marker for pathogenesis and prognosis of pre B-ALL patients.

Key Words: B- lymphocytes, acute leukemia, polymorphism, deletion, *PAX5*

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 3349

1. GİRİŞ VE AMAÇ

B hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), B hücre gelişiminin erken safhalarında meydana gelen genetik değişiklikler sonucunda, B hücrelerinin aşırı çoğalması ile ortaya çıkan ve çocukluk çağında yaygın olarak görülen bir lösemi tipidir. B hücrelerin olgunlaşması, kemik iliğindeki lenfoid öncül hücrelerin farklılaşması ile meydana gelir. B hücre oluşumu E2A (“helix-loop-helix” protein), EBF (“early B cell factor”) ve *PAX5* gibi yazılım faktörlerinin kontrolü altındadır [1]. *PAX5*; Hücre gelişimde, farklılaşmada ve hücre göçünde rol oynayan “paired box” gen ailesine ait üye bir yazılım faktörüdür [2]. B hücre gelişimi için öneme sahip olan *PAX5* yazılım faktörü, hedef genlerini hem baskılama hem de aktive etme özelliğine sahiptir. Bu sayede, B hücre gelişiminde rol oynayan önemli genleri aktive ederken, diğer hücre serilerinin gelişiminde önemli genlerin susturulmasını sağlar. Pax5 proteinin anlatımı öncül B hücrelerinden, erken plazma hücrelerine kadar devam eder. Bu anlatım B hücrelerinin plazma hücresine dönüşmesiyle sona erer [3].

PAX5 geninin normal B lenfositlerin gelişimindeki rolü uzun zamandır bilinmekle birlikte, B hücre kökenli tümörlerin patogenezindeki etkileri hakkında bilinenler çok yetersizdir. Hematopoetik kök hücreler ve öncül hücrelerdeki kontrolsüz *PAX5* anlatımı T hücrelerinin azlığına, B hücrelerinin aşırı çoğalmasına neden olur. Pro B hücreli tümörlere sahip B-ALL hastalarının %30’unda *PAX5* gen mutasyonları gösterilmiştir [4]. Ayrıca bu gende meydana gelen karboksi ucundan gerçekleşen farklı şekillerdeki alternatif kırılmaların, büyük delesyonlar ile karakterize olduğu bilinmektedir [5]. Bu bölgedeki ekzon kayıplarının *PAX5* geninin diğer hedef genleri ile etkileşimini etkilediği düşünülmektedir.

PAX5 geni ile yapılan araştırmalar çocuklukla hücre serileri, hayvan modelleri, lenfoma hastaları üzerinedir. B hücreli lösemilerde *Pax5* gen/protein anlatımı ve mutasyonlarının araştırıldığı çalışmalar son derece yetersizdir. B hücre gelişimi için kritik öneme sahip olan *PAX5* geninin B-ALL hastalarında ve B-hücrelerinin farklı olgunlaşma dönemlerinde (erken ve olgunlaşmamış dönem) araştırılması, *PAX5*’in B-ALL patogenezindeki rolünün daha iyi anlaşılmasında yardımcı olacaktır. Hastalık alt grupları arasındaki Pax5 anlatımı, hastalığın tanı/takip sürecinde yararlı bir belirteç olarak kullanılabilir. Primer hasta örneklerinde *PAX5* gen mutasyonlarının ve

delesyonlarının belirlenmesi ve hastaların klinik özellikleri ile (cinsiyet, yaş, tanı lökosit sayısı,..vb) ilişkilendirilmesi de bu genin, hastalığın prognozda muhtemel bir rolü olup olmadığını gösterecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem

İmmün Sistem, bakteri ve virüsler gibi yabancı organizmalara karşı gelişen ve kendinden olan ile olmayanı ayırt etme özelliğine sahip savunma sistemidir. İmmün yanıt; doğal ve edinsel immün yanıt olmak üzere 2 ana kolda incelenebilir [6]. Doğal immün yanıt, belli bir antijenden bağımsız olarak ortaya çıkan, sonucunda immünolojik hafıza oluşmayan sadece genel olarak vücuda karşı olanı tanımaya yönelik genel bir yanıttır. Doğal immün yanıtı; doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri, eozinofiller, bazofiller, nötrofiller, makrofajlar ve dentritik hücreler gerçekleştirir.

Edinsel immün yanıt ise, kendinden olmayan patojenin belirli epitoplarını tanıyıp, bu patojene özgü yanıtın oluşması ve sonucunda daha sonraki enfeksiyonlarda hızlı yanıt oluşturabilmek için immünolojik hafıza oluşturan yanıttır. Edinsel immün yanıtın temel elemanları B ve T lenfositleridir. Her bir B ve T hücresi organizmadan farklı olan epitopları tanıyan özgün bir antijen reseptörü taşırlar. Bu kadar fazla çeşitliliği tanımayı sağlayan bu sistem T hücrelerinde T hücre reseptörü (TCR) ve B hücrelerinde immünglobulin genlerinin yeniden yapılanmaları ile olur.

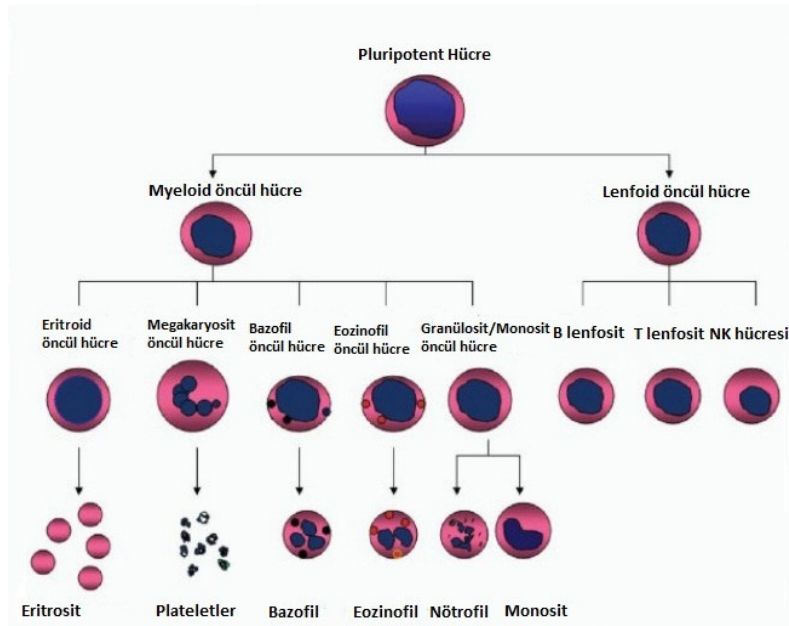
Lenfosit hücreleri özelleşmiş immün cevap geliştirdiğinden gelişimsel ve fonksiyonel olarak myeloid hücre serisinden ayrılırlar [7] .

2.2. Hematopoez

İmmün sistem hücrelerini de içeren kanın bütün şekilli elemanları, kemik iliğindeki pluripotent özellikteki hematopoetik hücrelerden köken alırlar [8].

Hematopoetik gelişimin ilk aşaması bir çok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip kök hücrelerin, myeloid veya lenfoid öncül hücrelere farklılaşmasıyla gerçekleşir. Hematopoetik öncül hücrelerden olgun kan hücrelerinin gelişimi, yani hematopoez; fetal dönemin erken evresinde vitellüs kesesinde (4-6 hafta) 6. haftadan sonra ise karaciğer ve dalakta (8. hafta) gerçekleşir. Kemik iliğinde üretim 4-5. aydan itibaren başlar. Doğumdan sonra ise, bütün hematopoetik fonksiyonlar sadece kemik iliğinde gerçekleşir. Karaciğer ve dalakta hiç bir hematopoetik aktivite kalmaz. Kanın bütün şekilli elemanları; eritrosit, megakaryosit, lenfosit, monosit, bazofil ve eozinofiller,

farklılaşma yeteneği olan pluripotent hücrelerden köken alırlar[9]. Pluripotent özellikteki bu hematopoetik kök hücreler, kendi kendini yenileyebilme (“self-renewal”) ve farklılaşma yeteneğine sahip uzun dönem (“long-term HSC”) hematopoetik kök hücrelerdir. Erken farklılaşma safhasında uzun dönem hematopoetik kök hücreler kendi kendini yenileyebilme özelliklerini kaybederek öncelikle kısa-dönem hematopoetik kök hücrelere (“short-term HSC”) daha sonrada hızlıca multipotent öncül hücrelere (MPP) farklılaşırlar. Multipotent öncül hücreler çok kısıtlı veya hiç kendi kendini yenileyebilme özelliği olmayan sadece lenfoid veya myeloid seri hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan özellikteki hücrelerdir [7]. Farklılaşan bu lenfoid öncül hücrelerden (“common lymphoid progenitor” = CLP) B ve T lenfositleri ile doğal öldürücü (“natural killer”=NK) hücreler oluşurken, myeloid öncül hücrelerden (“common myeloid progenitor”=CMP) eritroid, megakaryositik ve granülositik/monositik (GM) hücreleri oluşur. Multipotent öncül hücreler Flt3⁺, Thy-1.1⁻, c-kit^{hi}, lin⁻, sca-1^{hi} hücreler olarak tanımlanırlar. Bu multipotent öncül hücrelerin VCAM-1⁻ (“vascular cell adhesion molecule”) eksprese etmeyenleri GM hücre serilerine doğru yönelirken, VCAM⁺ eksprese eden hücreler lenfoid ve diğer myeloid hücre serilerine yönelirler [10]. İmmün sistem elemanlarından biri olan dendritik hücrelerin hematopoetik kök hücrelerden köken alındığı bilinmekle beraber bu hücrelerin lenfoid öncül hücrelerden mi yoksa myeloid öncül hücrelerden mi farklılaştığı net değildir [11].



Şekil 2–1: Hematopoez ve kanın şekilli elemanları

Hematopoetik hücreler morfolojik olarak birbirlerine çok benzemelerine rağmen fonksiyonel olarak işlevleri birbirinden çok farklıdır. Hücreler, monoklonal antikor panelleri ile tanınabilen yüzey proteinleri ile birbirinden ayırt edilebilmektedir. Bu proteinlerin standart adlandırılması ‘CD’ (ayırım kümesi = “cluster of differentiation”) sayısal tanımlamasıdır; bunlar belli bir hücre serisi veya hücre farklılaşma evresini tanımlamak için kullanılır [6].

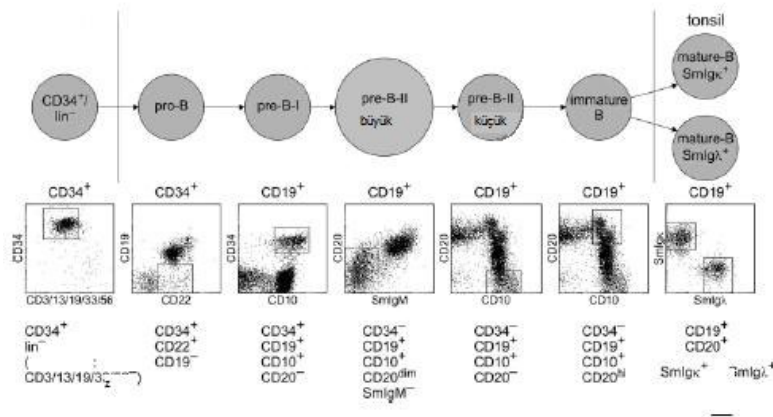
Kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşma özelliğine sahip kök hücrelerin olgun hücrelere farklılaşması epigenetik düzenlemeler ve transkripsiyon faktörleri gibi iç etkenler ile sitokinler, hormonlar veya adezyon molekülleri gibi çevresel faktörlerin kontrolü altında olur [12].

2.3. B Hücre Gelişimi

B lenfositleri ilk defa 1960’lı yılların sonlarına doğru, kuşlarda Bursa fabricius’da (*Bursa fabricii*) bulunmuş ve antikor üretiminden sorumlu hücreler olarak tanımlanmıştır. B lenfositleri memelilerde kemik iliğinde (“**B**one Marrow”), kuşlarda ise *Bursa fabriciusta* olgunlaştığı için adını bu organların baş harfinden alır [13]. B hücreleri ontogeninin erken evrelerinde omentum ve fetal karaciğerde üretilirken embriyonik dönemin ortalarında üretimi kemik iliğinde gerçekleşmeye devam eder. İnsanlarda B hücrelerinin farklılaşması ve olgunlaşması tümüyle kemik iliğinde gerçekleşir [14].

Hematopoetik kök hücrelerden farklılaşan genel lenfoid hücre serisinden, B hücre öncülleri oluşur. Genel lenfoid hücre serisinden farklılaşarak oluşan ilk B hücresi pre-pro B hücresi, fraksiyon A veya CLP-2 adını alır. Bu hücreler B hücrelerine özgü bir yüzey proteini olan B220 proteini taşırlar. B hücre serisi oluşturacak öncül hücreler interlökin-7’nin etkisiyle farklılaşarak CD34⁺, CD19⁻, CD22⁺ pro B hücrelerine dönüşürler. Olgunlaşmanın bir sonraki basamağı olan pre B I hücreleri hala erken dönem hücre yüzey proteini CD34’ü taşırsalar da olgun B hücre belirteci CD19 yüzey proteini açısından pozitif hale gelmişlerdir. Kromozomun ağır zincir lokusundaki immünglobulin genleri yeniden yapılandırılarak μ ağır zincir proteininin oluşmasını sağlar [6]. Bu aşamadaki B hücreleri pre B II büyük (“pre B II large”) hücreleri adını alırlar. Bu hücreler CD34⁻, CD19⁺, CD10⁺, CD20^{soluk} ve μ ağır zincirini sitoplazmik olarak taşıdığı için sIgM⁻ hücrelerdir. Pre B II büyük hücreler daha sonra CD34⁻,

CD19⁺, CD10⁺, CD20⁻ yüzey proteinlerini taşıyan pre B II küçük hücelere dönüşürler. Bu aşamada hala μ ağır zincir sitoplazmik haldedir [15]. B hücreleri pre B aşamasında iken μ ağır zincir proteinlerinin bir kısmı öncü bir B hücre reseptörü oluşturmak üzere hafif zincire benzeyen iki değişmez proteine bağlı olarak hücre yüzeyinde bulunurlar. Bu aşama B lenfositlerinin ilk denetim aşamasıdır. μ proteinin yanlış rekombinasyonu yüzünden bu proteini üretemeyen hücreler, apoptoza uğrayarak elenirler. μ proteini ve erken B hücre reseptörü kompleksi iki işlem için sinyal sağlar. Öncelikle 2. kromozomdaki Ig ağır zincir rekombinasyonu durdurulur. Bunun sebebi her bir B hücresinin kalıtsal olarak anne ya da babadan sadece birinin allelinden gelen immünglobulini üretmesidir. Allelik dışlama (“allelic exclusion”) adı verilen bu işlem ile her bir hücrenin tek bir özgülükte reseptör üretmesi sağlanır. İkinci sinyal ise Ig hafif zincir lokusunda önce kappa (κ) sonra lambda (λ) zincirinin rekombinasyonunu başlatır. Hafif zincirlerden biri üretildiğinde bu zincir ağır zincir ile birleşerek hücre zarında IgM antijen reseptörünü oluşturur. Bu reseptör, çoğalmayı sağlayan sinyaller göndererek hatasız IgM reseptörü üreten hücrelerin korunmasını sağlayıp, hatalı hücrelerin apoptoza giderek ölmelerini sağlar. Bu olay B hücre gelişimindeki ikinci denetim aşamasıdır. Doğru IgM reseptörü üreten hücrelerin gönderdiği sinyaller sonucunda rekombinaz enzimleri durdurulur ve rekombine olmamış diğer hafif zincir lokusundaki rekombinasyonlar engellenir. Bu sayede her bir B hücresi, anne veya babanın allelinden gelen kappa veya lambda zincirinin sadece bir tanesini üretir. Hücre yüzeyinde IgM üreten B hücreleri olgunlaşma basamağının bir sonraki evresi olan olgunlaşmamış (immatür) B hücreleri adını alır. Olgunlaşmamış B hücreleri yüzey proteinleri açısından CD34⁻, CD19⁺, CD20^{yüksek} hücrelerdir (şekil 2-2).



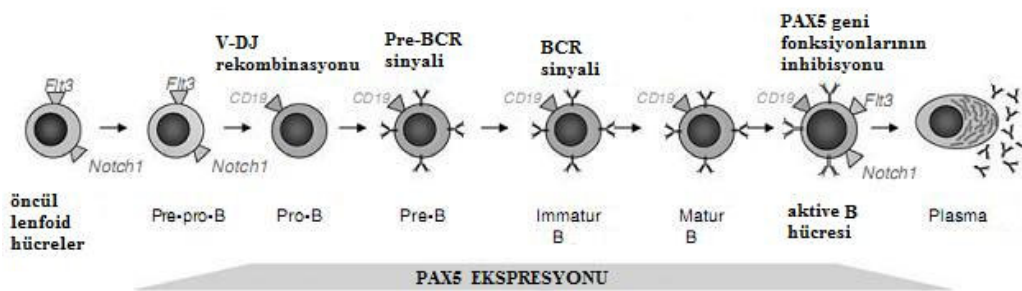
Şekil 2-2: B hücre gelişimi ve hücrelerin farklı yüzey proteinleri [15]

Bu hücrelerin olgun B lenfositlerine dönüşmesi ise kemik iliğinde veya kemik iliğini terk ettikten sonra periferik kanda gerçekleşir [6].

2.3.1. B hücre gelişiminde etkili olan yazılım faktörleri

Hematopoetik hücrelerin gelişimi ve hücrelerin farklılaşması transkripsiyon faktörlerinin ve çeşitli sinyal ileti yollarının kontrolü altındadır. B lenfogenezi erken dönemde üretimi başlayan yazılım faktörleri ve V(D)J rekombinasyonuna uğrayan immünglobulin genlerinin yeniden yapılanmalarının kontrolünde olur [16]. Erken B lenfosit gelişimi ve B lenfositlerine farklılaşması, *IL-7R* ve *FLT3* (fms benzeri tirozin kinaz 3) büyüme faktörleri ile *PU.1*, *E2A*, *EBF* ve *PAX5* gibi yazılım faktörlerinin aktivasyonu sonucu gerçekleşir [3]. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, interlökin 7 reseptörü ve *FLT3* geninin susturulduğu farelerde B hücre yetmezliği olduğu görülmüştür [17]. Yine *PU.1* ve *IKAROS* gibi genler sadece B hücrelerine özgü genler olmamakla birlikte bu genlerdeki bozuklukların B hücre gelişimini bozduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [16]. Erken dönem yazılım faktörlerinden *E2A* ve *EBF* yokluğunda B hücrelerinin IgH yeniden yapılanması gerçekleştirilmeden önceki safhada gelişimlerinin durduğu gözlemlenmiştir [16].

PAX5 yazılım faktörü ise yine erken B hücre gelişiminde rol oynayan önemli bir gen dir (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: B hücre gelişimi sürecinde PAX5 anlatımının rolü [3]

B hücre reseptörünün ağır zincirinde meydana gelen V J ve hafif zincirinde meydana gelen V(D) J yeniden yapılanmaları, lenfositlere özgü rekombinaz genleri olan

RAG1 (“recombination activating gene 1”) ve *RAG2* (“recombination activating gene 2”) ile TdT kontrolü altında gerçekleşen ve pro B aşamasındaki hücreler için karakteristik bir süreçtir [15]. İlk meydana gelen öncü B hücre reseptörü iki ağır zincir ve bunların VpreB (VPREB1) ve $\lambda 5$ (IGLL1) adlı iki bileşeninden meydana gelir. Olgun B hücrelerindeki B hücre reseptör kompleksi, sitoplazmik domainlerinde ITAM motifi (“immunoreceptor tyrosine-based activation motif”) bulunduran $Ig\alpha$ (CD79a) ve $Ig\beta$ (CD79b) üzerinden SYK, SRC ailesi kinazlarından olan LYN, FYN, BLK ve bruton tirozin kinaz (BTK) sinyal yolağını kullanarak B hücresinin çoğalmasını sağlar [18].

2.4. PAX gen ailesi ve PAX5 geni özellikleri

PAX gen ailesi oldukça eski ve evrimsel süreçte korunmuş bir gen ailesidir. 4 alt grupta incelenen toplam 9 üyesi bulunur.

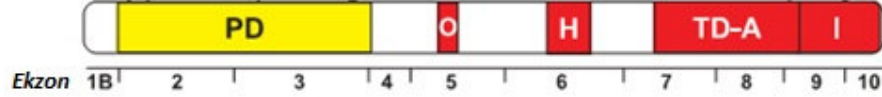
Grup 1’de *PAX1* ve *PAX9* grup 2’de *PAX2*, *PAX5*, *PAX8* grup 3’te *PAX3* ve *PAX7*, grup 4’te ise *PAX4* ve *PAX6* yer alır. Embriyonik dönemde ve organogenezde görev alan PAX ailesi üyeleri; 128 aminoasitlik N-terminal “paired domain” bölgesi, “homeo domain” bölgesi ve DNA’yı bağlayarak transaktivasyonu azaltan “octapeptid domain” bölgesi bulundurarak hedef genlerini transkripsiyon aşamasında etkiler ve bu genlerin anlatımlarını düzenler [2].

PAX5, ilk olarak 1989 yılında deniz kestanesinde keşfedilmiş ve dokuya özel aktivatör protein (TSAP “tissue specific activator protein”) adını almıştır. Daha sonra 1991 yılında memelilerde B hücre gelişimde görev aldığı keşfedilmiş ve adı BSAP (“B cell specific activator protein”) olarak değiştirilmiştir [19]. Biyokimyasal saflaştırması ve klonlanması sonucu bu genin PAX ailesi üyesi olduğu anlaşılmış ve *PAX5* olarak adlandırılmıştır [20]. *PAX5* geni temel olarak B hücre gelişiminde görevli bir gen olsa da ortabeyin gelişiminde de rolü olduğu gösterilmiştir [21].

9p13te yer alan *PAX5*’in 10 ekzonu olmasına rağmen; TATA bölgesi içeren ekzon 1A ve TATA bölgesi açısından fakir ekzon 1B olmak üzere 2 ayrı promotör bölgesi bulunur. Ekzon 1B’ye sahip olan *PAX5*, B lenfositlerinde aktive olurken, Ekzon1A’ya sahip olan *PAX5* ise santral sinir sistemi ve testiste aktive olur [22].

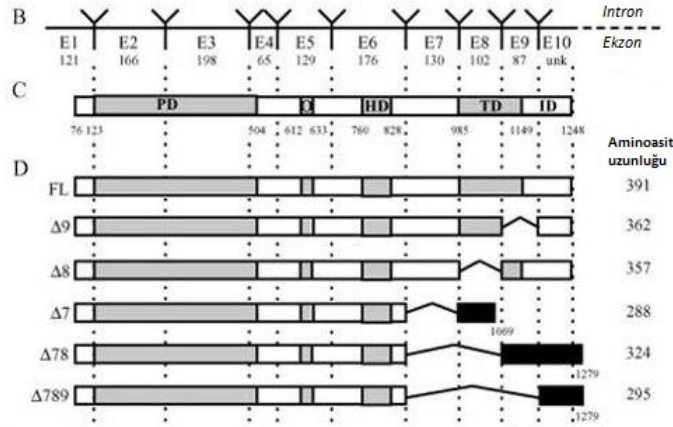
PAX5; diğer PAX ailesi üyeleri gibi; N terminal ucunda bulunan bir “paired domain” bölgesi, oktapeptid bölgesi, “homeo domain” bölgesi ile sadece grup 2 PAX ailesi üyelerinde bulunan (*pax2*, *pax5*, *pax8*) ve hedef genlerinin anlatımını arttırmasını

sağlayan bir prolin, serin ve threonin açısından zengin (PST) transaktivasyon (TD) bölgesi ve hedef genlerini C-terminal bölgesinden yakalayarak anlatımlarını azaltan baskılayıcı (inhibitory) bölgesinden oluşan bir gendir [2]. (şekil 2-4)



Şekil 2-4: PAX5 Geni yapısı; PD; Paired Domain, O;Oktapeptid bölgesi, H; Homeodomain, TD-A;Transaktivasyon bölgesi, I;Baskılayıcı (Inhibitory) bölge[4]

PAX2, *PAX5* ve *PAX8*'i içeren PAX ailesinin 2. alt grubunda bulunan genlerde insanlarda farklı protein dizileri ve karboksi ucundan değiştirilmiş farklı şekillerdeki alternatif kırılmaları da tespit edilmiştir. Bu alternatif kırılmalar, sadece transaktivasyon veya sadece baskılayıcı bölgede, ya da her ikisini kapsayan bir şekilde olabilmektedir. *PAX5* geninin uğradığı değişimler ise 3' ucundan ve ekzon 7-8-9'u kapsayacak şekildedir (şekil 2-5). Yapılan çalışmalarda, *pax5Δ7*, *pax5Δ7/8* ve *pax5Δ7/8/9* formlarının yeni bir protein oluşturduğu, bu proteinin transaktivasyon bölgesindeki (TA) PST açısından zengin kısmı çok daha fazla taşıdığı ve bu nedenle TA bölgesinin daha güçlü bir bağlanma sağladığı gösterilmiştir. *Pax5Δ8* ile *pax5Δ9* delesyonunu taşıyan formlarda ise transaktivasyon açısından bir farklılık tespit edilmediği gösterilmiştir. Ayrıca büyük delesyonlarla meydana gelen ekzon kayıpları *PAX5* geninin diğer hedef genleri ile etkileşimini etkilediği düşünülmektedir [5].



Şekil 2-5: PAX5 geninde görülen delesyonlar [5]

Bu delesyonların onkogenik olup olmadığı hala bilinmemekle beraber bu varyantların *PAX5* ve diğer hedef genlerinin anlatımını değiştirebileceği için tümör gelişiminde rolü olabileceği düşünülmektedir [23].

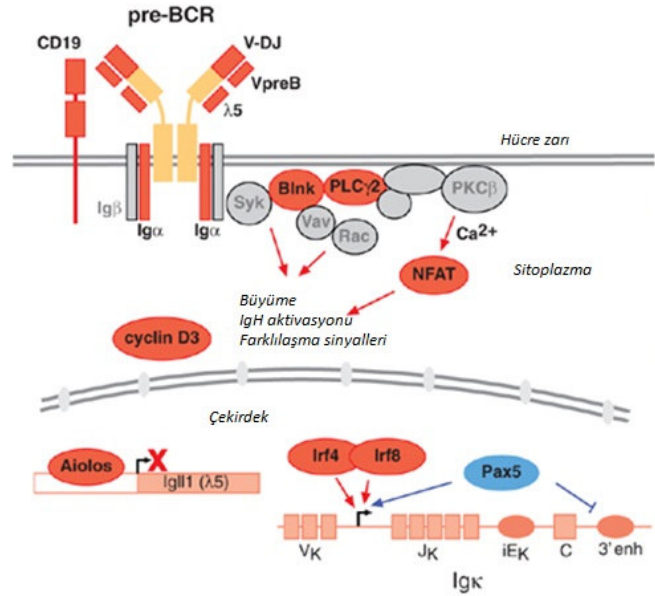
PAX5 geninin diğer önemli bir özelliği ise allelik dışlama özelliğini göstermesidir. Bir çok memeli genleri anne ve babadan gelen iki farklı allel tarafından üretilir. Bunun avantajı, mutasyonlar sonucu herhangi bir allelde bir sorun oluştuğunda diğer allelin görevini yerine getirmeye devam etmesidir. *PAX5* geni, B hücre gelişimi sırasında allel özgü anlatım gösterir. Hücrelerin *PAX5* anlatımı, pro B aşamasından olgunlaşmamış B hücresine gelene kadarki süreçte, sadece iki allelden biri tarafından gerçekleştirilir. Bu gende oluşacak mutasyonlar, sadece B hücrelerinde mutant proteinin üretilmesine neden olacaktır [24].

2.4.1.1. PAX5 geninin B hücre gelişimindeki rolü

PAX5 geninin DNA bağlama aktivitesi ilk olarak Cobaleda ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [3]. *PAX* gen ailesinden sadece *PAX5* hematopoetik sistemde görevlidir. *PAX5* gen anlatımı lenfoid öncül hücrelerden pre-pro aşamasındaki B lenfositlerine geçişte başlar, B hücrelerinin plazma hücresine farklılaşmasıyla son bulur [3]. *PAX5*'in transaktivatör ve baskılayıcı bölgesi olması nedeniyle hedef genlerini hem baskılama hem de aktive etme özelliğine sahiptir. Bu sayede *PAX5* B hücre gelişiminde rol oynayan önemli genleri aktive ederken, diğer hücre serilerinin gelişiminde görevli önemli genlerin susturulmasını sağlar. T hücre gelişiminde önemli rolü olan *NOTCH1*,

makrofaj gelişiminde görevli *MCSF-R* (“Macrophage colony-stimulating factor-receptor / Makrofaj koloni stimüle edici faktör-reseptör”), öncül hücrelerin farklılaşmasında önemli olan *FLT3* gibi farklı hücre serilerinde görevli genlere ek olarak *Sca1* gibi hücre yüzey proteinleri, *CGRP*, *Gp49p* gibi myeloid hücrelerin farklılaşmasında görevli genler ile *CCL3*, *CCL9* gibi bazı kemokinler ve *EMB*, *CCR5* gibi adezyon ve hücre göçünde görevli genler gibi yaklaşık 110 adet gen *PAX5* tarafından baskılanan genler olarak tanımlanmıştır [25].

Bunun yanında B hücre gelişimi ve B hücre reseptör sinyal iletilisinde önemli bir çok genin aktive olması *PAX5* tarafından kontrol edilir. Pre B hücre reseptöründe ITAM motifi ile iletiyi sağlayan *Igα* (CD79a), *VpreB*, $\lambda 5$ ve yine B hücre reseptöründe görevli *CD19* ve *CD21* yüzey proteinleri, merkezi adaptör protein olan *BLNK* (“B cell linker protein”), *Ig* yeniden yapılanmasında görevli *RAG2*, *PAX5* tarafından aktive edilen 170 gen arasından birkaçıdır [26]. (şekil 2-6)

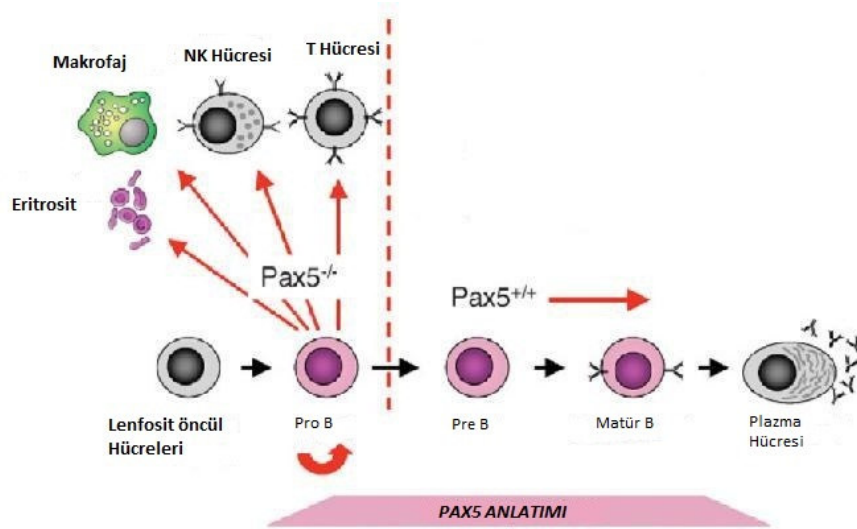


Şekil 2-6: B hücre reseptör yolağı; kırmızı ile gösterilen genler *PAX5* tarafından etkilenen genlerdir [3].

PAX5 olgun B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını da engeller. *XBPI* (“X-box binding protein 1”), *J Chain*, *BLIMP-1* (“B lymphocyte-induced maturation protein-1”) gibi B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşmesini sağlayan genler *PAX5* tarafından baskılanan genler arasındadır. Tavuk olgun B hücrelerinde *Pax5*

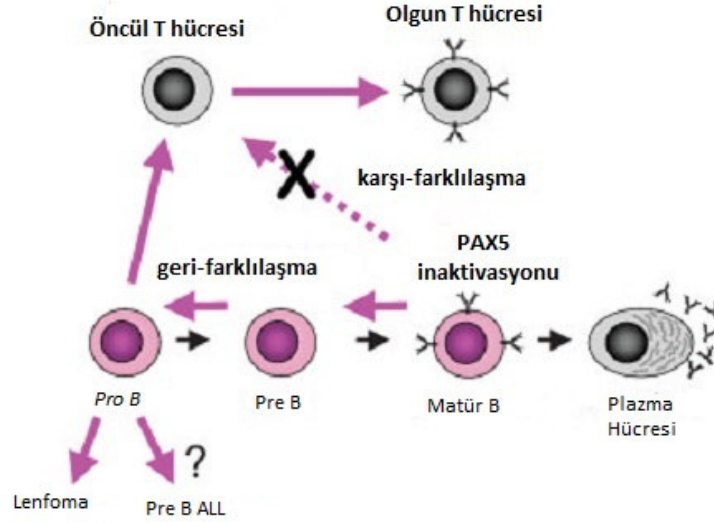
geni susturulduğu zaman bu hücrelerin belirli antijenler ile uyarılması sonucu *Blimp-1* gibi genlerin anlatımını arttırarak plazma hücresine dönüştüğü ve IgM salgıladığı gösterilmiştir [27].

Busslinger ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Pax5^{-/-}* farelerde B hücre gelişiminin pro B aşamasında kaldığı gösterilmiştir [28]. *Pax5^{-/-}* pro B hücrelerinin kendi kendini yenileyebilme özelliklerini kazandığı, B hücrelerine ait olmayan *Flt3* gibi genleri aktive ettiği, *CD19* gibi *Pax5* bağımlı genlerin aktive olmadığı ve bu hücrelerin IgH yeniden yapılanmalarını gerçekleştiremediği görülmüştür. Ayrıca bu hücrelerin çeşitli sitokinler ile uyarılması sonucu diğer hücre serilerine farklılaşabildiklerini gözlemlemiştir. (şekil2-7)



Şekil 2-7: *Pax5^{-/-}* Hücrelerin Diğer hücre serilerine dönüşebilme yeteneği [12]

Aynı grup olgun B hücrelerinde *Pax5* genini susturduğunda, bu hücrelerin önce pro B aşamasına geri döndüğünü daha sonra sitokinler ile uyarıldığında farklı hücre serilerine farklılaşabildiklerini, bu karşı hücre serisine farklılaşmanın (“transdifferentiation”) hücrelerin olgun B aşamasındayken gerçekleşemediğini göstermişlerdir [12]. (şekil:2-8)



Şekil 2-8: *PAX5* inaktivasyonu sonucu meydana gelen karşı farklılaşma ve geri farklılaşma

2.5. KANSER

Kanser, somatik hücrelerin genetik bir hastalığıdır. Tümör karyotiplerinin çoğu sayısal ve yapısal birçok bozukluk taşır. Gelişmiş ülkelerde, ortalama olarak beş kişiden biri kanser nedeni ile hayatını kaybetmektedir. Kanserlin önemi ise çok hücreli organizmalarda hücre davranış bozukluklarını yansıtmışından ileri gelmektedir. Kanser hücreleri, çok hücreli organizmaların kuruluş ve gelişimi ile ilgili en temel davranış kurallarını bozarak gelişim gösterirler. Aşırı bölünme ve normalde başka hücrelere ait olan bölgelere yayılma ve o bölgelerde klonlaşma kanser hücrelerinin en belirgin özelliklerindedir.

Kanserler, köken aldıkları doku ya da hücre tipine göre sınıflandırılırlar. Epitel hücrelerden kökenlenen tümörler karsinoma, bağ dokusu ya da kas dokusundan

kökenlenen tümörler sarkoma olarak adlandırılır. Her iki sınıflandırmaya da uymayan ve hematopoetik hücrelerden kökenlenen kanserler ise lösemi adını alırlar [29].

2.5.1. Lösemilerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Lösemiler, hematopoetik hücrelerin habis transformasyonu sonucu gelişen, heterojen, neoplastik hastalıklar grubudur. Morfolojik yönden, hastalığa tutulan hücre dizisinin tipine göre (myeloid ya da lenfoid) ve proliferen olan kan hücresinin genç ya da olgunlaşmış olmasına göre (akut ya da kronik) sınıflanırlar [30]. Lösemiler diğer kanser tiplerinden farklı olarak çok nadir şekilde ailevi karakter göstermekte ve bu da olayın nedeninin tek gen defektinden çok multifaktöryel ilişkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Akut lösemiler, olgunlaşmamış blast hücrelerinin kemik iliğindeki normal hematopoetik elemanlarının yerlerini almalarıyla ortaya çıkar, myeloid ya da lenfoid hücre serilerinden kökenlenirler. Kronik lösemiler ise, myeloid öncül hücrelerin yayılmasındaki ve farklılaşmasındaki artış ile ortaya çıkar [30].

Akut lösemilerde lösemik hücrelerin kemik iliğini aşırı istilası sonucu normal kan hücrelerinin yapımı engellenir ve buna bağlı olarak anemi, enfeksiyon, kanamalar meydana gelir. Lösemik hücrelerin kökenine göre akut lösemiler 2 ana gruba ayrılır:

- 1- Akut Lenfoblastik Lösemi
- 2- Akut Myeloblastik Lösemi

2.5.2. Akut Lenfoblastik Lösemi

ALL, çocuk ve yetişkinleri etkileyen, lenfoid progenitör hücrelerin malign hastalığıdır [31]. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır. Terapötik ajanların son 20 yılda gelişmesiyle çocukluk çağı ALL tedavisinde bir çok ilerleme kaydedilmiştir. Hastaların hala %25'i nükse uğrarken büyük çoğunluğu tamamen iyileşme şansına sahip olabilmektedir. Hematopoetik kökenli tümörlerin sebebi genellikle farklılaşmayı kontrol eden proto-onkogenlerin aktivasyonuna veya çoğalmasına neden olan spesifik kromozomal translokasyonlar sonucu olur. ALL'de anöploidiler ve kromozomal translokasyonlar tanı ve tedavi için büyük önem taşımaktadır. ALL hastalarının yaklaşık %25'i yüksek hiperdiploidi (>50 kromozom) gösterirler. Bu durum hastalar için kemoterapiye iyi yanıt vermek demek iken, hipodiploidi (<45 kromozom) olan hastalar genelde kötü prognoz gösterirler.

ALL'lerin yaklaşık %75'inde kromozomal translokasyonlar mevcuttur t(12;21)(p13;q22) translokasyonu olan hastalar daha iyi prognoz gösterirken, BCR-ABL füzyon proteininin oluşmasına sebep olan ve ALL hastalarının %2-5'inde görülen t(9;22)(q34;q11) translokasyonu ile t(4;11) translokasyonu kötü prognoz belirteci olarak bilinir [32].

2.5.2.1. B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (B-ALL)

Pediyatrik lösemi hastalarının yaklaşık %75'i immünglobulin gen yeniden yapılanmaları ve hücre yüzey proteinlerindeki artışa bakılarak B-ALL olarak sınıflandırılmaktadır [33]. B-ALL'de karyotipik ve moleküler genetik anormallikler kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır. Hastaların %30'undan fazlasında *TEL-AML1*, *MLL-AF4* ve *E2A-PBX* translokasyonları saptansa da B-ALL hastalarının büyük çoğunluğu başka genetik anomalilikler ve yaygın olmayan kromozom değişimlerini taşımaktadır. Bu hastalığın temelinde apoptoza karşı direnç ve malign hücrelere büyüme avantajı kazandıran genler veya sitokin gibi dış faktörlerin olabileceği düşünülmektedir. Pediyatrik B-ALL kemik iliği kökenli bir hastalıktır. Ancak bu hastalık yenidoğan ve çocukluk çağı hastalarında biyolojik ve klinik olarak farklılıklar göstermektedir [34]. Yenidoğan B-ALL hastalarında *MLL-AF4* t(4;11) translokasyonu bifenotipik B/myeloid serili lösemiye neden olabilir.

Bazı pro B-ALL hastalarında bulunan *E2A-HLF* füzyon genine neden olan t(17;19) translokasyonunun apoptoza karşı dirence sebep olduğu gösterilmiştir [35]. *E2A* geninin katıldığı diğer bir translokasyon ise *E2A-PBX1* füzyon genine sebep olan t(1;19) translokasyonudur. Bu translokasyon pre B-ALL hastaları için karakteristik olup bu alt grup hastalarının yaklaşık %25'inde görülür [36].

2.5.3. *PAX5*'in onkogenezdaki önemi

PAX5 geni özellikle çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerde oldukça dikkat çeken bir hedef genidir. Öncül B hücreli malignansilerin %30'u *PAX5* monoallelilik kayıp veya nokta mutasyonları gösterir. 2007 yılında Mulligan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 242 pediyatrik B-ALL hastasının %31,7'sinde *PAX5* geninde mutasyon tespit edilmiştir [4]. Yine Familiades ve arkadaşlarının 119 yetişkin Pro B-ALL hastasında yaptığı çalışmada hastaların %30'un da *PAX5* mutasyonu tespit edilmiştir [37].

İzotip dönüşümü veya somatik hipermutasyonların lenfomagenezde onkogenik mutasyonlara veya kromozomal translokasyonlara sebep olabilmektedir. Aktivasyon bağımlı sitidin (AID - “activation-induced cytidine”) geninin bu iki süreçte önemli rolü olduğu bilinmektedir. *AID* geninin *PAX5*'in aktive ettiği genler arasında yer almasından ötürü, B hücrelerinde gelişen izotip dönüşümü ve somatik hipermutasyonlara dolaylı olarak *PAX5* geninin de etkisi bulunmaktadır [26].

Yaygın büyük B hücreli lenfomaların (DLBCL) %50'sinden fazlasında atipik hipermutasyonlar tespit edilmiştir [38]. İmmünohistokimyasal çalışmalarda da klasik Hodgkin lenfomalarda ve B hücre serili lenfomalarda *pax5* proteininin artışı gözlemlenmiştir [39]. Kontrolsüz *PAX5* anlatımı sadece lösemilerde değil glioblastoma, nöroblastoma ve medulloblastomada da gösterilmiştir [40].

Delesyonlar ve mutasyonlar haricinde hematolojik kanserlerde *PAX5*'in tanımlanmış birçok translokasyonu vardır. En sık rastlanan B hücreli non hodgkin lenfomalarda görülen *PAX5*-*IGH* füzyon proteini oluşturan t(9;14) translokasyonudur [40]. Bu translokasyon olgun B hücrelerinde *pax5* inaktivasyonunu engelleyerek bu hücrelerin plazma hücresine farklılaşmasını engeller [41]. *PAX5* geninin katıldığı diğer bir translokasyon ise *PAX5* ile elastin (ELN) genini içeren t(7;9)(q11;p13) translokasyonudur. Yapılan çalışmalarda *in vitro* olarak *PAX5*-*ELN* füzyon proteininin CD19 anlatımını bloke ettiği gösterilmiştir. Bu yüzden bu translokasyonun hücrelerin B hücre farklılaşmasını pro B aşamasında durdurarak lösemiye yol açtığı düşünülmektedir [42].

B hücreli ALL hastalarının %1'inden azında yeni bir füzyon proteine yol açan t(9;22)(p13;q13) translokasyonu yine *PAX5* geninin *TEL* geni ile füzyon protein oluşturması ile oluşur [43]. *PAX5*'in FOXP1, ZENF521, PML, AUTS2 ve C20orf112 füzyon proteinlerini oluşturan translokasyonları tanımlanmış olsa da fonksiyonları bilinmemektedir [44].

Diğer bir taraftan, *Pax5*^{-/-} farelerde B hücrelerinin pro B aşamasına geri dönmesi ve kendi kendini yenileyebilme (“self-renewal”) özelliklerini kazanmaları *PAX5* anlatımının mutasyonlar veya negatif düzenleyici translokasyonları sonucu durmasının onkogeneizde rolü olup olmayacağı düşüncesini doğurmuştur. Yapılan çalışmalarda *Pax5*^{-/-} farelerin bir kısmında B hücreli lenfoma gelişirken, IgH lokusunun susmasına neden olan t(9;14) (*Pax5*-*Igh*) translokasyonuna uğratılmış farelerde beklenmedik

şekilde T hücre gelişiminin bozularak bu farelerde T hücreli lenfoma geliştiği gözlemlenmiştir [40].

Bu çalışma ile B hücre gelişimi için kritik öneme sahip olan *PAX5* geninin, B-ALL hastalarında ve hastalık alt gruplarında (erken ve olgunlaşmamış dönem) araştırılmasını amaçlanmıştır. Planlanan bu çalışma ile öncelikle *PAX5* gen ve protein anlatımları normal B hücrelerde, lösemi hücre serilerinde ve B-ALL hastalarına ait primer tümör örneklerinde belirlenmiştir. İkinci olarak hastalardaki *PAX5* gen mutasyonları ve delesyonlar saptanmıştır. Sonuçta amaçlanan *PAX5* geninin B-ALL hastalarında nasıl ve neden bozulduğu ve bu genin B hücreli lösemi patogenezindeki rolünün aydınlatılmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Çalışma, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD. Hematoloji/ Onkoloji Bilim Dalı (n=21), İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ve İç Hastalıkları AD'ları Hematoloji Bilim Dalı (n=26), Sağlık Bakanlığı Göztepe Hastanesi (n=24), Sağlık Bakanlığı Bakırköy Hastanesi (n=20) ve Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Hastanesi (n=11) Çocuk Hematoloji Birimleri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD. Hematoloji/ Onkoloji Bilim Dalı (n=1), Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD. Hematoloji / Onkoloji Bilim Dalı (n=3), Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=2), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi (n=1), Malatya Üniversitesi (n=1), ve Şişli Etfal (n=3) birimlerinden B-ALL tanısı almış çocukluk çağı (0-18 yaş) 134 olguda gerçekleştirilmiştir. Hasta materyali 2007-2010 yılları arasında anabilim dalımıza rutin translokasyon hizmeti almak için gelen hastaların sonuçları raporlandıktan sonra, arta kalan örneklerden elde edilmiştir. Çalışma İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik ve İmmünoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışma öncesi İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan onay alınmış ve örnekleri alınan tüm hastalara çalışmanın kapsamını detayları ile anlatan gönüllü onam formu imzalatılmıştır. Hastaların immünofenotiplerine göre ayrımı EGİL sınıflamasına uygun olarak yapılmıştır [45]. Kontrol grubu olarak; 3 sağlıklı kontrole ait periferik kandan ayrıştırılan CD19 + hücreler, travma nedeniyle ortopedi kliniğine başvuran gönüllü olur formu imzalatılmış sağlıklı kemik iliği örnekleri ve bu örneklerin üçünden akan hücre ölçer yardımıyla ayrıştırılmış pro B(CD34+,CD22+,CD19-) pre B (CD34+,CD19+,CD20+) ve olgunlaşmamış B (CD34-,CD19+) hücreler kullanılmıştır.

3.1.2. B-ALL Hastalarına ait klinik parametreler

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özellikleri Tablo 3-1'de gösterilmiştir. Akut lösemi hastalığının prognostik belirteçlerinden birisi de hastaların kemik iliği blast yüzdelerinin %20'den yüksek olmasıdır. Hastalarımızdan bir tanesinin kemik iliği blast yüzdesi %16 olmasına rağmen immünofenotip bulgularına bakılarak hastaya B-ALL teşhisi koyulması sebebiyle bu hastada çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 3-1: Hastaların Klinik Parametreleri

KLİNİK PARAMETRELER	PRO B ALL (n=17)	PRE B ALL (n=107)	Olgunlaşmamış B ALL (n=10)	Toplam B ALL (n=134)
CİNSİYET				
Kadın	8	62	4	74
Erkek	9	45	6	60
YAŞ				
<1yaş	0	4	0	4
<10 yaş	9	88	6	103
≥10 yaş	8	19	4	31
Tanı beyaz kan hücresi değeri (WBC) (G/L)				
Medyan	12800	12900	59400	28360
Minimum-maksimum değerler	3110-238000	1700-702000	6200-290000	1700-702000
Tanı Hb değeri(g/dl)				
Medyan	9.2	8.25	6.5	8
Minimum-maksimum değerler	5.1-11.3	1.4-11.9	5.3-13	1.4-13
Tanı Plt değeri (G/L)				
Medyan	77000	52500	37000	55.500
Minimum-maksimum değerler	1500-363000	3000-490000	34000-130000	1500-490000
Kemik iliği blast yüzdesi (%)				
Medyan	84	92	94	90
Minimum-maksimum değerler	41-100	16-100	88-100	16-100
Translokasyonlar				
t(4;11)	0	2	0	2
t(9;22)	0	1	2	3
t(12;21)	1	11	0	12
Tümör lysis				
Var	0	3	1	4
Yok	13	66	7	86
Bilinmeyen	4	38	2	44
Merkezi Sinir Sistemi				
Tutulumu				
Var	0	0	1	1
Yok	8	31	5	44
Bilinmeyen	9	76	4	89
Lenfadenopati				
Var	5	37	5	47
Yok	9	35	3	46
Bilinmeyen	3	35	2	40
Splenomegali				
Var	6	45	5	56
Yok	8	31	3	42
Bilinmeyen	3	31	2	36
Hepatomegali				
Var	10	48	6	64
Yok	4	29	2	35
Bilinmeyen	3	50	2	55

3.1.3. Kimyasallar

B-Merkaptoethanol	Sigma, Almanya
Etil Alkol	Merck, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Bromfenol mavisi	Sigma, Almanya
Gliserol	Sigma, Almanya
Tris baz	Sigma, Almanya
Ponceau S	Sigma,Almanya
Nonidet P40 (NP40)	BDH, Almanya
Sodyum florid	Sigma,Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
TEAA Buffer A	Wave System
TEAA Buffer B	Wave System
Syringe Wash Solution	Wave System
Buffer D	Wave System
%40 Akrilamid Solüsyon	AppliChem,Almanya
Agaroz	invitrogen, İsviçre
Yağsız süt tozu	Santa Cruz, İngiltere
Sheat Fluid	BD, ABD
TEMED	Sigma, Almanya
Amonyum persülfat	Applichem, Almanya
Metanol	Merck, Almanya

3.1.4. PZR Materyali

GoTaq DNA polimeraz (10U/μl)	Promega, ABD
5X Colorless Flexi Buffer	Promega, ABD
25mM MgCl ₂	Promega, ABD

10mM dNTP miks MBI Fermentas, Litvanya

3.1.5. cDNA Sentez Materyali

5X RT Buffer MBI Fermentas, Litvanya

10 mM dNTP miks MBI Fermentas, Litvanya

DTT MBI Fermentas, Litvanya

RNaz inhibitör (20U/ μ l) MBI Fermentas, Litvanya

Revers Transkriptaz (200 U/ μ l) MBI Fermentas, Litvanya

Random primer MBI Fermentas, Litvanya

3.1.6. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Etidyum Bromür

Steril ddH₂O ile 10mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı.

Agaroz jel yükleme tamponu (50X)

10 ml steril ddH₂O içinde %0,25 Bromfenol mavisi, %30 gliserol olacak şekilde hazırlandı.

Tris-asetat EDTA-TAE (500 ml, 50X)

121 gr Tris baz, 28,5 ml glasiyal asetik asit, 50 ml EDTA 0,5M ddH₂O ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

Solüsyon D

10 ml EL (eritrosit lizis) çözeltisi içinde 100 μ l β -Mercaptoetanol eklendi.

Lysis Buffer

250 ml ddH₂O içinde 1mM Tris (pH:8) , 5M NaCl, 0.5M EDTA, 0.5M NaF, 25 ml %100 gliserol, 2.5ml NP40 olacak şekilde hazırlandı.

0.5 M Tris pH 6.8

15.1 gr Tris'e 250 ml'ye kadar ddH₂O eklenir. 5N HCl ile pH ayarı yapıldı.

1.5M Tris pH 8.8

45.4 gr Tris'e 250 ml'ye kadar ddH₂O eklenir. 5N HCl ile pH ayarı yapıldı.

Elektroforez Buffer

1000 ml ddH₂O içerisine 145 gr glisin, 30 gr tris, 50 ml %10 SDS eklendi.

10X blot buffer pH 8.0

1000 ml ddH₂O içerisine 144.1 glisin, 30.3 tris eklendi. 1X blot buffer hazırlanırken %20 metanol eklenerek sulandırıldı.

10X TBS

1000 ml ddH₂O içerisine 100 mM Tris, 1.5M NaCl eklendi. 5N HCl ile pH 7.4'e ayarlandı.

TBS-Tween

100 ml 10X TBS üzerine 900 ml ddH₂O koyuldu. Hazırlanan solüsyona %0.05 tween 20 eklendi.

2X Protein Loading Buffer

30 ml ddH₂O içerisine 6ml 1.5M Tris pH 6.8, 4.5 ml beta-merkapto-ethanol, 9ml %20 SDS, 10.34 ml %87 gliserol, 250µl, Broom fenol mavisi eklendi.

StripBuffer

50 ml ddH₂O içerisine 6.25 ml 0.5M tris pH6.7, 10 ml %10 SDS, 349 µl B-ME eklendi.

3.1.7. Kullanılan Cihazlar

Hassas terazi (Shimadzu)

Otomatik pipetler (Glison, Eppendorf)

eker ocak (Kermanlar)

Otoklav (Kermanlar)

Distile su cihazı (Millipore)

Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) (Arçelik, Sanyo, Bosch,

Heraeus Sepatech)

Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)

Masa üstü mini santrifüj (Hettich, Eppendorf)

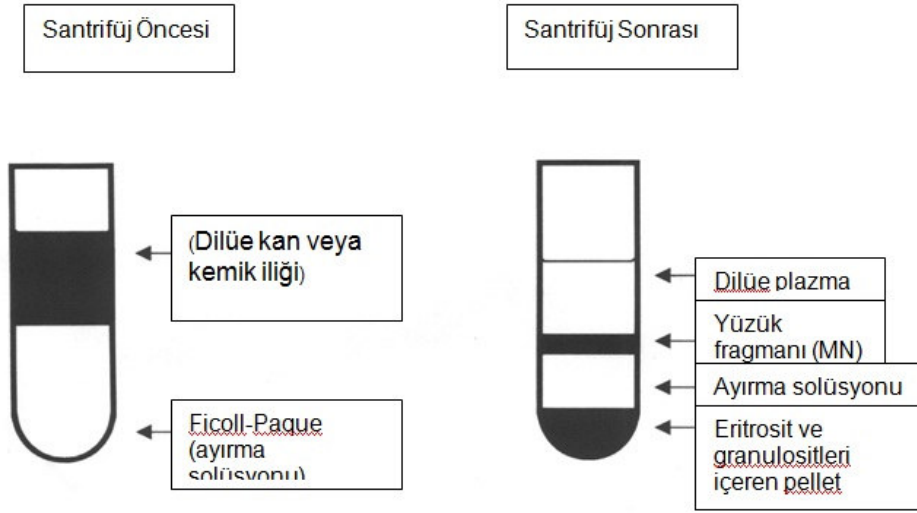
CCD kamera- bilgisayar donanımı (BIO-RAD)

Elektroforez aleti (Stratagene)
Güç kaynağı (Stratagene)
PZR cihazı (Techne)
Vorteks (Kermanlar)
Flow kabin (Thermo Scientific)
Spektrofotometre (Nanodrop)
DHPLC (Wave System)
Flow Sitometri- FACS Aria II (Becton Dickinson)
Blotting cihazı (Thermo Scientific)
Mini SDS/PAGE elektroforez (Thermo Scientific)
Vİ-CELL cell viability analyzers (Beckman Coulter)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Lökosit İzolasyonu

Hastalardan alınan kan/kemik iliği örneklerinden fikol-histopak (Ficoll-hypaque) yöntemi kullanılarak lökosit izolasyonu yapılmıştır. Fikol ile ayırıştırma yöntemi yoğunluk gradientine dayanmaktadır. Pıhtılaşmamış kan veya kemik iliği örneği fosfat tampon çözeltisi ile (PBS) sulandırıldıktan sonra dikkatlice fikolun üzerine yayılır. 2060 rpm’de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte 3 faz gözlemlenir. Örnekler; en altta sedimentasyona uğrayarak dibe çöken eritrositler ve yoğunlukları nedeniyle ayırıştırma solüsyonu olan fikolu geçebilen granülositler, orta fazda “buffy coat” adı verilen ve ayırıştırma fazının üstünde toplanan mononükleer hücreler (lenfosit, monosit, trombositler) en üst fazda ise plazma olacak şekilde ayrılırlar (şekil: 3-1). Pastör pipeti ile yeni tübe toplanan mononükleer hücreler, trombositlerden uzaklaştırılmak için 2 defa PBS ile yıkandı. Elde edilen Lökosit pelleti 600µl solüsyon D içinde çözülerek, steril vidalı kapaklı tüpte -80°C’de saklandı.



Şekil 3-1: Fikol yöntemi kullanılarak tam kandan mononükleer hücre izolasyonu

3.2.2. RNA Eldesi

600µl solüsyon D (guanidyum tiosiyanat ve beta merkaptöetanol içeren kuvvetli denatüran madde) içindeki lökosit örneklerinden, standart kit protokolüne uygun bir şekilde RNA izole edildi. (Qiagen, Almanya) RNA konsantrasyonu ve kalitesinin tayini için spektrofotometre (ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc. USA) kullanıldı.

3.2.3. cDNA Sentezi

Spektrofotometre kullanılarak RNA örneklerinin kalitesi ve miktarları ölçüldü. 1µg RNA ile cDNA sentezine başlandı. 20 µM random primer eklenerek 65°C'de 10 dakika bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı ilave edilmek üzere buza alındı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımının kondüsyonu

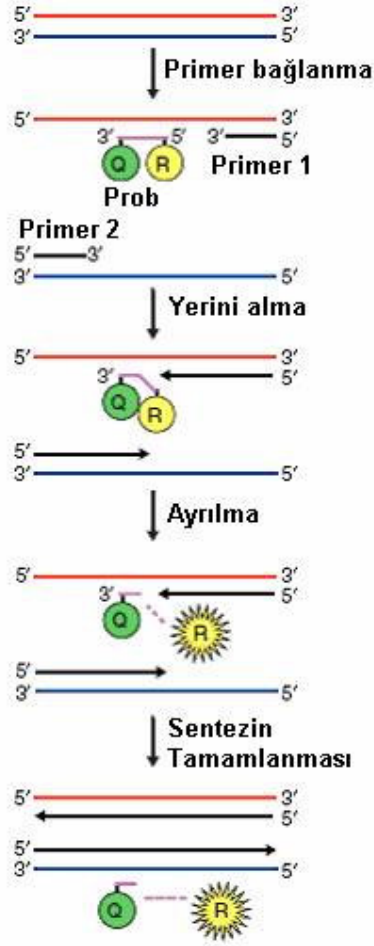
<i>Karışım</i>	<i>miktar</i>
5X RT Tampon	4µl
10 mM dNTP miks	2µl
DTT (0,1M)	1µl
RNaz inhibitör (20U/µl)	1µl
Revers Transkriptaz (250 U/µl)	1µl
Toplam	9µl

Hazırlanan karışım, örneklerin üzerine eklendikten sonra örnekler, 25°C’de 10 dk, 42°C’de 1 saat ardından da 70°C’de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

3.2.4. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Eş zamanlı kantitatif PZR, amplifikasyon gerçekleşirken izlenebilen, floresan işaretleyicilerin kullanıldığı ve alınan floresan yoğunluğunun, amplifikasyon ürünü ile doğru orantılı olarak arttığı bir yöntemdir. Özgün (işaretli proplar) ya da özgün olmayan işaretleyiciler (SYBR green vb) kullanılmaktadır. İşaretli proplardan en sık kullanılanları hidroliz ve hibridizasyon propları ile “Molecular beacon” ve “Scorpion” proplardır [46].

Bu çalışmada hidroliz prob çalışma prensibine dayanan UPL propları kullanılmıştır. Hidroliz propları DNA’ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) olarak adlandırılan işaretli eklentiler bulunmaktadır. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası, 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA’ya bağlanma durumunda floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında ise hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında hidroliz proplar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM’ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı oldukça floresan salınımı da bu artışa bağlı olarak devam eder. (şekil 3-2)



Şekil 3-2: Hidroliz probunun çalışma prensibi

Bu çalışmada, Light Cycler 480 cihazı kullanılarak (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) B-ALL hastaları (n=134) *PAX5* geni anlatım seviyeleri tespit edildi. *PAX5* genine özgü primer ve problar “Roche Applied Sciences” firmasının hizmeti olan insan uluslar arası prob kütüphanesinden (UPL) yararlanılarak tasarlandı. (şekil 3-3)

Use probe #36 (cat. no. 04687949001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	405 - 424	60	60	gtcccagcttccagtcacag
Right	18	452 - 469	60	67	gtgctcaccgaggacacc
Amplicon (65 nt)					
gtcccagcttccagtcacagcatagtgctccactggctccgtgacgcaggtgtcctcggtagacac					

Şekil 3-3: *PAX5* genine uygun primer ve prob çifti

Eş zamanlı kantitatif PZR'da kullanılacak karışım; Forward ve reverse primerlerden 5uM, hidroliz probundan 0.5uM, Light Cycler 480 probe master karışımından (Roche Applied Sciences, Germany) 5ul eklenip son hacmi 8ul olacak şekilde hazırlanarak 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı. Karışım dağıtılan her bir kuyucuğun üzerine hasta örneğinden 2 ul (100 ng/ul) cDNA eklenerek gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi.

3.2.4.1. Referans genlerin belirlenmesi

Referans genler her dokuda eşit miktarda ekspresyonunun olduğu bilinen hücresel yaşam fonksiyonlarından sorumlu genler arasından seçilir. Verilerin normalizasyonu gerçek zamanlı PZR yönteminde gen kantifikasyonu için ana basamaklardan biridir [47]. Bu genlerin anlatım düzeyleri, eş zamanlı kantitatif PZR ile ölçülerek, Microsoft-Excel tabanlı bir yazılım olan GeNorm programı (V3.4, Belgium) kullanılarak analiz edilmiştir. GeNorm her bir deney için en uygun aday referans genlerin belirlendiği bir sistemdir. Alt yapıyı oluşturan prensipler ve formüller Vandesompele ve ark. tarafından tanımlanmıştır [48]. Analizler sonucunda normalizasyon için *ABL*, *B-aktin*, *GAPDH*, *Siklofilin*, *HPRT*, *TBP*, *MRL* olmak üzere toplamda 7 referans gen analiz edilmiş, *Siklofilin* çalışma grubunda en stabil olan referans gen olarak belirlenmiştir.

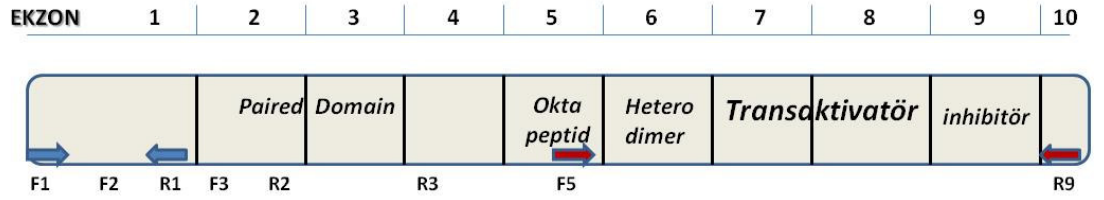
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PAX5 geninin promotör, transaktivatör ve inhibitör bölgelerine özgü primerler CLC workbench 3.6.1 (Danimarka) programı kullanılarak tasarlandı. Seçilen primerler 'NCBI Blast Search' DNA dizi karşılaştırma sayfasında taranarak bu primerlerin hem *PAX5* geninde (*NM_016734*) yerleşimli olduğu hem de insan genomunda başka bölgelere bağlanmadığı kontrol edildi. Tasarlanan primerler Tablo 3'te gösterilmiştir. Primerlerin *PAX5* geni üzerindeki yerleşimleri şekil 3-3'te gösterilmiştir.

Tablo 3-3: PAX5 geni delesyon ve mutasyonları tespit etmede kullanılan primerler

<i>Primer adı</i>	<i>Primer dizisi</i>	<i>T_m</i>	<i>bağlanma ısısı</i>	<i>ürün boyu</i>
Ekzon1F	AGCACTGCTGCTCTCCCG	60,4	60	341
Ekzon1R	CGCTCACAGGTCGGAATAAT	54,8		
Ekzon5F	AAGCGCAAGAGAGACGAA	54,1	55	714
Ekzon9R	TTCAGGCAAGTGGGGAT	56,5		

Şekil-3-4: Tasarlanan primer çiftlerinin PAX5 geni üzerindeki yerleşimi



Promotör bölge (ekzon 1) mutasyonları taramak için F1R1 bölge PZRleri yapıldı. Transaktivatör (ekzon 7-8) ve inhibitör (ekzon 9) bölgede oluşan delesyonları ve mutasyonları tanımlamak için ise F5R9 PZR yapıldı. PZR koşulları (tablo 3-4) ve PZR kondüsyonları (tablo 3-5) aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 3-4: PZR kondüsyonları

<i>F1R1 PZR</i>		<i>F5R9 PZR</i>	
10X buffer	5 µl	10X buffer	5 µl
Mgcl2	2.5 µl	Mgcl2	3 µl
dNTP (5mM)	4 µl	dNTP (5mM)	3 µl
F1 (5pmol)	2.5 µl	F5 (5pmol)	2.5 µl
R1 (5pmol)	2.5 µl	R9 (5pmol)	2.5 µl
taq	0.1 µl	taq	0.3 µl
dH2O	32.4 µl	dH2O	31.7 µl

Tablo 3-5: PZR Koşulları

F1R1 PZR koşulları		
Denatürasyon	95 °C	5 dk
35 siklus		
denatürasyon	94 °C	1 dk
primer bağlanma	60 °C	45 sn
uzatma	72 °C	45 sn
uzatma	72 °C	10 dk
F5R9 PZR koşulları		
Denatürasyon	95 °C	5 dk
40 siklus		
denatürasyon	94 °C	1 dk
primer bağlanma	59 °C	50sn
uzatma	72 °C	2dk
uzatma	72 °C	10dk

3.2.5.1. Agaroz Jel Elektrofrez

%2'lik konsantrasyonda agaroz jel hazırlanması için 1gr agaroz tartılarak 50 ml 1X TAE solüsyonu içinde bir beherde çözüldü. Karışım mikrodalga fırında homojenize olana kadar kaynatıldı. Takiben 56°C'ye kadar soğutularak içerisine 10mg/ml stok olarak hazırlanmış etidyum bromür solüsyonundan 1µl çeker ocak altında eklendi. Sıvı haldeki agaroz elektrofrez tepsinine döküldü. Taraklar yerleştirildi ve jelin donması için beklendi. Tepsi 1X TAE solüsyonu içeren yatay elektrofrez tankına yerleştirildi. Toplam 50µl volümde gerçekleştirilen PZR ile çoğaltılmış bölgenin kontrolü amacı ile 10 µl örnek alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırıldı. %2'lik agaroz jele 100bp DNA (Promega) marker ile yüklenen PZR ürünleri, 90 miliamper akımda yaklaşık 30dk. yürütüldü. UV ışık altında CCD kamera ile görüntüler bilgisayara aktarıldı.

3.2.6. DHPLC

DHPLC (denatüre edici yüksek performans sıvı kromatografisi) metodu, önceden tanımlanmış genleri, bilinen ve bilinmeyen genetik varyasyonlar ve mutasyonları için analiz etmeye yarayan bir methodur. Genlerdeki mutasyonları dHPLC sistemiyle taramak, komplementer ipliklerin DNA çift heliksini oluşturmak için spesifik bağlanmasına dayanır. Eğer gende tek nükleotidlik bir mutasyon oluşursa dahi iki

homodupleks ve iki heterodupleks oluşur ve bağlanma daha gevşektir. DNA çift sarmalını denatüre etmek için yüksek sıcaklıklar kullanılabilir. Eğer bir mutasyon oluşursa, heterodupleksin erime ısı, homodupleksinkinden daha düşük olacaktır. dHPLC de UV deteksiyon için UV lambası kullanılmaktadır. Kısmen erimiş DNA, mutasyon içermeyen erimemiş DNA homodupleksinden daha erken denatüre olacağından kolondan daha erken geçecektir. Böylece analiz sırasında, homodupleks pikinden daha erken dönemde başka bir pik gözlenecektir [49]. dHPLC sisteminin dizilemeden önce kullanılması hem maliyeti düşürmesinden, hem de uygulama ve analiz kolaylığından dolayı mutasyon ve SNP taramalarında avantaj sağlamaktadır.

%2'lik jelde amplifikasyonu gösterilen örnekler, *PAX5* amplikonlarına göre belirlenmiş olan ısılarda dHPLC'ye yüklendi (Tablo 3-5). Bu yükleme sırasında her enjeksiyon başına örneklerden 8 µl kullanıldı. Bu çalışmada örneklerin yanı sıra 2 adet standart (low ve high standartlar) ve her amplikon için mutant olmadığını bilinen 2 örnek kullanıldı. dHPLC'de örnek analizler bu standart ve kontrol örneklerine göre yapıldı. Farklılık arz eden hasta örnekleri çift yönlü dizilemeye gönderildi.

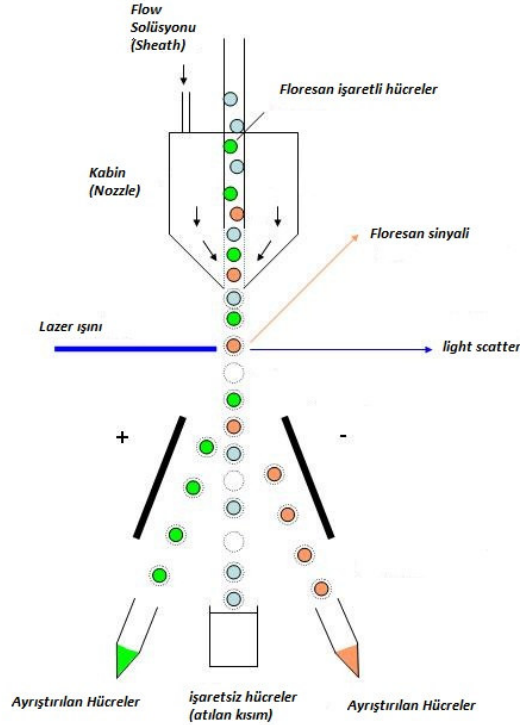
3.2.7. Dizileme Analizi

dHPLC'de farklılık gösteren örnekler için dizileme ve saflaştırma hizmetleri ticari firma aracılığı ile alındı. Dizileme sonuçlarına online olarak ulaşıldı ve CLC workbench 3.6.1 (Danimarka) programı kullanılarak analiz edildi.

3.2.8. Akan hücre ölçer (Akım sitometri) ile hücre ayrıştırma

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin incelenmesidir. "Akım" sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir. Akan hücre ölçer genel olarak; akış sistemi, ışık kaynağı (lazer), filtreler ve sinyal dedektörleri, ayırma mekanizması, bilgisayar ve yazılım programından oluşmaktadır [9]. Analiz kısmı ise hücre süspansiyonunun hazırlanması, hücrelere monoklonal antikor eklenmesi, cihazın kalibrasyonu, kontrol ve örneklerin cihazda işlenmesi, veri analizi ve veri yorumu aşamalarından oluşur. Akan hücre ölçerde hücre büyüklüğü, granülitesi ve hücrede incelenmek istenilen antijene özgü monoklonal antikorlar kullanılarak hücre yüzey proteinleri araştırılabilir. Tek floresan boya kullanılarak hücreler tek tip yüzey proteinine göre incelenebilirken, çoklu boyama (multicolor) özelliği olan akan hücre

ölçerlerde birden fazla floresan boya kullanılarak hücreler alt gruplara ayrılabilir. (şekil 3-5)



Şekil 3-5: Çoklu boyama ile akan hücre ölçerde birden fazla hücrenin ayrılması

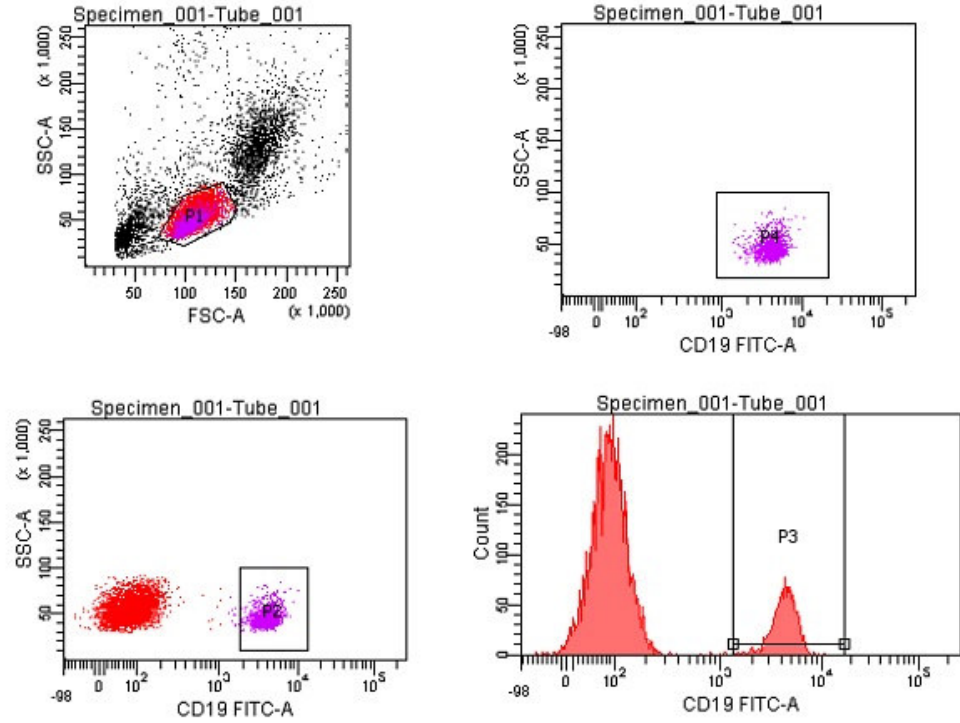
Ayrıştırma işlemi öncesi cihazın günlük kalibrasyon ayarı olan CST (Cytometer Setup & Tracking Beads, BD) boncukları ile ayarı yapıldı. Daha sonra hücrelerin istenilen saflıkta ve kalitede ayırımını kalibre etmek için Accudrop Delay boncukları kullanılarak cihaz ayarı yapıldı. Bu işlemlerden sonra hücreler FACS Aria II cihazında okutuldu. Tüm çalışmalar FACS Aria II (Becton Dickinson, ABD) ile yapıldı. Analizler FACS Diva 6.1.2 (Becton Dickinson, ABD) yazılımı ile gerçekleştirildi.

3.2.8.1. Mononükleer hücrelerden olgun B hücre ayrılması

Fikol ayrıştırma yöntemi ile ayrılan lökositler hücre sayım cihazında (Vİ-CELL cell viability analyzers, Beckman Coulter, ABD) sayıldı. Elde edilen hücreler fosfat tampon çözeltisi ile 3000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilerek 2 defa yıkandı. Daha sonra olgun B lenfositlerini işaretlemek için hücreler PBS+ %1 FBS (Fötal buzağı

serumu/fetal calf serum) yıkama solüsyonu içerisine alındı ve 1×10^6 hücre'ye $5 \mu\text{l}$ antikor (CD19-FITC, Klon HIB19, BD) eklenerek karanlıkta, buz üzerinde 20 dk. inkübasyona bırakıldı. Boyama işlemi sonrası hücreler tekrar yıkama işleminden geçirildi. Akan hücre ölçerinde önden saçılım (FS) –yandan saçılım (SS) grafiğinde lenfositler kapılındı. Lenfosit kapısı içerisinde yandan saçılım ve FITC floresan şiddetlerini gösteren dot-plot ekranı ile çalışıldı.

IST. UNI. IST. TIP FAK. DETAE IMMUNOLOJİ AB.



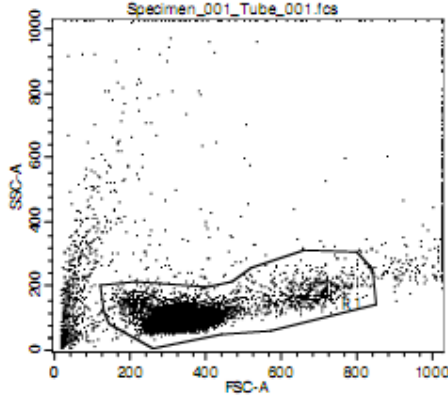
Şekil 3–6: Olgun B lenfosit izolasyonu

FITC floresan ışması veren hücreler ayrı bir tübe ayrıştırıldı. Ayrıştırma (sorting) sonrası elde edilen 500.000 olgun B hücresi RNA izolasyonu için solüsyon D içine alındı.

3.2.8.2. B hücre gelişiminde görülen B hücre alt gruplarının ayrılması

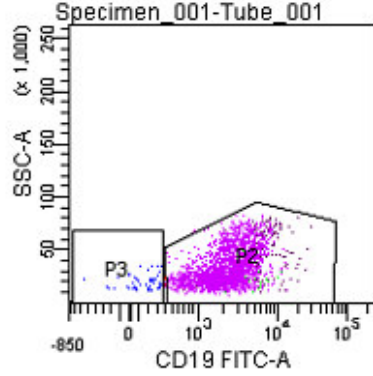
Hücre sayım cihazında sayılan hücreler PBS+ % 1 FBS solüsyonunun içerisine alındı. 1×10^6 hücre'ye $5 \mu\text{l}$ antikor (CD19-FITC, Klon HIB19, BD) eklenerek

karanlıkta, buz üzerinde 20 dk. inkübasyona bırakıldı. Akan hücre ölçerde önden saçılım (FS) –yandan saçılım (SS) grafiğinde lenfositler kaplandı. (şekil 3-7)



Şekil 3-7: Önden-saçılım / Yandan saçılım grafiğinde alınan lenfosit kapısı

Öncelikle hücreler CD19 yüzey proteini taşıyıp taşımadıklarına göre 2 ayrı tübe ayrıldı.



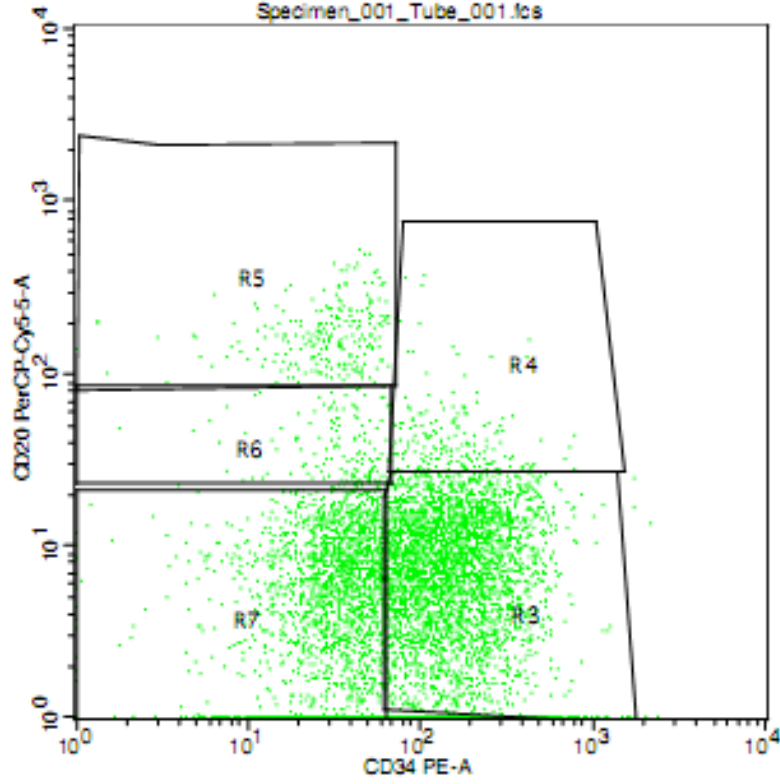
Şekil 3-8: FITC floresan şiddetine göre CD19+ ve CD19- hücrelerin ayrı ayrı kapılanması

CD34+,CD19-,CD22+ pro B hücrelerini izole etmek için CD19- hücreler CD34 (anti-CD34-PE Klon 563, BD) ve CD22 (anti-CD22-FITC Klon S-HCL-1,BD) antikorları ile muamele edildi.

CD19+ hücreler ise CD34, CD20 (anti-CD20-PerCP-Cy5.5 Klon L27, BD) ve IgM (anti-IgM-APC, Klon G20-127,BD) boyaları ile muamele edildi.

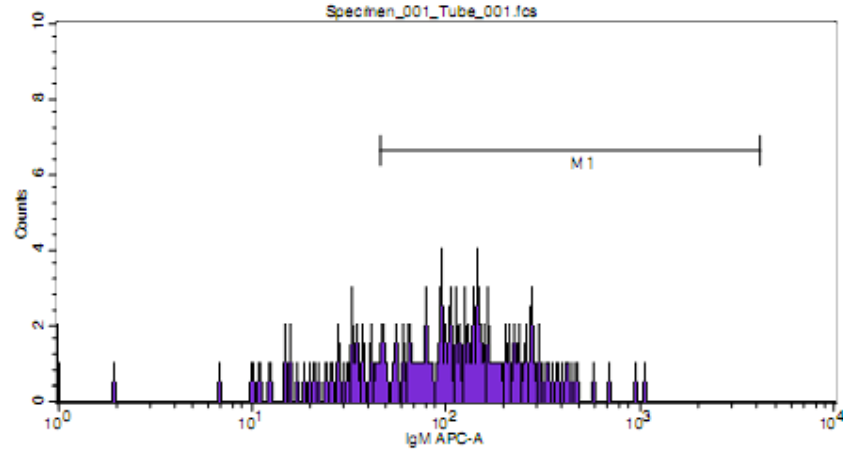
CD19+ hücreler B gelişimi sırasında görülen alt gruplara göre (şekil 2-2) ayrı ayrı kaplandı. Pre B I hücreleri R3 ,Pre B II küçük hücreleri R7, Pre B II büyük

hücreler R6 bölgesi ile kaplandı. Hastalar Pro B, Pre B ve Olgunlaşmamış B ALL olarak gruplandırıldığından bütün pre B lenfositleri aynı tübe ayrıştırıldı. Olgunlaşmamış B hücreleri ise R5 bölgesi ile kaplanarak ayrıştırıldı. (Şekil 3-9)



Şekil 3-9: CD34 / CD20 grafiğinde B hücre alt gruplarının kaplanması

R5 bölgesinden izole edilen hücrelerden olgunlaşmamış B hücrelerini ayırt etmek için yüzeyinde IgM olan hücreler (olgun B hücreleri) ayrıştırıldı. (şekil 3-10)



Şekil 3–10: Olgun ve olgunlaşmamış B hücrelerini ayırt etmek için IgM boyaması yapıldı. M1 ile işaretli hücreler yüzey IgM pozitif olgun B hücrelerdir.

3.2.9. Western Blot

Western blot, diğer adıyla protein immünblot, bir hücre ya da doku ekstraktındaki aranan özgün proteinleri tespit etmeye yarayan bir yöntemdir.

3.2.9.1. Protein Lizatın hazırlanması

Kan/kemik iliği örneklerinden izole edilen lökositler PBS ile sulandırılarak sayıldı. 50×10^6 hücre'ye 1 ml lizis tampon çözeltisi olacak şekilde hücreler lize edildi. Oluşan lizata 5'te 1 oranında proteaz inhibitör eklendi. Lizat 98°C 'de 5 dk. kaynatıldı. Hücreler 12000 rpm'de 20 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen üst faz yeni tübe alındı. Hazırlanan protein örnekleri çalışma gerçekleştirilene kadar -80°C 'de saklandı.

3.2.9.2. SDS-PAGE Jel elektroforezi ve Blotting

%40'lık akrilamid stok solüsyonundan 2.4 ml, 1.25 ml 1.5M Tris pH:8.8, 50 μl %10 SDS, 25 μl %10 APS ve 5 μl TEMED karıştırılarak %10'luk akrilamid jel hazırlandı. Jel hızlıca 75 mm'lik standart taraklar ile hazırlanmış dikey elektroforez camlarına döküldü. %10'luk yürütme jeli donduktan sonra ayırıcı jel (550 μl akrilamiks, 300 μl 0.5M Tris pH 6.8, 25 μl %10 SDS, 25 μl %10 APS ve 5 μl TEMED) hazırlandı ve yürütme jelinin üzerine dökülerek hızlıca taraklar yerleştirildi. Jel tamamen donduktan sonra taraklar kaldırıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Jellerin arası elektroforez tamponu ile dolduruldu. Protein lizatlara jele yüklenmeden önce 1:1 oranında 2X protein yükleme tamponu eklenmelidir. Lizat örnekleri 98°C 'de 5 dk

kaynatıldıktan sonra jelle yüklendi. Jel 30 mA'de yaklaşık 70 dk yürütüldü. Yürütülen jeldeki proteinler yarı-kuru transfer cihazında PVDF membrana aktarıldı. Aktarım sonrası protein bantları kontrol edilmek istenirse membran Ponceau S ile boyanabilir. Özgün olmayan bağlanmaları engellemek için membran 1 saat oda sıcaklığında %5'lik yağsız süt tozu içeren TBS-Tween içerisinde bekletildi. Daha sonra membran %5'lik yağsız süt tozu içerisinde birincil antikor ile +4°C'de gece boyunca inkübe edildi (Human PAX5 anti-mouse, 42kDa, Klon 24, BD, ABD). Bağlanmayan antikorları membrandan uzaklaştırmak için membran 3 defa TBS-Tween, 2 defa ise TBS solüsyonu ile yıkandı. Birincil antikoru tespit edebilmek için HRP boyalı ikincil antikor %5'lik yağsız süt tozu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında membran ile inkübe edildi (Anti-mouse, Milipore, ABD). Aynı şekilde bağlanmayan ikincil antikorları uzaklaştırmak için membran 3 defa TBS-tween, 2 defa ise TBS ile yıkandı. HRP boyasını görünür kılmak için kemiluminesans substratı (Lumi-Light Western Blotting substrate, Roche Applied Sciences, Almanya) eklenerek karanlık odada görüntü alındı. Çalışmamızda referans protein olarak Beta-Aktin proteini kullanılmıştır. (Human Beta-actin anti-rabbit, 42 kDa) Pax5 ve Beta-aktin proteinlerinin ağırlıkları aynı olduğu için önce beta-aktin proteini tespit edilmiş daha sonra membran 1 saat 55°C'de strip buffer ile bekletilerek üzerindeki bütün bağlanmalar kaldırılmıştır. Bu sayede aynı membran Pax5 protein tespiti için kullanılmıştır. Pax5 proteini pozitif kontrol örneği olarak pre B-ALL hücre serisi NALM-6 kullanılmıştır.

3.2.10. Hücre kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında insan pro B-ALL (FLEB14-4), pre B-ALL hücre serileri (NALM6, REH), karışık lenfosit populasyonu olan hücre serileri (MV4:11, SUPB27), T-ALL (JURKAT, MOLT4, CEM, RPMI8402) ve AML hücre serileri (NB4) kullanılmıştır. Hücreler (10^6 /ml) %10 FBS, streptomisin (100mg/mL) ve penisilin (100U/mL) (50mg/mL; Invitrogen Life Sciences, USA) içeren RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, USA) besi yerinde %5 CO₂ içeren ortamda 37°C de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

Hastaların ve kontrollerin relatif mRNA düzeylerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Mann-Whitney U testi niceliksel ölçekli

gözlemleri verilen iki örneğin aynı dağılımdan gelip gelmediğini incelemek için kullanılan bir parametrik olmayan istatistik testidir.

B-ALL hastalarının alt grupları arasında *PAX5* anlatımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olup olmadığını analiz etmek için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi, birbirinden bağımsız iki yada daha fazla grubun bağımlı bir değişkene ilişkin ölçümlerinin karşılaştırılarak iki dağılım arasında anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek amacıyla kullanılır.

PAX5 anlatımı ve delesyonlarının klinik bulgular ile arasındaki farklılıkları araştırmak amacıyla “ki kare” testi kullanılmıştır.

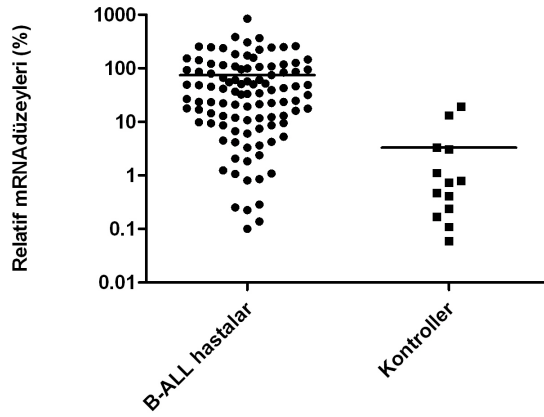
Hastaların klinik bulguları ile korelasyonlarını anlayabilmek için, değişkenlerin alt grupları arasındaki bağımlılıklarını, birlikte değişim olup olmadığını ortaya çıkarmak için kullanılan bir test olan “Multiple regresyon” kullanılmıştır.

Analizler StatGraph Centruion 15.1 (U.S.A version) ve GraphPad Prism 5.0 yazılımları kullanılarak yapılmıştır. Testler iki yönlü gerçekleştirilmiştir ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

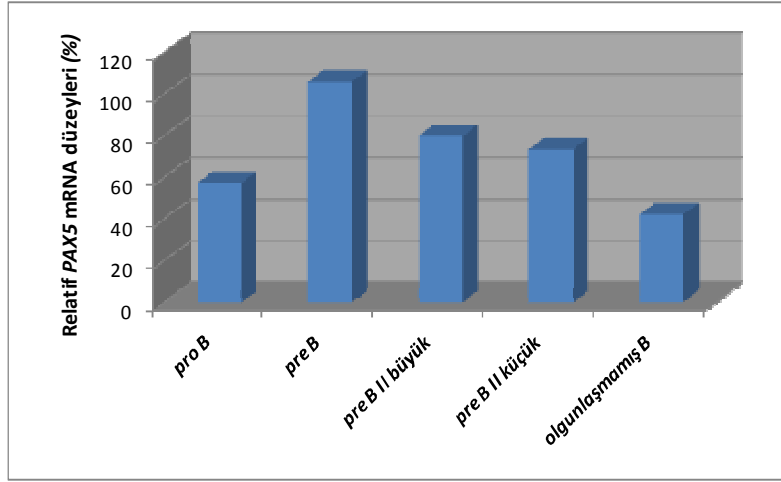
4.1. B-ALL hastalarında *PAX5* mRNA ve protein anlatımı

Normal kemik iliği örnekleri (n=10) ve çocukluk çağı B-ALL hastalarının (n=134) primer tümör örneklerinde gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak mRNA anlatımı araştırılmıştır. Hastalara ait *PAX5* mRNA anlatımları, kontrollerle karşılaştırıldığında ileri derecece anlamlı olmak üzere artmış olarak bulunmuştur. ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U test) (Şekil 4-1). B-ALL hastalarının %88'i kontrollere göre daha yüksek seviyede anlatım göstermiştir.



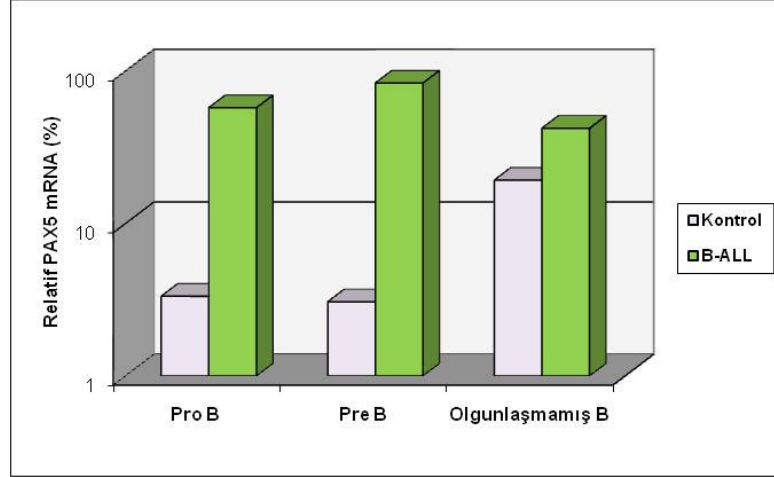
Şekil 4-1: B-ALL hastalarının ve sağlıklı kontrollerin relatif *PAX5* mRNA düzeyleri (%)

PAX5 anlatımının B hücre gelişimi üzerindeki etkisini daha iyi inceleyebilmek için hastalar immüfenotiplerine göre 5 alt grupta toplanarak incelenmiştir.(Şekil 4-2) İncelen alt gruplar arasında istatistiksel anlamda bir farklılık saptanmamasına rağmen ($p=0,40$, Kruskal Wallis testi) erken dönemde *PAX5* mRNA düzeyinin fazla olduğu daha sonra giderek azaldığı gözlemlenmektedir.



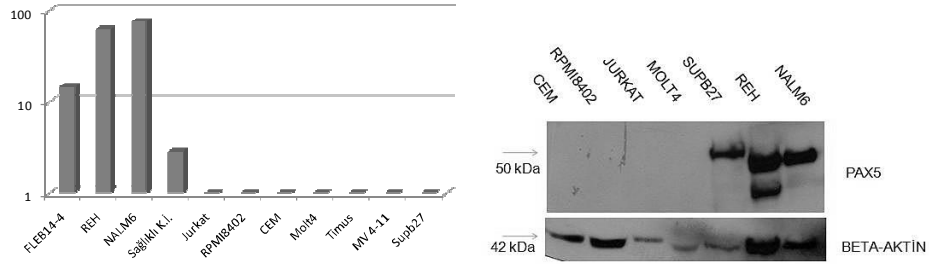
Şekil 4–2: Relatif *PAX5* mRNA düzeyinin alt gruplar seviyesinde incelenmesi

Kemik iliği hücreleri büyük ölçüde B hücre popülasyonunu yansıtmakla beraber, hasta alt gruplarındaki *PAX5* anlatımlarını daha güvenilir bir şekilde yapabilmek için akan hücre ölçer ile pre B, pre B II büyük ve pre B II küçük hücreleri ayrıştırılmıştır. Ancak her bir hücre grubu ayrı ayrı RNA izolasyonu için yetersiz sayıda olduğundan bu 3 alt grup “pre B” hücreler olmak üzere tek bir grupta toplanmış ve analiz edilmiştir. Hasta ve sağlıklı kemik iliği örnekleri pro B, pre B ve olgunlaşmamış B olmak üzere 3 ana grupta incelenmiştir. Mann-Whitney U testine göre pro B-ALL hastaları ($p = 0,009$) ile pre B-ALL hastalarında ($p=0,04$) sağlıklı dönem hücrelerine göre *PAX5* mRNA anlatımını anlamlı şekilde artırmıştır. Buna karşın olgunlaşmamış B-ALL hastaları sağlıklı dönem olgunlaşmamış B hücrelerine göre bir artış gösterse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p=1,00$) (Şekil 4-3)



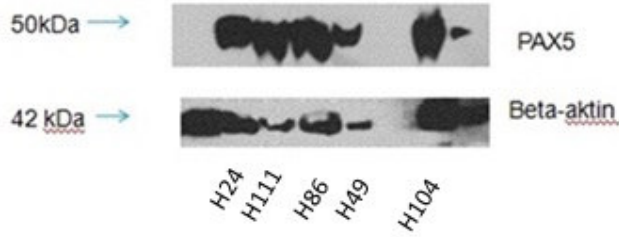
Şekil 4-3: Hasta alt gruplarının özgün dönem kontrolleri ile karşılaştırılması

Hücre serilerinde *PAX5* mRNA düzeyleri incelenmiş ve B-ALL hücre serileri dışında hiç bir hücre serisinde *PAX5* mRNA anlatımı tespit edilmemiştir. Hastalardaki bulgulara paralel olarak, pre B hücre serilerinde (REH, NALM6), pro B hücre serisine göre (FLEB14-4) daha fazla *PAX5* mRNA anlatımı gözlemlenmiştir (şekil 4-4). Hücre serileri protein yönünden incelendiğinde B-ALL hücre serilerinde protein varlığı gözlemlenirken diğer hücre serilerinde proteine rastlanılmamıştır. Pre B-ALL hücre serisi olan REH hücre serisinde $\Delta 8$ varlığı protein düzeyinde gösterilmiştir (şekil4-4).



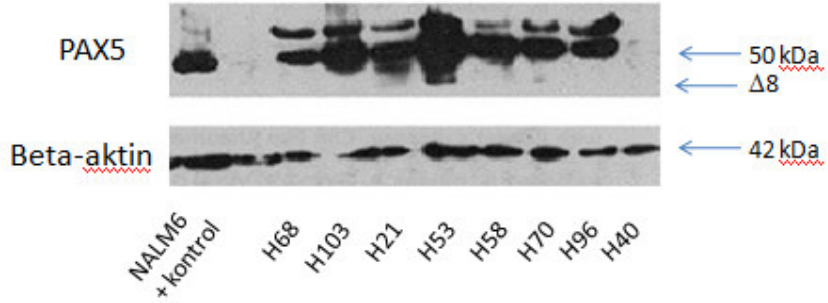
Şekil 4-4: Lösemi hücre serilerinde *PAX5* mRNA ve protein anlatımları

Hastalarda saptanan artmış mRNA anlatımının protein düzeyinde de var olup olmadığını saptamak için 15 B-ALL hastasında ve hücre serilerinde western blot yöntemi ile Pax5 protein varlığı incelenmiştir. *PAX5* gen anlatımı artmış olarak bulunan hastaların 13 tanesinde mRNA anlatımının proteine de dönüştüğü gösterilmiştir (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: B-ALL hastalarında PAX5 proteini varlığı

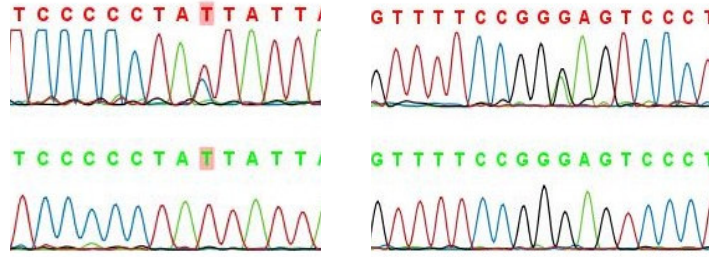
Protein düzeyinde araştırılan B-ALL hastalarından bazılarında (H21,H53) 8. ekzonun delesyonu ($\Delta 8$) sonucu oluşan kısa protein varyantı da kolaylıkla ayırt edilebilmektedir.



Şekil 4-6: B-ALL hastalarında PAX5 delesyonlarının proteine yansması: (NALM6 pozitif kontrol, H68, H103, H58, H70, H96 Pax5 proteini pozitif hastalar, H21 ve H53 $\Delta 8$ hastalar ve H40 Pax5 proteini negatif hasta)

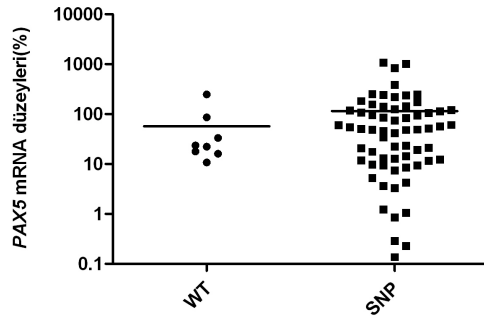
4.2. B-ALL hastalarında PAX5 mutasyon ve delesyonların tespiti

B-ALL hastalarında PAX5 gen mutasyonları ve delesyonlar araştırılmıştır. PAX5 geninin 3' UTR bölgesi (ekzon-1) ve transaktivatör bölgesindeki (ekzon 7-8-9) mutasyonların tespiti için PZR ile çoğaltılan bölgeler uygun ısılarda dHPLC'ye yüklenerek analiz edilmiştir. dHPLC'de farklılık gösteren örneklerde dizi analizi yapılmıştır. B-ALL hastalarında PAX5 geninde herhangi bir mutasyon saptanmazken, hastaların %90'ında (71/79) geninin 10. ekzonunda yer alan rs3780135 tek nükleotid değişimi (SNP) saptanmıştır. (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: rs3780135 (T>C) ve rs35469494 (G>A) değişimi gösterilmesi

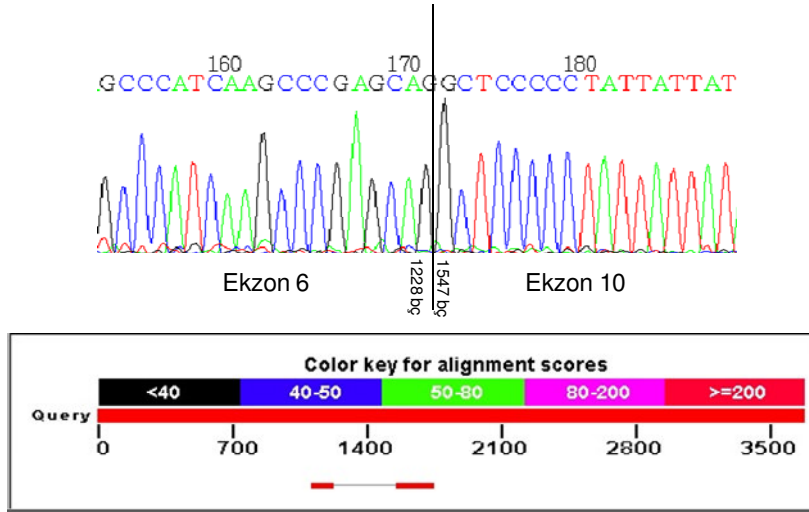
B-ALL hastalarının %3,8'inde (3/79) *PAX5* geni 9. ekzonda tanımlanmış olan rs35469494 polimorfizmi tespit edilmiştir (Şekil 4-7). Tespit edilen varyasyonların *PAX5* mRNA düzeyini etkileyip etkilemediğini tespit etmek için yabancı tip ve herhangi bir SNP'ye sahip olan hastalar *PAX5* mRNA anlatımı yönünden karşılaştırılmış ancak anlatım düzeyleri açısından anlamlı bir farklılığa rastlanılmamıştır ($p=0,61$) (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: Yabancı tip ve SNP içeren hastaların *PAX5* anlatımı yönünden karşılaştırılması

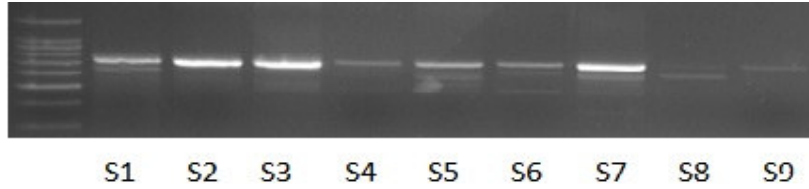
PAX5 geninde alternatif kırılma ile oluşan C' terminal bölge delesyonlarını saptamak için, cDNA örnekleri kullanılarak ekzon 6-7-8-9'u kapsayan 715 baz çiftlik bir bölge çoğaltılmış ve bu örnekler %2'lik agaroz jelde yürütülerek var olan delesyonlar tespit edilmiştir.

Görülen delesyonların hangi ekzonları kapsadığını doğru analiz etmek için jelde görülen bantlar saflaştırılarak edilerek dizi analizi yapılmıştır (şekil 4-9).



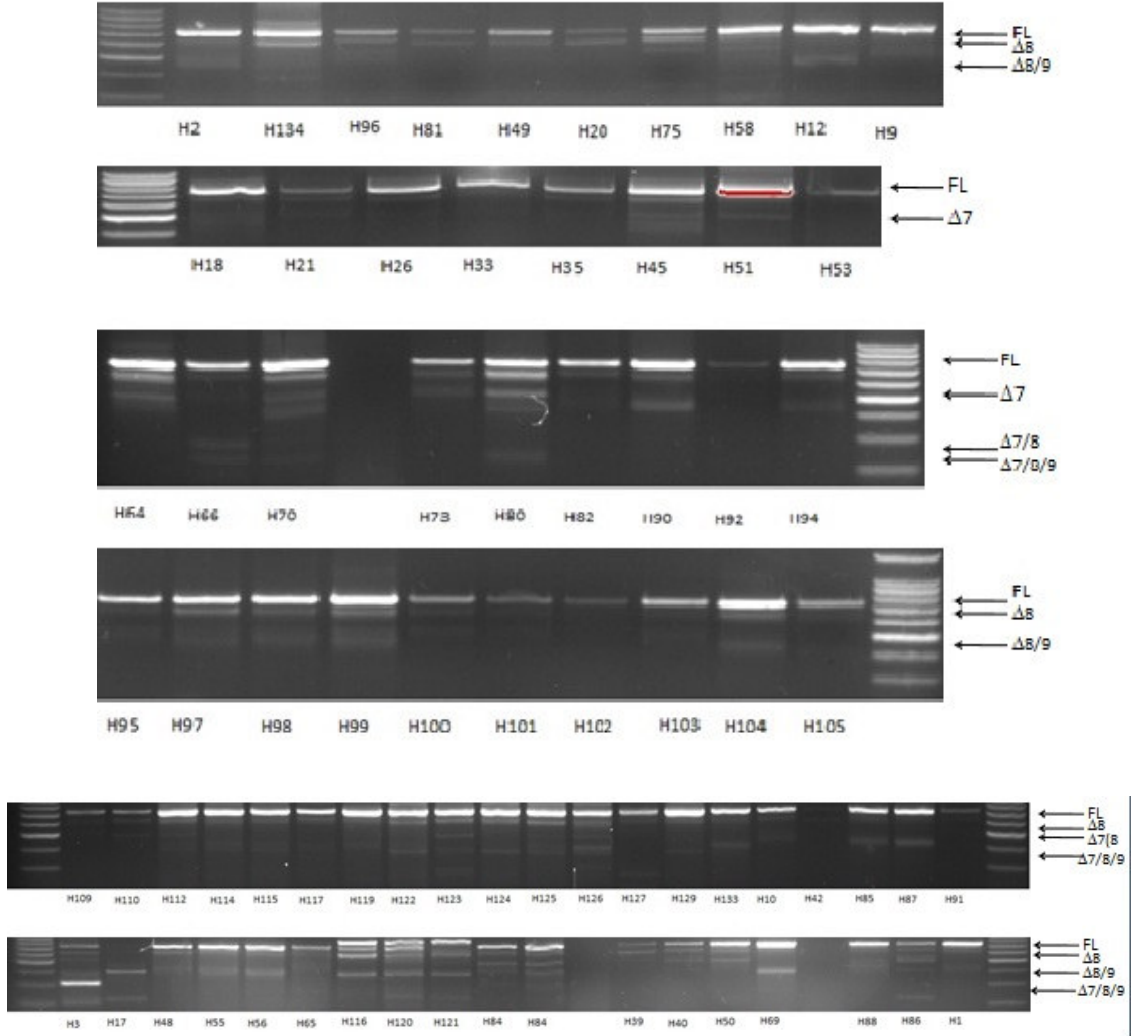
Şekil 4-9: Delesyon 7/8/9'un tanımlanması

Sağlıklı kontrollerin hepsinde delesyona uğramamış tam anlatım gösteren yabancı tip ("full length = FL") görülmüş, bazı kontrollerde *PAX5-Δ8* 'e rastlanılmıştır. (Şekil 4-10)



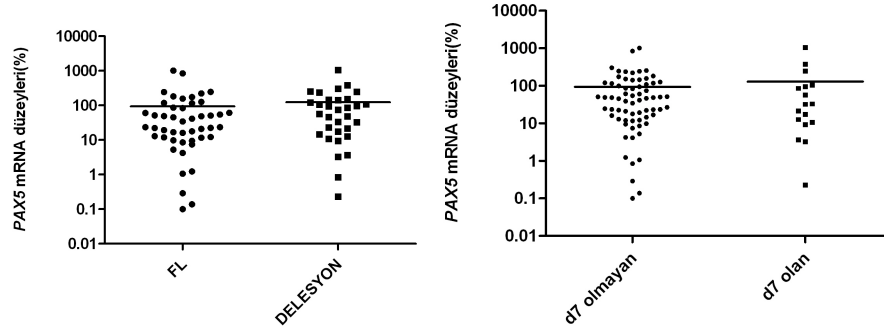
Şekil 4-10: Sağlıklı kontrollerde delesyon tespiti

Hastaların büyük çoğunluğu yabancı tip ile birlikte delesyonlu varyantları da taşımaktadır. Sadece 4 hastada yabancı tip bulunmadığı halde delesyonlar gözlemlenmektedir (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: B-ALL hastalarında *PAX5* geni transaktivatör bölgesinde görülen delesyonlar

Delesyona uğramamış yabancıl tip (FL) olan örnekler ile herhangi bir delesyonu olan örnekler *PAX5* mRNA düzeyleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. ($p = 0,46$) (şekil 4-12)



Şekil 4–12: A) Yabancıl tip ve herhangi bir delesyon içeren hastaların anlatım düzeylerine göre karşılaştırılması B) Delesyon 7 varlığı ve *PAX5* anlatımı ilişkisi

$\Delta 7$ *PAX5* geninin hedef genleri ile etkileşimleri açısından ayrı bir öneme sahiptir. Hastaların $\Delta 7$ varlığı ve $\Delta 7$ yokluğu açısından incelediğimizde, *PAX5* geni anlatımının değişmediği gözlenmiştir. (şekil 4-12)

Hastalarımızı genel olarak değerlendirecek olursak %59'u yabancıl tip anlatım gösterirken, %13'ü $\Delta 8$, %9'u $\Delta 8/9$ ve %19'u $\Delta 7/8/9$ 'a sahiptir.

4.3. *PAX5* Bulgularının B-ALL hastalarının klinik özellikleri ile ilişkisi

PAX5 geninin fenotipteki yansımalarını tespit etmek için, *PAX5* mRNA düzeyleri, SNP ve delesyonların varlığı ile B-ALL hastalarının klinik özellikleri arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. *PAX5* mRNA anlatımının; immünofenotip ($p = 0,33$) , cinsiyet ($p=0,50$) , yaş ($p = 0,73$) , tanı zamanı beyaz kan hücre sayısı ($p=0,39$), CD34 pozitifliği ($p= 0,28$) ve CD10+CD19 pozitifliği ($p= 0,77$) açısından anlamlı bir farklılığı olmadığı görülmüştür (Tablo 4-1). Bununla beraber genel olarak hastaların %12'si sağlıklı kontrollerden düşük anlatım gösterirken yenidoğan hastalarının (n=3) *PAX5* anlatımı kontrollerden yüksektir. Ayrıca CD10 ve CD19 yüzey antijeninin beraber anlatımı olan hastaların %11'i kontrollerden daha düşük anlatım seviyelerine sahipken CD10 ve CD19 negatif olan hastaların hepsi sağlıklı kontrollere göre artış göstermiştir.

Tablo 4-1:Klinik bulgular ile PAX5 anlatımı ilişkisi

KLİNİK BULGULAR		PAX5 ANLATIMI					P değeri
		< KONTROL	5 KAT	5-15 KAT	25-50 KAT	>50 KAT	
FENOTİP	PRO B	0	3	8	2	1	P= 0,33
	PRE B	11	13	24	14	16	
	İMMATÜR B	2	3	4	0	1	
YAŞ	YENİDOĞAN	0	1	1	0	1	P= 0,73
	1-10 YAŞ	10	13	23	14	12	
	>10 YAŞ	3	6	13	2	4	
CİNSİYET	KIZ	4	12	18	8	7	p= 0,50
	ERKEK	9	8	19	8	11	
TANI BEYAZ KAN HÜCRESİ DEĞERİ	<50.000	7	16	25	12	12	P=0,39
	>50.000	5	3	10	2	6	
CD34	POZİTİF	2	10	12	6	7	P= 0,28
	NEGATİF	8	6	20	9	10	
CD10+CD19	POZİTİF	6	9	13	11	11	P= 0,77
	NEGATİF	0	1	3	1	2	
DELESYON VARLIĞI	TAM ÜRÜN (FL)	5	10	19	5	8	P=0,46
	Δ8	0	0	4	2	4	
	Δ7/8/9	1	5	4	3	2	
	Δ8/9	1	0	2	2	2	
SNP	VAR	6	15	24	11	13	P=0,61
	YOK	0	1	5	1	1	

Dört hastada sadece büyük ekzon kayıpları ile karakterize delesyonlar mevcuttur. Bu hastaların hepsi pre B hastaları olmakla beraber 10 yaşından küçük, beyaz kan hücre değeri 50.000'in altında, her hangi bir t(9;22), t(4;11), t(12;21) translokasyonu, CD34 anlatımı olmayan hastalardır. Bu hastaların PAX5 geni anlatımları kontrollere göre artış göstermektedir.

Hastalarda görülen delesyonlar ile immüfenotip ($p = 0,08$), cinsiyet ($p=0,37$), CD10+CD19 pozitifliği ($p=0,95$), tanı zamanı beyaz kan hücre değeri ($p=0,10$) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamaktadır (Tablo 4-2). Olgunlaşmamış B-ALL hastalarında ($n=10$) sadece $\Delta 7/8/9$ görülürken, pro B ve olgunlaşmamış B ALL hastalarında hiç $\Delta 8/9$ 'a rastlanılmamıştır. Hastalar beyaz kan hücre değerlerine göre incelendiğinde değerleri 50.000'in altında olan hastalarda genellikle $\Delta 8/9$ varken, 50.000'in üzerinde olan hastalarda $\Delta 7/8/9$ vardır. Delesyon varlığı, yaş ile anlamlı bir şekilde değişim göstermektedir ($p=0,01$). Yenidoğan lösemi hastalarının hepsinde delesyon varken, 10 yaş üzeri hiç bir hastada $\Delta 8/9$ 'a rastlanılmamıştır. Delesyon varlığı, CD34 anlatımı ile de anlamlı bir şekilde değişim göstermektedir ($p= 0,05$). CD34 anlatımı olan hastalarda genellikle $\Delta 7/8/9$ 'a rastlanılırken CD34 olmayan hastalarda $\Delta 8$ sıktır.

Tablo 4-2: Klinik bulgular ile delesyon varlığı ilişkisi

KLİNİK BULGULAR		TAM ÜRÜN (FL)	DELESYON VARLIĞI			P değeri
			$\Delta 8$	$\Delta 7/8/9$	$\Delta 8/9$	
FENOTİP	PRO B	8	3	1	0	<i>p=0,08</i>
	PRE B	35	7	10	7	
	İMMATÜR B	3	0	4	0	
YAŞ	YENİDOĞAN	0	0	1	2	P=0,01
	1-10 YAŞ	36	8	9	5	
	>10 YAŞ	11	2	5	0	
CİNSİYET	KIZ	22	7	7	2	<i>p=0,37</i>
	ERKEK	26	3	8	5	
TANI BEYAZ KAN HÜCRESİ DEĞERİ	<50.000	34	7	13	2	<i>P=0,10</i>
	>50.000	12	3	2	4	
CD34	POZİTİF	17	1	7	0	P=0,05
	NEGATİF	23	8	7	6	
CD10+CD19	POZİTİF	15	6	8	5	<i>P=0,95</i>
	NEGATİF	2	1	2	1	
SNP	VAR	39	8	11	6	
	YOK	6	0	3	0	

5. TARTIŞMA

Lösemi, olgunlaşmamış blast hücrelerinin aşırı çoğalarak kemik iliğindeki normal hematopoetik hücrelerin yerini almasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır. Çocukluk çağı lösemi hastalarının yaklaşık %75'i immünglobulin gen yeniden yapılanmaları ve hücre yüzey proteinlerindeki artışa bakılarak B-ALL olarak sınıflandırılmaktadır [33]. Kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşma özelliğine sahip hematopoetik hücrelerin gelişimi ve farklılaşması, yazılım faktörlerinin ve çeşitli sinyal ileti yollarının kontrolü altındadır. B lenfogenezi, erken dönemde üretimi başlayan yazılım faktörlerinin ve V(D)J rekombinasyonuna uğrayan immünglobulin genlerinin yeniden yapılanmalarının kontrolünde olur [16]. *PAX5*, öncül lenfoid hücrelerin hematopoetik hücre serilerine farklılaşmasını engelleyip bu öncül hücrelerin B hücrelerine yönlendirilmesini sağlayan özgün bir yazılım faktörü olması açısından B lenfositleri için çok önemlidir.

PAX5'in B lenfositlerin gelişimindeki kritik rolü uzun zamandır bilinmekle birlikte, bu genin moleküler düzeydeki anomalilerinin malign B hücrelerinde ve hastalarda araştırılması konusu oldukça yenidir. Hematopoetik kök hücreler ve öncül hücrelerdeki kontrolsüz *PAX5* anlatımı T hücrelerinin azlığına, B hücrelerinin aşırı çoğalmasına neden olmaktadır [26]. *PAX5* anlatımının öncül lenfoid hücrelerde başladığı ve olgun B hücre evresine kadar devam ettiği bilinmektedir [50]. Fakat kemik iliğindeki pro, pre ve olgunlaşmamış hücreler arasında bir anlatım farkı olup olmadığı bilinmemektedir. Sağlıklı B hücre alt gruplarındaki *PAX5* anlatımı ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. *PAX5* anlatımının erken evre tek allel tarafından ("allelic exclusion"), olgun B hücrelerinde ise iki allel tarafından kontrol edildiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir [51]. Çalışmamızda normal kemik iliği hücreleri sağlıklı kemik iliğinden ayrıştırılmıştır. Pro, pre ve olgunlaşmamış B hücrelerinde *PAX5* gen anlatımı araştırılmış, pre ve pro B dönemlerinde *PAX5* anlatımının eşit düzeylerde olduğu, olgunlaşmamış B hücre döneminde ise *PAX5* anlatımının yaklaşık iki kat arttığı tespit edilmiştir. *PAX5* geninin olgunlaşmamış evrede daha yüksek bir anlatıma sahip olması *PAX5* kontrolünün olgunlaşmamış B hücrelerinde iki allele geçmesi ile açıklanabilir.

Çalışmamızda çocukluk çağı B hücreli akut lenfoblastik lösemi hastalarının (%90) lösemik blastlarındaki *PAX5* anlatımının, normal kemik iliği hücrelerine göre anlamlı bir şekilde artış gösterdiği bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda *PAX5* anlatımı B-

ALL hastalarında %74, AML hastalarında %50, B hücreli lenfomalarda ise %90 civarında artmış olarak gösterilmiştir [52, 53].

PAX5 geninin B hücre gelişimi üzerindeki etkilerini daha iyi anlayabilmek için hastalar immünofenotiplerine göre 5 alt grupta toplanmış ve hastalık alt grupları arasında *PAX5* anlatımının erken dönemde daha fazla olduğu, daha sonra giderek azaldığı gözlemlenmiştir. B hücre gelişiminin pre B evresinde gerçekleşen ve B hücrelerinin olgunlaşması için kritik öneme sahip V(D)J yeniden yapılanmaları ya da B hücre reseptörü oluşumunda görevli genlerin büyük bir kısmı *PAX5* geninin hedef genleri arasındadır. Pre B dönemindeki hücreler için *PAX5* geninin bu önemini göz önünde bulundurursak malign pre B hücreleri için yüksek *PAX5* anlatımı önemli bir onkogenik belirteç olabilir. Hastaları özgün dönem hücreleri ile karşılaştırabilmek için 3 ana grupta topladığımızda (pro B, pre B, olgunlaşmamış B) pro B ve pre B hastalarında *PAX5* anlatımı anlamlı bir şekilde artmışken, olgunlaşmamış B hastalarındaki anlatım farklılığı istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Yüksek mRNA anlatımı post-translasyonel düzenlenmeler sebebi ile her zaman protein üretimine sebep olmayabilir [29]. B-ALL hasta örneklerinde görülen yüksek *PAX5* mRNA anlatımının, hastaların %87'sinde (15 hastanın 13'ünde) proteine de dönüştüğü saptanmıştır. Hastalarımızda saptadığımız artmış Pax5 proteini özgün hedef genleri aracılığı ile diğer hematopoetik hücrelerin gelişiminde rol oynayan genleri baskılayıp, malign B hücrelerinin çoğalmasına neden olabilir. Ayrıca *PAX5* B hücre adezyonu, hücre göçü, hücre çoğalması, hücre yüzey proteinleri, membran kanal proteinleri ve hücre iskeletinin oluşumunda etkili olan genler gibi kritik öneme sahip birçok genin düzenlenmesinden sorumludur [25]. Hastalarımızda görülen Pax5 proteinindeki artış B hücre gelişimindeki farklı yolları tetikleyerek onkogenik etki gösterebilir. Hasta grubumuzda, *PAX5* gen anlatımının yaş, cinsiyet, immünofenotip, tanı zamanı beyaz kan hücre değeri, CD34, CD19 gibi hücre yüzey antijenleri varlığı gibi klinik parametrelerle ilişkisi saptanmış fakat anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Literatürde de *PAX5* ile ilişkilendirilen herhangi bir klinik parametre bulunmamaktadır.

PAX5 genindeki yüksek anlatımının sebebi mutasyonlar veya baskılayıcı bölgelerin delesyonlarından kaynaklanıyor olabilir. *PAX5* geninin karboksi ucundan meydana gelen farklı şekillerdeki alternatif kırılmalarının büyük delesyonlara yol açtığı bilinmektedir [54]. Bu delesyonların onkogenik etkilerinin olup olmadığı hala

bilinmemekle beraber bu varyantların *PAX5* geninin hedef genlerinin anlatımını düzenlediği TA ve baskılayıcı bölgeyi kapsaması nedeniyle hedef genlerinin anlatımını değiştirerek tümör gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir [23]. Çalışmamızda normal kemik iliği hücreleri ile hastalar arasındaki farklılıkları görebilmek için ekzon 7-8-9'u kapsayan bir bölge çoğaltılmış ve bu bölgedeki delesyonlar tespit edilmiştir. Kontrollerin hepsi tam ürün (FL) anlatımına sahip iken, birkaçında delesyon 8'e de rastlanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda, delesyon analizlerinde, sağlıklı kemik iliğinde bulunan sağlıklı öncül hücrelerde (CD34+ veya CD19+ hücreler) FL ürün anlatımı gösterilmiştir [55]. Ayrıca sağlıklı olgun B hücrelerinde FL ürünün yanı sıra *PAX5Δ8* varlığının görülebildiği bildirilmektedir [56]. Hastalarımızın %59'u sadece FL anlatımına sahipken, %41'in de en az bir ekzonun delesyonu tespit edilmiştir. Delesyona sahip hastaların çoğu genin FL anlatımı ile birlikte bir veya daha fazla ekzonun delesyonunu taşımaktadır. En sık görülen delesyon, hastaların %19'unda ekzon 7-8-9'u kapsayan en geniş delesyondur. Sekine ve arkadaşlarının bulgularına göre; $\Delta 7$, $\Delta 7/8$ ve $\Delta 7/8/9$ formlarının yeni bir protein oluşturduğu, bu proteinin transaktivasyon bölgesindeki (TA) PST açısından zengin kısmı çok daha fazla taşıdığı ve bu nedenle TA bölgesinin hedef genlere daha güçlü bir bağlanma sağladığı, $\Delta 8$ ile $\Delta 9$ taşıyan formlarda ise transaktivasyon açısından bir farklılık tespit edilmediği gösterilmiştir [57]. Bu bilgilere dayanarak hastalarımızı $\Delta 7$ varlığı ve yokluğu açısından karşılaştırdığımızda, *PAX5* anlatımının bu delesyona bağlı olarak değişmediği görülmüştür. Ayrıca hastalar kök hücre yüzey antijeni olan CD34 varlığı ile karşılaştırıldığında CD34 taşıyan hastalarda genellikle $\Delta 7/8/9$ içeren kayıplar varken, CD34 taşımayan hastalarda genellikle $\Delta 8$ içeren kayıplar vardır. Hematopoetik kök hücre belirteci CD34+ olan hastalarda oluşan *PAX5* delesyonları çok daha geniş ekzonları kapsarken, daha geç dönemdeki hastalarda genellikle sağlıklı insanlarda da rastlanan $\Delta 8$ 'e rastlanılmıştır. Hastalarda yapılan protein miktarı tayininde bazı hastalarda *Pax5Δ8* proteini de tespit etmemiz bu delesyonların proteine dönüşümünü de kanıtlamaktadır. Bu delesyonların lösemi gelişimi üzerine etkilerinin açığa çıkarılabilmesi için *PAX5*'in hedef genlerinin araştırılması gerekmektedir.

B hücreli lösemilerde Pax5 gen/protein anlatımı ve mutasyonlarının araştırıldığı çalışmalar son derece yetersizdir. Pre B hücreli malignansilerde *PAX5* geninde monoallelik kayıp veya nokta mutasyonları bildirilmiştir. Mullighan ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmada 242 pediyatrik B-ALL hastasının %32'sinde *PAX5* geninde mutasyon tespit edilmiştir [4]. Yine Familiades ve arkadaşlarının 119 yetişkin Pro B-ALL hastasında yaptığı çalışmada, hastaların %30'un da *PAX5* mutasyonu tespit edilmiştir [37]. Çalışmamızda *PAX5* geninin 5'-UTR bölgesi ile ve hedef genleri etkilediğini 7-8-9. ekzonlarını kapsıyan transaktivatör (TA) ve baskılayıcı bölgelerinin mutasyon taraması yapılmıştır. Yukarıda bahsedilen iki çalışmadan farklı olarak hastalarımızda bu bölgelerde herhangi bir mutasyona rastlanılmamıştır. Çalışmamızda kullandığımız mutasyon tarama yöntemleri, birlikte kullanıldıklarında güvenilirlikleri çok yüksek (>%95) ve hassas yöntemlerdir. Çocukluk çağı B-ALL hasta grubumuzda mutasyon tespit etmememizin iki önemli nedeni olabilir. Birincisi, çalışmamızda tüm gen taraması yapılmaması, mutasyonların yoğun olarak gözleendiği bölgeler olan “paired domain” ve “heterodomain” bölgelerinin de taranması ile mutasyonların tespitinin mümkün olması, ikincisi ise B-ALL alt gruplarındaki hasta sayılarının homojen olmamasıdır. Hasta grubu daha homojen bir şekilde oluşturulup, hasta sayısı artırılarak tüm gen mutasyon taraması ile *PAX5* geninin Türk çocukluk çağı B-ALL hastaları için sıklığı tespit edilebilir. Hastalarımızda mutasyon tespit edilmemesine karşın daha önce sağlıklı popülasyonda tanımlanmış, iki adet tek nükleotid polimorfizmi (SNP) saptanmıştır. Hastalarda %3,8 sıklıkla tespit edilen rs35469494 polimorfizmi sağlıklı Güney Afrika halkında %3, sağlıklı beyaz ırkta ise %6 sıklığında görülmektedir. Hastalarda %90 civarında görülen rs3780135 polimorfizmi ise sağlıklı insanlarda hastalara göre çok daha nadir görülmektedir. Bu polimorfizm sağlıklı Güney Afrika halkında %24, beyaz ırkta ise %36 sıklığında görülmektedir. Hastalarımızda bulunan polimorfizmler daha önce lösemilerde veya başka hastalıklarda tanımlanmamış ya da bu polimorfizmlerin herhangi bir klinik parametre ile ilişkisi gösterilmemiştir. *PAX5* geninde görülen alternatif kırılmalar 10. ekzonun başlangıç kısmından kırılıp buraya yeni bir dizi eklenmesi ile de olabilir[54]. rs3780135 polimorfizmi 10. ekzonda görülen hem protein kodlayan bölgede hem de değişikliğe uğrayan bölgede tanımlanmış bir SNP'dir. Bu nedenle bu polimorfizm *PAX5* geninin kırılma motifini değiştirerek yeni bir proteine sebep olabilir. Ya da bu polimorfizm değişikliğe neden olarak *PAX5* geninin stabilitesini etkiliyor olabilir. Sonraki çalışmalarda Türk popülasyonu açısından bu SNPlerin sıklıkları ve fonksiyonel etkileri araştırılmalıdır.

Çalışmamızda B hücre gelişiminde önemli olan *PAX5* geni çocukluk çağı B-ALL hastalarında analiz edilmiş ve gen/protein düzeyinde aşırı anlatımı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ilk defa sağlıklı (pro-pre-olgunlaşmamış) B hücrelerindeki *PAX5* anlatımı ortaya konmuş ve *PAX5* anlatımının özellikle erken dönemde (pre-pro) daha etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca dönemsel kontroller, hasta örnekleri ile karşılaştırılarak *PAX5* geninin B-ALL üzerindeki etkisi anlaşılacak istenmiştir. Malign pre B hücreleri için yüksek *PAX5* anlatımı karakteristik bir belirteç olabilir. Sağlıklı hücrelerde tam ürün anlatımı veya $\Delta 8$ görülürken hastaların %41'inin de ekzon 7,8 ve 9'u kapsayacak şekilde meydana gelen büyük delesyonlar dikkat çekicidir. *PAX5* geninde meydana gelen aktivatör veya baskılayıcı bölge kayıpları *PAX5* geninin hedef genlerini doğru ve etkin bir şekilde düzenleyememesine sebep olabilir. Bunun anlaşılabilmesi için öncelikle bu hastalarda *PAX5*'in hedef genlerindeki değişimler ortaya çıkarılmalıdır. Hastaların %90'unda rs3780135 polimorfizmi bulunmuştur. Bu polimorfizmin daha önce herhangi bir hastalık ile ilişkisi tanımlanmamıştır. Bulunan bu polimorfizmin protein kodlayan bölgede olması ve beyaz ırk sıklığına göre hastalarda çok daha fazla olması bu SNP'nin önemli olabileceğini göstermektedir.

Hematopoetik kökenli tümörlerin sebebi genellikle farklılaşma ve çoğalmada görevli proto-onkogenlerin translokasyonlar ya da başka etkiler sonucu aktive olmasıdır [40]. *PAX5* yazılım faktörünün, B hücrelerinin normal gelişim sürecinde kısıtlı bir anlatım gösterirken, malign hücrelerde aşırı artış göstermesi nedeniyle onkogenik etki gösterdiği kolaylıkla söylenebilir. Ayrıca *PAX5*'in delesyonlar ve mutasyonlar haricinde hematolojik kanserlerde tanımlanmış birçok translokasyonu vardır. B hücreli non Hodgkin lenfomalarda görülen t(9;14) (*PAX5*-*IGH*) translokasyonu olgun B hücrelerinde *pax5* inaktivasyonunu engelleyerek bu hücrelerin plazma hücrelerine farklılaşmasını engeller [41]. *PAX5* ile elastin (*ELN*) genini içeren t(7;9)(q11;p13) translokasyonunun ise CD19 anlatımını durdurduğu bu yüzden hücrelerin B hücre farklılaşmasını pro B aşamasında durdurarak lösemiye yol açtığı düşünülmektedir [42]. Bu özelliği ile *PAX5* özellikle çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerde oldukça dikkat çeken bir hedef genidir. Bugün B hücreli akut lenfoblastik lösemi tanısı için birçok belirteç tanımlanmıştır. İmmünofenotipleme ve kemik iliği yayma yöntemleri ile hastaların blast yükü ve malign hücre karakteri kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Yüksek *PAX5* anlatımı ya da bu gende bulunan delesyon/mutasyonlar hastalık alt

gruplarının moleküler ayrımı ve özellikle pre B-ALL patogenezi ve prognozu için önemli bir belirteç olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Northrup, D.L. and D. Allman, Transcriptional regulation of early B cell development. *Immunol Res*, 2008. 42(1-3): p. 106-17.
2. Lang, D., et al., PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol*, 2007. 73(1): p. 1-14.
3. Holmes, M.L., C. Pridans, and S.L. Nutt, The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunol Cell Biol*, 2008. 86(1): p. 47-53.
4. Mullighan, C.G., et al., Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 2007. 446(7137): p. 758-64.
5. Robichaud, G.A., et al., Human Pax-5 C-terminal isoforms possess distinct transactivation properties and are differentially modulated in normal and malignant B cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(48): p. 49956-63.
6. Abbas K. Abul, L.A.H., *Basic Immunology, Functions and Disorders of the immune system*. Elsevier Inc., 2001.
7. Kondo, M., et al., Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. 11(5): p. 520-6.
8. hoffbrand A., C.D., Tuddenham E. G. D, *Postgraduate Haematology*, Fifth Edition. Blackwell Publishing, 2005.
9. Sun, T., *Flow Cytometry and Immunohistochemistry for Hematologic Neoplasms*, 1st Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
10. Lai, A.Y. and M. Kondo, Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*, 2006. 203(8): p. 1867-73.
11. Lai, A.Y. and M. Kondo, T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol*, 2008. 20(4): p. 207-12.
12. Carotta, S. and S.L. Nutt, Losing B cell identity. *Bioessays*, 2008. 30(3): p. 203-7.
13. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 2008. 112(5): p. 1570-80.
14. Blom, B. and H. Spits, Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 287-320.
15. van Zelm, M.C., et al., Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol*, 2005. 175(9): p. 5912-22.
16. Fuxa, M. and J.A. Skok, Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr Opin Immunol*, 2007. 19(2): p. 129-36.
17. Carotta, S., et al., Pax5 maintains cellular identity by repressing gene expression throughout B cell differentiation. *Cell Cycle*, 2006. 5(21): p. 2452-6.

18. Nahar, R. and M. Muschen, Pre-B cell receptor signaling in acute lymphoblastic leukemia. *Cell Cycle*, 2009. 8(23): p. 3874-7.
19. Waters, S.H., K.U. Saikh, and J. Stavnezer, A B-cell-specific nuclear protein that binds to DNA sites 5' to immunoglobulin S alpha tandem repeats is regulated during differentiation. *Mol Cell Biol*, 1989. 9(12): p. 5594-601.
20. Adams, B., et al., Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev*, 1992. 6(9): p. 1589-607.
21. Urbanek, P., et al., Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*, 1994. 79(5): p. 901-12.
22. Rahman, M., et al., A repressor element in the 5'-untranslated region of human Pax5 exon 1A. *Gene*, 2001. 263(1-2): p. 59-66.
23. Yan, M., et al., Development of cellular immune responses against PAX5, a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res*, 2008. 68(19): p. 8058-65.
24. Nutt, S.L. and M. Busslinger, Monoallelic expression of Pax5: a paradigm for the haploinsufficiency of mammalian Pax genes? *Biol Chem*, 1999. 380(6): p. 601-11.
25. Schebesta, A., et al., Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*, 2007. 27(1): p. 49-63.
26. Cobaleda, C., et al., Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*, 2007. 8(5): p. 463-70.
27. Nera, K.P., et al., Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity*, 2006. 24(3): p. 283-93.
28. Cobaleda, C., W. Jochum, and M. Busslinger, Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature*, 2007. 449(7161): p. 473-7.
29. Alberts B L, R.M., Roberts K, Walter P, *Molecular Biology of the Cell*, 4 ed. New York: Garland Science, 2002.
30. Shiffman F, *Hematologic Pathophysiology*. Rhode Island:Lippincott-Raven, 1998.
31. Pui, C.H., M.V. Relling, and J.R. Downing, Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2004. 350(15): p. 1535-48.
32. Kuiper, R.P., et al., High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*, 2007. 21(6): p. 1258-66.
33. Look, A.T., Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, 1997. 278(5340): p. 1059-64.
34. Greaves, M., Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*, 1999. 35(14): p. 1941-53.

35. Inaba, T., et al., Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science*, 1992. 257(5069): p. 531-4.
36. Hunger, S.P., Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood*, 1996. 87(4): p. 1211-24.
37. Familiades, J., et al., PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. *Leukemia*, 2009. 23(11): p. 1989-98.
38. Pasqualucci, L., et al., Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 2001. 412(6844): p. 341-6.
39. Tiacci, E., et al., PAX5 expression in acute leukemias: higher B-lineage specificity than CD79a and selective association with t(8;21)-acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*, 2004. 64(20): p. 7399-404.
40. Souabni, A., W. Jochum, and M. Busslinger, Oncogenic role of Pax5 in the T-lymphoid lineage upon ectopic expression from the immunoglobulin heavy-chain locus. *Blood*, 2007. 109(1): p. 281-9.
41. Thomas-Tikhonenko, A. and D. Cozma, PAX5 and B-cell neoplasms: transformation through presentation. *Future Oncol*, 2008. 4(1): p. 5-9.
42. Bousquet, M., et al., A novel PAX5-ELN fusion protein identified in B-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type PAX5. *Blood*, 2007. 109(8): p. 3417-23.
43. Cazzaniga, G., et al., The paired box domain gene PAX5 is fused to ETV6/TEL in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res*, 2001. 61(12): p. 4666-70.
44. Nebral, K., et al., Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2009. 23(1): p. 134-43.
45. Bene, M.C., et al., Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 1995. 9(10): p. 1783-6.
46. Bustin, S.A., et al., Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*, 2005. 34(3): p. 597-601.
47. Radonic, A., et al., Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 313(4): p. 856-62.
48. Vandesompele, J., et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002. 3(7): p. RESEARCH0034.
49. Kaler, S.G., et al., Novel method for molecular detection of the two common hereditary hemochromatosis mutations. *Genet Test*, 2000. 4(2): p. 125-9.
50. Hagman, J. and K. Lukin, "Hands-on" regulation of B cell development by the transcription factor Pax5. *Immunity*, 2007. 27(1): p. 8-10.

51. Rhoades, K.L., et al., Allele-specific expression patterns of interleukin-2 and Pax-5 revealed by a sensitive single-cell RT-PCR analysis. *Curr Biol*, 2000. 10(13): p. 789-92.
52. Zhang, X., Z. Lin, and I. Kim, Pax5 expression in non-Hodgkin's lymphomas and acute leukemias. *J Korean Med Sci*, 2003. 18(6): p. 804-8.
53. Anderson, K., et al., Ectopic expression of PAX5 promotes maintenance of biphenotypic myeloid progenitors coexpressing myeloid and B-cell lineage-associated genes. *Blood*, 2007. 109(9): p. 3697-705.
54. Zwollo, P., et al., The Pax-5 gene is alternatively spliced during B-cell development. *J Biol Chem*, 1997. 272(15): p. 10160-8.
55. Santoro, A., et al., Altered mRNA expression of PAX5 is a common event in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 2009. 146(6): p. 686-9.
56. Sadakane, Y., et al., Expression and production of aberrant PAX5 with deletion of exon 8 in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia of children. *Br J Haematol*, 2007. 136(2): p. 297-300.
57. Sekine, R., et al., Identification and comparative analysis of Pax5 C-terminal isoforms expressed in human cord blood-derived B cell progenitors. *Immunol Lett*, 2007. 111(1): p. 21-5.

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 22/10/2008

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 10

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Uğur ÖZBEK'in üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Bio.Sinem ÖZDEMİRLİ'nin yürüteceği 2008/2696 protokol numaralı "B hücreli akut lenfoblastik lösemilerde PAX5 geninin araştırılması" başlıklı deneysel tez çalışma dosyası kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, Araştırma Fonu tarafından desteklenmesi şartı ile uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan COBAN
Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKÖĞLU
Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR
Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)
Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK (Katılmadı)
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
Hukukçu

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ HASTA ONAY FORMU

Tarih:

ÇALIŞMANIN KAPSAMI

1. “B HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLERDE PAX5 GENİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı çalışma B-hücreli lenfoblastik lösemi (B-ALL) ile ilgili bir çalışmadır. Bu çalışma, B-ALL hastalığının genetiğini aydınlatmak, B-ALL gelişim sürecini tanımlamak ve hedef tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesini sağlamayı hedeflemektedir.
2. Yapılması planlanan genetik incelemeler için sizden öncelikle 10ml periferik kan/kemik iliği örneği alınacaktır.
3. Alınan kan örneğinden DNA/RNA materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.
4. Saklanan örnekler B-hücre farklılaşmasında rol alan ilgili genler açısından protein ve gen ekspresyonları, mutasyon yönünden incelenecektir. Çıkan sonuçlar klinik parametreler ile ilişkilendirilip ilgili genlerin hedef tedavi için aday olup olamayacağı değerlendirilecektir.
5. Araştırma kapsamında yapılacak olan çalışmanın süresi 3 yıldır.
6. Çalışmaya 150 gönüllü hasta katılacaktır.
7. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir.
8. Elde edilen genetik bilgiler şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
9. Araştırma süresince sizden 1 defaya mahsus kan alınacaktır ve bunun dışında invaziv bir işlem gerçekleştirilmeyecektir.
10. Kan alma sırasında oluşabilecek herhangi bir sorun karşısında ücretsiz olarak tıbbi destek sağlanacaktır.
11. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
12. Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır.
13. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu talebiniz, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.
14. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabiliyorsunuz.

Kararınızdan önce size verilen bu bilgileri lütfen okuyunuz.

Yukarıdaki yazılı bilgileri okudum. B-ALL hastalığının genetiğine yönelik araştırmalar için çalışmaya kan vermeyi kimsenin etkisi altında kalmadan kendi rızamla kabul ediyorum.

Hastanın Adı, Soyadı:	İmzası	
Ebeveynin Adı, Soyadı:	İmzası	
Aileden Sorumlu Kişinin Adı, Soyadı:	İmzası	
Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, Soyadı:	İmzası	
Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, Soyadı:	Görevi:	İmzası

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SİNEM	Soyadı	ÖZDEMİRLİ
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	19/06/1985
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	46870323788
Email	sinemozdemirli@gmail.com	Tel	555-5101323

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. DETAE /İmmünoloji A.D.	2010
Lisans	M.Ü. Fen Fakültesi / Biyoloji A.D	2007
Lise	Adile Mermerci Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		77,5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	84.284	85.775	86.381
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Türk Hematoloji Derneği Genç katılımcı Ödülü: B-HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ HASTALARINDA PAX5 GENİ MOLEKÜLER ANALİZLERİ' ,2009

Türk Hematoloji Derneği Genç katılımcı Ödülü : 'AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ PATOGENEZİNDE DKK-1 GEN METİLENMESİ' ,2008

Özel İlgi Alanları (Hobileri):