

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**T-ALL HASTALARINDA NOTCH1 MUTASYONUNUN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜCEL ERBİLGİN**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. UĞUR ÖZBEK**

**GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2008**

## TEZ ONAYI

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

15/07/2008

Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN

Prof. Dr. Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
 Program Adı : Genetik Programı  
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
 Anabilim Dalı : Genetik Anabilim Dalı  
 Tez Sahibi : Yücel Erbilgin  
 Tez Başlığı : T-ALL Hastalarında NOTCH1 Mutasyonunun Araştırılması  
 Sınav Yeri : Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü  
 Sınav Tarihi : 08/07/2008

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Uğur Özbek (Tez danışmanı), İstanbul Üniversitesi, DETAE Genetik AD
2. Prof. Dr. Şükrü Palandüz, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Tıbbi Genetik Bilim Dalı
3. Prof. Dr. Sema Anak, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Hematoloji/Onkoloji Bilim Dalı
4. Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD
5. Doç. Dr. Kıvanç Çefle, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Tıbbi Genetik Bilim Dalı

**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.

Yücel Erbilgin

**ITHAF**

**Aileme**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca elinden gelen her türlü imkanı sağlayan, önüme her zaman yeni fırsatlar ve yeni fikirler sunan tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Uğur Özbek'e

Bu tezin her sayfasında emeği olan, bilgi birikimini ve sabrını benden esirgemeyen, teşekkürün yetersiz kalacağı Sayın Dr. Müge Aydın-Sayitoğlu'na

Beraber çalışmaya başladığımız günden itibaren bilgi birikiminin yanı sıra arkadaşlığını da benimle paylaşmış olan, Sayın Özden Hatırmaz'a,

Cümlelerle tanımlanamayacak, nadide insan Yrd. Doç. Naci Çine'ye,

Tezimin teknik ve deneysel kısımlarında yardımlarını esirgememiş, laboratuvarı eğlenceli hale getiren arkadaşlarım Özkan Özdemir, Suzin Çatal, Sinem Özdemirli ve Elif Uğurel'e,

Farklı enerjisi ve kişiliği ile yan yana ve tolerans içinde çalıştığım Dr. Burçak Vural'a,

Tezimin istatistiksel kısmındaki yardımları nedeniyle sevgili Elizabeth Rourke'a,

Hayatımın her anında ihtiyacım olan desteği sağlayan sevgili ailem ve dostlarım'a,

Son olarak da sabır ve katkıları için tüm lösemi hastalarına

SONSUZ TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 819

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN .....	iii
İTHAF .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanserin Tanımı ve Sınıflandırılması.....	3
2.2. Lösemilerin Tanımı ve Sınıflandırılması .....	4
2.2.1. Akut Lösemiler .....	6
2.2.1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) .....	6
2.2.1.2. T-Hücre Gelişimi.....	7
2.2.1.3. T-ALL Gelişimi .....	9
2.2.1.4. NOTCH Sinyal Yolağı .....	13
2.2.1.5. T-ALL'de Bozulmuş NOTCH1 Sinyal Aktivasyonu.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. GEREÇ.....	21
3.1.1. Hasta Grubu.....	21
3.1.2. T-ALL Hastalarına Ait Klinik Parametreler.....	22
3.1.3. Kimyasallar.....	23
3.1.4. PZR Materyali .....	23
3.1.5. cDNA Sentez Materyali .....	23
3.1.6. Kullanılan Cihazlar .....	24
3.1.7. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	24
3.2. Yöntemler.....	25
3.2.1. Lökosit İzolasyonu.....	25

3.2.2. RNA İzolasyonu .....	25
3.2.3. cDNA Sentezi .....	26
3.2.4. PZR .....	26
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	28
3.2.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	29
3.2.6. DHPLC.....	29
3.2.7. Dizileme Analizi .....	30
3.2.8. İstatistik Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA .....	48
KAYNAKLAR .....	52
FORMLAR .....	64
ETİK KURUL KARARI.....	65
ÖZGEÇMİŞ .....	66

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: T-ALL’de görülen translokasyonlar ve genetik bozukluklar (4).....	11
Tablo 3-1: T-ALL hastalarına ait klinik veriler. ....	22
Tablo 3-2: cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımının kondüsyonları.....	26
Tablo 3-3: HD-N, HD-C, PEST bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri. .....	27
Tablo 3-4: HD ve PEST bölgelerinin spesifik primerler ile yapılan PZR koşulları. ....	28
Tablo 3-5: dHPLC’de HD ve PEST ampliconlarına spesifik ısılar. ....	30
Tablo 4-1: T-ALL hastalarında, <i>NOTCH1</i> HD ve PEST domain mutasyonlarının dağılımı. ....	31
Tablo 4-2:T-ALL hastalarında <i>NOTCH1</i> heterodimerizasyon bölgesi için saptanan mutasyon ve diğer varyasyonlar.....	32
Tablo 4-3:T-ALL hastalarında PEST domaini için <i>NOTCH1</i> mutasyon ve varyasyonları. .....	33
Tablo 4-4: NOTCH1 heterodimerizasyon N-terminal domin mutasyonları.....	44
Tablo 4-5: NOTCH1 heterodimerizasyon C-terminal domain mutasyonları. ....	44
Tablo 4-6: NOTCH1 PEST domain mutasyonları. ....	45
Tablo 4-7: T-ALL hastalarının klinik ve immünolojik karakterlerinin NOTCH1 mutasyonları açısından değerlendirilmesi. ....	46



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hematopoietik gelişim (9) .....	4
Şekil 2-2: Lösemilerin sınıflandırılması .....	5
Şekil 2-3: İnsan ve fare timuslarında T-hücre gelişimi (21).....	8
Şekil 2-4: Timosit gelişiminde, farklılaşma basamakları ile gen ekspresyon profili arasındaki ilişki (4).....	12
Şekil 2-5: Timositlerin malign hale dönüşümünde rol oynayan yollar fonksiyonel açıdan dört farklı mutasyon sınıflandırılması ile ilişkilendirilmiştir (3).....	13
Şekil 2-6: Notch1 reseptör yapısı (41).....	14
Şekil 2-7: Kanonik Notch yolağının moleküler basamakları (41).....	15
Şekil 2-8: Notch1 ve T-hücre gelişimi.....	16
Şekil 2-9: <i>NOTCH1</i> gen mutasyon dağılımları.....	18
Şekil 4-1: T24'nin HD-N domaininde C1555C varyasyonu.....	33
Şekil 4-2: T62'nin HD-N domaininde D1561N varyasyonu.....	34
Şekil 4-3: T70, T92, T97'nin HD-N domaininde L1575P mutasyonu (68).....	34
Şekil 4-4: T24, T28'in HD-N domaininde L1586P mutasyonu (69).....	35
Şekil 4-5: T13, T27, T39, T77'nin HD-N domaininde R1599P mutasyonu (69).....	35
Şekil 4-6: T10'un HD-N domaininde L1601P mutasyonu (69).....	36
Şekil 4-7: T73'ün HD-N domaininde K1608N mutasyonu (69).....	36
Şekil 4-8: T2, T41, T53'ün HD-C domaininde Q1694S ve 1694Q>1798*stop varyasyonları.....	37
Şekil 4-9: T53'ün HD-C domaininde Q1688D ve S1691L varyasyonları.....	38
Şekil 4-10: T60'ın PEST domaininde T2376F varyasyonu.....	38
Şekil 4-11: T73'ün PEST domaininde 2440S>2446*stop varyasyonu.....	39
Şekil 4-12: T84'ün PEST domaininde Q2394*stop varyasyonu.....	40
Şekil 4-13: T92'nin PEST domaininde Q2399*stop mutasyonu (41).....	40
Şekil 4-14: T81'in PEST domaininde 2444V>2561*stop varyasyonu.....	41
Şekil 4-15: T95'in PEST domaininde 2445Q>2479*stop varyasyonu.....	42
Şekil 4-16: T89'un PEST domaininde Q2460*stop mutasyonu (41).....	43
Şekil 4-17: T74'ün PEST domaininde P2518L varyasyonu.....	43

Şekil 4-18: Hastaların mutasyon varlığı ve son durumlarına (ö-lü-sağ) göre Kaplan-Meier yaşam analizi sonuçları. Mut=0, mutasyon yokluğu, mut=1, mutasyon varlığını göstermektedir.....47

## SEMBOLLER / kısaltmalar listesi

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

T-ALL: T-hücreli akut lösemi

AML: Akut myeloid lösemi

KLL: Kronik lenfoblastik lösemi

KML: Kronik myeloid lösemi

NOTCH1 (TAN1): Translocation-associated NOTCH homolog

HD: Heterodimerizasyon bölgesi

HD-N: N-terminal heterodimerizasyon bölgesi

HD-C: C-terminal heterodimerizasyon bölgesi

PEST: *NOTCH1* geninin c-terminal bölgesi (polypeptide enriched in proline, glutamate, serine and threonin)

ICN1: İntra sellüler *NOTCH1* domain

HOX11: T-cell –leukemia homeobox 1

TAL1: T-cell acute lymphocytic leukemia

LYL1: leukemia, lymphoid 1

LMO1: LIM-domain

Calm: Clathrin-assembly protein

CSL: Core-binding faktör 1/hairless baskılayıcı/ lag-1

THR: T-hücre reseptör

ÇP: Çift pozitif

ÇN: Çift negatif

TP: Tek pozitif

TN: Tek negatif

γ: Gama

dHPLC: Denatüre edici yüksek performans sıvı kromatografisi

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

## ÖZET

Erbilgin Y.

T-ALL Hastalarında *NOTCH1* Mutasyonunun Araştırılması.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2008.

T-ALL çocuk ve yetişkinlerde timositleri etkileyen, kötü seyirli bir lösemi türüdür. Çoğunlukla transkripsiyon faktörlerinin bozulmuş ekspresyonuna öncülük eden kromozom translokasyonları, genetik ve epigenetik anormalliklerle karakterizedir. Tüm pediatrik ALL vakalarının %15'i ve yetişkin ALL vakalarının %25'i T-hücreli akut lösemidir. *NOTCH1*, T-ALL hastalarının <1% da bulunan t(7;9) kromozomal translokasyonuna katılan genlerden biri olarak keşfedilmiştir. NOTCH1 reseptörü aracılı-hücreler arası sinyal değişimi, hücre farklılaşmasını, proliferasyonunu ve apoptotik programları etkiler. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda Notch1 yolağının, T-hücreli akut lenfoblastik lösemilerin indüklenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir.

NOTCH1 mutasyonlarıyla T-ALL patogenez ve prognozu arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma sayısı azdır. Bu amaç doğrultusunda planladığımız çalışmada, yeni tanı T-ALL hastalarına ait periferik kan/kemik iliği örneklerinde (n=86), *NOTCH1* geninin yaygın mutasyon bölgeleri olan heterodimerizasyon (ekzon 26-27) ve Pest (ekzon 34) domain mutasyonları açısından incelendi. Bu çalışmamızda hasta grubumuzda;

1. NOTCH1 mutasyon sıklığı %24 olarak bulundu.
2. Hastaların klinik parametreleri ile (cinsiyet, tanı lökosit sayısı, relaps, translokasyon varlığı v.b.) mutasyon varlığı/yokluğu arasındaki ilişki incelendi. Tanıda artmış lökosit değeri ile mutasyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenirken diğer parametreler açısından anlamlı bir ilişki bulunmadı.
3. Yaygın *NOTCH1* mutasyonlarının T-ALL prognozunda muhtemel bir rolü olup olmadığı araştırıldı. T-ALL prognozu ile *NOTCH1* mutasyonları arasında bir bağlantı bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: T-hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), NOTCH1 sinyal yolu, *NOTCH1* mutasyonları, lösemi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 819

## ABSTRACT

Erbilgin, Y.

Analysis of NOTCH1 mutation in T-ALL patients.

İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Common Programme. İstanbul, 2008.

T-ALL is an aggressive cancer that preferentially affects children and adolescents. It is commonly associated with acquired chromosomal translocations and other genetic or epigenetic abnormalities, which lead to aberrant expression of a select group of transcription factors. T-ALL represents 15% of childhood and 25% of adult ALL. NOTCH1 was discovered as a partner gene in a t(7;9) chromosomal translocation found in <1% of T-ALLs. The NOTCH genes encode single-pass transmembrane receptors that regulate apoptosis, proliferation, and cell fate determination in multicellular organisms. Increases of NOTCH1 signaling cause the atypical T-cell differentiation, maturation and accumulation of precursor cells. Previous studies have demonstrated that the Notch1 gene is a frequent site of retroviral insertional mutagenesis in mouse models of T-ALL.

There aren't many studies that show the correlation between NOTCH1 mutations and T-ALL pathogenesis/ prognosis. For this reason, we aimed to research NOTCH1 mutations (26, 27, 34 exons) in T-ALL patients blood/ bone marrow samples by using dHPLC. Our achievements are;

1. To detect NOTCH1 mutations in our patients. NOTCH1 mutations frequency is 24% in our T-ALL patients,
2. To show the correlation between mutations +/- and patients clinical characteristics. We found correlation between high leukocyte count and mutations.
3. To determine role of common NOTCH1 mutations in T-ALL pathogenesis and prognosis. We couldn't detect any correlation between mutations and prognosis.

Key Words: T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), NOTCH1 pathway, *NOTCH1* mutations, leukemia.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 819

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlk kez 19. yüzyılda Avrupalı hekimler tarafından bazı hastaların kanında çok yüksek lökosit sayısı fark edilerek, lösemiye tanımlamak için “beyaz kan”, terimi kullanılmıştır. Daha sonraları Yunanca kökenli olarak beyaz anlamına gelen “leukos” ve kan anlamına gelen “haima” sözcüklerinden “ leukemia” (lösemi) terimi türetilerek kullanılmaya başlanmıştır (1).

Lösemiler kaynaklandıkları hücre tipine göre “lenfoid” ve “myeloid” lösemi olarak iki ana gruba ayrılır. Her ikisinin de “akut” ve “kronik” tipleri bulunmaktadır (1). Akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfoid öncül hücrelerin malign hastalığıdır. ALL her yaşta görülebilmekle beraber, en sık çocukluk çağında 2-5 yaşlarında ortaya çıkmaktadır. Etkin tedavilerin geliştirilmesindeki ilerleme çocuk hastalarda tedavi oranının %80'lere ulaşmasına neden olmuştur. ALL patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Bunun için moleküler teknolojilerden yardım alınmaktadır. Lösemi hücrelerindeki bozuklukların giderilmesine yönelik ilaçların geliştirilmesi hastalığın kontrolünün sağlanmasına neden olacaktır. Aynı zamanda, ALL oluşumuna sebep olan genetik değişikliklerin açığa çıkartılmasına yönelik araştırmalar, bilinen risk faktörlerinin ve anti lösemik ajanların klinik uygulamalarda kullanılabilmesine, sağ kalım oranı düşük, yüksek riskli lösemiye sahip hastalarda ise yeni tedavi protokollerinin oluşmasına olanak sağlayacaktır (2).

T- hücreli ALL çocuk ve yetişkinlerde timositleri etkileyen, kötü seyirli bir lösemi türüdür (3). Tüm pediatrik ALL vakalarının %15'i ve yetişkin ALL vakalarının %25'i T-hücreli akut lösemidir. T hücrelerinin malign transformasyonundan; hücre siklusü, farklılaşma, proliferasyon genleri ile kendini yenileme kapasitesini sağlayan genlerdeki genetik (mutasyon, gen ekspresyon değişiklikleri, translokasyon vb.) ve epigenetik (metilasyon vb.) değişiklikler sorumlu tutulmaktadır (4). Gelişim genlerinden olan *NOTCH1*'in T-ALL'de merkezi bir role sahip olduğu, son yapılan çalışmalarda *NOTCH1*'in somatik aktive mutasyonlarının T-ALL hastalarında %50 den yüksek oranlarda gözlenmiş olması ile ortaya çıkmıştır (4). *NOTCH1* sinyal ileti yolağının bozulmuş aktivitesinin T-ALL hastalarında gösterilmesi ve bu yolağa özgü inhibitörlerin var olması, hedefe yönelik tedavi protokollerini açısından bu yolağı önemli kılmaktadır (5, 6).

Bu tez projesi kapsamında, T-ALL hastalarımızdaki *NOTCH1* mutasyon sıklığı ve dağılımları, hastaların klinik parametreleri ile (cinsiyet, tanı lökosit sayısı, relaps, translokasyon varlığı v.b.) mutasyon varlığı/yokluğu arasındaki ilişki, *NOTCH1* mutasyonlarının T-ALL patogenezinde ve de prognozunda muhtemel bir rolü olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanserin Tanımı ve Sınıflandırılması

Kanser, somatik hücrelerin genetik bir hastalığıdır. Tümör karyotiplerinin çoğu sayısal ve yapısal bozukluk taşır. Kanserin bu özelliğinin ilk kanıtları, lösemiler ve lenfomalardaki tümör spesifik translokasyon çalışmalarında onkogenlerin ve transkripsiyon faktörlerinin rolünün araştırılması ile ortaya konmuştur (5). Gelişmiş ülkelerde, ortalama olarak beş kişiden biri kanser nedeni ile hayatını kaybetmektedir. Bununla beraber kalp hastalıklarının yol açtığı ölümler çok daha yüksek oranlarda olup, parazitik enfeksiyonlar ve kötü beslenme ciddi sorunlar yaratmaktadır. Kanserin önemi ise çok hücreli organizmalarda hücre davranış bozukluklarını yansıttığından ileri gelmektedir (6).

Kanser hücreleri kontrol dışı çoğalırlar (neoplazi) ve başka dokulara sızayıp koloni oluşturabilirler (malign). Kanserin nedeni; onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve mikroRNA genlerindeki değişikliklerdir. Bu değişiklikler çoğunlukla somatik olmakla birlikte, eşey hücrelerinde gerçekleşen mutasyonlar ailesel/ kalıtsal özellik gösterebilirler. Tek bir genetik değişiklik nadiren malign tümör oluşumuna neden olur. Çoğunlukla tümörler, transforme bir hücrenin genetik değişikliğe uğramış, sitogenetik olarak farklılık arz eden ikincil veya üçüncül klonlarını içerir (6, 7). Tümör gelişiminde, mutasyon ve doğal seleksiyon ile meydana gelen değişikliklerin somatik hücrelerde yansması normalde yıllar alır. Mutajenik ajanlar ve nonmutajenik ajanlar gen ekspresyonunu etkileyerek, hücre proliferasyonunu uyararak, mutant ve mutant olmayan hücrelerin ekolojik dengelerini değiştirerek bu süreci hızlandırırlar (6).

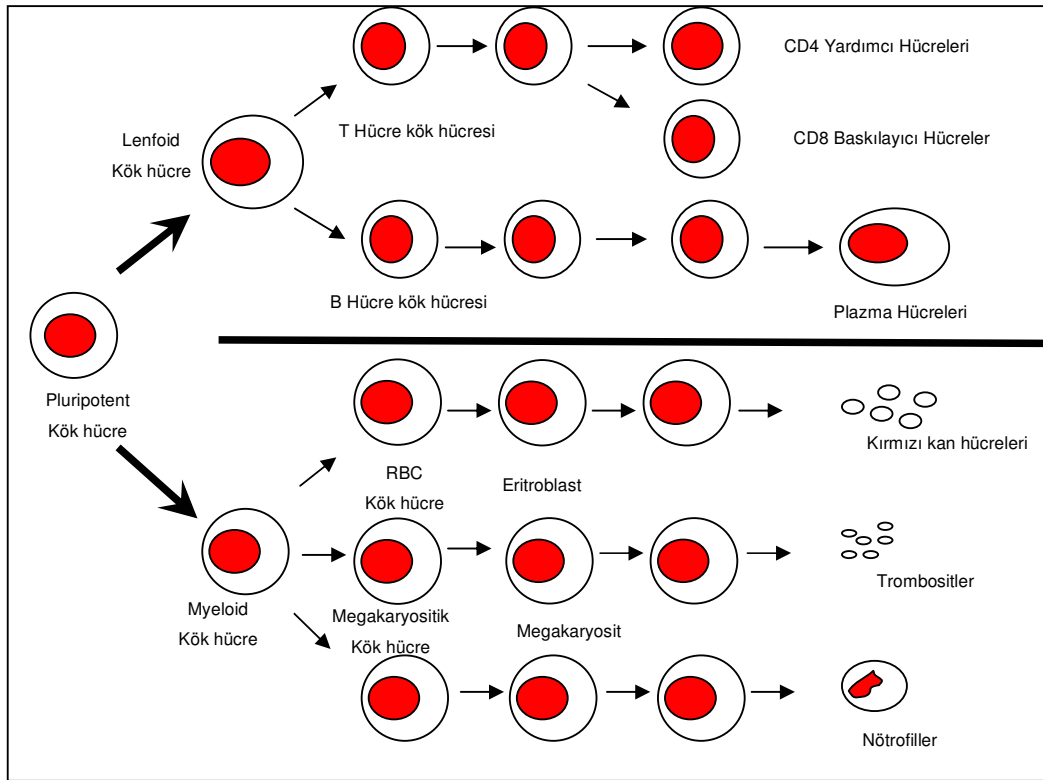
Mutasyonların değişik kombinasyonları farklı kanserlerde görüldüğü gibi aynı klinik tanıya sahip hastalarda da bu heterojeniteye rastlanır. Mutasyonlar rastgele olabileceği gibi, birçok kanser tipinde aynı tip genetik lezyonların tekrarları ile karşılaşılmaktadır. Bu da aslında sınırlı sayıda genetik yolun kansere neden olduğunu düşündürmektedir (6, 7).

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 (6).



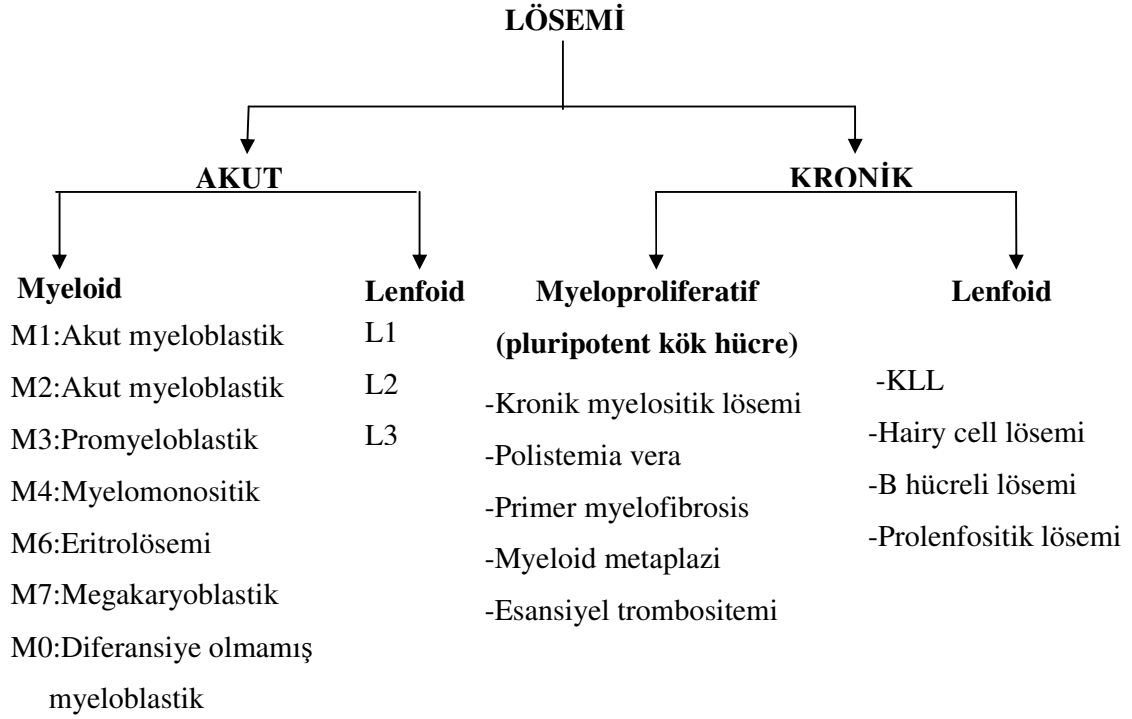
## 2.2. Lösemilerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Tüm hematopoietik hücreler, kendi kendine bölünebilen ve farklılaşma yeteneğine sahip kök hücrelerden gelişirler. Bu dengeli ve kontrollü büyüme, belirli sayıda olgun progenitör hücrelerin gelişmesi ve yayılması ile sonuçlanır (Şekil 2-1). Olgun progenitörlerin tümü, -eritrositler, lökositler, trombositler- belli bir yaşam süresi ile sınıflandırılmış ve hücre ölümüne göre programlanmıştır. Organizmanın canlılığında rol oynayan kök hücrelerde ise böyle bir programlama söz konusu değildir (8).



Şekil 2-1: Hematopoietik gelişim (9)

Lösemiler, hematopoietik 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 (Şekil 2-2) (9).



**Şekil 2-2: Lösemilerin sınıflandırılması**

Akut lösemiler genç, olgunlaşmamış (blastik) myeloid ya da lenfoid dizi hücrelerinin kemik iliği, çevre kanı ve diğer dokularda birikimi ile karakterize habis hastalıklardır. Lösemi hücrelerinin kemik iliğini istila etmesi sonucu normal kan hücrelerinin (eritrosit, granülosit ve trombosit) üretimi engellenir ve buna bağlı olarak gelişen anemi, enfeksiyon ve kanamalar hastalığın ana belirti ve bulgularını oluştururlar. Kemik iliğinde >30% blast yüzdesi görülür ve akut lösemiler iki ana kategoriye ayrılırlar:

1. Akut lenfoblastik (lenfoid) lösemi (ALL)
2. Akut myeloid lösemi (AML)

Kronik lösemiler (KML) ise, miyeloid progenitör hücrelerinin yayılmasındaki ve farklılaşmasındaki artış ile ortaya çıkarlar. KML tanımlanan ilk lösemi türüdür (8).

### 2.2.1. Akut Lösemiler

Akut lösemi olgunlaşmamış myeloid ya da lenfoid hücrelerin proliferasyonu ile kendini gösteren bir hastalıktır. Akut lösemiler tedavi protokollerine verdikleri yanıtlar bakımından yaş gruplarına göre çocukluk (<15 yaş), yetişkin (15-60 yaş) ve 60 yaş üstü olmak üzere üç gruba ayrılır. Akut lösemi, tüm kanserlerin %10'unu, lösemilerinde yaklaşık olarak yarısını oluşturur. ALL'lerin %80'ini çocuk, AML'lerin %80'ini yetişkin hastalar oluşturmaktadır. Yaşa göre farklı sıklıklarda görülmeleri akut lösemilerin patogeneplerinde farklı lösemik olaylar ve yatkınlıkların rol oynadığını işaret eder (10-12).

Lösemi tek bir myeloid veya lenfoid progenitör hücrenin habis transformasyona uğraması ve bu transforme hücrenin çoğalarak gittikçe büyüyen bir klon oluşturması sonucu gelişir. Akut lösemi hücrelerinin temel karakteristik niteliği farklılaşma yeteneğini kaybetmiş olmalarıdır. Bu hücrelerin olgunlaşması AML'de myeloblast ya da promyelosit, ALL'de lenfoblast düzeyinde kalmıştır. Gerek farklılaşma bozukluğu, gerekse aşırı proliferasyon sonucu lösemi hücreleri kemik iliğinde birikir. AML'de farklılaşma bozukluğundan dolayı hücrelerin olgunlaşmaması, bu lösemik hücre birikiminin primer sebebi olarak kabul edilir. Lösemi hücreleri öncelikle kemik iliğinde proliferer olur, sonra çevre kanına geçer ve diğer dokulara infiltre olurlar (8).

İnsanda akut lösemilerin etiyojisi halen bilinmemektedir. İyonize radyasyon, bazı ilaç ve kimyasal maddeler, virüsler ve genetik faktörlerin vakaların küçük bir bölümünde lösemi gelişiminden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Ancak, bilinen az sayıdaki risk faktörü ve genetik değişimler, tüm lösemi olgularının çok az bir kısmının etiyojisini açıklayabilmektedir (10, 11).

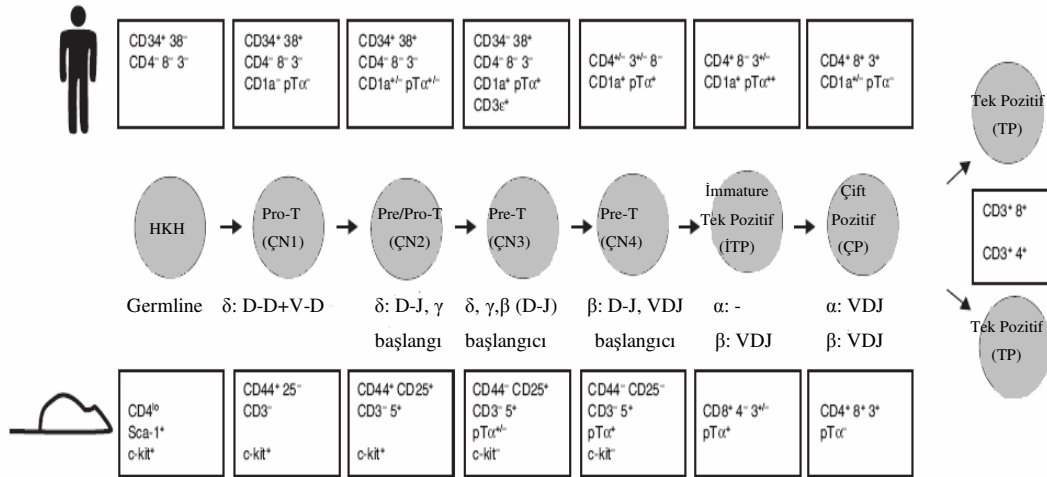
#### 2.2.1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

ALL, çocuk ve yetişkinleri etkileyen, lenfoid progenitör hücrelerin malign hastalığıdır (2). Tüm çocukluk çağı kanserlerinin ~25%'ini oluşturmaktadır. ALL lösemilerin en iyi tedavi edilebilen formudur (12). Anemiye bağlı solgunluk, halsizlik, çarpıntı, nefes darlığı ve ağır formlarında kalp yetmezliği bulguları; lökopeniye bağlı peteşi, purpura, ekimoz, mukoza ve iç organ kanamaları gelişebilmektedir (13). Erkeklerde kız çocuklarına oranla daha sık ve kötü prognozla gözükmektedir (14). Yapılan pek çok çalışmaya rağmen lökomogenez hakkında bilinenler yetersiz

kalmaktadır. Hastalığın klinik, patolojik ve immünotip bulguları iyi dokümanite edilmesine rağmen çevresel ve kalıtsal faktörlerin rolleri tam olarak açıklanamamıştır (13, 15, 16). Progenitör hücrelerin T hücre/ B hücre farklılaşma sürecindeki bozuklukların ALL gelişiminde yol açtığı düşünülmektedir. Gelişim basamaklarında meydana gelen spesifik mutasyonlar, sınırsız kendini yenileme kapasitesinin ortaya çıkmasına neden olurlar (2, 17). ALL patogeneziye yönelik son dönemde yapılan çalışmaların çoğu, ALL'deki genetik lezyonların anlaşılması ve bu bozuklukların hücre proliferasyon, farklılaşma ve sağ kalım üzerine etkilerinin ortaya çıkarılması üzerinedir (18).

### **2.2.1.2. T-Hücre Gelişimi**

Farklı fonksiyonel özelliklere sahip memeli T hücrelerinin gelişimi oldukça kompleks bir süreçtir. T-hücreleri, kemik iliği veya fetal karaciğerde pluripotent prekürsör hücrelerden köken alırlar. Pluripotent hücreler buradan T-hücre farklılaşmasının gerçekleşeceği yer olan timusa göç ederler (19). T-hücre gelişim süreci, temel olarak CD4 ve CD8 membran moleküllerinin ekspresyon düzeylerine bağlı olarak fenotipik basamaklara ayrılmıştır (Şekil 2-3). İnsan ve farede, timositler sıralı olarak; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (çift negatif, ÇN), CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (insan immatüre tek pozitif, İTP) veya CD8<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (fare immatüre tek pozitif, İTP), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (çift pozitif, ÇP) ve son olarak da CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> veya CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (tek pozitif, TP) şeklinde gelişim basamaklarında yer almaktadır. T-hücre reseptör geni yeniden düzenlenme (THR) kompleksinin bir parçası olan CD3'ün ekspresyonu, fonksiyonel THR'ın hücre yüzeyinden sunulabilmesi için gereklidir (20).



Şekil 2-3: İnsan ve fare timuslarında T-hücre gelişimi (21).

T-hücre gelişimi boyunca farklılaşma süreci timik stromadan gelen sinyallerce düzenlenir. Hematopoetik progenitör hücreler timusa kortiko-medullar bölgeden girerler. Sınırlı sayıda progenitör timusa girer ve yayılma, erken gelişim evresi boyunca devam eder. Erken ÇN evre süresince, timositler dıştaki subkapsüller bölgeye göç ederler (22). Bu aşamada ilk THR gen yeniden düzenlenmeleri gerçekleşir. İTP ve ÇP evreleri boyunca kortekse zıt yönde ilerlerler. Kortiko medullar eklenti bölgesi yakınında bir seri seçim süreci gerçekleşir. Sonuçta immünokompetan medullar TP hücreleri timustan ayrılır ve kana karışır (23).

T-hücre gelişiminin sıralı ve farklı basamaklarının amacı, herbiri fonksiyonel ve tek olan THR kompleksine sahip olgun T-hücre oluşumunun sağlanmasıdır. THR molekülleri iki disülfid bağlı zincirden oluşmaktadır. Bunlar herbiri sabit ve değişken kısımlar içeren THRα ve THRβ zinciri veya THRγ ve THRδ zincirleridir (24, 25). Bu değişken kısımlar MHC/peptid kompleksinin tanınmasından sorumludurlar ve birçok V (değişken), D (çeşitli, sadece βve δ için), ve J (eklenti) gen segmentlerinin kombinasyonları ile kodlanırlar. Sonuç olarak, THR moleküllerinin kombinasyonel repertuarları diye adlandırılan birçok farklı kombinasyona sahip gen segmentleri yapılabılır (25, 26).

THR genlerinin farklı kombinasyonları değişmez bir sırayı takip etmektedir. ÇN süreç boyunca, ilk olarak *THRδ* lokus düzenlenmesi, ardından da *THRγ* gen düzenlenmeleri gerçekleşir (25, 26). Başarılı kombinasyonlar sonucu fonksiyonel γδ

THR oluşur ve  $THR\gamma\delta+$  T hücresi gelişir. Alternatif olarak, fonksiyonel  $\beta$ -zinciri sentezi ile hücre  $\alpha\beta$  T hücrelerine farklılaşabilir. TP süresince,  $THR\beta$  zincirinin işlevsel olup olmadığı, sabit pre- $THR\alpha$  zinciri ile hücre yüzeyinde eksprese edilmesi ile test edilir. Bu sürece  $\beta$ -seçimi denir (27). Pre-THR kompleks sinyali, hücre döngüsüne girmesini ve ÇP hücrelere farklılaşmasını tetikler. Sonrasında proliferasyon durur ve *THRA* gen düzenlenmesi başlar (28).  $THR\alpha\beta$  kompleksi hücre yüzeyinde eksprese olur. Oluşan kompleks fonksiyonel ise kendi-MHC molekülleri ile reaksiyona girer (pozitif seçim), tepkime yokluğunda ise (negatif seçim) gerçekleşir. Gelişen timositlerin %95 i bu yolla seçilerek apoptoza uğrar. Hayatta kalan hücreler TP timosit haline gelirler ve  $CD4+$  yardımcı T hücrelere veya  $CD8+$  sitotoksik T hücrelere olgunlaşırlar ve naif T lenfositler olarak perifere göç ederler (29, 30).

Erken dönem T-hücre gelişiminde proliferasyon, gelişim ve gen düzenlenmeleri mikroçevre tarafından sağlanan THR- bağımsız sinyallerce başlatılıp düzenlenir. Bu düzenleyici sinyaller, timik epitelyum tarafından sentezlenen kemokinler, adezyon molekülleri, sitokinler, Wnt proteinleri ve Notch ligantları tarafından sağlanır. Eğer bir hücre sinyale duyarlıysa (doğru reseptörün eksprese edilmesi ile), hücre içi sinyal iletisi başlayacak ve transkripsiyon faktörleri aktive olacaktır. Transkripsiyon faktörleri gen “enhancer” bölgelerinde bulunan veya “core promotor” bölgelerde sunulan spesifik DNA dizilerine bağlanırlar ve böylece gen spesifik transkripsiyon başlar. Gen kohortlarının koordine ekspresyonu farklılaşmakta olan hücrelerin fonksiyonel ve fenotipik karakteristiğini değiştirecektir.

### 2.2.1.3. T-ALL Gelişimi

T-hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) timositlerin malign bir hastalığıdır. Pediatrik ALL vakalarının %10-15'i, yetişkin ALL'lerin %25'i T-ALL dir. Yüksek blast sayısı, mediastinal ve merkezi sinir sistemi tutulumları görülür (31). T-ALL genellikle timusta ortaya çıkar ve vücuda yayılır, tedavi yokluğunda ölüm görülür. Hali hazırdaki T-ALL tedavileri temel olarak çeşitli kemoterapötiklerin kombinasyonlarından oluşur. Son 50 yılda pediatrik ALL'ler için tedavi başarı oranı önemli ölçüde artmıştır (2). Ancak yetişkin T-ALL lerde bu oran daha düşüktür. Uzun süreli sağ kalım oranı; 60 yaşın altındaki hastalarda %30-40 olup, 60 yaş üstü vakalarda bu oran %10'lara kadar inmektedir (32-35).

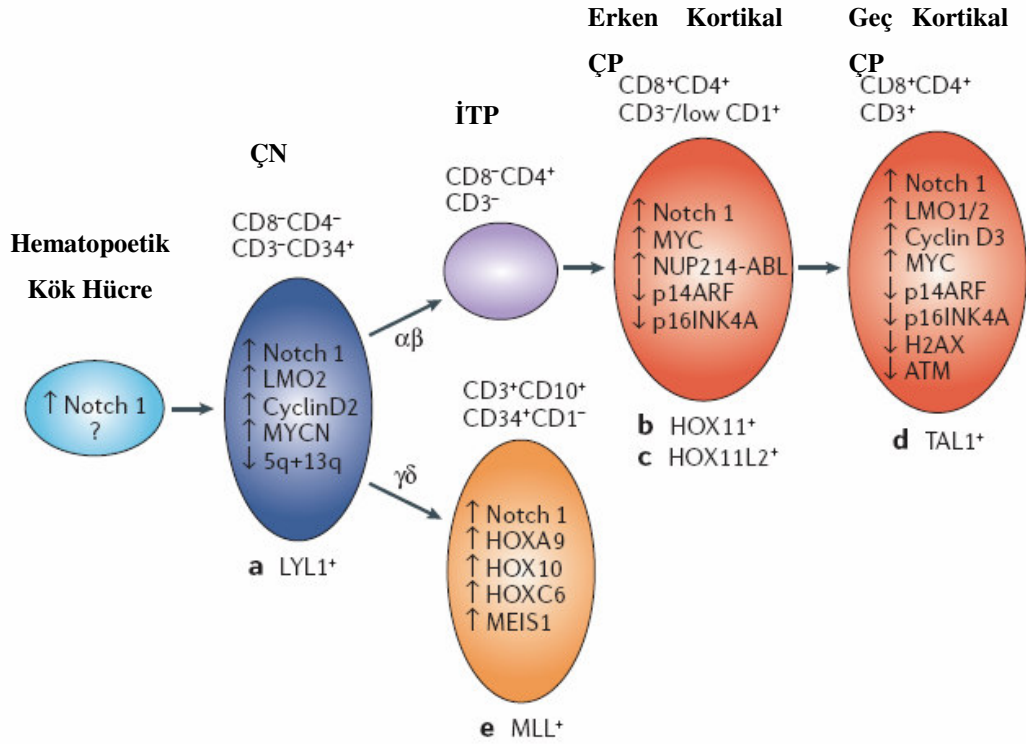
T-hücrelerinin malign transformasyonundan; hücre döngüsü, farklılaşma, proliferasyon genleri ile kendini yenileyebilme kapasiteyi sağlayan genlerdeki genetik (mutasyon, gen ekspresyon değişiklikleri, translokasyon vb.) ve epigenetik (metilasyon vb.) değişiklikler sorumlu tutulmaktadır. Sitogenetik analizler ve kromozomal translokasyon kırıklarının moleküler klonlanması, T-ALL de bozulmuş olarak eksprese edilen transkripsiyonel regülatör proteinlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. TAN1 (NOTCH1) dışında bu proteinlerin önemi, kodladıkları genlerin T-hücre reseptör (THR) gen “enhancer” ve promotor bölgelerine yakın yer almalarıdır (Tablo 2-1). Bu transloke proteinler genellikle normal embriyogenik gelişim sürecinde önemli olmakla beraber birçoğu normal timosit gelişimi için esansiyel değildir (17).

T-ALL patogenezi, T-hücre gelişiminde rol oynayan onkogenlerin aktivasyonu ve gelişim basamaklarındaki gen ekspresyon profili ile ilişkilidir. Bu gelişim süreci beş önemli basamakta sınıflandırılmıştır (Şekil 2- 4). Bu basamakların ilk ikisi, *TAL1* ve/veya *LYL1*, *LMO1* ve/veya *LMO2*'nin artmış ekspresyonları ile tanımlanmaktadır. Üçüncü ve dördüncü dönemlerde ise *HOX11* ve/veya *HOX11* ilişkili onkoproteinlerin artmış ekspresyonları saptanmıştır. Son basamak ise spesifik *HOX* genlerinin artmış ekspresyonunun karakteristik patterniyle beraber MLL-ENL füzyon proteinini içermektedir. T-ALL'nin onkogenik transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonları temel alınarak sınıflandırılması klinik uygulamalarda önemlidir. Örneğin; *HOX11* aktivasyonu iyi prognoz göstergesi iken *TAL1* ve *LYL1* kötü prognoz belirteçleridir (30, 31).

Tablo 2-1: T-ALL’de görülen translokasyonlar ve genetik bozukluklar (4).

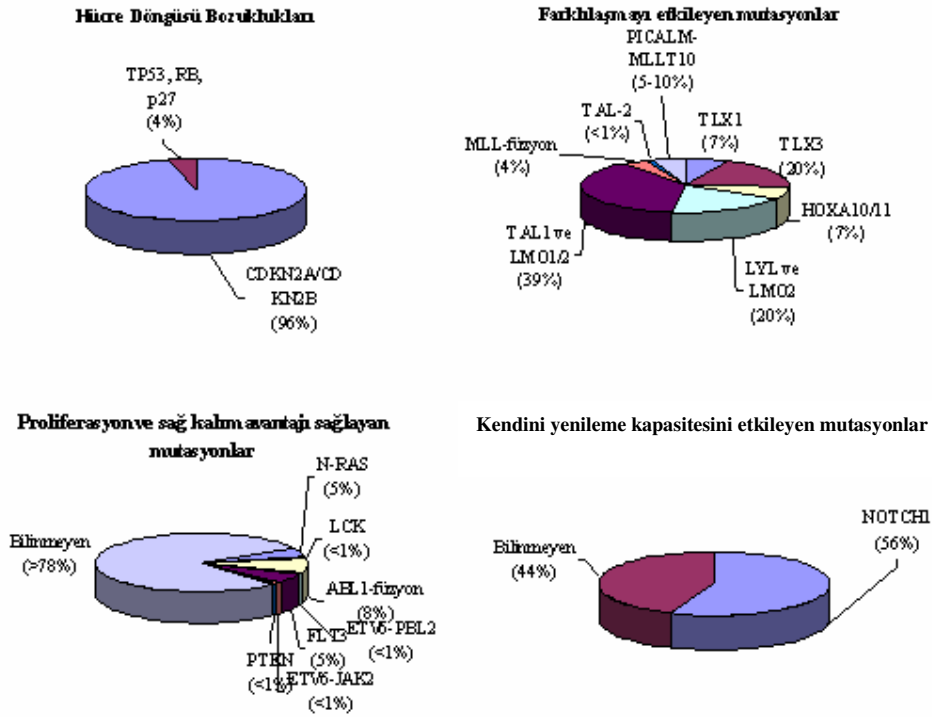
Protein Tipi	T-ALL Onkogen	Kromozomal Değişim	Etkilenen Genler	Normal Gelişimdeki Rolü
Homeodomain	<i>HOXA</i> ailesi	İnv(7)(p15;q34)	<i>THRB</i> lokusuna inversiyon	Aksial şekillenme
Homeodomain	<i>HOX11</i>	t(7;10)(p15;q34); t(10;14)(q35;q11)	<i>THRB</i> lokusuna translokasyon; <i>THRA/D</i> lokusuna translokasyon	Dalak gelişimi
Homeodomain	<i>HOX11L2</i>	t(15;14)(q35;q32); t(5;14)(q35;q11)	<i>BCL11B</i> lokusuna translokasyon; <i>THRD</i> lokusuna translokasyon	MSS gelişimi
bHLH	<i>BHLHB1</i>	t(14;21)(q11;q22)	<i>THRA</i> lokusuna translokasyon	MSS gelişimi
bHLH	<i>LYL1</i>	t(7;19)(q35;p13)	<i>THRB</i> lokusuna translokasyon	Hematopoez
bHLH	<i>TAL1</i>	t(1;14)(p32;q11)	<i>THRA/D</i> lokusuna translokasyon	Embriyonik HKH gelişimi
bHLH	<i>TAL2</i>	t(7;9)(q35;q34)	<i>THRB</i> lokusuna translokasyon	MSS gelişimi
bHLH/Lzip	<i>MYC</i>	t(8;14)(q24;q11)	<i>THRA/D</i> lokusuna translokasyon	Hücre büyümesi ve apoptoz
LIM domain	<i>LMO1</i>	t(11;14)(p15;q11)	<i>THRA/D</i> lokusuna translokasyon	Bilinmiyor
LIM domain	<i>LMO2</i>	t(11;14)(p13;q11); t(7;11)(q35;p13)	<i>THRA/D</i> lokusuna translokasyon, <i>TCRB</i> lokusuna translokasyon	Embriyonik HKH gelişimi
CC-domain-tirozin kinaz	<i>EML1-ABL1</i>	t(9;14)(q34;q32)	Gen füzyonu	Sitoiskelet (EML1)-nükleer sinyal (ABL1)
ETS-domain-tirozin kinaz	<i>ETV6-JAK2</i>	t(9;12)(p24;p13)	Gen füzyonu	Hematopoez (ETV6)-immün cevap (JAK2)
ETS-domain-tirozin kinaz	<i>ETV6-ABL1</i>	t(9;12)(q34;p13)	Gen füzyonu	Hematopoez (ETV6)-immün cevap (ABL1)
Tirozin kinaz	<i>LCK</i>	t(1;7)(p34;q34)	<i>THRB</i> lokusuna translokasyon	THR sinyali
Notch reseptör	<i>NOTCH1</i>	t(7;9)(q34;q34.3)	<i>THRB</i> lokusuna translokasyon; gen kırılması; aktivasyon	T-hücre kaderi
Nükleoporin-GEF	<i>NUP98-RAP1GDS1</i>	t(4;11)(q21;p15)	Gen füzyonu	Nüklear transport (NUP98)-Ras aktivasyonu (RAP1GDS1)
Nükleoporin-tirozin kinaz	<i>NUP214-ABL1</i>	epizomal	Gen füzyonu	Nüklear transport (NUP214)-nükleer sinyal (ABL1)
ENTH-domain-AT-hook	<i>CALM-AF10</i>	t(10;11)(p13;q21)	Gen füzyonu	(CALM)-bilinmeyen transkripsiyonel düzenlenme (AF10)





**Şekil 2-4: Timosit gelişiminde, farklılaşma basamakları ile gen ekspresyon profili arasındaki ilişki (4).**

Timositlerin malign hale dönüşümünde rol oynayan yollar fonksiyonel açıdan dört farklı mutasyon sınıflandırılması ile ilişkilendirilmiştir: 1) hücre döngüsünü etkileyen mutasyonlar; 2) farklılaşmayı etkileyen mutasyonlar; 3) proliferasyon ve sağ kalım avantajı sağlayan mutasyonlar; 4) kendini yenileme kapasitesini arttıran mutasyonlar (Şekil 2- 5). Normal timus hücresinin lösemik T-hücresine dönüşebilmesi için farklı tipteki mutasyonların koordine şekilde bir arada bulunması gerekmektedir. Fakat maligniteye yol açan mutasyonların hepsi henüz tanımlanamamıştır. Yeni onkogen ve mutasyonların keşfi mikro array tabanlı, tüm genomu kapsayan çalışmalar ile yapılmaya çalışılmaktadır (3).



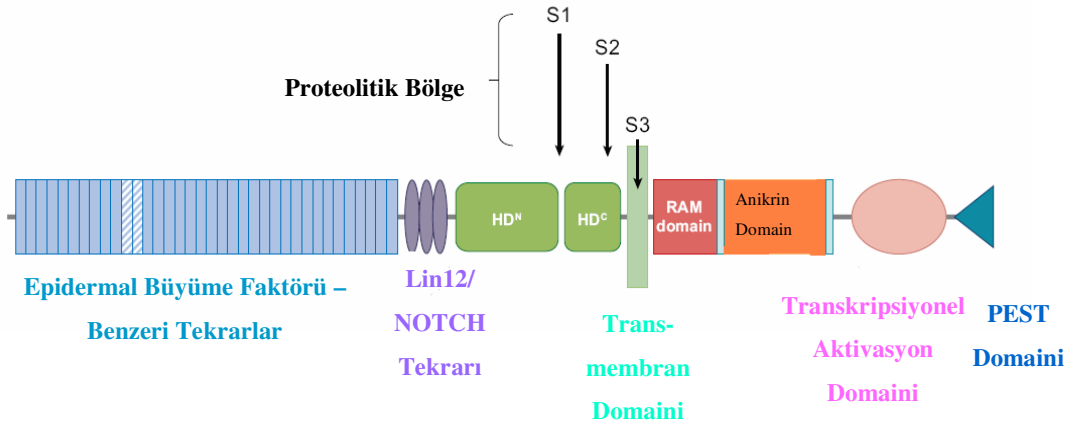
Şekil 2-5: Timositlerin malign hale dönüşümünde rol oynayan yollar fonksiyonel açıdan dört farklı mutasyon sınıflandırılması ile ilişkilendirilmiştir (3).

#### 2.2.1.4. NOTCH Sinyal Yolu

NOTCH sinyal yolu, evrim süresince korunmuş, gelişim döneminde hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan bir mekanizmadır (36). *NOTCH* gen ailesi, sinyal yoluna katılan, tek-geçişli transmembran reseptörünü kodlar. Memelilerde dört *NOTCH* geni (*NOTCH 1-4*) bulunur. JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 ve DLL4 NOTCH ligantlarıdır (37). *NOTCH1* ve *NOTCH2* genleri geniş ölçüde memelilerde eksprese edilip, embriyonik gelişimde önemli rollere sahiptirler. *Notch1* mutasyonlarına sahip fareler, embriyonik dönemin 9.5 gününde vasküler ve somit defekleri göstermiştir. *Notch2* geninde hipomorfik mutasyonlara sahip fareler ise doğuma kadar yaşayabilmekle beraber kalp, böbrek ve akciğer gibi yaşamsal organlarda ciddi bozukluklara sahiptirler. İnsanlarda, *NOTCH3* geninin ekstrasellüler domaininde meydana gelen mutasyonlar serebral otozomal dominant arteriopati ve lökoensefalopati ile ilişkili görülmüştür. Ayrıca *NOTCH4*'ün bozulmuş ekspresyonu damar gelişimini etkilemektedir (38).

*NOTCH1*, en sık olarak T-hücre gelişiminde eksprese edilir (39). NOTCH'un T-hücre gelişimi ile ilişkili olabileceği ilk olarak, bazı T-ALL hastalarında *NOTCH* geninin bir parçasının (*TAN-1*) *THRB* lokusuna transloke olduğunun bulunmasıyla düşünülmüştür (40). Sonrasında T-ALL hastalarının büyük çoğunluğunda (~%50) *NOTCH1* geninin aktif mutasyonları bildirilmiştir (4).

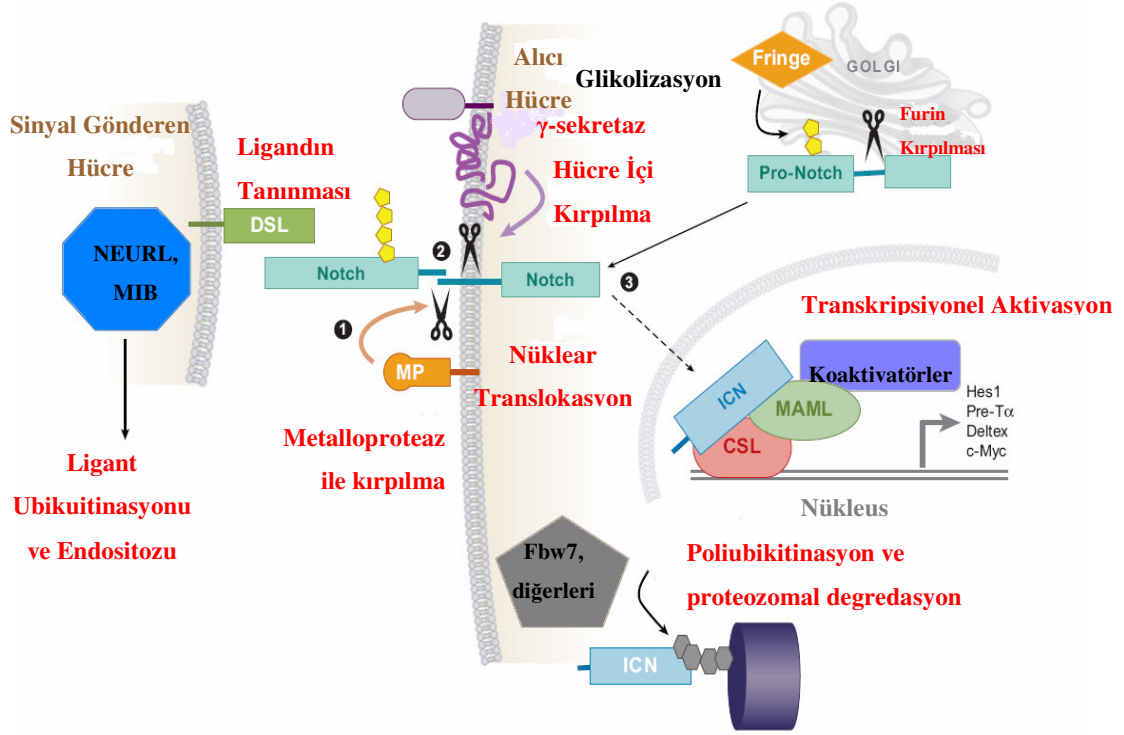
*NOTCH1* 9q34.3 kromozom bölgelerinde lokalize, 34 ekzondan oluşan, 51.42 Kb büyüklüğünde transkripte sahip olan bir gen dir. NOTCH endoplazmik retikulumda tek bir protein olarak sentezlenir (pre-NOTCH) ve post-translasyonel değişikliğe uğratılacağı golgi aygıtına taşınır. Olgun T hücrelerinde NOTCH1 ektodomaini, 36 epidermal growth faktör (EGF)-benzeri tekrar, üç Lin12/NOTCH tekrarı (LNRs) ve jukstamembran heterodimerizasyon domaini içerir (Şekil 2-6). LNRs ve heterodimerizasyon domainleri, birlikte NOTCH reseptörlerine spesifik önemli bir negatif düzenleyici bölge (NRR) meydana getirirler. NOTCH1'in hücre içi parçası (ICN1), RAM domaini, yedi adet anikrin benzeri tekrarlar, transkripsiyonel aktivasyon domaini ve ICN1 döngüsünü düzenleyen C-terminal PEST bölgesi içerir (37-39).



**Şekil 2-6: Notch1 reseptör yapısı (41).**

Notch reseptörleri, komşu hücre yüzeyinden eksprese edilen Delta/Serrate/Lag-2 ailesine mensup ligantları (Delta1,3,4 ve Jagged1,2) bağlayarak aktive olurlar. Ligandın bağlanmasından sonra NOTCH üç önemli proteolitik kırılmaya (S1-S3) uğrar (42-45) (Şekil 6-7). Son kırılma,  $\gamma$ -sekretaz tarafından katalizlenir ve hücre içi domain (ICN)

membrandan kopar, nükleusa transloke olur. Nükleus içinde, yüksek “core-binding faktör 1/hairless baskılayıcı/ lag-1” (CSL) ile etkileşir (46-48). ICN yokluğunda CSL, histon deasetilaz ile etkileşerek transkripsiyon baskılayıcısı olarak fonksiyon gösterir (Şekil 2-7) (49, 50).

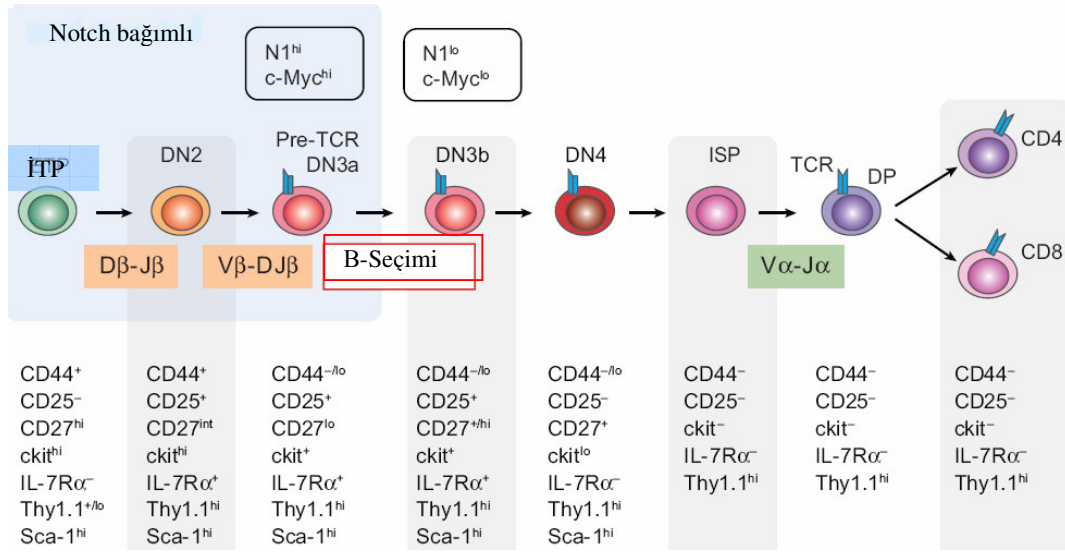


Şekil 2-7: Kanonik Notch yolunun moleküler basamakları (41).

Sitokinler ve Wnt proteinlerinin aksine Notch sinyalini başlatan ligantlar salgılanmaz, bunun yerine timik epitel hücre membranından eksprese edilirler. Yüksek düzeyde NOTCH ligantları Jagged1 ve 2, Delta1 ve 4 fetal ve yetişkin fare timusunda eksprese edilir (51-54). NOTCH ligantlarının ekspresyonu kemirgen ve insan kemik iliği stromasında (Jagged1) ve kemirgen fetal karaciğer (esas olarak Delta1 ve 4). NOTCH reseptörleri kemik iliğinde hematopoetik progenitör hücreler tarafından, fetal karaciğerde çift negatif timositler tarafından eksprese edilirler (35, 50-56).

*NOTCH* eksprese eden hematopoetik progenitör hücreler timusa girdiğinde ve NOTCH ligantları ile etkileştiğinde, NOTCH hedef genlerinin ekspresyonu başlar (54).

NOTCH sinyali, T-hücre kaderinin belirlenmesi için esansiyeldir (Şekil 2-8). *Notch1* geninin delesyona uğratıldığı farelerde T-hücre gelişiminin ÇN1 basamağında tamamen durduğu ve timusta ektopik B-hücre gelişiminin ortaya çıktığı görülmüştür (55). Notch sinyalinin bu etkisi CSL aracılı olmaktadır (56). Diğer taraftan, IC-N ile uyarılmış fare kemik iliklerinde B-hücre gelişiminin inhibe olduğu ve T-hücre yönünde gelişim olduğu gözlenmiştir (58). Benzer yanıtlar, IC-Notch1 veya 4 overexprese eden insan hematopoetik progenitörlerle transplante edilmiş farelerde görülmüştür (56, 59).



Şekil 2-8: Notch1 ve T-hücre gelişimi.

Fonksiyonel Notch1, erken dönemde timus içi T-hücre progenitörlerinin (İTP) tanınmasında ve DN3a (çift negatif 3a) evresinde olgunlaşmada önem teşkil etmektedir.  $\beta$  seçilimi, Notch1 ve c-MYC ekspresyonlarının dinamiği ile ilişkilidir. Notch1 yokluğu  $\beta$  seçim evresini bloke eder. DN, CD4/CD8- çift negatif; ISP, intermediate tek pozitif; DP, CD4+/CD8+ çift pozitif (41).

T hücreleri THR gen düzenlenmelerini tamamladıklarında  $\alpha\beta$  veya  $\gamma\delta$  ekspresyonu gösterirler. *NOTCH1* bu nesillerin belirlenmesinde ikili role sahip olabilir; Erken dönem timosit popülasyonunda NOTCH1 sinyalinin aktive olması ile  $\gamma\delta$  farklılaşması tetiklenebilir. Bununla beraber, geç evrede NOTCH1 sinyalinin inhibisyonu da net olarak  $\alpha\beta$  gelişimini bloke eder (57-62). *NOTCH1* gen ekspresyonu, erken dönem ÇN timositlerde yüksek, ÇP hücrelerde düşük, CD4 ve CD8 TP hücrelerde orta düzeydedir. NOTCH3 ekspresyon düzeyleri ÇN ve ÇP timositlerde NOTCH1 ile

karşılaştırılacak olursa bir hayli yüksektir. Bununla beraber, ÇN ten ÇP e geçişte baskılanırlar ve olgun T lenfositlerinde çok düşük düzeylerde eksprese edilirler (63).

En iyi bilinen *NOTCH* hedef genleri, transkripsiyonel baskılayıcılar olarak görev alan, Hairy-Enhancer of Split (*HES*)1 ve 5, HES ilişkili represör protein (Herp), basic-helix-loop-helix (bHLH) proteinleridir (47, 66). Gerçekte kemik iliğinde *HES1* ve *HES5* in artmış ekspresyonu B-hücre gelişimini inhibe eder (67).

*NOTCH* sinyalinin T-hücre programı içerisinde nasıl aktarıldığı ve downstream mekanizmasının çoğu kısmı hala bilinmemektedir. Doku ve gelişim evresine göre spesifik *NOTCH* ligantlarının ve reseptörlerinin ekspresyonu her ligandın tek ve önemli bir fonksiyona sahip olduğunu düşündürmektedir. Ancak, hangi ligandın hangi mekanizma ile farklı yönde hücre gelişimine neden olduğu net değildir (63).

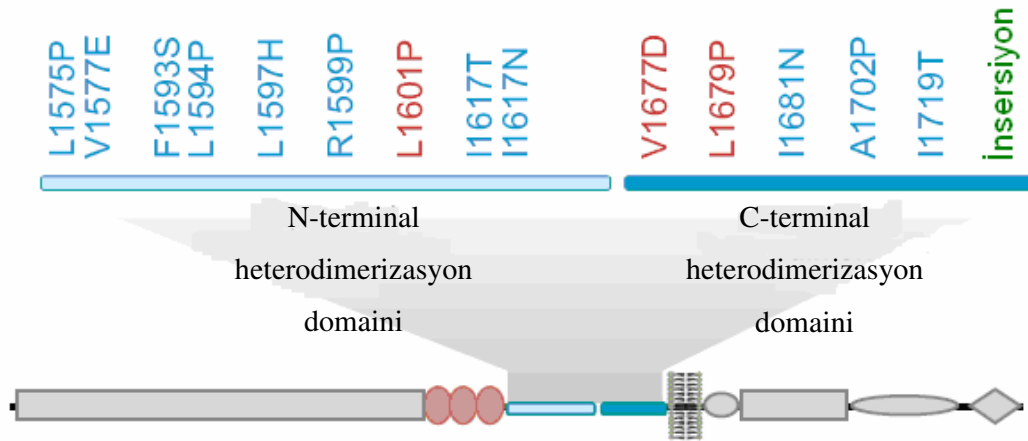
#### 2.2.1.5. T-ALL'de Bozulmuş *NOTCH1* Sinyal Aktivasyonu

*NOTCH1*, T-ALL hastalarının <1% da bulunan t(7;9) kromozomal translokasyonuna katılan genlerden biri olarak keşfedilmiştir. Bu translokasyonda ekstrasellüler domainin büyük kısmı delesyona uğrar ve ortaya EGF ve *NOTCH/LIN12* tekrarlarını kaybetmiş, çeşitli büyüklüklerde *NOTCH1* peptidleri açığa çıkar (64). Bu kesilmiş *NOTCH1* izoformları (örneğin, *TAN1*), geçici olarak *THRB* lokusu biçiminde eksprese edilir ve ligant bağımsız aktiviteye neden olur. Tan1 eksprese eden hematopoetik progenitör hücreler ile transfekte edilmiş farelerde, T-hücreli lösemi geliştiği gösterilmiştir (65-67).

*NOTCH1*'in T-ALL'de merkezi bir role sahip olduğu, son yapılan çalışmalarda *NOTCH1*'in somatik aktive mutasyonlarının T-ALL hastalarında %50 den yüksek oranlarda gözlenmiş olması ile ortaya çıkmıştır. 30 adet insan T-ALL hücre soyu  $\gamma$ -sekretaz inhibitörü kullanılarak *NOTCH1* etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hücre soylarının *NOTCH1* alleli için dizilenmesi sonucunda N- ve C- terminal heterodimerizasyon domainlerinde missense mutasyonlar, PEST bölgesinde de kısa insersiyon ve delesyonlar tanımlanmıştır (68). *NOTCH* ilişkili T-ALL hücre soylarında ve yaklaşık olarak primer T-ALL vakalarının %10-20 sinde hem heterodimerizasyon bölgesinde hem de PEST domaininde mutasyonlar tesbit edilmiştir. Her iki bölgede mutasyon bulunuyorsa, bu mutasyonlar her zaman aynı *NOTCH1* allelinin cis parçasına

lokalizedirler. Yapısal olarak bu NOTCH1 sinyalinin artışına neden olur (68). T-ALL de *NOTCH1* mutasyonları heterozigottur ve tümörler diğer mutant olmayan NOTCH1 allelini eksprese etmeyi sürdürürler.

Heterodimerizasyon domaini (HD), NOTCH1'in intrasellüler ve ekstrasellüler kısmı arasındaki stabil ilişkiyi sağlar ve ligand bağımsız sinyal oluşumunu engeller (69). Heterodimerizasyon domain mutasyonları iki tiptir (Şekil 2-9) : tip1 mutasyonları, korunmuş bölgelerde tek aminoasit substitüsyonları veya kısa çerçeve içi birkaç rastgele aminoasit insersiyon veya delesyonlarını içermektedir. Nadir görülen tip2 mutasyonları, C-terminal ucuna ardı sıra gelen 12-15 amino asitlik insersiyonlardır. Bu tip mutasyonlar, S2 kırılma bölgesinin duplikasyonuna neden olurlar. Tip1 mutasyonlar çözülebilir furin işlenmesini destabilize ederler. Bu da normal koşullar altında NOTCH1 alt ünitelerinin ayrılmasına neden olur (70).



**Şekil 2-9: NOTCH1 gen mutasyon dağılımları.**

**Tip 1A** mutasyonları heterodimerizasyon domaininin normal koşullarda ayrılmasına neden olur. NOTCH1 mutasyonlarının ~%20'sini oluştururlar. **Tip 1B** mutasyonları heterodimer stabilitesini azaltır, mutasyonların ~%80'ini kapsarlar. **Tip 2** mutasyonları 12- 15 nükleotidlik insersiyon ve delesyonları içerir. Ligand bağımsız instabiliteye neden olan bu mutasyonlar daha nadir görülür (41).

PEST bölgesinin ICN1 döngüsünün düzenlenmesinde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. Çoğu C-terminal kırılma bölgesi yüksek oranda korunmuş 2521WSSSSP2526 dizisine sahiptir. Hücre kültüründe, bu dizide oluşan mutasyonların ICN1 fosforilasyonunu azaltarak ICN1 stabilitesini artırdığı gözlenmiştir (71). Düzenleyici motiflerden olan S2514,S2517 ve S2539 bir RNA polimeraz II holoenzimi

komponenti olan siklin-bağımlı kinaz 8 ile fosforile edilebilirler. Bu bölgelerin delesyonu, NOTCH transkripsiyon kompleksi kinetiğini değiştirebilir ve böylece hedef genlerin artmış ekspresyonuna ya da baskılanmalarına neden olabilirler (72).

ICN1'in transformasyonu tetikleyebilmesi için T-hücre spesifik kooperatif sinyallere ihtiyacı vardır. Bu hipotez, pre-THR sinyali yokluğunda ICN1'in bozulmuş ve artmış ekspresyonunun lösemiye neden olması ile desteklenmektedir (71). NOTCH1 direkt olarak pre-TCR $\alpha$  geninin (*Ptcra*) upregülasyonu ile ilişkilidir. Ancak ekspresyonuna kesinlikle ihtiyaç olduğu söylenemez. Buna kanıt, NOTCH1'in kondisyonel delesyonlarında T-hücrelerinde *Ptcra* ekspresyonunun devam etmesidir. Diğer bir faktör olarak Ikaros CSL yokluğunda *Prcra* indüksiyonunda etkin olabilir (62, 74, 75). Bununla beraber, THR sinyalinin iki komponenti olan *RAS* ve *LCK* da lökomogenez ile ilişkili görülmüştür. *NOTCH1*, *DELTA1* ve *PRESENİLİN-1* transkripsiyonunu *RAS* tetikleyebilir. Bu da NOTCH yolağının aktivasyonuna sebebiyet verir (76). NOTCH ve *LCK* sinyal yolakları, hücre sağ kalımını arttıran ve malign klonlara yeni onkogenik mutasyonlar kazandıran bir seri anti-apoptotik genlerin aktivasyonuna neden olurlar (73). Pre-TCR sinyali üzerinden etkili bir başka gen de *SİKLİN D3* tür ve ÇN timositlerin proliferasyonu için önemlidir. T-hücre gelişiminde bu etkisinin yanı sıra, lökomogenezde NOTCH1 ile iş birliği yapmaktadır (77).

NOTCH sinyali THR temelli apoptozu engelleyebilir ve kontrol edilemeyen büyüme ve yayılma gösteren timositlerin oluşumuna neden olabilir (78-80). Daha da fazlası, NOTCH1 ilişkili T-ALL'de lenfoblastlar klonaldır ve lökomogenez için ek onkogenik bozulmalara ihtiyaç vardır. Buna bağlı olarak, Notch1 MYC, E2A-PBX1 ile ortaklaşa çalışabilir ve dominant negatif Ikaros veya Ikaros(-) fare modellerinde T-ALL yi tetikleyebilir (74-77).

Bütün bu mekanizmlar, NOTCH1 aktivasyonunun T-ALL patogeneğinde merkezi role sahip olduğunu ve birçok moleküler yolakla ortaklaşa çalıştığını ortaya koymaktadır.

T-ALL nin tersine, *NOTCH1* mutasyonları B-ALL de görülmez (4). AML vakalarında ise nadiren görülür (78). *NOTCH1* mutasyonuna sahip AML'ler minimal myeloid farklılaşma göstermektedirler. Sıklıkla T hücre antijenlerini eksprese ederler ve ekspresyon profillerine göre alt gruplara ayrılırlar. İlginç olarak, *NOTCH1* mutasyonuna sahip AML hastalarının yüksek oranda Tribbles homolog2 (*Trib2*) eksprese ettikleri



gözenmiştir. Fare hematopoetik kök hücrelerinde eksprese edildiğinde Trib2 nin Notch1 in direkt transkripsiyonel hedeflerinden biri olduğunu ve AML'yi tetiklediği gösterilmiştir (81).

T-ALL dışında NOTCH sinyalinin bozulmuş aktivasyonu pankreas karsinomları, servikal karsinomlar, prostat karsinomu, multiple myeloma, B-hücreli kronik lenfositik lösemide ve melanomlar gibi birçok kanser tipinde gösterilmiştir. Ayrıca, NOTCH sinyali tümör anjiyogenezinde rol oynayarak karsinogenezi tetikleyebilir (79).

Bu çalışmamızda, T-ALL hastalarımızdaki *NOTCH1* mutasyon sıklığı ve dağılımları, hastaların klinik parametreleri ile (cinsiyet, tanı, lökosit sayısı, relaps, translokasyon varlığı v.b.) mutasyon varlığı/yokluğu arasındaki ilişki, NOTCH1 mutasyonlarının T-ALL patogenezinde ve de prognozundaki rolü araştırıldı.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Hasta Grubu

Çalışma, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD. Hematoloji/ Onkoloji Bilim Dalı (n=11), İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ve İç Hastalıkları AD'ları Hematoloji Bilim Dalı (n=41), Sağlık Bakanlığı Göztepe Hastanesi (n=5), Bakırköy Hastanesi (n=14) ve Okmeydanı Hastanesi (n=1) Çocuk Hematoloji Birimleri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD. Hematoloji/ Onkoloji Bilim Dalı (n=2), Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD. Hematoloji/ Onkoloji Bilim Dalı (n=1), Haydarpaşa Numune Hastanesi Çocuk Hematoloji Birimleri (n=1), Şişli Etfal (n=7) ve Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=3) İç Hastalıkları Hematoloji Birimlerinden T-ALL tanısı almış 86 olguda gerçekleştirildi. Çalışma başlatılmadan önce İ.Ü. Çapa Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan onay alındı ve hasta onam formu imzalatıldı. Hasta materyali 1999-2008 yılları arasında toplanmıştır. Hastalarımızın n=75'ü pediatrik, n=11'i yetişkindir. Hastaların immün fenotiplerine göre ayrımı EGIL sınıflamasına uygun olarak yapılmıştır (82). Hastalara ait klinik parametreler Tablo 3-1'de verilmiştir. Çalışma İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik laboratuvarında yapılmıştır.

### 3.1.2. T-ALL Hastalarına Ait Klinik Parametreler

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik durumları Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

**Tablo 3-1: T-ALL hastalarına ait klinik veriler.**

<b>Klinik Parametreler (n=86)</b>	<b>Kişi Sayısı</b>
Cinsiyet	
Kadın	28
Erkek	58
Ortalama Yaş	
≤16 (8,1 ± 4,2)	75
>16 (28 ± 9,1)	11
Tanıda Lökosit	
< 50X10 <sup>9</sup> /L	37
> 50X10 <sup>9</sup> /L	37
Bilinmeyen	12
T-Hücre İmmünofenotip	
İmmature	32
Mature	18
Kortikal	17
Tanımlanamayan	19
Materyal Zamanı	
Tanı	71
Relaps	4
Bilinmeyen	11
Lenf Adenopati	
var	35
yok	51
Merkezi Sinir Sistemi Tutulumu	
var	13
yok	73
Son Durum	
Remisyon	23
Ex	40
Takip dışı	23

**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
Glasiyal asetik asit	Merck, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
TEAA Buffer A	Wave System
TEAA Buffer B	Wave System
Syringe Wash Solution	Wave System
Buffer D	Wave System

**3.1.4. PZR Materyali**

GoTaq DNA polimeraz (10U/ $\mu$ l)	Promega, USA
5X Colorless Flexi Buffer	Promega, USA
25mM MgCl <sub>2</sub>	Promega, USA
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/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, Litvanya
Revers Transkriptaz (200 U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, Litvanya

Random primer

MBI Fermentas, Litvanya

### **3.1.6. Kullanılan Cihazlar**

Hassas terazi (Shimadzu)

Otomatik pipetler (Glison, Eppendorf)

Çeker 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)

Qia-cube (Qiagen)

### **3.1.7. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler**

**Etidyum Bromür**

Steril ddH<sub>2</sub>O ile 10mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı.

**Agaroz jel yükleme tamponu (10ml)**

10 ml steril ddH<sub>2</sub>O içinde %0,25 Bromfeol 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 ddH<sub>2</sub>O ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

**Solüsyon D**

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

**3.2. Yöntemler**

T-ALL hastalarından tanı sırasında kan veya kemik iliği örnekleri toplandı. Kan/kemik iliği materyallerinden Qiagen RNA izolasyon kiti ile üretici firmanın önerdiği metod doğrultusunda Qia-cube cihazı kullanılarak total RNA elde edildi (Qiagen, Almanya). Bu örneklerden daha sonra cDNA sentezi yapıldı. Bu cDNA'lar kullanılarak, NOTCH1 reseptörünün heterodimerizasyon ve PEST bölgesine spesifik primerler ile Polimeraz zincir Reaksiyonu (PZR) yapıldı. PZR örnekleri uygun ısılarda denatüre edici yüksek performans sıvı kromatografisine (dHPLC) yüklenerek analiz edildi. dHPLC'de değişiklik gösteren ürünler çift yönlü dizilendi. Dizilemeler CLC work bench 3.6.1 (Danimarka) programı kullanılarak analiz edildi.

**3.2.1. Lökosit İzolasyonu**

Eritrosit lysis (EL) tampon çözeltisi kullanılarak santrifügasyon yöntemi ile kan/kemik iliği materyalinden lökosit izole edildi. Lökosit pelleti 600µl Solüsyon D içinde çözülerek, steril vidalı kapaklı tüpte -80°C'de saklandı.

**3.2.2. RNA İzolasyonu**

600µl Solüsyon D içindeki lökosit örneklerinden, standart kit protokolüne uygun olarak Qia-cube cihazında otomatize bir şekilde RNA izole edildi (Qiagen, Almanya).

### 3.2.3. cDNA Sentezi

Spektrofotometre kullanılarak RNA örneklerinin kalitesi ve miktarları ölçüldü. Her örnek 10µl de 1µg RNA olacak şekilde sulandırıldı. 1µl random primer eklenerek 70°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 kondüsyonları.**

<b>Reaksiyon karışımı</b>	
5X RT Buffer	4µl X
10 mM dNTP mix	1µl X
DTT (0,1M)	4µl X
RNaz inhibitör (20U/µl)	1µl X
Revers Transkriptaz (200 U/ µl)	1µl X
Toplam	9µl

Bu karışım, ilk karışım eklendikten sonra 37°C’de 1 saat ardından da 70°C’de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

### 3.2.4. PZR

*NOTCH1* geninin daha önceki çalışmalarda mutasyon saptanan heterodimerizasyon bölgesi (HDN, HDC) ve PEST bölgelerini amplifiye etmek için NM 017617 dizisi üzerinden “FastPCR” (Mikrosoft Visiual Studia 6.0, Visual Basic 6.0 SP6) primer dizayn programı kullanılarak forward ve reverse primer çiftleri dizayn edildi (Tablo 3-3). Dizayn edilen primerlerin “BLAST” programı ile Gen Bankasındaki insana ait diğer genlerdeki homolojisi araştırıldı ve başka genlere uymadığı saptandı.

**Tablo 3-3: HD-N, HD-C, PEST bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri.**

Gen Bölgesi	Primer Dizileri	Primer Boyu	Ürün Boyu
HDN-1	F: 5'- ACTGTGACAGCCAGTGCAAC -3'	20	353 bp
	R: 5'- GCCGTAGTAGGGGAAGATCA -3'	20	
HDN-2	F: 5'- CAACAGCTCCTTCCACTT -3'	18	297 bp
	R: 5'- CACTGCCGGTTGTCAATCT -3'	19	
HDC	F: 5'- AGATTGACAACCGGCAGTC -3'	19	216 bp
	R: 5'- CCACGAAGAACAGAAGCACA -3	20	
PEST-1	F: 5'- CCTGTCCCAGATGATGAGCT -3'	20	308bp
	R: 5'- TCTCCTGGGGCAGAATAGTGT -3'	21	
PEST-2	F: 5'- CTGGCGGTGCACACTATTCT- 3'	20	386bp
	R: 5'- ATCCACAGAGCGCACACAGA- 3'	20	

T-ALL cDNA'ları kullanılarak, *NOTCH1* geninin heterodimerizasyon ve PEST bölgelerine spesifik primerler ile uygun koşullarda PZR yapıldı (Tablo 3-4). PZR örnekleri %2'lik agaroz jelde yürütülüp amplifikasyon varlığı gösterildi.



**Tablo 3-4: HD ve PEST bölgelerinin spesifik primerler ile yapılan PZR koşulları.**

<b>PZR Reaksiyon İçeriği</b>	<b>Miktar</b>	<b>PZR Reaksiyon Koşulları</b>	
<b>HDN-1</b>			
ddH <sub>2</sub> O	34,8 µl	Ön denatürasyon	95°C 5'
5X Buffer	5 µl	Denatürasyon	95°C 45"
MgCl <sub>2</sub>	2 µl	Bağlanma	60°C 45"
dNTP (2mM)	5 µl	Uzama	72°C 1'
Primerler (10pmol)	1 µl	Tamamlanma	72°C 10'
Taq Polimeraz	0,2 µl	Döngü sayısı	40
cDNA	2 µl		
<b>HDN-2, HDC</b>			
ddH <sub>2</sub> O	34,8 µl	Ön denatürasyon	95°C 5'
5X Buffer	5 µl	Denatürasyon	95°C 45"
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	Bağlanma	56°C 45"
dNTP (2mM)	5 µl	Uzama	72°C 1'
Primerler (10pmol)	1 µl	Tamamlanma	72°C 10'
Taq Polimeraz	0,2 µl	Döngü sayısı	40
cDNA	2 µl		
<b>PEST1-2</b>			
ddH <sub>2</sub> O	34,8 µl	Ön denatürasyon	95°C 5'
5X Buffer	5 µl	Denatürasyon	95°C 45"
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	Bağlanma	55°C 45"
dNTP (2mM)	5 µl	Uzama	72°C 1'
Primerler (10pmol)	1 µl	Tamamlanma	72°C 10'
Taq Polimeraz	0,2 µl	Döngü sayısı	40
cDNA	2 µl		

### 3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

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 görünüler bilgisayara aktarıldı.

### 3.2.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

%2 konsantrasyonda agaroz jel hazırlanması için 1gr. Agaroz tartılarak 50 ml 1X TAE solüsyonu içinde bir beherde çözüldürüldü. 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 elektroforez tepsisine döküldü. Taraklar yerleştirildi ve jelin donması için beklendi. Tepsi 1X TAE solüsyonu içeren yatay elektroforez tankına yerleştirildi.

### 3.2.6. DHPLC

WAVE kolon-tabanlı bir formatta özel bir yüksek-çözünürlükte DNA ve RNA analiz sistemidir. Başlıca uygulama alanları genetik mutasyonların görüntülenmesi ve tespitini, mikrobiyal, farmasötik, biyoteknoloji, adli tıp, bitki ve hayvan araştırmalarındaki yeni yöntemleri kapsamaktadır (80).

DHPLC (denatüre edici yüksek performans sıvı kromatografisi) metodundan yararlanarak önceden tanımlanmış genleri, bilinen ve bilinmeyen genetik varyasyonlar ve mutasyonları için analiz eder. 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 ısısı, 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 pikin gözlenecektir (81). DHPLC sisteminin dizilemeden önce kullanılması hem maliyeti düşürmesinden hemde uygulanım ve analiz kolaylığından dolayı mutasyon ve SNP taramalarında avantaj sağlamaktadır (82) .

%2'lik jelde amplifikasyonu gösterilen örnekler, NOTCH1 ampikonlarına 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 ampikon için mutant olmadığını bildiğimiz 2

örnek kullanıldı. dHPLC’de örnek analizler bu standart ve kontrol örneklerine göre yapıldı. Farklılık arz eden hasta örnekleri çift yönlü dizilemeye gönderildi.

**Tablo 3-5: dHPLC’de HD ve PEST ampliconlarına spesifik ısılar.**

Gen Bölgesi	İlk Isı	İkinci Isı
HDN-1	64 °C	66,3 °C
HDN-2	64,8 °C	67 °C
HDC	65,5 °C	66,7 °C
PEST-1	64 °C	66 °C
PEST-2	64,8 °C	65,2 °C

### 3.2.7. Dizileme Analizi

DHPLC’de farklılık gösteren örnekler için dizileme ve purifikasyon 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. İstatistik Analiz

T-ALL hastalarına ait değişkenler (mutasyon varlığı ve tüm klinik parametreler) Fisher’s exact test ile analiz edildi. Gruplar (immünofenotip grupları) ve klinik parametreler (cinsiyet, yaş vb.) arasındaki korelasyonlar regresyon analizi ile belirlendi. Sağ kalım analizleri Kaplan-Meier metodu ile belirlendi ve gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için Cox Regresyon testi kullanıldı. Analizler SPSS 10.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. *P* değerleri çift taraflı olarak alındı ve  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada, 28 kadın, 58 erkek olmak üzere toplam 86 T-ALL hastası *NOTCH1* geninin yaygın mutasyon bölgeleri olan heterodimerizasyon (ekzon 26-27) ve Pest (ekzon 34) domain mutasyonları açısından incelendi. PZR ile çoğaltılan bölgeler uygun ısılarda dHPLC'ye yüklenerek analiz edildi. dHPLC'de farklılık gösteren örnekler çift yönlü dizilemeye gönderilerek değerlendirildi. Çift yönlü dizileme sonucunda 86 T-ALL hastasının 21'inde (%24) mutasyon görüldü. Bu mutasyonların 13'ü ( %15) sadece heterodimerizasyon (HD) bölgesinde, 6 tanesi sadece (%7) PEST bölgesinde, 2 'si (%2) hem HD hem de PEST bölgelerinde görüldü (Tablo 4-1).

**Tablo 4-1: T-ALL hastalarında, *NOTCH1* HD ve PEST domain mutasyonlarının dağılımı.**

	75 Çocuk Hastada mutasyon sayısı	11 yetişkin hastada mutasyon sayısı
Herhangi bir domainde mutasyon (% toplam kohort)	18	3
Sadece HD	11 15%	2 19%
Sadece PEST domaininde	5 7%	1 8%
HD+PEST	2 3%	
HD-N ( bütün HD-N mutasyonlarının %)	10	2
Lösinden proline	4 40%	2 100%
Diğer nokta mutasyonları	6 60%	
HD-C (bütün HD-C mutasyonlarının %)	3	
Nokta mutasyonları	1	
İnsersiyon ve/veya delesyonlar	3 100%	
PEST (bütün PEST mutasyonlarının %)	7	1
Stop kodon oluşturan nokta mutasyonları	2 29%	1 100%
İnsersiyon ve/veya delesyonlar	3 43%	
Lösinden proline	2 29%	

Tespit edilen bütün *NOTCH1* mutasyonları ve varyasyon tipleri Tablo 4-2'de ve Tablo 4-3'de bildirilmektedir.

**Tablo 4-2:T-ALL hastalarında *NOTCH1* heterodimerizasyon bölgesi için saptanan mutasyon ve diğer varyasyonlar.**

Domain	Hasta No	Sınıf	Mut. Tipi	Amino asit değişimi	Mutasyon bildirimi
HD-N	T24	NM	4665 C>T, 4757 T>C	C1555C, L1586P	T
	T62	NM	4681 G>A	D1561N	B
	T70	NM	4724 T>C	L1575P	T
	T92	NM	4724T>C	L1575P	T
	T97	NM	4724T>C	L1575P	T
	T28	NM	4757 T>C	L1586P	T
	T13	NM	4796 G>C	R1599P	T
	T27	NM	4796 G>C	R1599P	T
	T39	NM	4796 G>C	R1599P	T
	T77	NM	4796 G>C	R1599P	T
	T10	NM	4802 T>C	L1601 P	T
	T73	NM	4824 G>T	K1608N	T
	HD-C	T2	İns	5082_5083 insT, 5093_5094 insT	1694Q>1798*stop
T41		İns	5082_5083 insT, 5093_5094 insT	1694Q>1798*stop	B
T53		NM, İns	5064 G>T, 5072 C>T, 5082 ins 5083	Q1688D, S1691L, 1694Q>1720*stop	B
T3		NM	5097 C>T	1699	SNP
T12		NM	5097 C>T	1699	SNP
T18		NM	5097 C>T	1699	SNP
T22		NM	5097 C>T	1699	SNP
T27		NM	5097 C>T	1699	SNP
T28		NM	5097 C>T	1699	SNP
T30		NM	5097 C>T	1699	SNP
T32		NM	5097 C>T	1699	SNP
T35		NM	5097 C>T	1699	SNP
T38		NM	5097 C>T	1699	SNP
T47		NM	5097 C>T	1699	SNP
T51		NM	5097 C>T	1699	SNP
T55		NM	5097 C>T	1699	SNP
T68		NM	5097 C>T	1699	SNP
T71		NM	5097 C>T	1699	SNP
T73		NM	5097 C>T	1699	SNP
T74		NM	5097 C>T	1699	SNP
T77	NM	5097 C>T	1699	SNP	
T80	NM	5097 C>T	1699	SNP	
T85	NM	5097 C>T	1699	SNP	
T88	NM	5097 C>T	1699	SNP	
T92	NM	5097 C>T	1699	SNP	
T97	NM	5097 C>T	1699	SNP	

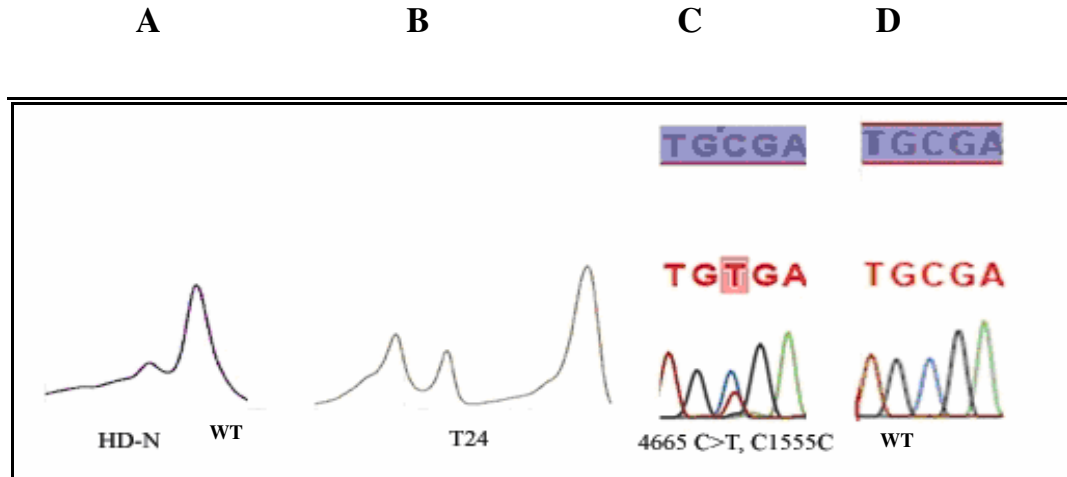
T, daha önceden tanımlanmış olan mutasyonları ve varyasyonlar; B, bilinmeyen varyasyonlar; SNP, tek nükleotid polimorfizimi; NM, nokta mutasyonu; İns, insersiyon.

**Tablo 4-3:T-ALL hastalarında PEST domaini için *NOTCH1* mutasyon ve varyasyonları.**

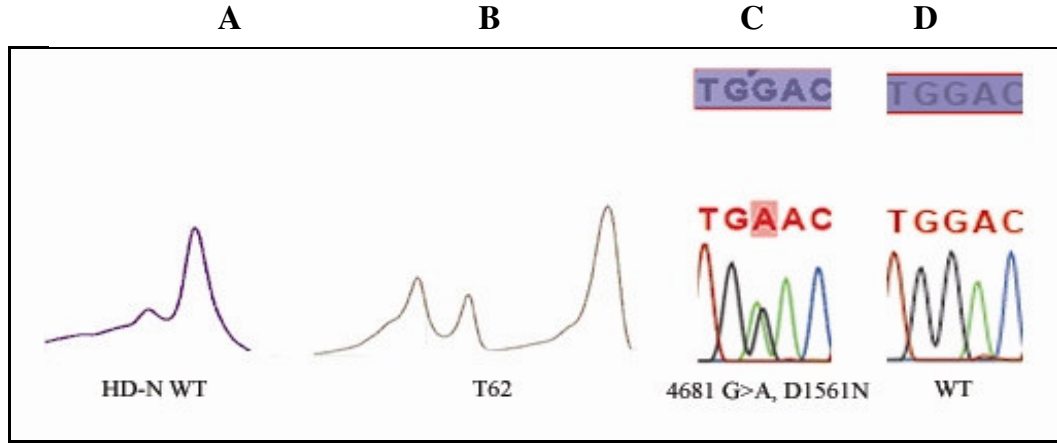
Domain	Hasta No	Sınıf	Mut. Tipi	Amino asit değişimi	Mutasyon bildirimi
PEST	T60	NM	7126 A>T 7318 A>G, 7320_7321 ins,dup AGGGG,	T2376F	B
	T73	NM, ins,dup	7321_7322 ins TCCCTCTGA, 7329 C>A, 2440S>2446*stop 7359 G>A, 7364 C>A		B
	T84	NM	7180 C>T	Q2394 *stop	B
	T92	NM	7195 C>T	Q2399 *stop	T
	T81	İns, NM	7331_7332 ins GAGCTTCG, 7357 G>C 7335_7336 insA, 7336_7337 insATG,	2444V>2561*stop	B
	T95	İns, NM	7338_7339 insGGCC, 7354 CC>TG 7355, 2445Q>2479*stop 7378 C>A		B
	T89	NM	7378 C>T	Q2460 *stop	T
	T74	NM	7553 C>T	P2518L	B

T, daha önceden tanımlanmış olan mutasyonları ve varyasyonlar; B, bilinmeyen varyasyonlar; SNP, tek nükleotid polimorfizimi; NM, nokta mutasyonu; İns, insersiyon; dup, duplikasyon.

Tanımlanan mutasyonlara ait dizi analizi ve dHPLC diagramları Şekil 4-1'den Şekil 4-17'ye kadar gösterilmektedir.

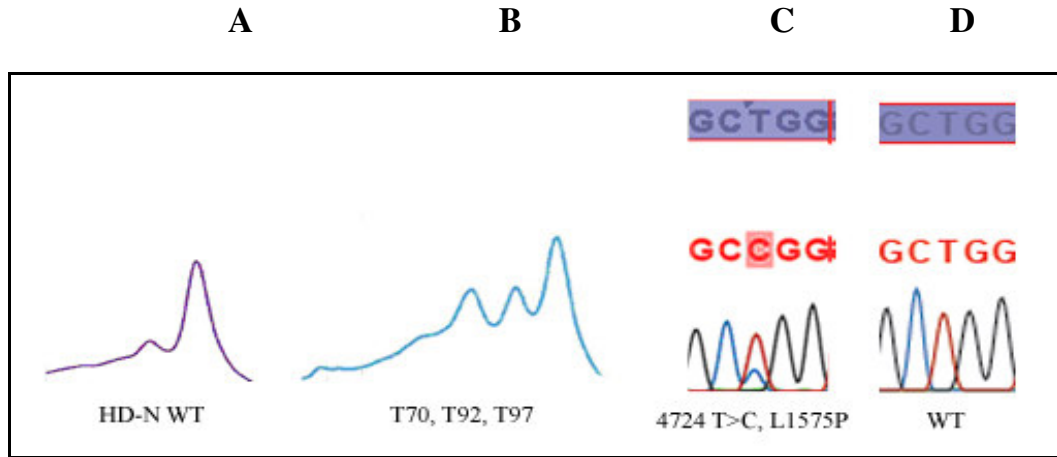
**Şekil 4-1: T24'nin HD-N domaininde C1555C varyasyonu.**

A, HD-N bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T24 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T24 dizileme sonucu; D, 4665 nükleotidin normal tip bulunduğu dizileme sonucu.



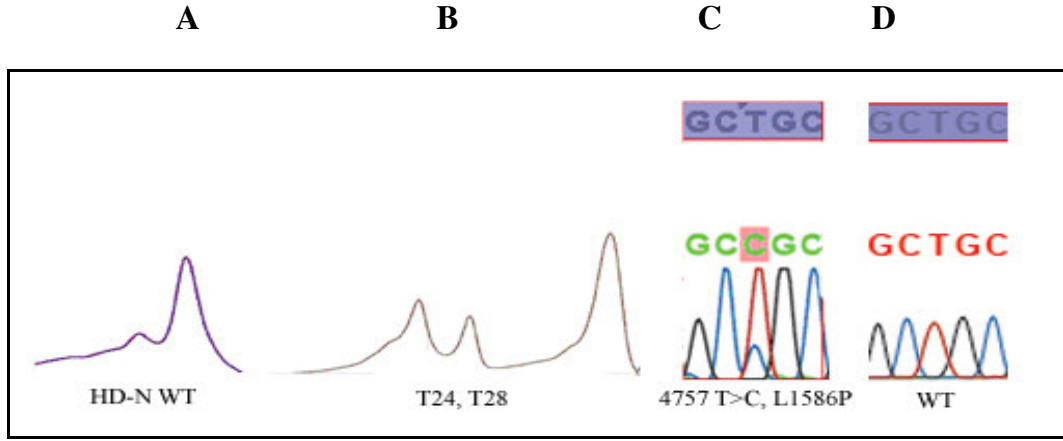
**Şekil 4-2: T62'nin HD-N domaininde D1561N varyasyonu.**

A, HD-N bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T62 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T62 dizileme sonucu; D, 4681 nükleotidin normal tip bulunduğu dizileme sonucu.



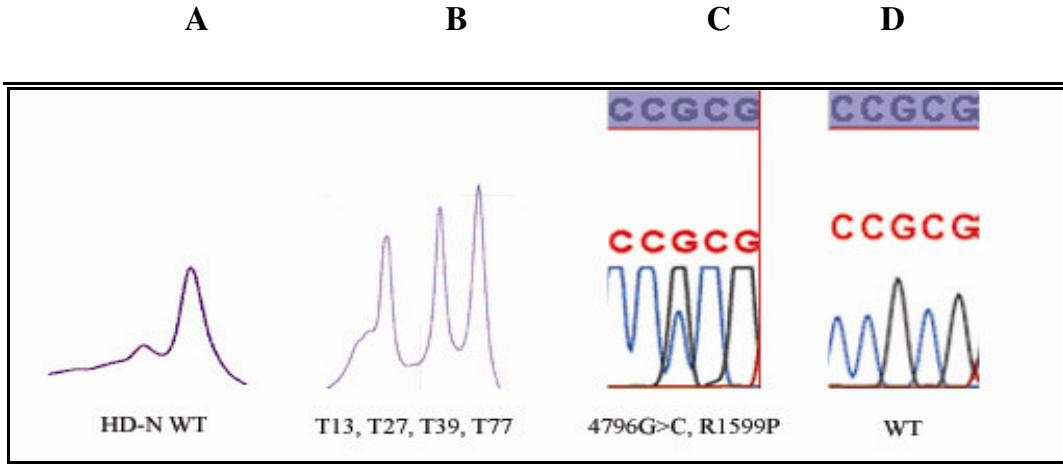
**Şekil 4-3: T70, T92, T97'nin HD-N domaininde L1575P mutasyonu (68).**

A, HD-N bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T70, T92, T97 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T70, T92, T97 dizileme sonucu; D, 4724 nükleotidin normal tip bulunduğu dizileme sonucu.



**Şekil 4-4: T24, T28'in HD-N domaininde L1586P mutasyonu (69).**

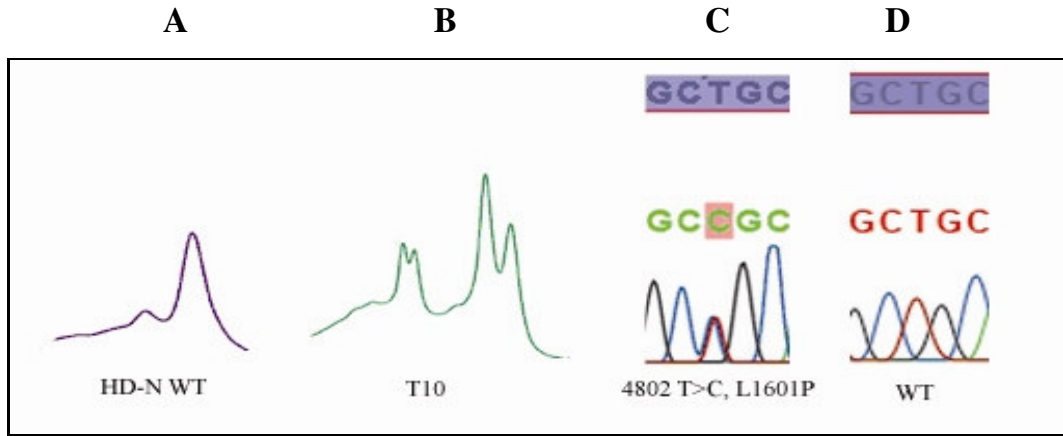
A, HD-N bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T24, T28 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T24, T28 dizileme sonucu; D, 4757 nükleotidin normal tip bulunduğu dizileme sonucu.



**Şekil 4-5: T13, T27, T39, T77'nin HD-N domaininde R1599P mutasyonu (69).**

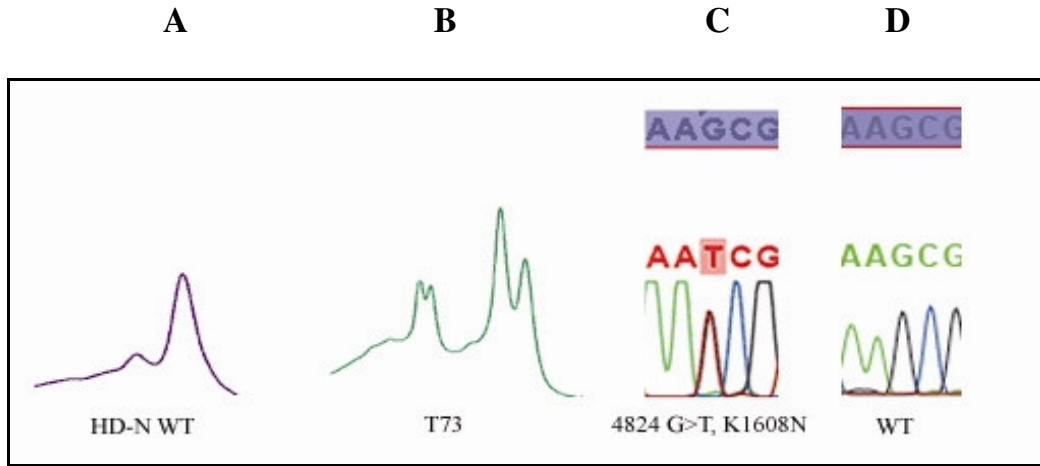
A, HD-N bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T13, T27, T39, T77 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T13, T27, T39, T77 dizileme sonucu; D, 4796 nükleotidin normal tip bulunduğu dizileme sonucu.





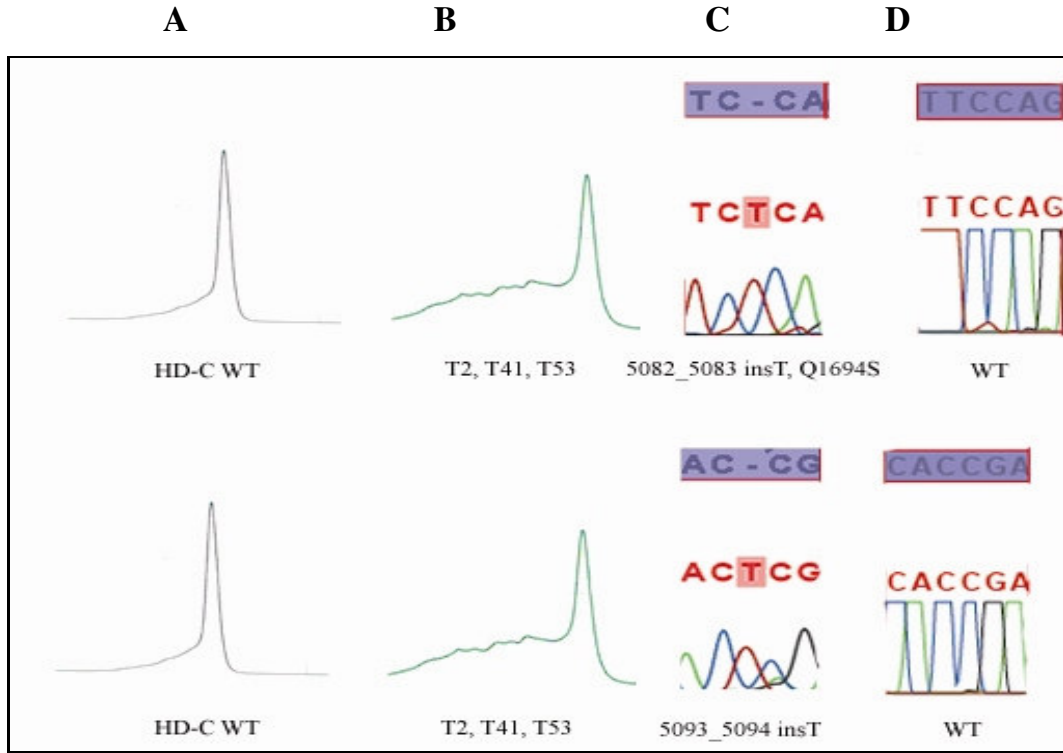
**Şekil 4-6: T10'un HD-N domaininde L1601P mutasyonu (69).**

A, HD-N bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T10 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T10 dizileme sonucu; D, 4802 nükleotidin normal tip bulunduğu dizileme sonucu.



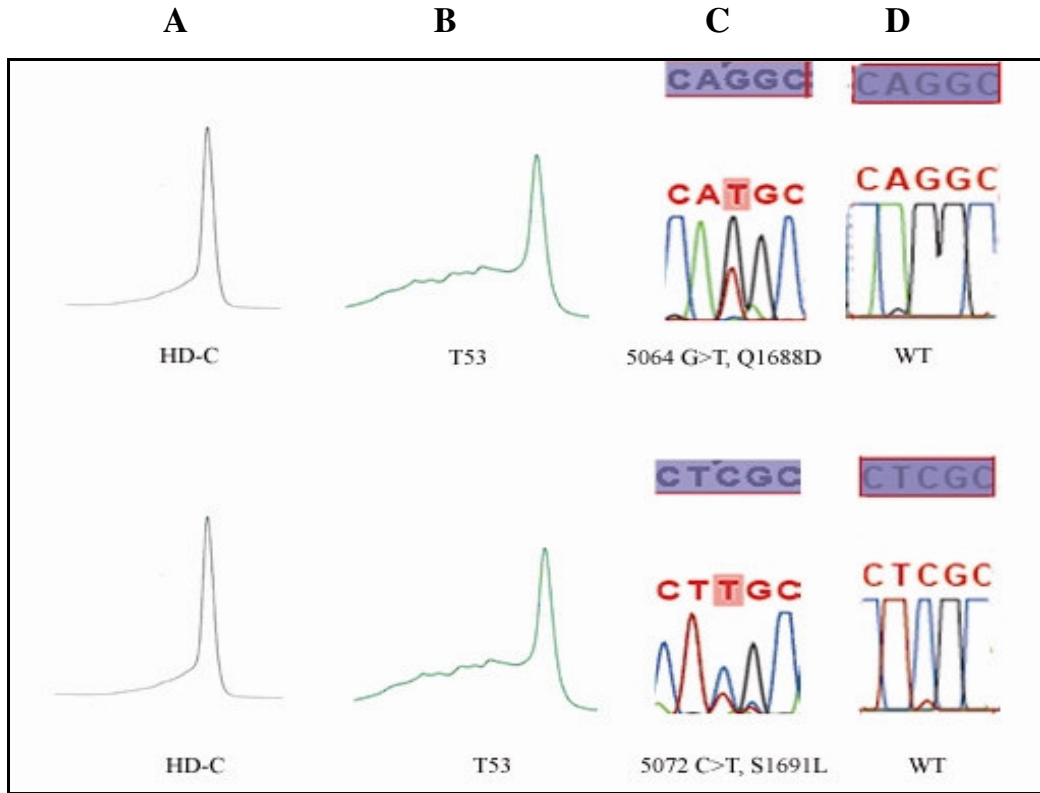
**Şekil 4-7: T73'ün HD-N domaininde K1608N mutasyonu (69).**

A, HD-N bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T73 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T73 dizileme sonucu; D, 4824 nükleotidin normal tip bulunduğu dizileme sonucu.



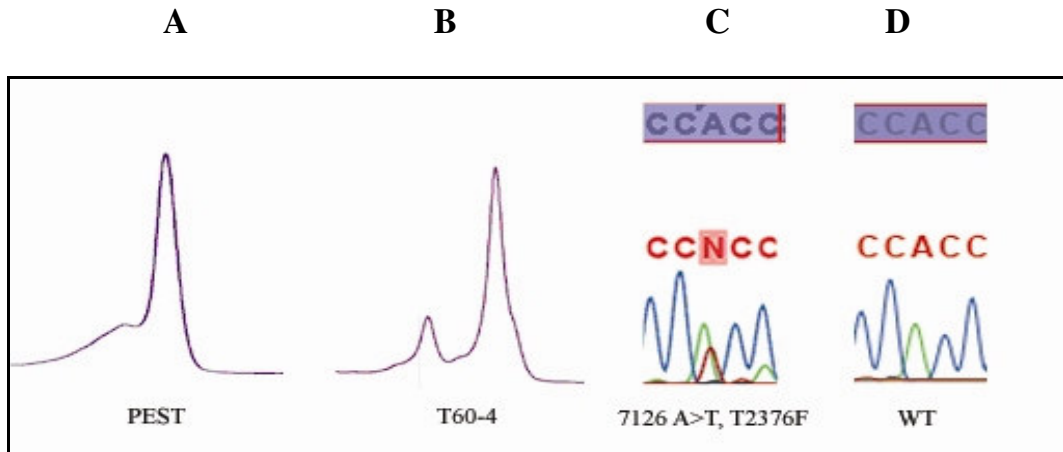
**Şekil 4-8: T2, T41, T53'ün HD-C domaininde Q1694S ve 1694Q>1798\*stop varyasyonları.**

A, HD-C bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T2, T41, T53 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T2, T41, T53 dizileme sonucu; D, bu bölge için normal tip dizileme sonucu.



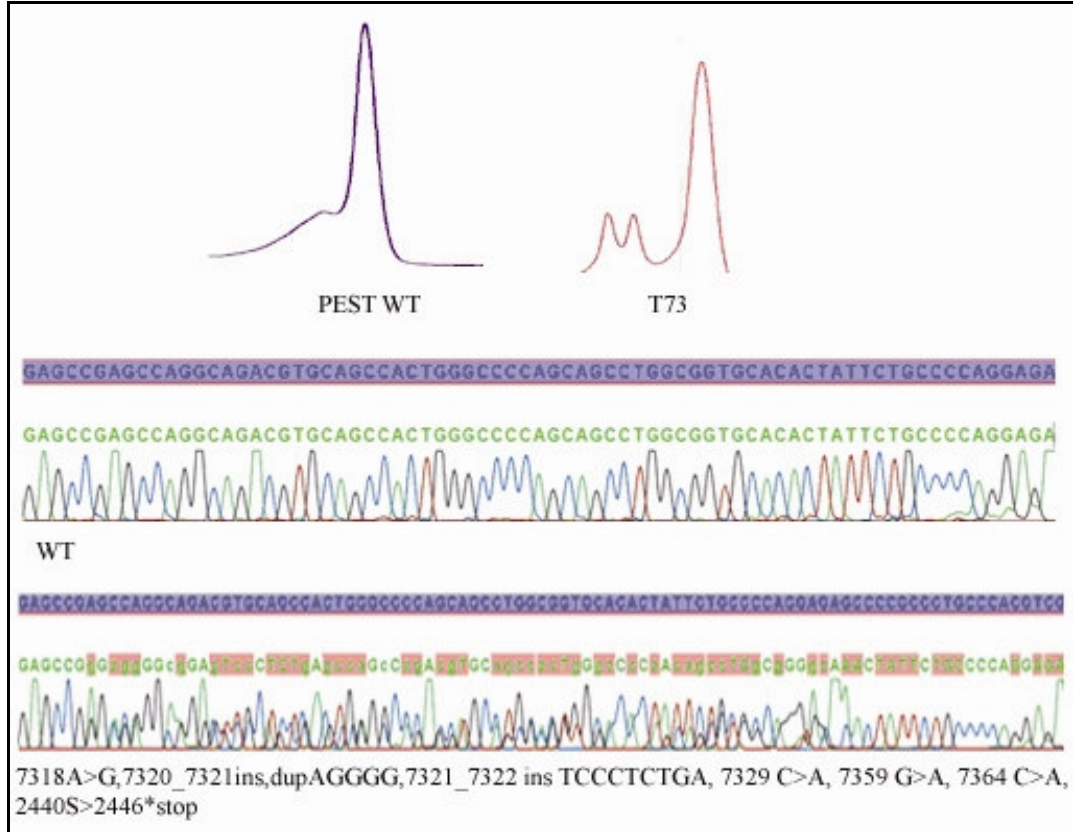
**Şekil 4-9: T53'ün HD-C domaininde Q1688D ve S1691L varyasyonları.**

A, HD-C bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T53 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T53 dizileme sonucu; D, bu bölge için normal tip dizileme sonucu.



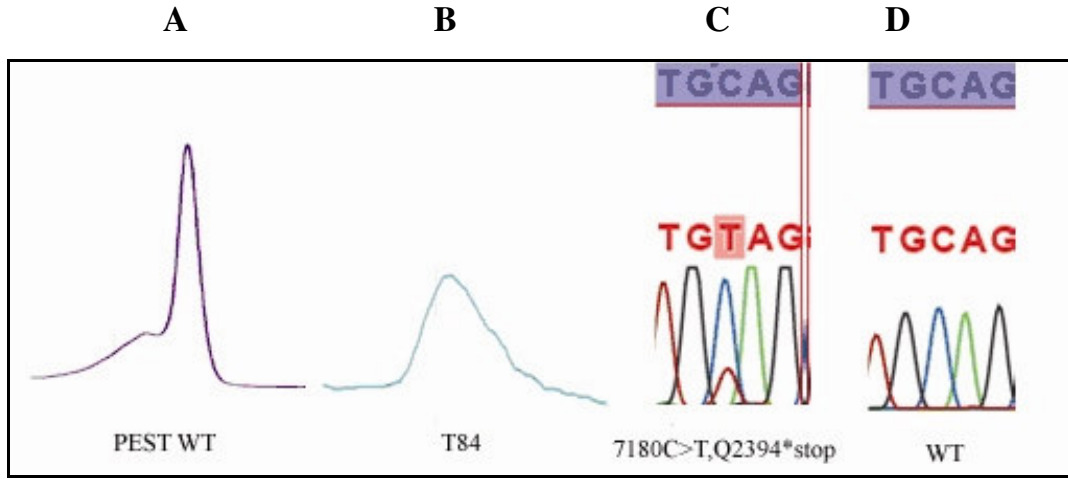
**Şekil 4-10: T60'm PEST domaininde T2376F varyasyonu.**

A, PEST bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T60 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T60 dizileme sonucu; D, bu bölge için normal tip dizileme sonucu.



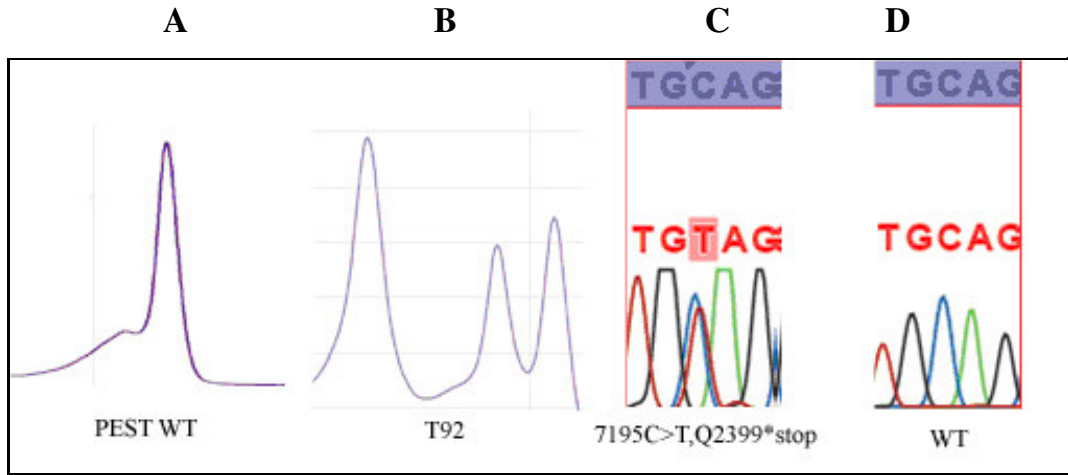
**Şekil 4-11: T73'ün PEST domaininde 2440S>2446\*stop varyasyonu.**

Üst kısımdaki ilk grafik PEST bölgesi için normal tip dHPLC pik paternini; ikincisi T73 için mutant dHPLC pik paternini; birinci dizileme sonucu normal tip diziyi, en alttaki dizileme sonucu mutant T73 dizileme sonucunu ifade etmektedir.



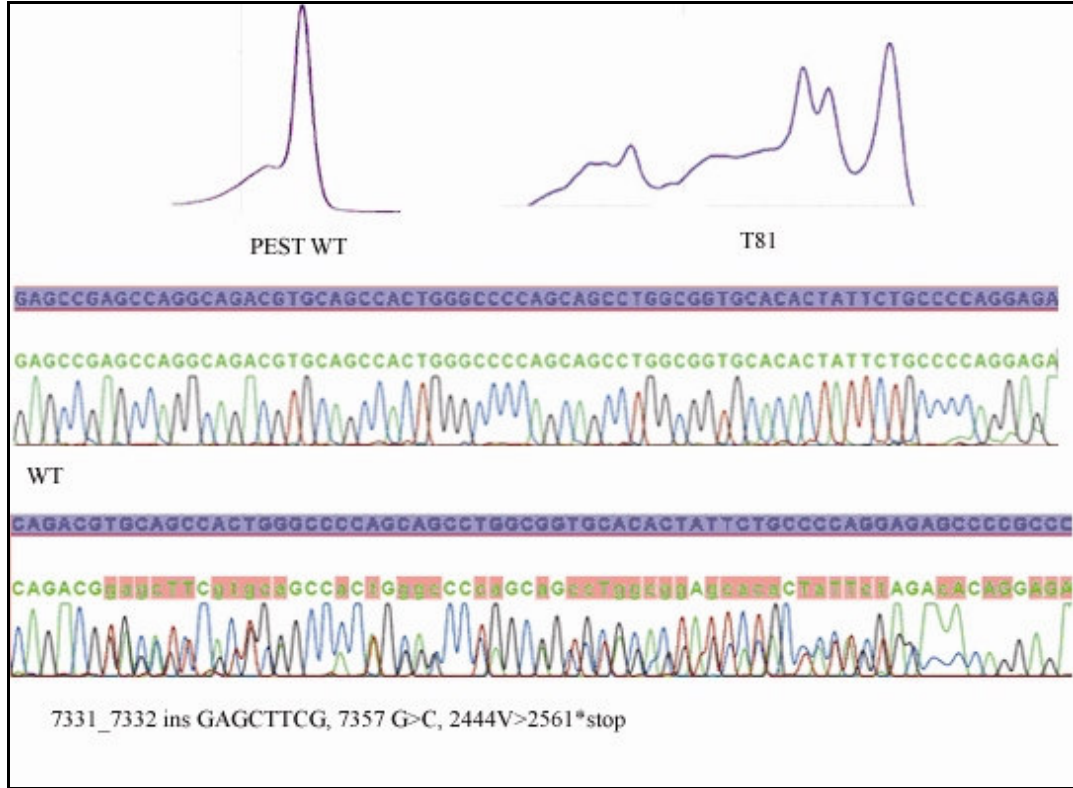
**Şekil 4-12: T84'ün PEST domaininde Q2394\*stop varyasyonu.**

A, PEST bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T84 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T84 dizileme sonucu; D, bu bölge için normal tip dizileme sonucu.



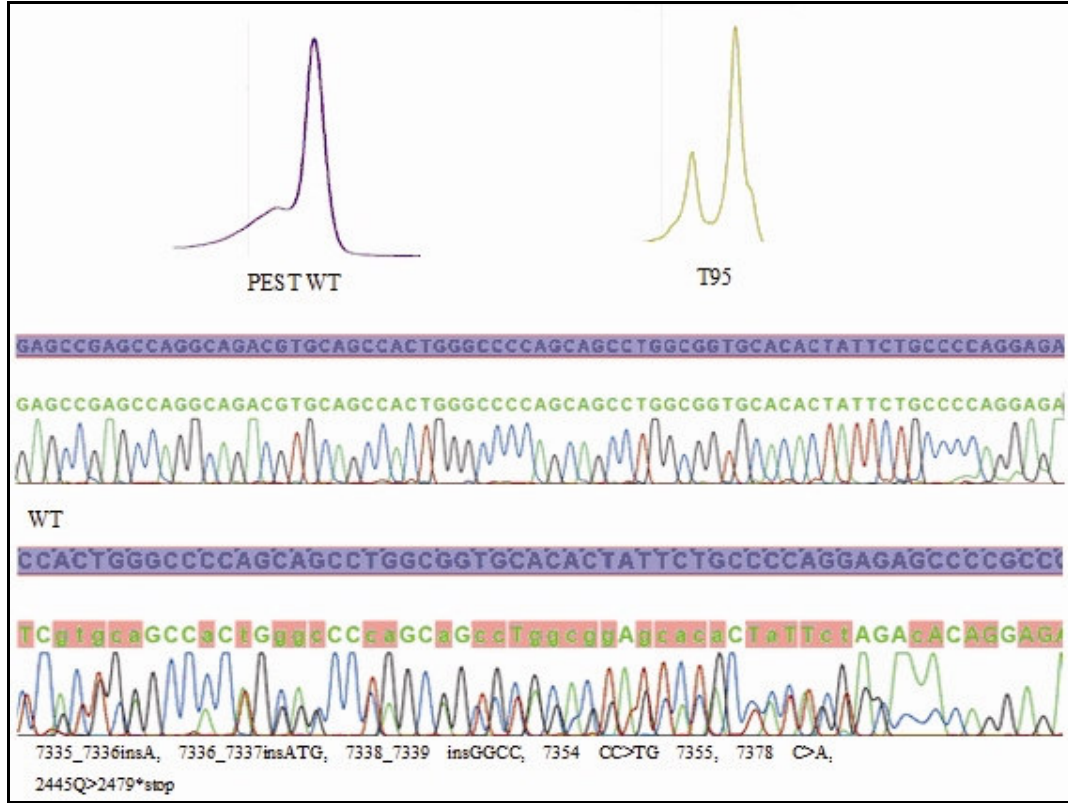
**Şekil 4-13: T92'nin PEST domaininde Q2399\*stop mutasyonu (41).**

A, PEST bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T92 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T92 dizileme sonucu; D, bu bölge için normal tip dizileme sonucu.



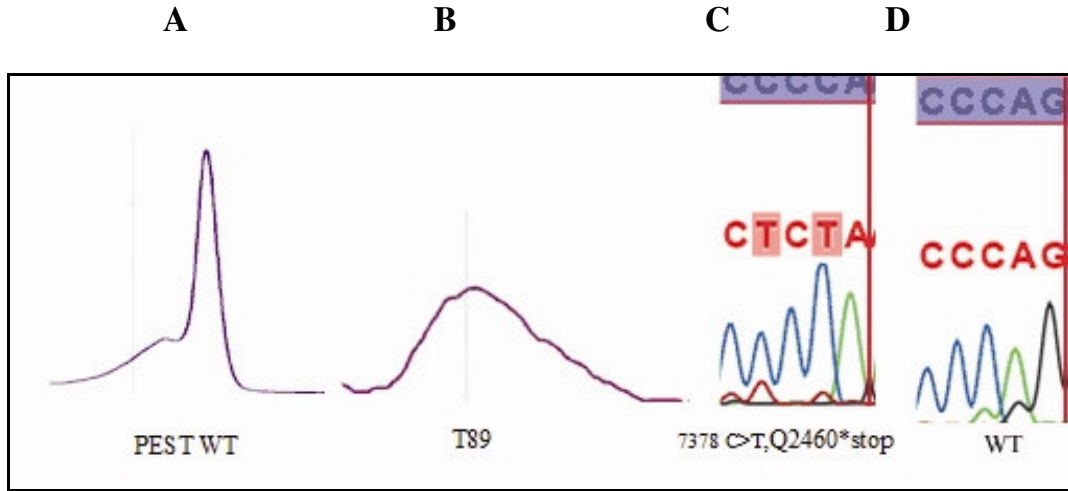
**Şekil 4-14: T81'in PEST domaininde 2444V>2561\*stop varyasyonu.**

Üst kısımdaki ilk grafik PEST bölgesi için normal tip dHPLC pik paternini; ikincisi T81 için mutant dHPLC pik paternini; birinci dizileme sonucu normal tip diziyi, en alttaki dizileme sonucu mutant T81 dizileme sonucunu ifade etmektedir.



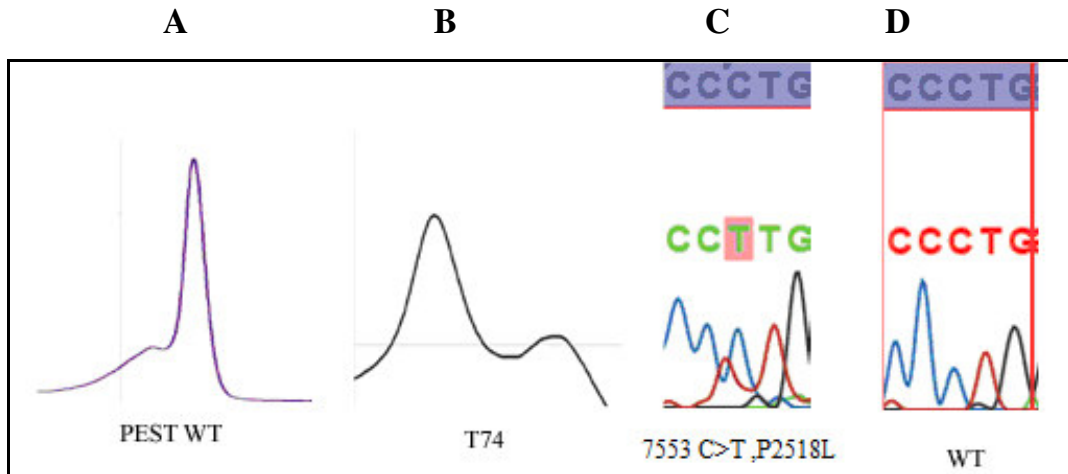
**Şekil 4-15: T95'in PEST domaininde 2445Q>2479\*stop varyasyonu.**

Üst kısımdaki ilk grafik PEST bölgesi için normal tip dHPLC pik paternini; ikincisi T95 için mutant dHPLC pik paternini; birinci dizileme sonucu normal tip diziyi, en alttaki dizileme sonucu mutant T95 dizileme sonucunu ifade etmektedir.



**Şekil 4-16: T89'un PEST domaininde Q2460\*stop mutasyonu (41).**

A, PEST bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T89 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T89 dizileme sonucu; D, bu bölge için normal tip dizileme sonucu.



**Şekil 4-17: T74'ün PEST domaininde P2518L varyasyonu.**

A, PEST bölgesi için normal tip dHPLC pik paterni; B, T74 için mutant dHPLC pik paterni; C, mutant T74 dizileme sonucu; D, bu bölge için normal tip dizileme sonucu.

HD domaini mutasyonlarını (n=13) nokta mutasyonları ve (n=3) insersiyonlar oluşturmaktadır. PEST domaini, stop kodonuna yol açan (n=3) nokta mutasyonu, (n=2) lösinden proline dönüşüme sebep olan nokta mutasyonu ve (n=3) insersiyon/delesyon mutasyonu içermektedir. HD domain mutasyonlarından çoğu (n=12) HD-N domaininde



lokalle olmakla beraber, 3 hastada mutasyon HD-C bölgesinde bulunmaktadır. HD-N mutasyonları yaygın mutasyon bölgeleri içinde 1554-1610 amino asitleri arasında bulunmaktadır (Tablo 4-4). Bunlardan 11 adeti bilinen mutasyonlar arasında olup sadece bir yeni varyasyon görülmüştür. HD-N domain mutasyonlarından 9 tanesi (L1586P, L1575P, R1599P) tip 1B mutasyon tipindedir ve heterodimerizasyon bölgesinin instabilitesini artırırlar. İki hasta ise (L1601P, K1608N) heterodimer birleşimini bozan tip 1A mutasyonlarına sahiptir.

**Tablo 4-4: NOTCH1 heterodimerizasyon N-terminal domain mutasyonları.**

Heterodimerizasyon N-terminal (HD-N)		
1554	ECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRD	1610
T62	-----N-----	
T70	-----P-----	
T92	-----P-----	
T97	-----P-----	
T24	-----P-----	
T28	-----P-----	
T13	-----P-----	
T27	-----P-----	
T39	-----P-----	
T77	-----P-----	
T10	-----P-----	
T73	-----N-----	

HD-C domain mutasyonları 1680-1737 amino asitleri arasında yer almaktadır (Tablo 4-5). Nokta mutasyonları ve çerçeve kaymasına yol açan T nükleotid insersiyonları görülmüştür.

**Tablo 4-5: NOTCH1 heterodimerizasyon C-terminal domain mutasyonları.**

Heterodimerizasyon domaini (HD-C)		
1681	IDNRQCVQASQCFQSATDVAAFLGALASLGS LNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHF	1737
T53	-----D--L---VGCVCRTRCLPDPPEPSHRPGCPHA* STOP	
T2	-----SECHSTWPHSWERSPRWAASTSPTRS RPCRVRPWSRPRRRSCT	
T41	-----SECHSTWPHSWERSPRWAASTSPTRS RPCRVRPWSRPRRRSCT	

Pest mutasyonları 2375-2571 amino asitleri arasında yer almaktadır (Tablo 4-6). Bu bölgede nokta mutasyonlarının yanı sıra insersiyon ve duplikasyonlar tespit

edilmiştir. PEST domaini için hastalarımızdan ikisi bilinen mutasyon, altısı daha önceden tanımlanmamış varyasyonlar taşımaktadır.

**Tablo 4-6: NOTCH1 PEST domain mutasyonları.**

PEST domaini		
237		243
5	ATQP <del>H</del> LVQTQQVQPQNLQM <del>Q</del> QQNLQ <del>P</del> PANIQQQQSLQPPPPPPQPHLGVSSAASGHLG	1
T60	<del>F</del> -----	
T84	-----*STOP	
T92	-----*STOP	
PEST domaini		
243		259
7	GEP <del>S</del> QADVQPLG <del>P</del> SSLA <del>V</del> H <del>T</del> ILPQ <del>E</del> SPALPTSLP <del>S</del> SLVPPVTAAQFLTPPSQHSYS <del>S</del> P	4
T73	---G <del>G</del> E <del>G</del> S <del>L</del> *STOP	
T81	-----G <del>A</del> S <del>C</del> S <del>H</del> W <del>A</del> P <del>A</del> A <del>C</del> R <del>C</del> T <del>L</del> F <del>C</del> Q <del>Q</del> E <del>S</del> PALPTSLP <del>S</del> SLVPPVTAAQFLTPPSQHSY	
T95	-----T <del>C</del> G <del>H</del> W <del>A</del> P <del>A</del> V <del>W</del> R <del>C</del> T <del>L</del> F <del>C</del> H <del>R</del> R <del>A</del> P <del>P</del> C <del>P</del> R <del>R</del> C <del>H</del> P <del>R</del> W <del>S</del> H <del>P</del> *STOP	
T89	-----*STOP	
PEST domaini		
251		257
4	SPVDN <del>T</del> PS <del>H</del> QLQVPEHPFLTPSPESP <del>D</del> QWSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIAR	1
T74	-----L-----	

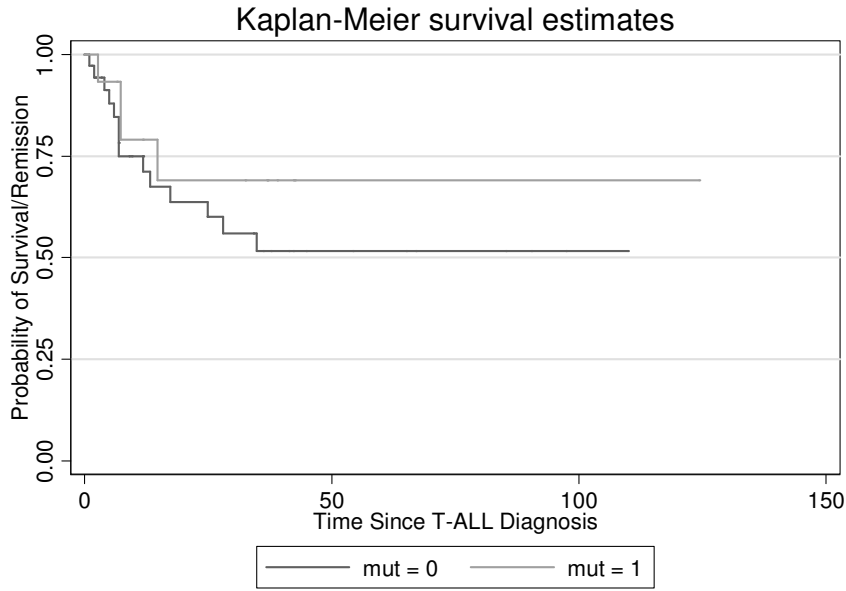
Yetişkin ve pediatrik T-ALL hastaları, mutasyon sıklıkları açısından karşılaştırıldıklarında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p=1,000$ ). Tanı zamanı lökosit düzeyleri ile mutasyon sıklıkları karşılaştırıldığında, mutasyonlu hastaların lökosit düzeylerinin, mutasyon içermeyen hastaların lökosit değerlerinden anlamlı şekilde düşük olduğu tesbit edildi ( $p=0,035$ ). Hastaların son durumları (ölüm/sağ kalım) göz önüne alındığında, remisyon ve sağ kalım ile mutasyon varlığı, yokluğu arasında anlamlı bir ilişki gözükme de remisyonunda olup *NOTCH1* mutasyonu taşıyan hastaların sayısı ( $n=13$ ), ölen hastaların sayısından ( $n=4$ ) yüksektir ( $p=0,247$ ) (Tablo 4-7).

**Tablo 4-7: T-ALL hastalarının klinik ve immünolojik karakterlerinin NOTCH1 mutasyonları açısından değerlendirilmesi.**

Hasta Karakteristiği	Notch1 Mutasyonu		p (%)
	Pozitif, n (%)	Negatif, n (%)	
Cinsiyet			0,447
Kadın	8 (29,6)	19 (70,4)	
Erkek	13 (22)	46 (78)	
Ortalama Yaş			1,000
≤16	17 (23,9)	54 (76,1)	
>16	3 (27,3)	8 (72,7)	
Tanıda Lökosit			<b>0,035</b>
< 50X10 <sup>9</sup> /L	13 (35,1)	24 (64,9)	
> 50X10 <sup>9</sup> /L	5 (13,9)	31 (86,1)	
T-Hücre İmmünotip			0,757
İmmature	6 (18,8)	26 (81,3)	
Mature	5 (27,8)	13 (72,2)	
Kortikal	4 (23,5)	13 (76,5)	
Materyal Zamanı			1,000
Tanı	17 (24,3)	53 (75,7)	
Relaps	1 (20)	4 (80)	
Lenf Adenopati			0,429
var	7 (20)	28 (80)	
yok	14 (27,5)	37 (72,5)	
Merkezi Sinir Sistemi Tutulumu			0,201
var	5 (38,5)	8 (61,5)	
yok	16 (21,9)	57 (78,1)	
Son Durum			0,247
Remisyon	13 (32,5)	27 (67,5)	
Ex	4 (17,4)	19 (82,6)	

İmmünotipik bulgularına göre immatur dönem (n=32), kortikal dönem (n=17) ve matur dönem (n=18) olarak gruplandırılan (EGİL sınıflamasına göre) T-ALL hastaları, mutasyon varlığı/yokluğu açısından değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü (p=0,757).

Bilinen klinik parametrelerle mutasyon varlığı yokluğu arasında anlamlı bir korelasyon belirlenmedi. Yaşayan hastalardaki ortalama takip süre 11.8 ay (aralık 1-124.3 ay) dır. Kaplan-Meier eğrilerinin mutasyon varlığı ve sağ kalıma göre karşılaştırılması sonucu yaşam dağılımları önemli düzeyde farklılık göstermemektedir.  $P= 0,329$  (%95 CI 0,20-1,7) (Şekil 4-18).



**Şekil 4-18: Hastaların mutasyon varlığı ve son durumlarına (ölü-sağ) göre Kaplan-Meier yaşam analizi sonuçları. Mut=0, mutasyon yokluğu, mut=1, mutasyon varlığını göstermektedir.**

## 5. TARTIŞMA

Çok sayıdaki farklı genin kromozomal translokasyonlarla aktivitelerinin bozulması ve immatur timositlerin onkogenik transformasyonu, T-ALL patogenezini oluşturmaktadır (79). Son yıllarda yapılan araştırmalar, artmış NOTCH sinyalinin T-ALL patogenezinde önemli role sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle de *NOTCH1* mutasyonlarının T-ALL hastalarının ~%50'sinde görülmesi bu geni hedef tedaviler açısından önemli kılmaktadır (68).

Araştırmamızda ulaştığımız *NOTCH1* mutasyon sıklığı %24'tür. Bu ise önceden yapılmış çalışmalarda bildirilen mutasyon sıklıklarından (Weng ve arkadaşları %50, Grotel ve arkadaşları %57, Breit ve arkadaşları %52, Lee ve arkadaşları %48,5, Zhu ve arkadaşları %37 olarak bildirmişlerdir) oldukça düşük bulundu (68). Bunun yanısıra, ilk defa bu çalışmada bildirilen yeni varyasyonlar tespit edildi. Bu iki bulgu ilk bakışta, Türk toplumunun barındırdığı genetik varyasyonlar açısından diğer toplumlardan farklı özellikler taşıyabileceğini düşündürmektedir. Sonuçların daha iyi yorumlanabilmesi için daha yüksek sayıda hasta gurupları ile kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

*NOTCH1* gen mutasyonları sıklıkla HD ve PEST domainlerinde saptanmıştır. Bu domainlerdeki mutasyonların, NOTCH1 bağımlı sinyal iletilişinin aktivasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (68). T-ALL hastalarımızdan ikisinde, tip 1A mutasyon (L1601P, K1608N) varlığı gözlemlendi. Tip 1A mutasyonları, S2 kırılma bölgesinin ligand bağımsız olarak ADAM-metalloproteazlar tarafından kırılmasına sebep olur. Bunun sonucunda, spontan olarak NOTCH1 ekstrasellüler ( $N^{EC}$ ) ünitesi ile NOTCH1 transmembran ( $N^{TM}$ ) parçası birbirinden ayrılır (72). Dokuz T-ALL hastasında ise tip 1B mutasyonu (L1586P, L1575P, R1599P) belirlendi. Tip 1B mutasyonları da tip 1A gibi NOTCH1 heterodimer stabilitesini bozarlar. Fakat bu etki sadece denatüranların varlığında açığa çıkar. Bunun gibi mutasyonlar,  $N^{EC}$ 'nin yavaş ve kendiliğinden bağımsız hale gelmesine neden olurlar.  $N^{EC}$  ve  $N^{TM}$  ilişkisinin kopması, HD domainin dinamik hale geçmesini sağlar ve böylece metalloproteazların S2 kırılma bölgesine ulaşmaları kolaylaşır. Bu da ICN1'in bozulmuş üretimi ile sonuçlanır. Altını çizmek gerekirse, aktif olan HD domain mutasyonlarının hepsi NOTCH1 sinyalini ligand bağımsız olarak aktive eder (70). HD domain mutasyonu taşıyan hastalarımızdan üçü,

en sık görülen HD domain mutasyonu olan L1575P ve bir hastamız L1601P mutasyonunu taşımakta idi. Bu iki tip mutasyonun önemi NOTCH1 sinyalini  $\gamma$ -sekretaz bağımlı olarak uyardıklarıdır (4). Solid tümörlerden farklı olarak lösemi hücreleri, kan akımı yardımı ile hücre otonom büyüme sinyalleri doğrultusunda farklı organ ve dokulara infiltre olabilir. HD mutasyonları nedeniyle NOTCH1 sinyalinin hücre otonom aktivasyonu T-ALL'yi birçok yoldan tetikleyebilir. NOTCH1 sinyali normalde, lenfoid öncüllerinde T-hücre gelişimini uyararak için çok zayıftır. Kemik iliği öncüllerinde NOTCH1 HD domain mutasyonları, hücreleri T-hücre yönünde farklılaşmaya iterler (83). Böylece kemik iliğinde yeni genetik özellikler kazanma riski yüksek olan, T-ALL gelişimi gösterebilecek bir T-hücre havuzu oluşur. Bu da T-ALL'nin her zaman timik gelişim göstermeyip kemik iliği kökenli hücrelerce de geliştirilebilmesini açıklamaktadır (83). Bunun yanında, timus NOTCH ligandlarını eksprese eden stromal hücrelerce zengindir. NOTCH1 mutasyonlarının fonksiyonel olması timus kökenli T-ALL'nin timus dışı bölgelere yayılmasında önemli olabilir (51, 84-86).

HD domaininin yanı sıra, *NOTCH1* geninin 3' terminal bölgesindeki anlamsız ("nonsense") ve çerçeve kayması mutasyonları sonucunda, NOTCH1 proteininin karboksi terminal bölgesinden kırılmasını beklemekteyiz. NOTCH1'in C-terminal kısmı PEST domainini içermektedir. Bu domain, protein yapımı ve yıkımı ile ilişkili motifleri kapsamaktadır. PEST domainindeki bölgesel delesyonlar normalde yarı ömrü oldukça düşük olan proteinin kararlılığını artırır ve NOTCH1 sinyalinin artmış aktivitesine sebep olur. Hastalarımızdan yedisi "stop kodon" oluşumuna sebep olan çerçeve içi nokta mutasyonlarına sahiptiler. Bu mutasyonlardan ikisi (Q2399stop, Q2460 stop) daha önceden tanımlanmış mutasyonlardır. PEST bölgesi için hastalarımızın altısında daha önce tanımlanmamış varyasyonlar belirlendi. Bulduğumuz yeni varyasyonlar karakteristik açıdan daha önce tanımlanan mutasyonlara paralellik gösterse de, fonksiyonel olarak incelenmeleri gerekmektedir. Yeni PEST domain mutasyonları, protein stabilitesinin kontrolünü sağlayan fonksiyonel C-terminal amino asit dizilerini değiştirerek fonksiyon kazanımına yol açabilir (87).

Hastaların karakteristik özelliklerini (yaş, cinsiyet vb.) mutasyon varlığı yokluğu ile karşılaştırdığımızda lökosit sayısı dışında mutasyonların hasta kriterlerinden bağımsız olarak var olduğu görüldü. Hastalardaki azalmış lökosit sayısı ile mutasyon

varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,035$ ). Düşük lökosit değerleri iyi prognoz ile ilişkilidir (2).

ALL vakalarında risk bağımlı kişisel tedavilerin uygulanmaya başlanması modern klinik onkolojide kısmen başarılmıştır (2). Prekürsör B-hücreli ALL'lerde, çeşitli kromozom anomalileri ve *MLL/AF4*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* veya *TEL/AML1* füzyon transkriptleri son dönem tedavi protokollerinin risk algoritmalarının içerisinde yer almaktadır. Çocukluk çağı T-ALL'lerde ise risk bağımlı tedavi uygulamaları tedaviye cevap parametrelerine (MRD kinetiği ve prednison yanıtı) dayalıdır. Ancak, hali hazırda erken dönem cevap ve sağ kalım ile ilişkili güvenilir genetik belirteçler mevcut değildir. Az sayıda hasta ile yapılan çalışmalarda *HOX11*, *TAL1* ve *LYL* genlerinin artmış ekspresyonları tedaviye yanıt ile ilişkilendirilmiştir (31, 91). Bu çalışmalar doğrultusunda ilerleyen zamanlarda gen ekspresyon profilleri prognostik belirteçler olarak kullanılabilir (92). Erken dönem ALL-BFM, COALL ve POG protokollerinde kortikal T-hücre immünofenotipi, diğer immünofenotiplerle karşılaştırıldığında tedaviye iyi yanıt ile ilişkili bulunmuştur (93-96). Daha önce yapılan birkaç çalışmada, *NOTCH1* mutasyonlarının, mutasyon tiplerinden bağımsız olarak, özellikle de çocukluk çağı T-ALL'lerde erken dönem tedaviye yanıt ve tedaviye bağımlı uzun süreli sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur. (87, 90). Çalışmamızda, sağ kalım ve mutasyon analizleri sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmedi. Ancak mutasyonlu hastaların immünofenotip, yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak sağ kalım oranının mutasyon taşımayanlara göre daha yüksek olduğu görüldü.

*E2A-PBX* veya *c-myc* transgenik farelerde *Notch1* mutasyonları T-ALL oluşumuna eşlik etmektedir (75, 97). Fare modellerinde *Notch1*'in diğer onkogenlerle birlikte ekspresyonun görülmesi, *NOTCH1* ekspresyon eden, hematopoietik hücre öncüllerindeki *NOTCH1* mutasyonlarının, farklı yollarla ilişki içinde olmasına işaret etmektedir. Bunun sonucunda T-ALL alt gruplarında (immatur-kortikal ve matur) *NOTCH* aktivasyonu farklı yollardaki aktivasyonlarla birlikte karşımıza çıkmaktadır. *NOTCH1* yolağındaki bozukluklar komşu hücreleri T-hücre gelişimi yönünde tetikleyecektir. Transkripsiyon faktörlerinin artmış ekspresyonu gibi lökogenik olaylar sonucunda da bu hücrelerde T-ALL gelişimi gözlenmiştir (90).

*NOTCH1* sinyalinde yüksek sıklıktaki *NOTCH1* mutasyonları merkezi role sahiptir. *NOTCH1* mutasyonlarının B-hücreli ALL'de görülmemesi, AML'de ise nadir

görülmesi bu yolağın T-ALL'deki önemini vurgulamaktadır (87). T-ALL'nin yanı sıra NOTCH sinyalinin bozulmuş aktivasyonuna birçok kanser ve anomalide rastlanmaktadır. Aort kalp kapak anomalileri (98), Alzheimer hastalığı (37), pankreas karsinomları (99), servikal karsinomlar (100, 101), prostat karsinomları (102), meme kanseri(103) ve melanomlar (104) örnek olarak verilebilir. NOTCH sinyalinin bütün bu kanserlerde ve özellikle de T-ALL hastalarındaki aktivitesi, kendisini hedef tedaviler açısından önemli hale getirmiştir.

Çalışmamızda ilk kez Türk T-ALL hastalarında *NOTCH1* mutasyonlarının varlığı ve sıklığı gösterildi. Mutasyon sıklığı diğer grupların bildirdiği oranlardan farklı olarak daha düşük bulundu. Bu kapsamda ileriye dönük çalışmalarda, bu hastaların *NOTCH1*'in yanı sıra *NOTCH* gen ailesinin diğer üyeleri olan *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4* açısından da çalışılması bize NOTCH yolağının T-ALL'deki etkisi üzerine daha geniş bilgiye sahip olabilmemize olanak sağlayacaktır. Bilinen mutasyonların yanı sıra hastalarımızda önceden bildirilmemiş yeni varyasyonların varlığı saptandı. Bu varyasyonların fonksiyonelliğinin araştırılması hastalığa özgü mutasyonların tanımlanması açısından önemlidir. Prognostik açıdan *NOTCH1* mutasyonlarına bakacak olursak, T-ALL hastalarımızda mutasyon varlığı ve sağ kalım ile ilişkili olarak anlamlı bir fark görülmedi. Ancak mutasyon saptanan hastalarda sağ kalım oranının yüksek olması ve lökosit değerlerinin anlamlı şekilde düşük olması *NOTCH1* mutasyonlarının iyi prognostik belirteç olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezin doğruluğunun araştırılması için daha yüksek sayıda T-ALL hastasında *NOTCH1* mutasyonlarının araştırılması gerekmektedir. Çalışmanın genişletilmesi ile NOTCH sinyal yolunun T-ALL'deki aktivitesi daha net açığa çıkartılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca NOTCH sinyal yoluna özgü inhibitörlerin varlığı, T-ALL'de yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.



### KAYNAKLAR

1. Beutler E L.M., Coller BS, Kipps TJ. (2001) *Williams Hematology*. (6 ed.) , McGraw Hill Co.
2. Pui C.H., Relling M.V., and Downing J.R., Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; **350 (15)**: p. 1535-48.
3. De Keersmaecker K., Marynen P., and Cools J., Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2005; **90 (8)**: p. 1116-27.
4. Grabher C., von Boehmer H., and Look A.T., Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2006; **6 (5)**: p. 347-59.
5. Knudson A.G., Cancer genetics. *Am J Med Genet* 2002; **111 (1)**: p. 96-102.
6. Alberts B L., J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P *Molecular Biology of The Cell*. 4 ed. 2002, New York: Garland Science.
7. Croce C.M., Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; **358 (5)**: p. 502-11.
8. Smith C., Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 2003; **10 (1)**: p. 9-16.
9. Schiffman F., (1998) *Hematologic Pathophysiology*. Rhode Island: Lippincott-Raven
10. G. Dinçol Y.P., T.Atamer. (2003) *Klinik Hematoloji*. (1 ed.). İstanbul.
11. Hong Y.S., Chang J.H., Kwon O.J., Ham Y.A., and Choi J.H., Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase gene in Korean lung cancer patients. *Exp Mol Med* 1998; **30 (4)**: p. 192-8.
12. Woo M.H., Shuster J.J., Chen C., Bash R.O., Behm F.G., Camitta B., Felix C.A., Kamen B.A., Pui C.H., Raimondi S.C., Winick N.J., Amylon M.D., and Relling M.V., Glutathione S-transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid malignancies. *Leukemia* 2000; **14 (2)**: p. 232-7.
13. Nathan D.G., Oski, F.A., Neimeyer, C.M., Sallan, *Hematology Infancy and Childhood*. 4th ed. . 1993: WB Saunders Company.

14. Willman C.L., Molecular evaluation of acute myeloid leukemias. *Semin Hematol* 1999; **36** (4): p. 390-400.
15. Davies S.M., Bhatia S., Ross J.A., Kiffmeyer W.R., Gaynon P.S., Radloff G.A., Robison L.L., and Perentesis J.P., Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; **100** (1): p. 67-71.
16. Krajcinovic M., Sinnett H., Richer C., Labuda D., and Sinnett D., Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer* 2002; **97** (2): p. 230-6.
17. Armstrong S.A. and Look A.T., Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; **23** (26): p. 6306-15.
18. Weinstein I.B. and Joe A.K., Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; **3** (8): p. 448-57.
19. Rothenberg E.V., Moore J.E., and Yui M.A., Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 2008; **8** (1): p. 9-21.
20. Godfrey D.I., Kennedy J., Suda T., and Zlotnik A., A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 1993; **150** (10): p. 4244-52.
21. Staal F.J., Weerkamp F., Langerak A.W., Hendriks R.W., and Clevers H.C., Transcriptional control of t lymphocyte differentiation. *Stem Cells* 2001; **19** (3): p. 165-79.
22. Lind E.F., Prockop S.E., Porritt H.E., and Petrie H.T., Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 2001; **194** (2): p. 127-34.
23. Ueno T., Hara K., Willis M.S., Malin M.A., Hopken U.E., Gray D.H., Matsushima K., Lipp M., Springer T.A., Boyd R.L., Yoshie O., and Takahama Y., Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity* 2002; **16** (2): p. 205-18.

24. Davis M.M. and Bjorkman P.J., T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; **334 (6181)**: p. 395-402.
25. Borst J., Brouns G.S., de Vries E., Verschuren M.C., Mason D.Y., and van Dongen J.J., Antigen receptors on T and B lymphocytes: parallels in organization and function. *Immunol Rev* 1993; **132**: p. 49-84.
26. van Dongen J.J., Comans-Bitter W.M., Wolvers-Tettero I.L., and Borst J., Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency. *Thymus* 1990; **16 (3-4)**: p. 207-34.
27. Aifantis I., Buer J., von Boehmer H., and Azogui O., Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus. *Immunity* 1997; **7 (5)**: p. 601-7.
28. Satyanarayana K., Hata S., Devlin P., Roncarolo M.G., De Vries J.E., Spits H., Strominger J.L., and Krangel M.S., Genomic organization of the human T-cell antigen-receptor alpha/delta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85 (21)**: p. 8166-70.
29. Surh C.D. and Sprent J., T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994; **372 (6501)**: p. 100-3.
30. Kisielow P. and von Boehmer H., Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 1995; **58**: p. 87-209.
31. Ferrando A.A., Neuberg D.S., Staunton J., Loh M.L., Huard C., Raimondi S.C., Behm F.G., Pui C.H., Downing J.R., Gilliland D.G., Lander E.S., Golub T.R., and Look A.T., Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; **1 (1)**: p. 75-87.
32. Thomas X., Boiron J.M., Huguet F., Dombret H., Bradstock K., Vey N., Kovacsovics T., Delannoy A., Fegueux N., Fenaux P., Stamatoullas A., Vernant J.P., Tournilhac O., Buzyn A., Reman O., Charrin C., Boucheix C., Gabert J., Lheritier V., and Fiere D., Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. *J Clin Oncol* 2004; **22 (20)**: p. 4075-86.
33. Annino L., Vegna M.L., Camera A., Specchia G., Visani G., Fioritoni G., Ferrara F., Peta A., Ciolli S., Deplano W., Fabbiano F., Sica S., Di Raimondo F., Cascavilla N., Tabilio A., Leoni P., Invernizzi R., Baccarani M., Rotoli B.,

- Amadori S., and Mandelli F., Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study. *Blood* 2002; **99** (3): p. 863-71.
34. Linker C., Damon L., Ries C., and Navarro W., Intensified and shortened cyclical chemotherapy for adult acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2002; **20** (10): p. 2464-71.
35. Hunault M., Harousseau J.L., Delain M., Truchan-Graczyk M., Cahn J.Y., Witz F., Lamy T., Pignon B., Jouet J.P., Garidi R., Caillot D., Berthou C., Guyotat D., Sadoun A., Sotto J.J., Lioure B., Casassus P., Solal-Celigny P., Stalnikiewicz L., Audhuy B., Blanchet O., Baranger L., Bene M.C., and Ifrah N., Better outcome of adult acute lymphoblastic leukemia after early genoidentical allogeneic bone marrow transplantation (BMT) than after late high-dose therapy and autologous BMT: a GOELAMS trial. *Blood* 2004; **104** (10): p. 3028-37.
36. Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., and Lake R.J., Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; **284** (5415): p. 770-6.
37. Bray S.J., Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7** (9): p. 678-89.
38. Kraman M. and McCright B., Functional conservation of Notch1 and Notch2 intracellular domains. *FASEB J* 2005; **19** (10): p. 1311-3.
39. Hasserjian R.P., Aster J.C., Davi F., Weinberg D.S., and Sklar J., Modulated expression of notch1 during thymocyte development. *Blood* 1996; **88** (3): p. 970-6.
40. Ellisen L.W., Bird J., West D.C., Soreng A.L., Reynolds T.C., Smith S.D., and Sklar J., TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; **66** (4): p. 649-61.
41. Aster J.C., Pear W.S., and Blacklow S.C., Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol* 2008; **3**: p. 587-613.
42. De Strooper B., Annaert W., Cupers P., Saftig P., Craessaerts K., Mumm J.S., Schroeter E.H., Schrijvers V., Wolfe M.S., Ray W.J., Goate A., and Kopan R.,

- A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999; **398 (6727)**: p. 518-22.
43. Song W., Nadeau P., Yuan M., Yang X., Shen J., and Yankner B.A., Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96 (12)**: p. 6959-63.
  44. Struhl G. and Greenwald I., Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 1999; **398 (6727)**: p. 522-5.
  45. Ye Y., Lukinova N., and Fortini M.E., Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants. *Nature* 1999; **398 (6727)**: p. 525-9.
  46. Schweisguth F. and Posakony J.W., Suppressor of Hairless, the *Drosophila* homolog of the mouse recombination signal-binding protein gene, controls sensory organ cell fates. *Cell* 1992; **69 (7)**: p. 1199-212.
  47. Fortini M.E. and Artavanis-Tsakonas S., The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell* 1994; **79 (2)**: p. 273-82.
  48. Jarriault S., Brou C., Logeat F., Schroeter E.H., Kopan R., and Israel A., Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995; **377 (6547)**: p. 355-8.
  49. Kao H.Y., Ordentlich P., Koyano-Nakagawa N., Tang Z., Downes M., Kintner C.R., Evans R.M., and Kadesch T., A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 1998; **12 (15)**: p. 2269-77.
  50. Hsieh J.J., Zhou S., Chen L., Young D.B., and Hayward S.D., CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96 (1)**: p. 23-8.
  51. Anderson G., Pongracz J., Parnell S., and Jenkinson E.J., Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur J Immunol* 2001; **31 (11)**: p. 3349-54.

52. Harman B.C., Jenkinson W.E., Parnell S.M., Rossi S.W., Jenkinson E.J., and Anderson G., T/B lineage choice occurs prior to intrathymic Notch signaling. *Blood* 2005; **106** (3): p. 886-92.
53. Harman B.C., Jenkinson E.J., and Anderson G., Entry into the thymic microenvironment triggers Notch activation in the earliest migrant T cell progenitors. *J Immunol* 2003; **170** (3): p. 1299-303.
54. Felli M.P., Maroder M., Mitsiadis T.A., Campese A.F., Bellavia D., Vacca A., Mann R.S., Frati L., Lendahl U., Gulino A., and Screpanti I., Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol* 1999; **11** (7): p. 1017-25.
55. Wilson A., MacDonald H.R., and Radtke F., Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* 2001; **194** (7): p. 1003-12.
56. Han H., Tanigaki K., Yamamoto N., Kuroda K., Yoshimoto M., Nakahata T., Ikuta K., and Honjo T., Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 2002; **14** (6): p. 637-45.
57. Washburn T., Schweighoffer E., Gridley T., Chang D., Fowlkes B.J., Cado D., and Robey E., Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* 1997; **88** (6): p. 833-43.
58. Jiang R., Lan Y., Chapman H.D., Shawber C., Norton C.R., Serreze D.V., Weinmaster G., and Gridley T., Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* 1998; **12** (7): p. 1046-57.
59. Wolfer A., Wilson A., Nemir M., MacDonald H.R., and Radtke F., Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* 2002; **16** (6): p. 869-79.
60. Ciofani M., Schmitt T.M., Ciofani A., Michie A.M., Cuburu N., Aublin A., Maryanski J.L., and Zuniga-Pflucker J.C., Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol* 2004; **172** (9): p. 5230-9.

61. Tanigaki K., Tsuji M., Yamamoto N., Han H., Tsukada J., Inoue H., Kubo M., and Honjo T., Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* 2004; **20** (5): p. 611-22.
62. Lehar S.M., Dooley J., Farr A.G., and Bevan M.J., Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood* 2005; **105** (4): p. 1440-7.
63. Campese A.F., Bellavia D., Gulino A., and Screpanti I., Notch signalling at the crossroads of T cell development and leukemogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2003; **14** (2): p. 151-7.
64. Aster J., Pear W., Hasserjian R., Erba H., Davi F., Luo B., Scott M., Baltimore D., and Sklar J., Functional analysis of the TAN-1 gene, a human homolog of Drosophila notch. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; **59**: p. 125-36.
65. Pear W.S., Aster J.C., Scott M.L., Hasserjian R.P., Soffer B., Sklar J., and Baltimore D., Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* 1996; **183** (5): p. 2283-91.
66. Aster J.C., Xu L., Karnell F.G., Patriub V., Pui J.C., and Pear W.S., Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol Cell Biol* 2000; **20** (20): p. 7505-15.
67. Allman D., Karnell F.G., Punt J.A., Bakkour S., Xu L., Myung P., Koretzky G.A., Pui J.C., Aster J.C., and Pear W.S., Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med* 2001; **194** (1): p. 99-106.
68. Weng A.P., Ferrando A.A., Lee W., Morris J.P.t., Silverman L.B., Sanchez-Irizarry C., Blacklow S.C., Look A.T., and Aster J.C., Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; **306** (5694): p. 269-71.
69. Sanchez-Irizarry C., Carpenter A.C., Weng A.P., Pear W.S., Aster J.C., and Blacklow S.C., Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol Cell Biol* 2004; **24** (21): p. 9265-73.

70. Malecki M.J., Sanchez-Irizarry C., Mitchell J.L., Histen G., Xu M.L., Aster J.C., and Blacklow S.C., Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol* 2006; **26 (12)**: p. 4642-51.
71. Chiang M.Y., Xu M.L., Histen G., Shestova O., Roy M., Nam Y., Blacklow S.C., Sacks D.B., Pear W.S., and Aster J.C., Identification of a conserved negative regulatory sequence that influences the leukemogenic activity of NOTCH1. *Mol Cell Biol* 2006; **26 (16)**: p. 6261-71.
72. Fryer C.J., Lamar E., Turbachova I., Kintner C., and Jones K.A., Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* 2002; **16 (11)**: p. 1397-411.
73. Sade H., Krishna S., and Sarin A., The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol Chem* 2004; **279 (4)**: p. 2937-44.
74. Girard L., Hanna Z., Beaulieu N., Hoemann C.D., Simard C., Kozak C.A., and Jolicoeur P., Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev* 1996; **10 (15)**: p. 1930-44.
75. Feldman B.J., Hampton T., and Cleary M.L., A carboxy-terminal deletion mutant of Notch1 accelerates lymphoid oncogenesis in E2A-PBX1 transgenic mice. *Blood* 2000; **96 (5)**: p. 1906-13.
76. Beverly L.J. and Capobianco A.J., Perturbation of Ikaros isoform selection by MLV integration is a cooperative event in Notch(IC)-induced T cell leukemogenesis. *Cancer Cell* 2003; **3 (6)**: p. 551-64.
77. Dumortier A., Jeannot R., Kirstetter P., Kleinmann E., Sellars M., dos Santos N.R., Thibault C., Barths J., Ghysdael J., Punt J.A., Kastner P., and Chan S., Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2006; **26 (1)**: p. 209-20.
78. Palomero T., McKenna K., J O.N., Galinsky I., Stone R., Suzukawa K., Stiakaki E., Kalmanti M., Fox E.A., Caligiuri M.A., Aster J.C., Look A.T., and Ferrando A.A., Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. *Leukemia* 2006; **20 (11)**: p. 1963-6.



79. Weng A.P. and Lau A., Notch signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Future Oncol* 2005; **1** (4): p. 511-9.
80. Bagattin A., Veronese C., Bauce B., Wuyts W., Settimo L., Nava A., Rampazzo A., and Danieli G.A., Denaturing HPLC-based approach for detecting RYR2 mutations involved in malignant arrhythmias. *Clin Chem* 2004; **50** (7): p. 1148-55.
81. Kaler S.G., Devaney J.M., Pettit E.L., Kirshman R., and Marino M.A., Novel method for molecular detection of the two common hereditary hemochromatosis mutations. *Genet Test* 2000; **4** (2): p. 125-9.
82. Bennett R.R., den Dunnen J., O'Brien K.F., Darras B.T., and Kunkel L.M., Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing. *BMC Genet* 2001; **2**: p. 17.
83. Pui J.C., Allman D., Xu L., DeRocco S., Karnell F.G., Bakkour S., Lee J.Y., Kadesch T., Hardy R.R., Aster J.C., and Pear W.S., Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 1999; **11** (3): p. 299-308.
84. Aster J.C., Robertson E.S., Hasserjian R.P., Turner J.R., Kieff E., and Sklar J., Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *J Biol Chem* 1997; **272** (17): p. 11336-43.
85. Harman B.C., Jenkinson E.J., and Anderson G., Microenvironmental regulation of Notch signalling in T cell development. *Semin Immunol* 2003; **15** (2): p. 91-7.
86. Mohtashami M. and Zuniga-Pflucker J.C., Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development. *J Immunol* 2006; **176** (2): p. 730-4.
87. Breit S., Stanulla M., Flohr T., Schrappe M., Ludwig W.D., Tolle G., Happich M., Muckenthaler M.U., and Kulozik A.E., Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; **108** (4): p. 1151-7.

88. Weng A.P., Nam Y., Wolfe M.S., Pear W.S., Griffin J.D., Blacklow S.C., and Aster J.C., Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Mol Cell Biol* 2003; **23** (2): p. 655-64.
89. Jundt F., Anagnostopoulos I., Forster R., Mathas S., Stein H., and Dorken B., Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 2002; **99** (9): p. 3398-403.
90. Zhu Y.M., Zhao W.L., Fu J.F., Shi J.Y., Pan Q., Hu J., Gao X.D., Chen B., Li J.M., Xiong S.M., Gu L.J., Tang J.Y., Liang H., Jiang H., Xue Y.Q., Shen Z.X., Chen Z., and Chen S.J., NOTCH1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis. *Clin Cancer Res* 2006; **12** (10): p. 3043-9.
91. Ferrando A.A., Neuberg D.S., Dodge R.K., Paietta E., Larson R.A., Wiernik P.H., Rowe J.M., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., and Look A.T., Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2004; **363** (9408): p. 535-6.
92. Breit S., Nees M., Schaefer U., Pfoersich M., Hagemeyer C., Muckenthaler M., and Kulozik A.E., Impact of pre-analytical handling on bone marrow mRNA gene expression. *Br J Haematol* 2004; **126** (2): p. 231-43.
93. Ludwig W.D., Harbott J., Bartram C.R., Komischke B., Sperling C., Teichmann J.V., Seibt-Jung H., Notter M., Odenwald E., Nehmer A., and et al., Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. *Recent Results Cancer Res* 1993; **131**: p. 269-82.
94. Niehues T., Kapaun P., Harms D.O., Burdach S., Kramm C., Korholz D., Janka-Schaub G., and Gobel U., A classification based on T cell selection-related phenotypes identifies a subgroup of childhood T-ALL with favorable outcome in the COALL studies. *Leukemia* 1999; **13** (4): p. 614-7.
95. Pullen J., Shuster J.J., Link M., Borowitz M., Amylon M., Carroll A.J., Land V., Look A.T., McIntyre B., and Camitta B., Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia* 1999; **13** (11): p. 1696-707.

96. Cario G., Stanulla M., Fine B.M., Teuffel O., Neuhoff N.V., Schrauder A., Flohr T., Schafer B.W., Bartram C.R., Welte K., Schlegelberger B., and Schrappe M., Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; **105** (2): p. 821-6.
97. Hoemann C.D., Beaulieu N., Girard L., Rebai N., and Jolicoeur P., Two distinct Notch1 mutant alleles are involved in the induction of T-cell leukemia in c-myc transgenic mice. *Mol Cell Biol* 2000; **20** (11): p. 3831-42.
98. Garg V., Muth A.N., Ransom J.F., Schluterman M.K., Barnes R., King I.N., Grossfeld P.D., and Srivastava D., Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 2005; **437** (7056): p. 270-4.
99. Miyamoto Y., Maitra A., Ghosh B., Zechner U., Argani P., Iacobuzio-Donahue C.A., Sriuranpong V., Iso T., Meszoely I.M., Wolfe M.S., Hruban R.H., Ball D.W., Schmid R.M., and Leach S.D., Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 2003; **3** (6): p. 565-76.
100. Talora C., Sgroi D.C., Crum C.P., and Dotto G.P., Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev* 2002; **16** (17): p. 2252-63.
101. Nair P., Somasundaram K., and Krishna S., Activated Notch1 inhibits p53-induced apoptosis and sustains transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-dependent pathway. *J Virol* 2003; **77** (12): p. 7106-12.
102. Santagata S., Demichelis F., Riva A., Varambally S., Hofer M.D., Kutok J.L., Kim R., Tang J., Montie J.E., Chinnaiyan A.M., Rubin M.A., and Aster J.C., JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Res* 2004; **64** (19): p. 6854-7.
103. Parr C., Watkins G., and Jiang W.G., The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. *Int J Mol Med* 2004; **14** (5): p. 779-86.
104. Hoek K., Rimm D.L., Williams K.R., Zhao H., Ariyan S., Lin A., Kluger H.M., Berger A.J., Cheng E., Trombetta E.S., Wu T., Niinobe M., Yoshikawa K.,

Hannigan G.E., and Halaban R., Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004; **64** (15): p. 5270-82.

## FORMLAR

### BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Tarih:

#### ÇALIŞMANIN KAPSAMI

1. “T-ALL hastalarında NOTCH1 mutasyonlarının araştırılması” adlı çalışma lösemi hastalığının aydınlatılması üzerine yapılacak olan bir çalışmadır.
2. Yapılması planlanan genetik incelemeler için sizden öncelikle 10ml periferik kan örneği alınacaktır.
3. Alınan kan örneğinde DNA/RNA materyaliniz izole edilerek saklanacaktır.
4. Araştırma süresi 1 yıldır.
5. Size ait kişisel ve tıbbi bilgiler şifreli bir bilgisayarda korunacaktır.
6. Biyolojik örnekler kodlanarak saklanacaktır; isim, soyadı gibi bilgiler laboratuvar ortamında kullanılmayacaktır.
7. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
8. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan istediniz üzere ayrılabilirsiniz.
9. Araştırma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir.
10. Bu çalışmanın size maddi bir getirisi olmadığı gibi sizden de herhangi maddi talepte bulunulmayacaktır.

Kararınızdan önce size verilen bu bilgileri lütfen okuyunuz.

Yukarıda yazılı bilgileri okudum. Sağlıklı kontrol grubu olarak moleküler genetik araştırmalar için kan vermeyi kendi rızamla kabul ediyorum.

Adı Soyadı

İmzası

Açıklamayı Yapan Kişinin Adı Soyadı

İmzası

## ETİK KURUL KARARI

### İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 20/12/2006  
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Salonu  
Toplantı Sayısı : 12

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Uğur ÖZBEK'in üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Tıbbi Biyolog Yücel ERBİLGİN'in yürüteceği 2006/2122 protokol numaralı "T-ALL Hastalarında Notch1 Mutasyonunun Araştırılması" başlıklı tez çalışması Araştırma Fonundan Desteklenmek şartı ile kurumumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, 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. Cahide GÖKKUŞU  
Biokimya A.D  
Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ  
Anesteziyoloji A.D.  
Prof.Dr. Neşe ÇOLAK  
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.  
Prof.Dr. Nuran YILDIRIM  
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.  
Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR  
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN  
Nöroloji A.D.  
Prof.Dr. Pınar SAİP (Katılmadı)  
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü  
Prof.Dr. Sevinç EMRE  
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D  
Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU  
Biokimya A.D  
Prof.Dr. Veli UYSAL  
Patoloji A.D.  
Prof.Dr. Yeşim ERBİL  
Genel Cerrahi A.D.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Yücel	<b>Soyadı</b>	Erbilgin
<b>Doğ.Yeri</b>	Tolbuhin/Bulgaristan	<b>Doğ.Tar.</b>	17.10.1983
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	32542792846
<b>Email</b>	yucel_erbilgin@yahoo.com	<b>Tel</b>	05385691083

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	İ.Ü, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi biyolojik Bilimler	2005
<b>Lise</b>	Sakıp Sabancı Anadolu Lisesi	2001

### 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	Orta	65	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	69,768	72,384	75,529
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Mikrosoft ofis programları	Orta

**Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**

- Erbilgin Y, Sayitoğlu M, Hatırnaz Ö, Özbek U. T-ALL Hastalarında NOTCH1 Mutasyonlarının Araştırılması. 33. Ulusal Hematoloji Kongresi 16-19 Ekim 2007, Ankara, Türkiye. En iyi klinik araştırma ödülü.
- Erbilgin Y., Hatırnaz O., Ateşoğlu E., Fıratlı T., Bayık M., Ferhanođlu B., Ozbek U. İmatinib Direnci Gösteren Hastalarda C-ABL Gen Mutasyonlarının Araştırılması 32. Ulusal Hematoloji Kongresi 8-12 Kasım 2006, Antalya, Türkiye. Genç araştırmacı ödülü.

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):****Yüzme**