



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ OLGULARINDA 13q
DELESYON BÜYÜKLÜĞÜNÜN CGH+SNP ARRAY
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

SEVGİ IŞIK

DANIŞMAN

DOÇ. DR. BEYHAN DURAK ARAS

2020



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ OLGULARINDA 13q
DELESYON BÜYÜKLÜĞÜNÜN CGH+SNP ARRAY
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

SEVGİ IŞIK

DANIŞMAN

DOÇ. DR. BEYHAN DURAK ARAS

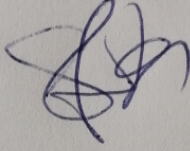
2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

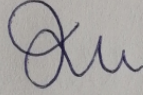
Sevgi IŞIK' ın Doktora Tezi olarak hazırladığı “**Kronik Lenfositik Lösemi Olgularında 13q Delesyon Büyüklüğünün CGH+SNP Array Yöntemi İle Araştırılması**” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” edilmiştir.

24 / 01 / 2020

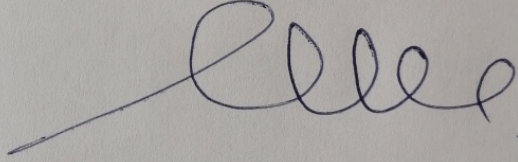
Üye: Prof. Dr. Sevilhan ARTAN



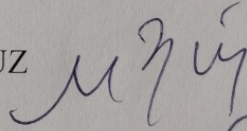
Üye: Prof. Dr. Eren GÜNDÜZ



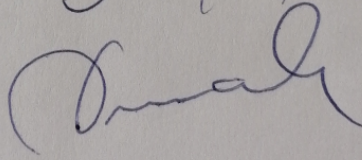
Üye: Prof. Dr. O. Meltem AKAY



Üye: Prof. Dr. Meral YİRMİBEŞ KARAOĞUZ



Üye: Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulu'nun ... / ... / ... tarih ve ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Özkan ALATAŞ

ÖZET

Kronik lenfositik lösemi yetişkinlerde en sık gözlenen lösemi türü olup, sıklıkla tekrar eden bazı kromozomal anomalilerin prognostik önemleri tanımlanmıştır. En sık gözlenen anomali delesyon 13 (del(13q)) olup, izole görüldüğünde iyi prognostik biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Ancak izole del(13q) saptanan KLL olgularının klinik bulgularının oldukça heterojen olduğu gözlenmektedir. Bizim çalışmamızda izole del(13q) saptanan olgularda del(13q) büyüklüğünün ve genomdaki diğer kopya sayısı değişiklikleri (KSD) ve heterozigosite kayıplarının (LOH) klinik heterojenite üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza FISH yöntemi ile izole del(13q) saptanan otuz iki KLL olgusu dahil edilmiş olup, otuz olgunun periferik kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde aCGH+SNP yöntemi ile KSD ve LOH'lar analiz edilmiştir.

Çalışmamız sonucunda 28/30 olguda del(13q) saptanmıştır. Delesyon büyüklüğü 0,34 - 28,81 Mb arasında değişkenlik göstermiştir ve delesyon tipi (tip ve tip 2) ile klinik bulgular arasında bir ilişki saptanmamıştır. Olgularımızdan 1'i izole del(13q) iken kalan olguların birinde del(13q) dışında 1 kromozom bölgesinde, 4 olguda 2 kromozom bölgesinde KSD saptanmış olup, diğer olgularda en az 3 KSD tespit edilmiştir. Bir olguda saptanan en fazla KSD altmış bir adettir.

Yaptığımız çalışma sonucunda del(13q) büyüklüğünün oldukça heterojen olduğu ve içerdiği genler açısından da heterojenite gösterdiği saptanmıştır. Genomda diğer KSD'ler arasında nadir KSD'ler saptanmış olup, ayrıca 1 olguda *ATM* gen bölgesini içeren LOH tespit edilmiştir. Saptanan KSD'ler arasında 16p13.3, *NOTCH*, *COL1A1* ve 2p artışlarının ve 18p11.32 kayıplarının prognostik önemlerinin olabileceği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, kopya sayısı değişikliklerinin, KSD büyüklüklerinin ve LOH analizlerinin KLL patogenezinin açıklanması için önemli olması sebebiyle array

yönteminin oldukça etkili olduğu savunulmuştur. Ayrıca delesyon 13q büyüklüğünün ve saptanan diğer KSD'lerin prognostik etkisinin açığa kavuşması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: KLL, del(13q), Mikroarray



SUMMARY

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in adults, and prognostic value of frequently recurrent chromosomal abnormalities are discovered. Deletion of chromosome 13 [del(13q)] is the most common chromosomal anomaly in CLL and it is considered as a good prognostic biomarker when it is observed isolated. But it is also noticed that clinical findings of patients with isolated del(13q) are quite heterogenous. In our study, we aimed to investigate the relation between this clinical heterogeneity and size of del(13q) and other copy number variations (CNV) and loss of heterozygosities (LOH) in CLL patients with del(13q).

In this study, 32 CLL patients with isolated del(13q) determined by FISH method included and CNV & LOH analysis were performed by aCGH+SNP method in DNA obtained by peripheral blood sample of 30 patients.

We found that 28/30 patients had del(13q). The size of deletions ranged between 0,34 and 28,81 Mb, no correlation was found between the type of deletions (type 1 / type 2) and clinical findings. Only one of our patients had isolated del(13q), one had other CNV in a chromosomal region, 4 had in 2 chromosomal regions other patients had at least 3 CNVs except for del(13q). The largest number of CNVs found in a patient was sixty one.

It is concluded that the size of del(13q) and the genes involved were very heterogenous. The other CNVs found were rare CNVs, and one patient had LOH involving *ATM* gene region. Out of the found CNVs; it is concluded that gain of 16p13.3, *NOTCH*, *COL1A1*, 2p and loss of 18p11.32 may have a prognostic value. Last of all, it is defended that array method is considerably effective because analyses of CNVs, size of CNVs and LOHs are important to explain the pathogenesis of CLL. Also, more studies are needed to figure out the prognostic value of 13q deletion size and other detected CNVs.

Key Words: CLL, del(13q), Microarray

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet	ii
Summary	iv
İçindekiler	v
Tablo Dizini	vii
Şekil Dizini	viii
Simge ve Kısaltmalar Dizini	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KLL'de Genetik Aberasyonlar	4
2.1.1. Kromozom 11 uzun kol delesyonları	4
2.1.2. Kromozom 17 kısa kol delesyonları	4
2.1.3. Trizomi 12	5
2.1.4. Kromozom 13 uzun kol delesyonları	6
2.1.5. Gen mutasyonları	10
2.1.5.1. Immunglobulin ağır zincir mutasyonları	10
2.1.5.2. <i>NOTCH1</i> gen mutasyonları	12
2.1.5.3. <i>SF3B1</i> gen mutasyonları	12
2.1.5.4. <i>ATM</i> gen mutasyonları	12
2.1.5.5. <i>TP53</i> gen mutasyonları	13
2.1.5.6. Diğer gen mutasyonları	15
2.2. Mikroarray Yöntemi	16
2.2.1. KLL'de mikroarray	17
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1. Hasta Grubu	19
3.2. Gereçler	19
3.2.1. Aletler	19
3.2.2. Kimyasal maddeler	20
3.3. Yöntemler	20
3.3.1. DNA izolasyonu	20
3.3.2. DNA'nın niteliksel ve niceliksel analizi	22
3.3.3. DNA'nın enzimatik etiketleme kiti ile restriksiyon kesimi	22
3.3.4. DNA örneklerinin flouresan işaretlenmesi	24

3.3.5. Etiketlenmiş DNA'nın temizlenmesi	25
3.3.6. Ürün miktarı ve spesifik aktivite hesaplanması	25
3.3.7. Hibridizasyon öncesi hazırlık	26
3.3.8. Hibridizasyon	27
3.3.9. Hibridizasyon sonrası yıkama için hazırlık	27
3.3.10. Hibridizasyon sonrası yıkama	28
3.3.11. Mikroarray taratılması	28
3.3.12. İmaj dosyalarının analizi	28
3.3.13. Array sonuçlarının yorumlanması	29
3.3.14. İstatistiksel değerlendirme	29
4. BULGULAR	30
4.1. 13q14'te saptanan kopya sayısı kayıpları	32
4.2. Diğer KSD ve LOH bulguları	43
5. TARTIŞMA	51
5.1. Del(13q) saptama oranları	51
5.2. Del(13q) Büyüklüğü	54
5.2.1. MDR bölgesi	54
5.2.2. Tip 1 ve tip 2 del(13q)	56
5.3.3. 13q14'te lokalize diğer genler	58
5.3. Diğer KSD'ler	60
5.4. Log2 değerleri	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR DİZİNİ	68
EKLER DİZİNİ	74
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Rai ve Binet Evreleme Sistemleri	3
Tablo 3.1. Restriksiyon Kesim Karışımı Bileşenleri	23
Tablo 3.2. Restriksiyon kesimi için PCR programı	23
Tablo 3.3. DNA denatürasyon ve fragmentasyonu için PCR programı	23
Tablo 3.4. Flouresan işaretleme karışımı	24
Tablo 3.5. DNA etiketlemesi için PCR programı	24
Tablo 3.6. Beklenen ürün miktarı ve spesifik aktivite değerleri	26
Tablo 3.7. Hibridizasyon karışımı	26
Tablo 3.8. Hibridizasyon için PCR programı	27
Tablo 4.1. Olgulara ait yaş, cinsiyet, hastalık evresi, OS ve TTFT bilgileri	31
Tablo 4.2. 13q14 kromozom bölgesi için CGH+SNP array sonuçları	33
Tablo 4.3. <i>RB1</i> gen delesyonu sıklığı ve klinik bilgileri ile aralarındaki ilişki	42
Tablo 4.4. Log2 değeri 0,15 ile filtreleme sonucunda pozitif gözlenen anomalilere yönelik FISH çalışma sonuçları	43
Tablo 4.5. Ortak KSD ve LOH saptanan bölgeler ve içerdikleri OMIM veritabanında tanımlı genler	44
Tablo 5.1. Del(13q) ilişkili FISH ve aCGH sonuçlarının uyumsuzluk gösterdiği çalışmalar	52
Tablo 5.2. %30'dan düşük oranda del(13q) saptanan olguların del(13q) anomalisine ait FISH delesyon oranları, array sonuçları, log2 değerleri ve olguların DLRSD değerleri	54
Tablo 5.3. Del(13q) büyüklükleri ve MDR bölgelerinin içerdikleri genler	56

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 2.1.	Del(13q)'nun fiziksel haritası	7
Şekil 2.2.	miR-15a ve miR-16-1'nin BCL2 üzerindeki etkisinin şematik gösterimi	7
Şekil 2.3.	miR-15a/16-1 ve hedef genleri arasındaki ilişkinin şematik gösterimi	9
Şekil 2.4.	Del(13q)'da FISH prognostik akım şeması	10
Şekil 2.5.	Immunglobulin molekülünün şematik gösterimi	11
Şekil 2.6.	KLL hastalığının klinik zamanlarına göre <i>NOTCH1</i> gen mutasyon frekansı	12
Şekil 2.7.	KLL'de TP53 etki ağı	14
Şekil 2.8.	Hematolojik malignitelerde mikroarray kullanımı	17
Şekil 3.1.	Mikroarray iş akışı	21
Şekil 3.2.	A) 4x180K mikroarray slaytı için contalı lam, B) Mikroarray slaytının contalı lam üzerine yerleştirilmesi, C) Hibridizasyon haznesinin sıkıştırılması	27
Şekil 4.1.	Olgu 9'a ait del(13q) görüntüsü	33
Şekil 4.2.	Del(13q) büyüklüğünün ve TTFT arasındaki ilişki	43
Şekil 4.3.	Olgu 19'a ait kromozom 11'de saptanan LOH görüntüsü	48
Şekil 4.4.	1q42.2-q42.3 kopya sayısı kaybı ile TTFT arasındaki ilişki	49
Şekil 4.5.	2p12-2p11.2 kopya sayısı artışı ile TTFT arasındaki ilişki	50
Şekil 5.1.	İki farklı log2 değeri ile yapılan analiz sonuçlarının karşılaştırılması	64

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
<i>RB1</i>	<i>Retinoblastoma 1</i>
<i>ATM</i>	<i>ATM serine threonine kinase</i>
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>
<i>NOTCH1</i>	<i>Notch receptor 1</i>
CGH	Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
aCGH+SNP	CGH+SNP Array
IGVH	immunoglobulin ağır zincir
miR	microRNA
p(IGVH)	immunoglobulin ağır zincir mutasyonu pozitif
n(IGVH)	immunoglobulin ağır zincir mutasyonu negatif
KS	Konvensiyonel sitogenetik
FISH	Flouresan in situ hibridizasyon
TTFT	Tedaviye başlama süresi
OS	Genel sağkalım
MDR	Minimal delesyon bölgesi
DLEU	Delected in leukemia
Del	Delesyon
PFS	Hastaliksız yaşam süresi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
NGS	Yeni nesil dizileme
LOH	Heterozigosite kaybı

UPD	Uniparental dizomi
KSD	Kopya sayısı değişiklikleri
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
DLRSD	Derivative Log Ratio Standard Deviation
CLL-IPI	KLL uluslararası prognostik indeksi



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemi genetik bir hastalık olup, mutasyonların birikmesi sonucu ortaya çıkan oldukça heterojen bir durumdur. Teknolojinin gelişmesi ile bu heterojeniteyi daha iyi anlamaya başlamıştır. Tedavi direncinin azaltılması ve yeni terapötik hedeflerin tanımlanması için genetik çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır (Burrell, McGranahan, Bartek, & Swanton, 2013).

Kronik lenfositik lösemi (KLL) ileri yaşta en sık gözlenen lösemi türü olup, KLL'de tekrar eden genetik aberasyonların prognostik önemleri bilinmektedir. Kromozom 17 kısa kol, kromozom 11 uzun kol delesyonları kötü prognoz ile ilişkilendirilirken, trizomi 12 ise orta prognoz sınıfında yer almaktadır. Kromozom 13 uzun kol delesyonları ise en sık gözlenen anomali olup, izole olduğunda iyi prognostik biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Dohner et al., 2000).

İzole 13q delesyonu saptanan olgular genellikle "bekle ve gör" yaklaşımı ile takip edilmektedirler. Ancak bu hastaların bir kısmında progresyon gözlenmekte ve bu nedenle tedavi başlanmaktadır. İzole 13q delesyonu saptanan bu olgularda klinik heterojenitenin sebebi henüz net olarak ortaya koyulmamıştır. Ancak delesyonlu bölgenin *Retinoblastoma 1 (RB1)* genini içermesi ve/veya delesyon yüzdesinin yüksek olmasının etkili olduğunu savunan çalışmalar mevcut olup, aksini savunan çalışmalar da söz konusudur.

Biz de çalışmamızda floresan in-situ hibridizasyon yöntemi ile izole 13q delesyonu saptanan otuz iki KLL olgusuna ait periferik kandan elde edilen DNA örneklerinde CGH+SNP array yöntemi ile 13q delesyon büyüklüğünün ve genomun diğer bölgelerinde meydana gelen kopya sayısı değişiklikleri ve heterozigosite kayıplarının izole del(13q) olgularının klinik heterojenitesi üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Kronik lenfositik lösemi (KLL)'nin insidansı popülasyonların yaş ve cinsiyet yapısına göre farklılık göstermektedir. İleri yaşta en sık gözlenen lösemi türü KLL olup, Amerika Birleşik Devletleri'nde insidansının 4,1/100.000 olduğu belirtilmektedir. Vakaların tanı anındaki ortalama yaşları 67-72 arasında olup, erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha fazladır (1,7/1). İnsidans oranı yaşla birlikte arttıkça, önümüzdeki yıllarda demografik değişiklikler sebebiyle KLL'nin prevalans ve mortalitesinin artması beklenmektedir. Kronik lenfositik lösemi tanısı alan olguların yaklaşık dörtte üçünden fazlası tesadüfen kan sayımı testlerinde keşfedilmektedir. Yeni tanı genç hastaların oranı daha sık yapılan kan sayımı testleri sebebiyle artış göstermektedir (Dighiero & Hamblin, 2008; Hallek, 2017).

Kronik lenfositik lösemi üç aydan uzun süre periferik kanda her mikrolitrede 5000'den fazla CD5⁺CD23⁺ B lenfositlerin klonal proliferasyonu ve birikmesi ile karakterize edilmektedir (Bosch & Dalla-Favera, 2019). Sekonder olarak lenfoid organlarda, dalakta ve lenf nodlarında da klonal proliferasyon gözlenmektedir (O'Reilly, Murphy, Rawe, & Garvey, 2018). Kronik lenfositik lösemi klinik olarak heterojenite göstermektedir. Olguların üçte biri hiç tedavi gerektirmeden, "bekle-gör" yaklaşımı ile takip edilmektedirler. Tedaviye progresyon gelişmesi durumunda karar verilmektedir. Ancak olguların bazılarında hızlı progresyon meydana gelmekte olup, kötü prognostik markırların eşlik ettiği agresif klinik gözlenmektedir ve bu olgulara hemen tedavi başlanmaktadır (O'Reilly et al., 2018). Prognostik olarak sınıflandırılmasında iki ayrı sistem kullanılmaktadır. Bunlardan ilki Rai evreleme sistemi olup, beş alt gruptan (evre 0-IV) oluşmaktadır. Düşük riskli alt grupta (evre 0) sadece lenfositoz görülürken, orta riskli grupta (evre I/II) palpe edilebilir lenf nodları veya hepatosplenomegali saptanmaktadır. Yüksek riskli grup ise (evre III/IV) anemi ve trombositopeni ile kendini göstermektedir. Binet evreleme sistemi de Rai evreleme sistemine benzer fiziksel ve laboratuvar bulgularına dayanır ve hastalar A'dan C'ye kadar sınıflandırılır (Tablo 1.1) (Bosch & Dalla-Favera, 2019). Her iki evreleme

sistemi de hastalığın progresyonunu öngörme konusunda etkili değildir (Nabhan & Rosen, 2014). Kronik lenfositik lösemi biyolojisinin açıklanmasında ve tedavi seçeneklerinde meydana gelen gelişmeler bu açığı kapatmaya çalışmaktadır.

Tablo 2.1. Rai ve Binet Evreleme Sistemleri (Nabhan & Rosen, 2014)

Evre	Risk	Klinik bulgular	Yaşam süresi (yıl)
Rai			
0	Düşük	Kan ve kemik iliğinde lenfositoz	>10
I/II	Orta	Lenfadenopati ± hepatosplenomegali	7
III/IV	Yüksek	Anemi ± trombositopeni	<4
Binet			
A	Düşük	<3 lenfadenopati alanı	12
B	Orta	>3 lenfadenopati alanı	7
C	Yüksek	Anemi ± trombositopeni	2-4

Son yirmi yılda yapılan çalışmalar sonucunda immunoglobulin ağır zincir (IGVH) mutasyonları ve çeşitli tekrarlayan genetik anomalileri içeren önemli patofizyolojik bulgular keşfedilmiştir. Bu bulguların biyolojik önemleri onların prognostik ve terapötik etkilerini yansıtmaktadır. Örneğin IGVH mutasyonları KLL olgularının %60'ında gözlenir ve iyi prognoz ile ilişkilendirilir. Agresif hastalık progresyon olasılığı oldukça düşüktür (Buccheri et al., 2018).

Son zamanlarda yapılan bir proje sonucunda KLL uluslararası prognostik indeks (CLL-IPI) geliştirildi ve bu prognostik model yaş, hastalık evresi, serum $\beta 2$ mikroglobulin, *TP53* anomalisi ve *IGHV* mutasyon durumları olan üzere 5 parametre kullanır. Her ne kadar hastaların yaşam süresi için planlanmış olsa da yeni tanı hastaların tedaviye başlama süreleri konusunda da bilgi verici bir sistemdir. Fakat rutinde kullanımı henüz yaygın değildir (Hallek, 2017; Molica et al., 2016).

2.1. KLL'de Genetik Aberasyonlar

Kronik lenfositik lösemi oldukça heterojen genetik profile sahip bir hastalık grubudur. Konvansiyonel sitogenetik (KS) ile KLL'de anomali saptama oranı %40-50 iken, Flouresan *in-situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi ile bu oran %80'e çıkmıştır (Autore, Strati, Laurenti, & Ferrajoli, 2018; Durak et al., 2009). Dengeli translokasyonların sık görüldüğü diğer B hücreli lösemilerin aksine, KLL'de en sık gözlenen genetik anomaliler; mutasyonlar, delesyonlar ve trizomiler olup, bu genetik anomaliler ilk tedaviye başlama süreleri (TTFT) ve genel yaşam süreleri (OS) için önemli belirteçler olarak kabul edilmektedirler (Autore et al., 2018; Buccheri et al., 2018).

2.1.1. Kromozom 11 uzun kol delesyonları

Kromozom 11 uzun kol delesyonları [del(11q)]'nın görülme sıklığı kemoterapi almamış, ileri evre KLL olgularında yaklaşık %25, erken evre KLL olgularında ise %10'dur. Genellikle kromozom 11'in uzun kol delesyonları q23 bandında meydana gelir ve bu kromozomal bölge *ATM* (ATM serine/threonine kinase) genini kapsamaktadır. Delesyon pozitif olguların %30-40'ında *ATM* geninin diğer alelinde mutasyon saptanmaktadır. Atm proteini DNA hasar yanıt yolağında önemli bir role sahiptir. Tipik olarak *ATM* delesyonları ilerlemiş lenfodenopati, hızlı hastalık progresyonu ve kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedir (Hallek, 2019; Jiang et al., 2016). İlginç olarak kemoimmunoterapinin bazı *ATM* delesyonu olan olgularda kötü prognostik özellikler üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir (Hallek et al., 2010). Ayrıca yapılan bir çalışmada *ATM* gen aberasyon sıklığının oldukça düşük olduğu ve kötü prognostik özellikler ile ilişki olmadığı, del(11q)'nun patobiyolojisinin anlaşılması için yeni çalışmaların yapılması gerektiği savunulmaktadır (Ouillet et al., 2012).

2.1.2. Kromozom 17 kısa kol delesyonları

Kromozom 17 kısa kol delesyonları [del(17p)] kemoterapi almamış KLL olgularının %5-8'inde gözlenmekte olup, bu delesyonlar 17. kromozomun p13 bandında meydana gelmektedir. *Tumor protein p53 (TP53)* geni bu bölgede lokalize olup, del(17p) saptanan KLL olgular genotoksik kemoterapilere karşı

direnç göstermektedirler. Benzer şekilde *TP53* mutasyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmekte olup, KLL olgularında *TP53* mutasyon gözlenme oranının %4-37 olduğu belirtilmektedir. Kromozom 17 kısa kol delesyonu saptanan olguların %80'inde, diğer alelde mutasyon olduğu, delesyonun eşlik etmediği *TP53* mutasyonlarının ise oldukça nadir olduğu bilinmektedir. Yeni tanı KLL olgularında *TP53* aberasyonları hızlı hastalık progresyonu ve tanı anından itibaren 3-4 yıl yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedir. (Buccheri et al., 2018; Hallek, 2019).

Kemoterapi almamış KLL olgularında *TP53* aberasyon oranı düşük iken, kemoterapi alan olgularda *TP53* aberasyonlarının görülme sıklığının arttığı gözlenmektedir. Kromozom 11 uzun kol delesyonlarının sonucunda *TP53* yolağının olumsuz etkilendiği savunulmaktadır. Kemoterapi gibi ajanların etkisiyle DNA'da çift kırık oluşması sonucu *ATM* geni *TP53* yolağını aktive eder. Böylelikle *ATM* hücre döngüsünü düzenleyerek, DNA onarım yollarını aktive etmekte veya apoptozu indükleyerek genomun bütünlüğünü korumakta görev almaktadır. Nadir olarak gözlenirse de del(11q) ve del(17p)'nin birlikte gözlenmesi, tek başına gözlendiklerinde olduğundan fazla kötü prognoza sebep olmaktadır. Endişeye sebebiyet verme ihtimali sebebiyle "izle ve bekle" politikası ile takip edilen KLL olgularında rutin olarak *TP53* aberasyonlarının analizi önerilmese de tedavi endikasyonu gelişen olgularda tedavi öncesi bu analizlerin yapılması gerekmektedir (Buccheri et al., 2018).

2.1.3. Trizomi 12

Trizomi 12 (+12) tanı anında KLL olgularının %15'inde saptanmakta olup, orta prognostik sınıfta değerlendirilmektedir. Trizomi 12'li KLL olgularında ortalama tedaviye başlama süresinin otuz üç ay, ortalama genel sağkalım süresinin ise yüz on dört ay olduğu belirtilmektedir. Trizomi 12 eğer FISH yöntemi ile saptandıysa bu olguların %70'i izole +12 olup, %18'ine 13. kromozom uzun kol delesyonu (del(13q)), %8'ine del(11q) ve %4'üne del(17p) anomalileri eşlik ettiği bildirilmektedir. Konvensiyonel sitogenetik yöntemi ile saptanan +12'lerin %30'unun izole, %5'inin trizomi 18 ile birlikte, %3'ünün ise 14. kromozom translokasyonları ile birlikte saptandığı raporlanmıştır. Aynı

zamanda sıklıkla +12'ye *NOTCH1* gen mutasyonu eşlik etmektedir (%40) ve bu durum kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Richter sendromu olgularında sık görülmesi de bu veriyi destekler niteliktedir (Autore et al., 2018; Bosch & Dalla-Favera, 2019).

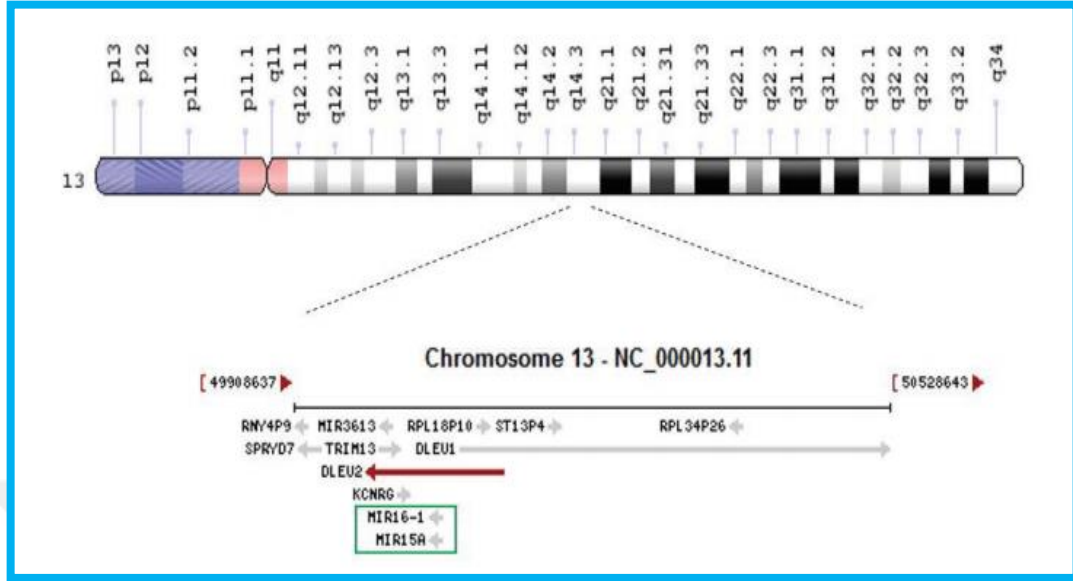
2.1.4. Kromozom 13 uzun kol delesyonları

Kronik lenfositik lösemi'de en sık gözlenen kromozomal anomali del(13q) olup, FISH ile saptanma oranı %50'dir. Bu delesyonlar submikroskopik olduğu için saptanma oranı KS ile %8-10'a kadar düşmektedir. Delesyon 13q izole olarak saptandığında iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Grygalewicz et al., 2016).

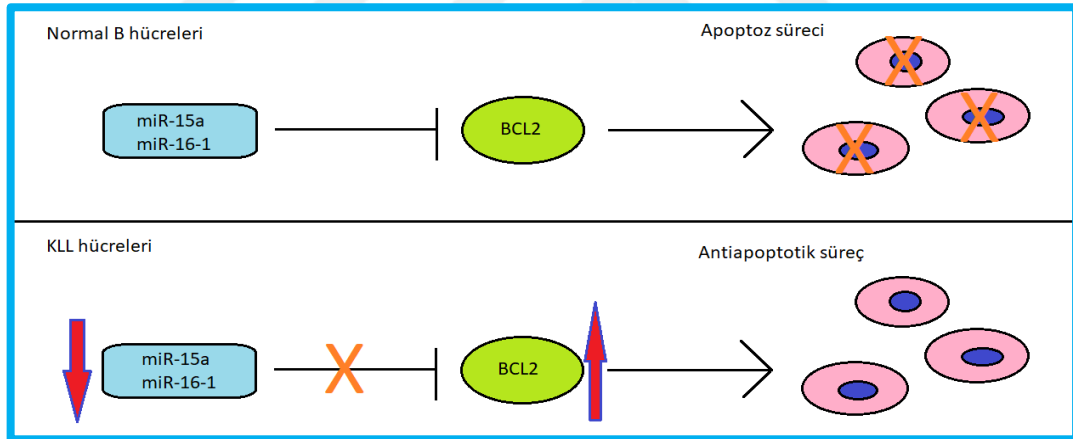
Kromozom 13q delesyonları kromozomun q14 bölgesinde meydana gelmektedir. Bu bölgede bir minimal delesyon bölgesi (MDR) tanımlanmıştır. Bu bölge *deleted in leukemia (DLEU) 2* genini, *DLEU 1* geninin 1.eksonunu ve *DLEU2* geninin intronik bölgesinde lokalize olan microRNA (miR)-15a/16-1 kümesini içerir (Şekil 2.1). *DLEU2* poliadenile ve splice edilmiş uzun bir kodlamayan RNA (lncRNA) kodlar ve bu lncRNA X kromozom inaktivasyonu veya aktivasyonu, imprinting ve transkripsiyonel koaktivasyonu veya gen ekspresyonunun regülasyonu dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonlarında etkilidir. Ancak *DLEU2*'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekte ve başka bir lncRNA dizisi ile homoloji göstermemektedir. MicroRNA-15a/16-1 kümesinin ise yapılan çalışmalar sonucunda tumor supressor olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Klein et al., 2010). Delesyon 13q KLL patogenezinden sorumlu tutulmaktadır (Puiggros, Blanco, & Espinet, 2014).

MicroRNA-15a ve miR-16-1 hücre döngüsünün G0/G1-S evresinde önemli rolü olan proteinlerin negatif düzenlenmesinde görev yapmaktadırlar. Bu miRNA'ların kaybı söz konusu olduğunda *Ccnd2* ve *Ccnd3* proteinleri daha hızlı aktive edilir ve bu da *Rb1*'in hızlı fosforilasyonuna sebep olmaktadır. Sonuç olarak miR-15a ve miR-16-1 kaybı olan hücrelerde *E2F*'nin aktivasyonu ile hücre döngüsüne hızlı bir giriş yapılmış ve pro-proliferatif fenotip indüklenmesine yol açmaktadır. Kronik lenfositik lösemi hastalarının lenfositlerinde miR-15a ve miR-16-1'in düşük ekspresyonu antiapoptotik bir

protein olan Bcl2'nin yüksek ekspresyonuna yol **açmaktadır** ve bunun da sonucunda apoptoz süreci inhibe olmaktadır (Şekil 2.2) (Braga et al., 2017).



Şekil 2.1: del(13q)'nın fiziksel haritası (Biterge Süt ve Balı'ndan uyarlanmıştır (Biterge Süt B. & Balı D.F., 2018).



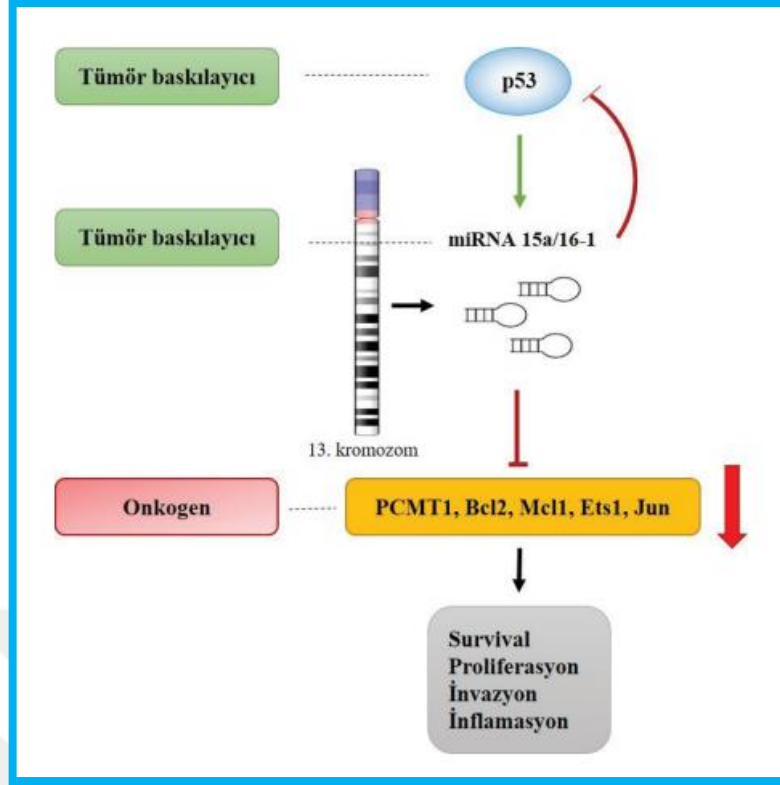
Şekil 2.2.: miR-15a ve miR-16-1'nin BCL2 üzerindeki etkisinin şematik gösterimi (Braga ve ark.'larından uyarlanmıştır) (Braga et al., 2017).

Apoptoz süreci Bcl-2 ailesinin mitokondriyal bağımlı yolunun aktivasyonu ile gerçekleştirilir. Bu protein ailesi Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL gibi apoptozu baskılayan ve Bax, Bak, Bid, Bim, Puma gibi apoptozu indükleyen proteinlerde oluşur. Kronik lenfositik lösemi'de B lenfosit sağkalımının, primer olarak Bcl-2 ailesi proteinlerinin ifade bozukluğu sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Yüksek düzey Mcl-1 ve artmış Bcl-2/Bax oranı kötü tedavi yanıtı ile ilişkilendirilmektedir (Braga et al., 2017).

Kromozom 13q delesyon bölgesinde bulunan bu iki mikroRNA'nın P53 ekspresyonu üzerinde de etkisi olduğu savunulmaktadır. Delesyon 13q sonucunda yüksek antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonu ile yüksek pro-apoptotik P53 ekspresyonunun bir denge oluşturduğu belirtilmektedir. Bu veriler del(13q)'nun iyi prognoz ile ilişkili olmasının sebebi olarak gösterilmektedir (şekil 2.3) (Braga et al., 2017).

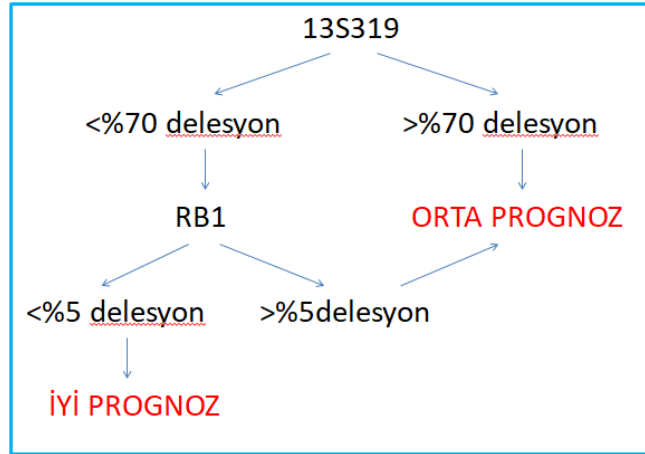
Delesyon 13q büyüklüğü çeşitlilik göstermekte olup, kırık bölgeleri heterojenite göstermektedir. Delesyonlu bölgenin büyüklüğü 300 Kb'dan 70 Mb'a kadar değişkenlik göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda iki alt grup tanımlanmıştır; tip 1 ve tip 2 13q delesyonları. Tip 1 delesyonları kısa delesyonlar olarak tanımlanıp MDR bölgesinin kaybı ile meydana gelmektedir. Tip 2 delesyonları ise geniş delesyonlar olup, *RB1* geninde de delesyon gözlenmektedir. Tip 2 delesyonlarının kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Dal Bo et al., 2011; Ouillette et al., 2012; Puiggros et al., 2014). Ancak aksine *RB1* delesyonlarının prognostik etkisi olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur (Grygalewicz et al., 2016; Huang et al., 2016). Bu nedenle delesyon büyüklüğünün prognostik etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Kromozom 13q'daki delesyonlar genellikle (%76) monoallelik olup, %24 oranında biallelik delesyonlar da gözlenmektedir (Klein et al., 2010). Biallelik delesyonlar genellikle daha küçük delesyonlar olup, delesyonlu bölge *RB1* genini içermemektedir (Puiggros et al., 2014). Prognostik önemleri ise tartışmalı olup, bazı araştırmacılar monoallelik delesyondan köken aldıklarını ve daha agresif kliniğe sebep olduğunu savunurken (Chena et al., 2008; Dal Bo et al., 2011; Van Dyke et al., 2010), bazıları monoallelik ve biallelik delesyonlar arasında prognostik açıdan bir farklılık olmadığını belirtmektedir (Garg et al., 2012; Puiggros et al., 2013). Ayrıca delesyon büyüklüğü ve yüzdesinin birlikte değerlendirilmesi gerektiği, <70 ve tip 1 del(13q) daha uzun tedaviye başlama süresi (TTFT), >70% del(13q) ya da <70 ve tip 2 del(13q) daha kısa TTFT ile ilişkili olduğu savunulmaktadır (Şekil 2.4) (Dal Bo et al., 2011).



Şekil 2.3: miR-15a/16-1 ve hedef genleri arasındaki ilişkinin şematik gösterimi (Biterge Süt B. & Balı D.F., 2018)

Yapılan bir başka çalışmada yüksek 13q delesyonu (>%80) (13q-Y) olan KLL olguları ile düşük 13q delesyonu (<%80) (13q-D) olan KLL olguları arasında miRNA ekspresyon oranlarının farklı olduğu, 13q-Y olgularda miR-143'ün downregüle, miR-155'in ise overeksprese olduğu belirtilmiştir. Bu microRNA'ların hedefinde ise *BCL2*, *MDM2*, *TP53* gibi apoptozda görevli ve KRAS, PI3K-AKT yolağı gibi proliferasyonda görevli genler bulunmaktadır. Yüksek 13q delesyonlarının düşük apoptoz, yüksek proliferasyon düzeyine sebep olduğu belirtilmektedir (Hernandez-Sanchez et al., 2016).



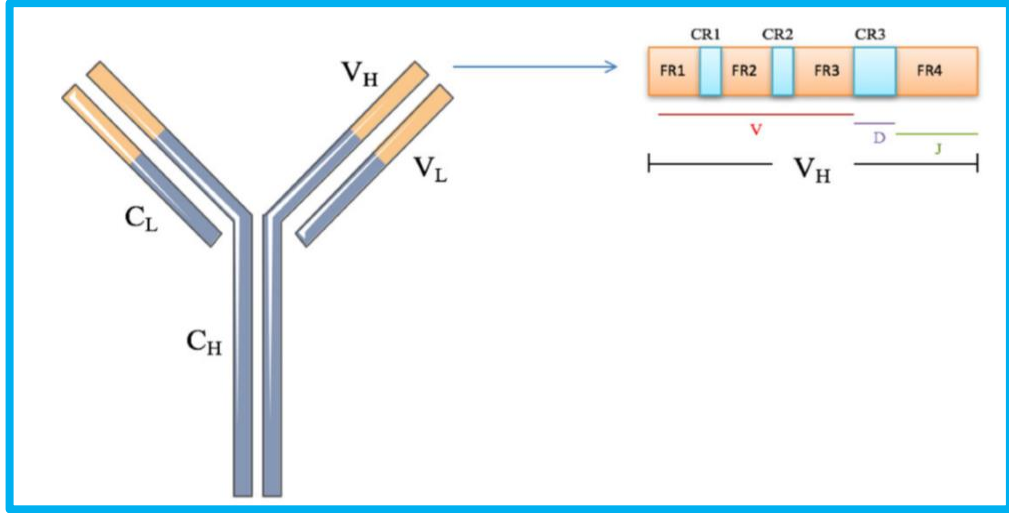
Şekil 2.4: del(13q)'da FISH prognostik akım şeması (Dal Bo ve ark.'larından uyarlanmıştır)
(Dal Bo et al., 2011).

2.1.5. Gen mutasyonları

2.1.5.1. Immunglobulin ağır zincir mutasyonları

İmmunoglobulin ağır zincir (*IGHV*) mutasyonlarının prognostik önemleri iyi tanımlanmış olup, mutasyon pozitif (p*IGHV*) olguların kliniği daha iyi seyretmektedir. Immunglobulin ağır zincir mutasyonu negatif (n*IGHV*) olguların hastalıksız yaşam sürelerinin (PFS) 1 ve 5 yıl arasında değişirken, p*IGHV* olgularında 9,2 ile 18,9 yıl arasında değiştiği belirtilmektedir. Benzer şekilde n*IGHV* olgularına ait OS'lerinin 3,2 ile 10 yıl arasında, p*IGHV* olgularının OS'lerinin ise 19,9 ile 25,8 yıl arasında olduğu tespit edilmiştir. Kötü prognostik bulgular söz konusu olduğunda bile *IGHV* mutasyonlarının OS üzerinde daha belirleyici olduğunu savunan araştırmalar vardır (Crombie & Davids, 2017).

Normal B hücre olgunlaşması sürecinde V (variable), D (diversity) ve J (junctional) segmentlerinin kromozomal rekombinasyonu ağır ve hafif immunglobulin zincirlerinin V bölgesini oluşturur. Tüm V bölgesi immunglobulin işlevini etkilerken, 3 tamamlayıcı bölge (CR1-3) antikor spesifitesine katkıda bulunur. Bu bölgelerden CR1 ve 2 V bölgesinde bulunurken CR3 D bölgesinde yer alır. Çerçeve bölgeleri de (FR1-4) şekil 2.5'de gözlendiği gibi yer almaktadır (Crombie & Davids, 2017).

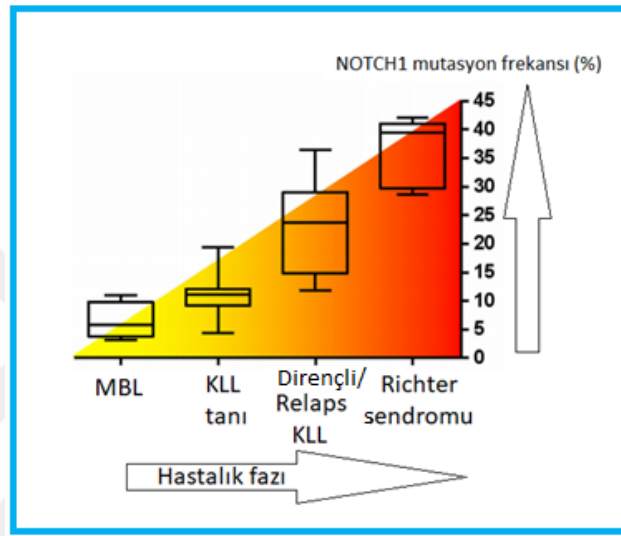


Şekil 2.5: Immunglobulin molekülünün şematik gösterimi (Crombie & Davids, 2017).

Prognostik önemi ortaya koyulmuş *IGHV* mutasyonları stabil olup, klonal gelişim göstermemektedir ve bu sebeple mutasyon analizlerinin tekrar edilmesi gerekmemektedir. Ancak *IGHV* mutasyon analizlerinin bazı kısıtlayıcı özellikleri bulunmaktadır. Genellikle immunglobulin ağır zincir mutasyonları *IGHV* transkriptinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmesi, dizilenmesi ve transkriptin immünoglobulin veritabanlarında mevcut olan bilinen germ hattı genleriyle karşılaştırılması yöntemine dayanmaktadır. Mevcut farklı teknikler göz önünde bulundurulduğunda, kurumlar arası tutarsız sonuçlar gözlenmekte olduğu belirtilmektedir. Bu farklılıklar klonal transkript dışında bir transkriptin çoğaltılma riski, bazı primerlerin subklonları kaçırma riskinden kaynaklanabilmektedir. Çerçeve bölgelerinin primerleri ile yapılan çalışmalarda tam uzunlukta transkript elde edilememekte ve germline benzerlik yüzdelerinin yanlış hesaplanması riski ortaya çıkmaktadır. Ek olarak, immünoglobülin veri tabanlarında ve mutasyonlarının yüzdesini hesaplamak için kullanılan yazılım programlarındaki farklılıklar söz konusudur. Son zamanlarda yeni nesil dizileme (NGS) yöntemleri ile çalışmalar yapılmakta olup, geleneksel yöntemlere göre daha doğru sonuçlar elde edildiği belirtilmektedir. Ayrıca NGS *IGHV* yeniden düzenlenme ile ilişkili olmayan mutasyonları da tespit etme olanağı sağlamaktadır (Crombie & Davids, 2017).

2.1.5.2. *NOTCH1* gen mutasyonları

Kronik lenfositik lösemi'de en fazla *NOTCH1* geninde mutasyon saptanmakta olup, bu mutasyonlar kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Tanı anında *NOTCH1* görülme sıklığı %10 olup, hastalık progresyonu ilerledikçe mutasyon frekansı artış göstermektedir (şekil 2.6). Sıklıkla nIGHV ve +12 KLL olgularında *NOTCH1* mutasyonları saptanmaktadır (Autore et al., 2018; Gaidano, Foa, & Dalla-Favera, 2012).



Şekil 2.6. KLL hastalığının klinik zamanlarına göre *NOTCH1* gen mutasyon frekansı (Autore ve ark.'larından uyarlanmıştır (Autore et al., 2018).

2.1.5.3. *SF3B1* gen mutasyonları

U2 splayzomun bir komponenti olan *SF3B1* olgun mRNA oluşturulmasında görev yapmaktadır. Bu gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda hatalı mRNA oluşmakta ve *SF3B1* gen mutasyonları kötü prognostik biyobelirteç kabul edilmektedir. Kronik lenfositik lösemi'de görülme sıklığı %10-14 olup, genellikle nIGHV, del(11q) ve *ATM* mutasyonları ilişkilidir. (Condoluci & Rossi, 2019; Maleki et al., 2019).

2.1.5.4. *ATM* gen mutasyonları

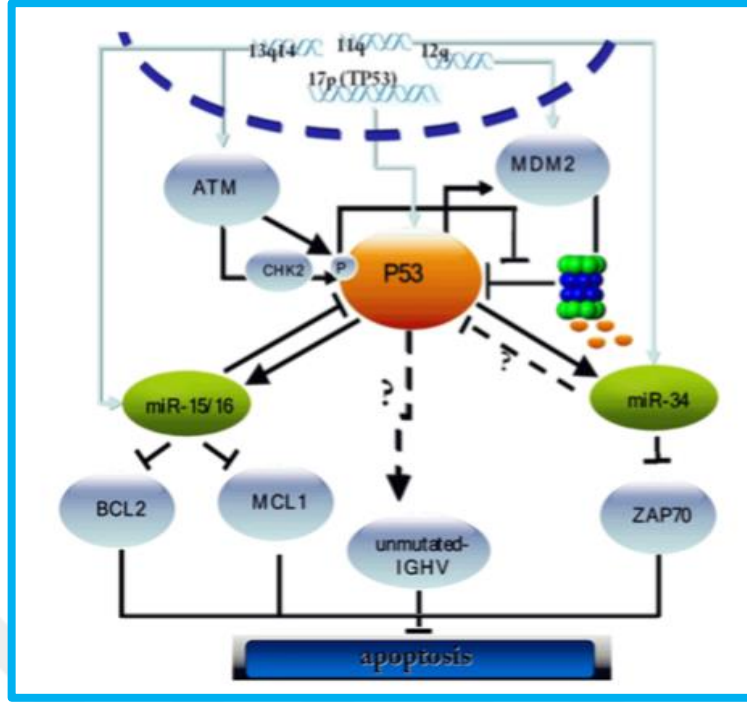
Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) geni 11q22-11q23'de lokalize olup, phosphatidylinositol-3 kinase (PT3K) ailesinin bir üyesidir. DNA tamir mekanizmalarının ve apoptoz yolağının aktifleştirilmesinde görev almaktadır. Kromozom 11 delesyonu pozitif KLL olgularında minimal delesyonlu bölge

içerisinde yer almaktadır. Gen mutasyonları genellikle del(11q) ve *BIRC3* delesyonları ya da mutasyonları ile ilişkilendirilmektedir. Ancak daha kötü prognoza sebep olduğu belirtilmektedir. Tanı anında *ATM* mutasyon sıklığı %10-15 olarak bildirilmiştir (Condoluci & Rossi, 2019; Guarini et al., 2012; Rose-Zerilli et al., 2014). Germ hattında zaten mevcut *ATM* genindeki patojenik olmayan varyantlar ve polimorfizmlerden mutasyonların ayrılması gerekliliği ve genin çok uzun olması *ATM* gen mutasyon analizlerini zorlaştırmaktadır. Yapılan bir çalışmada *ATM* mutasyonlarının del(11q) negatif olduğu durumlarda bile TTF1 üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple *ATM* geni için kopya sayısı değişikliklerinin analiz edilmesinin yeterli olmadığı savunulmuştur (Nadeu et al., 2016).

2.1.5.5. TP53 gen mutasyonları

Kromozom 17 kısa kol delesyonları ile *TP53* mutasyonları %80 konkordans göstermektedir. Ancak del(17p)'nin eşlik etmediği, *TP53* mutasyonlarının pozitif olduğu durumlar da kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Bu sebeple del(17p) saptanmayan olgularda, *TP53* gen mutasyon analizlerinin yapılması ve alternatif tedavi seçeneklerinin düşünülmesi gerektiği savunulmaktadır.

Kromozom 11, 13 ve trizomi 12'deki anomaliler KLL'de en sık gözlenen anomalilerdir ve TP53'ün önemli bir rol oynadığı *TP53* mikroRNA devresinin yapımına katılırlar. Bu TP53 ve miRNA ağında aralarındaki etkileşimlerin belirlenmesi, yalnızca yeni prognostik belirteçlerin tanımlanmasına yol açmamış, aynı zamanda patofizyolojisine yeni bakış açıları getirmiştir ve KLL'de *TP53* mutasyonu ile ilişkili tedavi direncinin üstesinden gelmek için yeni hedefler belirlenmeye başlamıştır (şekil 2.7).



Şekil 2.7. KLL'de TP53 etki ağı (Wang & Wang, 2013).

Kromozom 11 uzun kol delesyonları ile *TP53* mutasyonları ilişkili olup, miR-34b ve miR-34c 11q23'de, miR-34a 1p36'da lokalizedir. miR-34 ailesinin tümör supressör olarak görev yaptığı ortaya koyulmuştur. miR-34 ailesinin etkisini gösterebilmesi için aktif bir p53 proteinine ihtiyaç duymaktadır. Bu sebeple düşük miR-34a ekspresyonu kötü prognoz ve kemoterapi direnci ile ilişkilendirilmiştir (Wang & Wang, 2013). Onkojenik stres ile aktive edildiğinde *ATM* geni direkt veya indirekt olarak, *CHK2* (check point kinase 2) üzerinden p53'ü fosforlar ve böylelikle p53'ün Mdm2'ye bağlanması ve proteozomlar tarafından degrade edilmesi inhibe edilmiş olur. Kromozom 13q'dan kodlanan miR-15a ve 16-1 direkt olarak *TP53*'ün negatif düzenleyicisi olarak görev yaparlarken, *TP53*'de miR-15a/miR-16-1'ü transaktif etmektedir. Ayrıca transkripsiyondan bağımsız olarak miR-16-1'in P53 tarafından regüle edildiği gösterilmiştir. P53 pri-mikroRNA'ların pre-mikroRNA'lara dönüşmesini tetikler ve olgun miR-16-1 düzeyi artmış olmaktadır. Ek olarak bu TP53-mikroRNA döngüsü Bcl2'nin yer aldığı downstream yolları regüle etmektedir. miR-15a/miR-16-1 antiapoptotik Bcl2 ve Bcl2 bağlantılı Mcl1 (myeloid cell leukemia sequence 1) düzeyini azaltırken, Bax'ın fonksiyonu TP53 tarafından değiştirilir (Wang & Wang, 2013). Kromozom 12'de lokalize

olan *MDM2* geni *TP53*'ü doğrudan inhibe etmektedir. Trizomi 12'nin Mdm2 seviyesinin artmasına sebep olabileceği belirtilmektedir. Nutlin-3 bir Mdm2 antagonisti olup, Mdm2-p53 bağlanmasını hedef alır ve p53'ü aktive ederek p53'e bağlı apoptozu indüklemektedir. Bununla birlikte *MDM2* polimorfizmlerinin KLL için risk faktörü olarak tanımlanıp tanımlanmayacağı tartışma konusu olup, *MDM2* polimorfizmleri ile p53 arasındaki muhtemel bağlantılar henüz açığa kavuşmamıştır. Prognostik önemi iyi açıklanmış *IGHV* mutasyonları ile *TP53* anomalileri arasındaki ilişki konusundaki veriler çelişkili olup, p*IGHV* hastalarda *TP53* mutasyon durumunun değerlendirilmesi tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından faydalı olacağı belirtilmektedir (Wang & Wang, 2013).

2.1.5.6. Diğer gen mutasyonları

Telomer uzunluğunun korunmasında görev alan *POT1* gen mutasyonları KLL olgularının %3-5'inde gözlenmektedir. Genellikle *NOTCH1* ve *SF3B1* gen mutasyonlarında olduğu gibi n*IGHV* olgularda saptanmıştır. Prognostik öneminin anlaşılması için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır (Amin & Malek, 2016).

Kronik lenfositik lösemi'de tekrarlayan bir diğer mutasyon ise *BIRC3* mutasyonları olup, *BIRC3* geni NF-KB sinyal yolağının aktivatörü olarak görev yapan *MAPK314*'ün negatif düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu genin mutasyonları kötü klinik ve genetik bulgular ile ilişkilendirilmektedir (Gaidano et al., 2012).

Tool like reseptör (TLR) için adaptör görevi gören *MYD88* mutasyonları için bir hotspot bölge tanımlanmıştır (L265P) ve KLL'de görülme sıklığı %2-3 olup, p*IGHV*'ler daha sık gözlenmektedir. Agresif olmayan KLL ile ilişkilendirilmektedir. Hastalık progresyonu ile ilişkisi olmayıp, erken dönem KLL'de gözlenmektedir (Amin & Malek, 2016; Gaidano et al., 2012).

Kanserde önemli olduğu bilinen WNT yolağının overekspresyon, mutasyon ya da epigenetik değişiklikler ile KLL olgularında aktif olduğu gösterilmiştir. Ancak WNT yolağının KLL'de terapi için iyi bir hedef olup olmadığı henüz açıklanamamıştır (Amin & Malek, 2016).

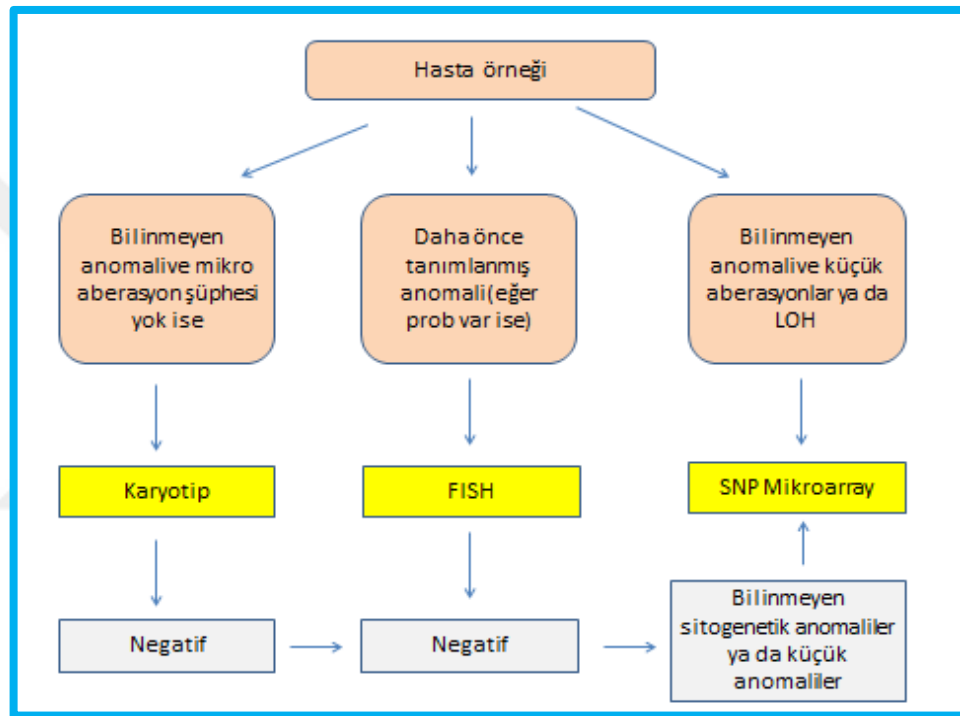
Kronik lenfositik lösemi olgularının %5'inde gözlenen *EGR2* mutasyonlarının, tanı anında gerçek frekansı bilinmemekte olup, KLL'deki rolü de henüz açıklanamamıştır (Amin & Malek, 2016).

2.2. Mikroarray Yöntemi

Kanserde gözlenen genetik anomaliler arasında kromozom translokasyonları, amplifikasyonlar, allelik kayıplar, heterozigosite kayıpları (LOH), delesyonlar, mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler en sık gözlenen anomalilerdir. Rutinde konvensiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemleri kullanılmakta olup, translokasyon, inversiyon, delesyon veya anöploid gibi anomaliler tespit edilmektedir. Flouresan in-situ hibridizasyon G bantlamaya göre çok daha yüksek çözünürlüğe sahip olsa da, bilinmeyen anomalilerin ve global kromozomal anomalilerin tespit edilmesi için uygun bir yöntem değildir. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyona dayalı array (aCGH) 1990'ların başında geliştirilmiştir ve karyotipleme ve FISH ile tespit edilemeyen tüm genom kopya sayısı değişikliklerinin (KSD) tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Tek nükleotid polimorfizm (SNP) array, aCGH'in aksine hem KSD'leri ve LOH'ları veya kopya sayısından bağımsız LOH/uniparental dizomi (UPD)'leri tespit edebilmektedir (Song & Shao, 2015).

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyonda olgu DNA'sı ve referans DNA'nın karşılaştırılması sonucunda elde edilen verilere göre delesyonlar ve/veya duplikasyonlar saptanmaktadır. İnsan genomuna özgü problemler cam lam üzerinde bulunur ve array'in rezolüsyonuna bağlı olarak onbinlerce ya da birkaç milyon prob bulunabilmektedir. Fragment halde ve farklı floresan renklerle işaretli olan DNA'lar problemlere bağlanırlar ve lazer tarayıcısı sayesinde ortaya çıkan ışımalar sonucunda olgu ve referans örneklerinin yoğunluklarının oranı belirlenmektedir. Eğer yoğunlukları eşit ise ilgili genomik bölge normal olarak değerlendirilir. Bunun aksine flouresan yoğunluğu >1 ise duplikasyonu, <1 ise delesyonu işaret etmektedir. Verilerin incelenmesinde ve yorumlanmasında biyoinformatik oldukça önemli bir rol almaktadır. Hedef problemlerin polimorfik allellerden seçildiği SNP array yöntemi CGH array yöntemi ile benzerlik göstermekte olup, sadece olgu

DNA'sı işaretlenmektedir. Günümüzde CGH+SNP arraylerin bir arada tasarlandığı platformlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Erzurumluoglu & Artan, 2018). Hematolojik malignansilerde özellikle konvansiyonel sitogenetik ve FISH'in yetersiz kaldığı durumlarda mikroarray yönteminin oldukça faydalı olacağı belirtilmektedir. Ancak henüz hematolojik malignitelere array kullanımı ile ilgili kılavuzlar bulunmamaktadır. Şekil 2.8.'de hematolojik malignitelere SNP array'in kullanıma yönelik bir öneri yer almaktadır (Song & Shao, 2015).



Şekil 2.8.: Hematolojik malignitelere mikroarray kullanımı (Song & Shao'dan uyarlanmıştır) (Song & Shao, 2015).

2.2.1. KLL'de mikroarray

Kronik lenfositik lösemi translokasyonların öneminin ortaya koyulduğu diğer B hücreli hematolojik malignansilerin aksine kromozomal bazı delesyonlar ve artışlar ile genetik açıdan karakterize bir hastalık grubudur. Konvansiyonel sitogenetik ile anomali saptama oranı %50 iken FISH ile bu oranın %80'e çıktığı bilinmekte olup, rutinde sıklıkla FISH yöntemi kullanılmaktadır. Sitogenetik analiz için yapılan G bantlama tekniğinin rezolüsyonu yaklaşık 5 Mb olup, küçük delesyonları yakalama konusunda başarısızdır. Ayrıca analiz için bölünen hücrelere ihtiyaç duyulması

dezavantajlarından birisidir. Bölünen hücrelere ihtiyaç duymayan ve interfaz hücrelerinde analize imkan veren FISH yönteminin rezolüsyonu yaklaşık 100 kb'dır. Sitogenetik ile en sık saptanan anomali +12 iken, FISH ile 13q14 delesyonudur. Fakat hedefe yönelik analize imkan vermesi de FISH yönteminin dezavantajıdır. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) yöntemi de hasta ve referans DNA örneklerini karşılaştırarak kromozomal artış ve kayıpları tespit edebilmektedir. Ancak rezolüsyonu düşüktür (5-20 Mb). Bu sebeple araştırma laboratuvarlarında yerini CGH'e dayalı array (aCGH) yöntemi almıştır. Array yöntemlerinin rezolüsyonu anomalili klonun büyüklüğüne bağlı olup, en sık kullanılan array yöntemi oligonukleotid'e dayalı array yöntemidir. Yüksek rezolüsyona sahiptir ve 25-60 nükleotid uzunluğunda problardan faydalanmaktadır. Yüksek rezolüsyona sahip arrayler daha küçük genomik aberasyonları ve yaklaşık kırık noktalarını daha spesifik tespit etmektedirler. Yapısal anomalilerin nadir gözleendiği KLL hasta grubunda aCGH yöntemi kopya sayısı değişiklerinin tespit edilmesi için oldukça faydalı bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Tek bir test ile kısa sürede (yaklaşık yetmiş iki saat) tüm genomdaki kopya sayısı değişiklikleri tespit edilebilmektedir (Higgins, Gunn, & Robetorye, 2008; Sargent et al., 2009).

Ancak KLL olgularında array yönteminin bazı dezavantajları olduğu da savunulmuştur. Optimum duyarlılık ve doğru analiz için değrede olmamış ve yüksek miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca belki de en majör dezavantajı tekniksel sensitivitesidir. Array ile anomalinin saptanabilmesi için tümör yükünün %25-30 olması gerektiği belirtilmektedir. Bu sebeple yeni kemoterapi almış ya da transplante olmuş olgular için array yönteminin kullanılması önerilmemektedir. Array çalışmaya başlamadan önce CD5/CD19 yüzey markerı pozitif hücrelerin seçilmesi ve tümör yükünün en az %25 olması gerektiği önerilmektedir. Ayrıca array yönteminin bir anomaliyi saptaması için anomali oranının en az %25 olması gerektiği belirtilmektedir (Higgins et al., 2008; Patel et al., 2008; Sargent et al., 2009).

Sonuç olarak rutinde konvansiyonel sitogenetik çalışmasının bir katkısının olmayacağı durumlarda, FISH veya aCGH yöntemlerinin kullanılması gerektiği savunulmaktadır (O'Malley et al., 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD.'na 2010 ve 2019 yılları arasında ESOĞÜ Tıp Fakültesi Hematoloji BD., Eskişehir Özel Ümit Hastanesi Hematoloji Bölümü, Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi Hematoloji Bölümü ve Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji BD.'ından konvansiyonel sitogenetik ve FISH çalışması için yönlendirilen ve izole del(13q) (del13S319) saptanan 32 KLL olgusu dahil edilmiştir. Olgulara ait periferik kan örnekleri EDTA'lı tüpler içerisinde bölümümüze ulaştırılmıştır.

Çalışmamız için ESOĞÜ klinik uygulamalar etik kurul onay kararı (2018-39) bulunup, tüm olgulardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

3.2. Gereçler

3.2.1. Aletler

- Hibridizasyon Fırını (Agilent)
- Hibridizasyon Fırını Rotatoru (Agilent)
- Hibridizasyon Haznesi (Agilent)
- Hibridizasyon Haznesi Contaıı Lamı (Agilent)
- Mikroarray Tarayıcısı (Agilent)
- Manyetik Karıştırıcı Çubuk (Corning)
- Isıtma Özellikli Manyetik Karıştırıcı (Corning)
- Ozon Bariyer Lam Kapağı (Agilent)
- 1.5 L Cam Tabak (Borcam)
- Lam yıkama plakaları (Wheaton)
- Lam tutucusu (Agilent)
- Pipet seti (Gilson)
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı (PE GenAmp System 9700)
- Vorteks (Heidolph)
- Derin Dondurucu (Arçelik)

- Buzdolabı (Arçelik)
- Strip (Perkin Elmer)
- Mikrofüj Tüpleri (Ambion)
- Toplama Tüpü (Qiagen)
- Spin kolonu (Qiagen)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
- Su banyosu
- Termostat (Biosan)

3.2.2. Kimyasal maddeler

- Proteinaz K Solüsyonu (Qiagen)
- İnsan gDNA'sı (Kadın/Erkek)
- İnsan 4x180K CGH Mikroarray Kiti (Agilent SurePrint G3 Cancer CGH+SNP)
- Alu I (Agilent)
- Rsa I (Agilent)
- Genomik DNA enzimatik Etiketleme Kiti (Agilent)
- Oligo aCGH Yıkama Tamponu 1 ve 2 (Agilent)
- Oligo aCGH Hibridizasyon Kiti (Agilent)
- 1xTE (Tris EDTA, pH 8.0) (Agilent)
- Asetonitril (Sigma)
- PBS
- Distile Su

3.3. Yöntemler

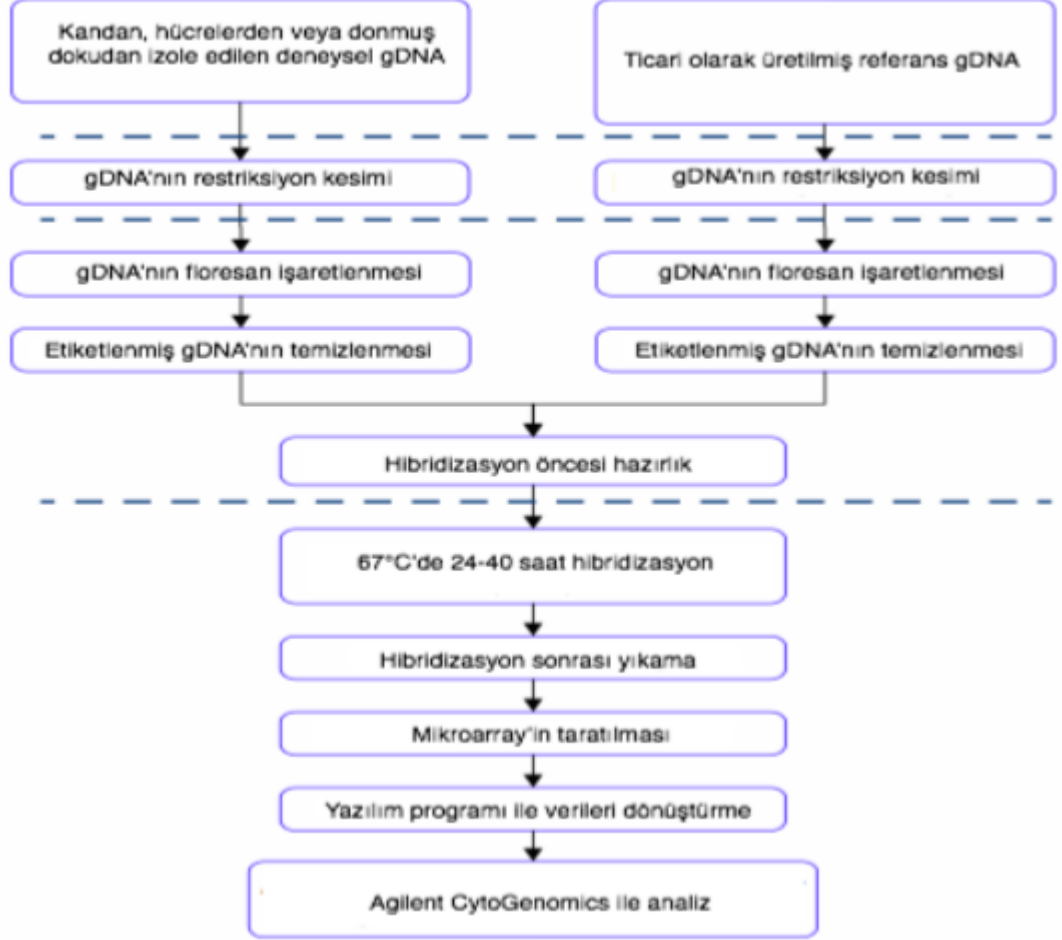
Çalışmamızda Şekil 3.1'de belirtilen iş akışı takip edilmiştir.

3.3.1. DNA izolasyonu

➤ Bir tüp içerisine önce 10 µL Proteinaz K (20 mg/ml) eklenmiştir. Sonra 200 µL periferik kan örneği ve 200 µL ekstraksiyon tamponu eklenmiştir ve 15 sn vorteks yapılmıştır.

➤ 15 dk 56°C'de termostatta bekletilmiştir. Süre sonunda örneğin tüpün dibinde tolanmasını sağlamak amacıyla kısa bir santrifüj yapılmıştır.

- 210 µL binding solüsyon eklenip, vorteks yapılmıştır.
- Daha sonra karışım spin kolona aktarılarak, 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir ve sonunda tüpün dibinde toplanan sıvı dökülmüştür.



Şekil 3.1: Mikroarray iş akışı

- Spin kolona 650 µL yıkama tamponu 1 eklenip, 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir ve sonunda tüpün dibinde toplanan sıvı dökülmüştür.
- Spin kolona 500 µL yıkama tamponu 1 eklenip, 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir ve sonunda tüpün dibinde toplanan sıvı dökülmüştür.
- Spin kolona 250 µL yıkama tamponu 1 eklenip, 14000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiştir ve sonunda tüpün dibinde toplanan sıvı dökülmüştür.
- Spin kolon yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarılmıştır ve 200 µL elüsyon tamponu eklenip, 5 dk oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

3.3.2. DNA'nın niteliksel ve niceliksel analizi

Genomik DNA (gDNA)'nın atıklardan arındırılmış ve minimal degrede olması önemlidir ve gDNA'nın konsantrasyonunun ve saflığının değerlendirilmesi için NanoDrop ND-1000 UV-VIS spektrofotometresi kullanılmıştır.

- NanoDrop program menüsünden Nükleik asit ölçümü seçilip, örnek tipi DNA-50 olarak ayarlanmıştır.
- 1.5 µL distile su ve 1.5 µL elüsyon tamponu ile blank yapılmıştır.
- 1,5 µL hasta DNA'larından kullanılarak konsantrasyonları ölçülmüştür.
- Ürün miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ürün } (\mu\text{g}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng}/\mu\text{L}) \times \text{Örnek Hacmi}}{1000 \text{ ng}/\mu\text{g}}$$

3.3.3. DNA'nın enzimatik etiketleme kiti ile restriksiyon kesimi

Her bir PCR tüpüne dört hasta ve dört referans DNA örneklerinden 20,2 µL eklenmiştir. Tablo 3.1.'e göre restriksiyon kesim karışımı (RKK) hazırlanmıştır. Hasta ve referans DNA'larının olduğu tüplerin her birine 5.8 µL RKK eklenmiştir ve PCR cihazına yüklenmiştir. Uygulanan program tablo 3.2'de yer almaktadır.

Uygulanan PCR programı bittikten sonra her bir tüpün içerisine 5 µL Random Primeri pipetaj yapılarak eklenmiştir. Daha sonra PCR cihazında DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için tablo 3.3'deki program uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Restriksiyon Kesim Karışımı Bileşenleri

Bileşen	Reaksiyon (µL)	Başına 8 reaksiyonluk (µL)
Distile Su	2	18
10xRestriksiyon Enzim tamponu	2,6	23,4
BSA	0,2	1,8
Alu I	0,5	4,5
Rsa I	0,5	4,5
Son Hacim	5,8	52,2

Tablo 3.2. Restriksiyon kesimi için PCR programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37°C	2 saat
2	65 °C	20 dakika (dk)
3	4 °C	Beklet

Tablo 3.3. DNA denatürasyon ve fragmentasyonu için PCR programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	95 °C	3 dk
2	4 °C	Beklet

3.3.4. DNA örneklerinin flouresan işaretleme

Flouresan işaretleme için oluşturulan karışım (FİK) tablo 3.4.'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.4 : Flouresan işaretleme karışımı

Bileşen	Reaksiyon Başına (μL)	4 reaksiyonluk (μL)
5xReaksiyon Tamponu	10	50
10xdNTP	5	25
Cyanine 3-dUTP Cyanine 5-dUTP	3	15
Exo (-) Klenow	1	5
Son Hacim	19	95

Referans DNA'ların olduğu tüplere Cyanine 3-dUTP içeren, hasta DNA'larının olduğu tüplere ise Cyanine 5-dUTP içeren FİK karışımından 19 μL eklenmiştir. Daha sonra DNA etiketlemesi yapılması amacıyla tablo 3.5.'deki PCR programı uygulanmıştır.

Tablo 3.5.: DNA etiketlemesi için PCR programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37 °C	2 saat
2	65 °C	10 dk
3	4 °C	Beklet

3.3.5. Etiketlenmiş DNA'nın temizlenmesi

- Her bir hasta ve referans örneği için 1.5 µL'lik mikrofüj tüpleri etiketlenirilmiş ve içlerine filtre yerleştirilmiştir (Amicon ultra-0.5, ultracel-30 membran, 30kDa).
- Her bir DNA örneği 430 µL 1xTE ile pipetaj yapılarak içlerinde filtre bulunan tüplere aktarılmıştır.
- Tüpler 14,000xg'de, 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde kalan kısım atılmıştır.
- Her bir tüpe 480 µL 1xTE eklenmiştir ve tüpler 14,000xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Filtreler etiketlenirilmiş yeni mikrofüj tüplerinin içerisine ters çevrilerek yerleştirilmiştir ve 1 dk boyunca 1,000xg'de santrifüj edilmiştir.

3.3.6. Ürün miktarı ve spesifik aktivite hesaplanması

- Nanodrop Programında MikroArray, örnek tipi olarak da DNA-50 olarak seçilmiştir.
- Örneklerin ölçümü öncesi 1,5 µL distile su ve 1,5 µL 1xTE ile blank yapılmıştır.
- Örneklerden 1,5 µL kullanılarak gDNA konsantrasyonu ve hacmi ölçülmüştür.
- Spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik aktivite} \quad = \quad \frac{\mu\text{L boya başına pmol}}{\mu\text{L gDNA başına } \mu\text{g}}$$

(µg gDNA başına pmol boya)

- Ürün miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Ürün miktarı } (\mu\text{L}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{L)} \times \text{Örnek Hacmi } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng/}\mu\text{g}}$$

- Spesifik aktivite ve ürün miktarının beklenen değerleri tablo 3.6.'da yer almaktadır.

➤ Tek bir PCR tüpünde Cy3 ile etiketli referans örnekleri ile Cy5 ile etiketli gDNA örnekleri birleştirilmiştir.

Tablo 3.6.: Beklenen ürün miktarı ve spesifik aktivite değerleri

Giriş DNA	Ürün miktarı	Cy3 etiketli örneklerin spesifik aktivitesi	Cy5 etiketli örneklerin spesifik aktivitesi
0,2-0,5	2,5-3,0	15-25	15-20

3.3.7. Hibridizasyon öncesi hazırlık

Hibridizasyon karışımı hazırlanmadan önce oligo aCGH hibridizasyon kitinde bulunan 10x bloke edici ajana 1,350 µL distile su eklenmiştir ve oda sıcaklığında bir saat bekletilmiştir.

Hibridizasyon karışımı için tablo 3.7’de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.7.: Hibridizasyon karışımı

Bileşen	Hibridizasyon başına hacim (µL)	4 reaksiyonluk hacim (µL)
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL)	5	20
10x aCGH bloke edici ajan	11	55
2x HI-RPM hibridizasyon tamponu	55	275
Son hacim	71	350

Referans ve olgu örneklerinin bir arada olduğu karışımdan 39 µL alınarak yeni PCR tüpüne aktarılmıştır ve her bir tüpe hibridizasyon

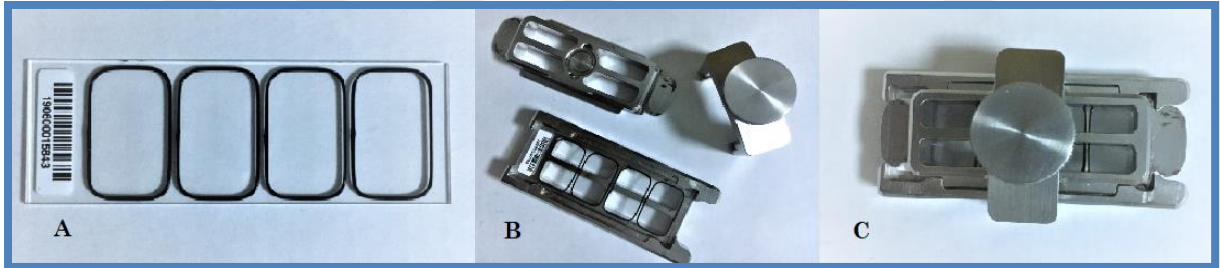
karışımından 71 μ L pipetaj yaparak eklenmiştir. Tablo 3.8’de belirtilen PCR programı uygulanmıştır.

Tablo 3.8: Hibridizasyon için PCR programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	3 dk
2	37°C	30 dk

3.3.8. Hibridizasyon

Hibridizasyon haznesine yerleştirilen contalı lam dört bölüme ayrılmıştır. Bu bölümlere “sürükle ve dağıt” metodu ile örnekler yayılmıştır. Array slaytının problemlerin bulunduğu kısmı aktif yüz olarak adlandırılır ve aktif yüz aşağı gelecek şekilde contalı lam üzerine yerleştirilmiştir. Bu esnada lamaların yüzeyine dokunmamaya dikkat edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2.: A) 4x180K mikroarray slaytı için contalı lam, B) Mikroarray slaytının contalı lam üzerine yerleştirilmesi, C) Hibridizasyon haznesinin sıkıştırılması

Lam haznesi 65°C’ye önceden ayarlanmış hibridizasyon fırınında bulunan rotator yuvasına yerleştirilmiştir. Denge için karşısına denk gelecek şekilde boş bir hazne daha yerleştirilmiştir. Rotator hızı 20 devir / dk’ ya ayarlanarak, 65°C’de 16-24 saat hibridizasyona bırakılmıştır.

3.3.9. Hibridizasyon sonrası yıkama için hazırlık

Yıkama işleminde kullanılacak tüm malzemeler asetonitril ile yıkanıp, distile su ile durulanmıştır.

Yıkama tamponu 2 bir gece önce 37°C’de ayarlı olan etüve bırakılmıştır.

Yıkama yapılmadan önce, cam tabak içerisine yıkama tamponu 1 array slaytının contalı lamdan çıkarılması için oda ısısında hazırlanmıştır.

Bir başka cam tabak içerisinde yıkama tamponu 1 oda sıcaklığında, yıkama tamponu 2 37°C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir.

3.3.10. Hibridizasyon sonrası yıkama

Hibridizasyon haznesinden çıkarılan slaytın yıkama tamponu 1 içerisinde contalı lamdan ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan yıkama tamponu 1 içerisinde yıkama plağı yardımıyla beş dk. bekletilmiştir. Beş dk. sürenin sonunda yıkama tamponu 2 bulunan cam tabak içerisine alınmış ve bir dk bekletilmiştir.

Mikroarray slaytı üzerine ozon bariyer lam kapağı kapatılarak lam tutucusuna uygun şekilde yerleştirilmiştir.

3.3.11. Mikroarray taratılması

Lam tutucusu tarayıcı cihazına yerleştirildikten sonra bilgisayardan “scan control” programı açılmıştır ve aşağıdaki ayarlar yapılmıştır.

- 4x180K mikroarray için Profile Agilent G3_CGH seçilmiştir.
- Slide ID <Auto Detect> olarak seçilmiştir.
- Channes R+G şeklinde seçilmiştir.
- Scan Rigion Agilent HD (61x21,6mm) olarak seçilmiştir.
- Resolution 3 µm şeklinde ayarlanmıştır.
- Tiff 16 bit seçilmiştir.
- R PMT ve D PMT %100'e ayarlanmıştır.
- İmaj dosyası için dosya seçimi yapılmıştır.
- Tarayıcı hazır uyarısı alındıktan sonra mikroarrayin yerleştirildiği yuva belirtilmiştir ve taramaya başlanmıştır.

3.3.12. İmaj dosyalarının analizi

Tarama işlemi tamamlandıktan sonra Feature Extraction 3.0.2.11 ve Agilent CytoGenomics 3.0.2.11 yazılımları imaj dosyasından veri elde etme ve log oranlarına dönüştürme için kullanılmıştır.

3.3.13. Array sonuçlarının yorumlanması

Mikroarray analizleri için aberasyon tespit metodu-2 (ADM2) kullanılmış olup, log2 değeri Agilent mozaik filtre ayarında önerildiği gibi 0,15 (>0,15 ise artış, < -0,15 ise kayıp) olarak kabul edilmiştir. En az 5 prob bağlanan bölgeler analize dahil edilmiştir.

Analizlere öncelikle yalancı pozitif olasılıkları elenmesi ile başlanmıştır.

Daha sonra array dağılım derecesi yüksek, log2 değeri 0,15 olan 3 anomali için konfirmasyon amaçlı FISH çalışması yapılmış (ZytoLight SPEC ERBB2/TOP2A/CEN17 Triple color probe, ZytoLight SPEC PTEN/CEN10, LSI D15S11/CEP15, Abbott) ve FISH sonuçlarının negatif çıkması sonucu daha önce del(13q) oranları bilinen, dağılım derecesi, log2 değeri ve delesyon yüzdesi düşük olan olgu 6'ya göre log2 değeri 0,19 olarak belirlenmiştir. Yeni filtreleme 0,19 log2 değeri ile yapılmıştır.

Sonrasında kopya sayısı değişikliklerinin saptandığı bölgelere yönelik veritabanlarında araştırmalar yapılmış ve bu bölgeler ile klinik bulgular arasında istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır.

En sık kullanılan veritabanları Varsome, OMIM, DGV, PubMed, Clinvar, COSMIC'dir.

3.3.14. İstatistiksel değerlendirme

Verilerin analizi IBM SPSS 21 programı ile yapılmıştır. Nicel değişkenlere ait belirtici istatistikler ortalama +/- standart sapma, nitel değişkenler ise frekans ve yüzde ile gösterilmiştir. Nitel değişkenler arasındaki ilişkiler ki kare analizleri ile değerlendirilmiş olup, tedaviye başlama sürelerine ait grafikler Kaplan-Meier yöntemi ile elde edilmiştir. tedaviye başlama sürelerine ait grup karşılaştırmalarında log-rank testi kullanılmıştır. Analizlerden elde edilen sonuçlarda $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

İzole 13q delesyonu saptanan olgulardaki klinik heterojenite ile kromozom 13 uzun kol delesyon büyüklüğünün ve kopya sayısı değişiklikleri (KSD)'in ilişkisini araştırmayı amaçladığımız çalışmamıza dahil edilen otuz iki KLL olgusu daha önce FISH yöntemi ile del(11q), del(17p), +12 ve del(13q) anomalileri açısından analiz edilmiş ve sadece izole del(13q) saptanan olgulardır. İki olgunun DNA kalitesi kötü olduğu için CGH+SNP array çalışmaları tamamlanamamış olup, bulgularımız otuz hasta verisine dayanmaktadır. Otuz olgunun on dördü kadın, on altısı erkek olup, yaş ortalamaları altmış dokuzdur (43-89, ±9)'dur. Çalışmaya dahil edilen otuz olgunun üçünün klinik bilgilerine ulaşamamıştır. Geriye kalan yirmi yedi olgunun on üçü tedavi almakta olup, tedavisiz izlem altında olan olgu sayımız on dördür. Olgularımız Rai evreleme sistemine göre sınıflandırılmış olup, evre 0, I ve II erken evre, III ve IV geç evre olarak kabul edilmiştir. Yirmi olgu erken evre grubunda yer alırken, yedi olgu geç evre grubunda sınıflandırılmıştır. Olgularımızın yaş, cinsiyet, genel sağkalım ve tedaviye başlama süreleri, hastalık evre bilgileri tablo 4.1.'de yer almaktadır.

Olgularımızı tedavi alıp almamalarına göre gruplandırdığımızda on dört olgunun tedavisiz izlem altında olduğu, on üç olgunun tedavi aldığı belirlenmiş olup, 3 olgunun klinik bilgilerine ulaşamamıştır. Yine olgularımızı tanı tarihinden itibaren 5 yıl içinde tedavi alıp almamalarına göre sınıflandırdığımızda 8 olgunun 5 yıl içinde tedavi almadığı, on üç hastanın 5 yıl içinde tedaviye başladığı ve 8 olgununda tanı tarihinden henüz 5 yıl geçmediği ancak tedavi almadıkları belirlenmiştir.

Tablo 4.1.: Olgulara ait yaş, cinsiyet, hastalık evresi, OS ve TTFT bilgileri

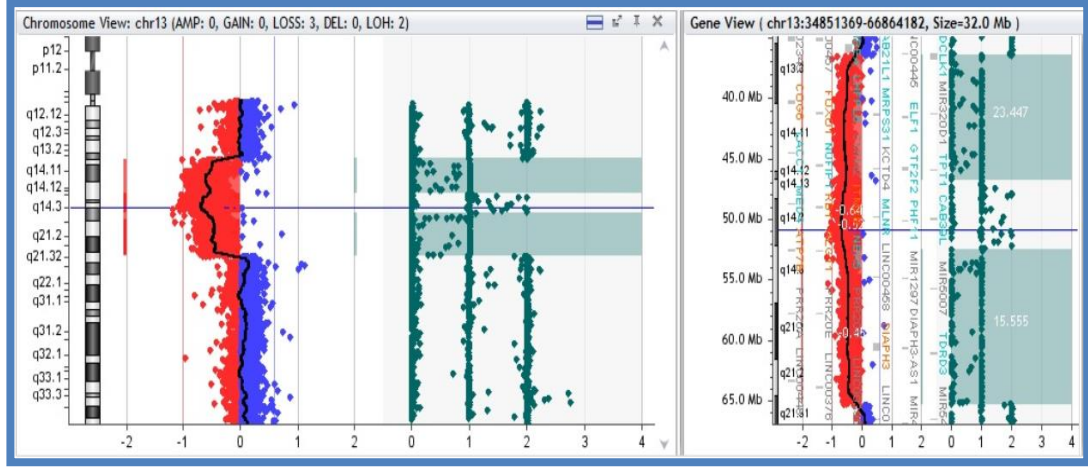
Olgu no	Yaş	Cinsiyet	Evre	OS (ay)	TTFT (ay)
1	63	E	II	73	Tİ
2	73	E	II	84	6
3	70	E	I	36	Tİ
4	71	E	II	94	33
5	81	E	-	-	-
6	77	E	III	20	16
7	82	E	III	64	TA
8	77	E	II	144 (ex)	20
9	80	K	I	108	Tİ
10	68	K	III	36	6
11	47	K	III	84	73
12	77	K	I	117	Tİ
13	69	K	I	26	Tİ
14	89	K	I	161	45
15	66	K	I	73	Tİ
16	70	K	III	34	30
17	67	E	II	21	Tİ
18	63	E	III	159	TA
19	67	K	III	15	TA

20	83	K	II	2	Tİ
21	74	K	II	33	Tİ
22	43	K	I	-	Tİ
23	64	E	0	67	Tİ
24	72	E	0	44	Tİ
25	58	E	0	28	Tİ
26	66	K	I	93	Tİ
27	61	E	II	176	Tİ
28	68	E	-	176	TA
29	82	E	0	19	Tİ
30	67	K	-	-	-

E: erkek, K: Kadın, OS: genel sağkalım, TTFT: tedaviye ilk başlama tarihi, - : bilinmiyor, Tİ: tedavisiz izlem, TA:tanı anında tedaviye başlama

4.1. 13q14'te saptanan kopya sayısı kayıpları

Çalışmaya dahil edilen otuz olgunun yirmi sekizinde del(13q) CGH+SNP array yöntemi ile gözlenmiş olup, geriye kalan iki olguda del(13q) saptanmamıştır. Kromozom 13'de gözlenen delesyon büyüklükleri 343.639kb ile 28,811.533kb arasında değişiklik göstermektedir. Delesyon 13q saptanan olguların tümünde 13q14 kromozom bölgesinde *DLEU2*, *TRIM13*, *KCNRG*, *miR-15a/16-1* ve *DLEU1* gen bölgelerinin kaybı gözlenmiştir (Şekil 4.1). *Retinoblastoma 1* gen kaybı ise on dört olguda saptanmıştır. Olgularımız *RB1* gen delesyonu açısından daha önce FISH ile incelenmiş olup, iki olguda FISH negatif sonuçlanmış iken aCGH'de *RB1* gen delesyonu saptanmıştır. Toplamda del(13q) açısından 4 olgunun FISH ve array çalışma sonucu uyumsuzluk göstermektedir.



Şekil 4.1.: Olgu 9'a ait del(13q) görüntüsü

Çalışmamız sonucunda 13q14 kromozom bölgesinde gözlenen kayıpların büyüklükleri ve içerdikleri gen bölgeleri tablo 4.2.'de yer almaktadır.

Tablo 4.2.: 13q14 kromozom bölgesi için CGH+SNP array sonuçları

Olgu No	Bölge	Büyüklük (kb)	Genler
1	13q14.2	439.896	<i>EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, CTAGE10P, MIR3613</i>
	13q14.2- q14.3	862.116	<i>DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1</i>
2	13q14.13- q21.1	9,339.703	<i>LRCH1, ESD, HTR2A, SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2, DHRS12, ATP7B, ALG11, UTP14C, NEK5, NEK3, THSD1, VPS36, CKAP2, SUGT1, CNMD, PCDH8, OLFM4, RUBCNL, LINC01198, HTR2A-AS1, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-S1, C13orf42, FAM124A, SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703, TMEM272, CCDC70, LOC101929657, MRPS31P5, LINC02333, TPTE2P3, HNRNPA1L2, MIR759, LINC01065, LINC00558, LINC00458, MIR1297, MIR5007</i>

3

13q13.1-
q14.3

20,486.027

FRY, BRCA2, N4BP2L2, PDS5B, KL, STARD13, RFC3, NBEA, MAB21L1, DCLK1, SOHLH2, SPART, CCNA1, RFXAP, SMAD9, ALG5, EXOSC8, SUPT20H, POSTN, TRPC4, UFM1, FREM2, STOML3, LHFPL6, COG6, FOXO1, MRPS31, SLC25A15, ELF1, WBP4, KBTBD6, KBTBD7, MTRF1, RGCC, VWA8, DGKH, AKAP11, TNFSF11, EPSTI1, DNAJC15, ENOX1, CCDC122, LACC1, TSC22D1, NUFIP1, GTF2F2, TPT1, SLC25A30, COG3, SIAH3, ZC3H13, CPB2, LCP1, LRCH1, ESD, HTR2A, SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2, DHRS12, ATP7B, ALG11, UTP14C, NEK5, NEK3, THSD1, VPS36, CKAP2, SUGT1, CNMD, ZAR1L, N4BP2L1, MINOS1P1, N4BP2L2-IT2, LINC00423, STARD13-AS, LINC02344, LINC02343, LINC00457, LINC00445, CCDC169-SOHLH2, CCDC169, SPART-AS1, SERTM1, CSNK1A1L, LINC01048, LINC00547, LINC00571, LINC00437, LINC00366, FREM2-AS1, PROSER1, NHLRC3, MIR4305, LINC00332, LINC00548, LINC00598, MIR320D1, TPTE2P5, MIR621, SUGT1P3, MIR3168, LOC101929140, NAA16, OR7E37P, MIR5006, VWA8-AS1, LINC02341, FAM216B, LINC01050, LINC00428, LINC00400, ENOX1-AS2, LINC00284, LINC00390, SMIM2-AS1, SMIM2, SMIM2-IT1, MIR8079, SERP2, TUSC8, TSC22D1-AS1, LINC00407, LINC00330, GPALPP1, LOC101929259, KCTD4, SNORA31B, SNORA31, TPT1-AS1, SLC25A30-AS1, ERICH6B, LINC01055, SPERT, CPB2-AS1, LRRC63, LINC00563, RUBCNL, LINC01198, HTR2A-AS1, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A, SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703, TMEM272, CCDC70,

			<i>LOC101929657, MRPS31P5, LINC02333, TPTE2P3, HNRNPA1L2</i>
4	q14.2- q14.3	994.565	<i>DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, -AS1, RNASEH2B</i>
5	q14.2-	2,173.258	<i>MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, TDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4</i>
6	q14.2- 14.3	2,829.771	<i>RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, AB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42</i>
7	q14.2- q14.3	2,453.59	<i>SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4</i>
8	q14.13- q21.2	14,314.538	<i>LCPI1, LRCH1, ESD, HTR2A, SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2, DHRS12, ATP7B, ALG11, UTP14C, NEK5, NEK3, THSD1, VPS36, CKAP2, SUGT1, CNMD, PCDH8, OLFM4, PCDH17, DIAPH3, TDRD3, LRRC63, LINC00563, RUBCNL, LINC01198, HTR2A-AS1, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A,</i>

			<p><i>SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703, TMEM272, CCDC70, LOC101929657, MRPS31P5, LINC02333, TPTE2P3, HNRNPA1L2, MIR759, LINC01065, LINC00558, LINC00458, MIR1297, MIR5007, PRR20A, PRR20E, PRR20D, PRR20C, PRR20B, LINC02338, LINC00374, DIAPH3-AS1, DIAPH3-AS2, LINC00434</i></p>
9	q13.3-q21.31	28,811.533	<p><i>DCLK1, SOHLH2, SPART, CCNA1, RFXAP, SMAD9, ALG5, EXOSC8, SUPT20H, POSTN, TRPC4, UFM1, FREM2, STOML3, LHFPL6, COG6, FOXO1, MRPS31, SLC25A15, ELF1, WBP4, KBTBD6, KBTBD7, MTRF1, RGCC, VWA8, DGKH, AKAP11, TNFSF11, EPSTI1, DNAJC15, ENOX1, CCDC122, LACC1, TSC22D1, NUFIP1, GTF2F2, TPT1, SLC25A30, COG3, SIAH3, ZC3H13, CPB2, LCP1, LRCH1, ESD, HTR2A, SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNKG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2, DHRS12, ATP7B, ALG11, UTP14C, NEK5, NEK3, THSD1, VPS36, CKAP2, SUGT1, CNMD, PCDH8, OLFM4, PCDH17, DIAPH3, TDRD3, PCDH20, CCDC169-SOHLH2, CCDC169, SPART-AS1, SERTM1, CSNK1A1L, LINC01048, LINC00547, LINC00571, LINC00437, LINC00366, FREM2-AS1, PROSER1, NHLRC3, MIR4305, LINC00332, LINC00548, LINC00598, MIR320D1, TPTE2P5, MIR621, SUGT1P3, MIR3168, LOC101929140, NAA16, OR7E37P, MIR5006, VWA8-AS1, LINC02341, FAM216B, LINC01050, LINC00428, LINC00400, ENOX1-AS2, LINC00284, LINC00390, SMIM2-AS1, SMIM2, SMIM2-IT1, MIR8079, SERP2, TUSC8, TSC22D1-AS1, LINC00407, LINC00330, GPALPP1, LOC101929259, KCTD4, SNORA31B, SNORA31, TPT1-AS1, SLC25A30-AS1, ERICH6B, LINC01055, SPERT, CPB2-AS1, LRRC63, LINC00563, RUBCNL, LINC01198, HTR2A-AS1, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203,</i></p>

			<i>CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A, SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703, TMEM272, CCDC70, LOC101929657, MRPS31P5, LINC02333, TPTE2P3, HNRNPA1L2, MIR759, LINC01065, LINC00558, LINC00458, MIR1297, MIR5007, PRR20A, PRR20E, PRR20D, PRR20C, PRR20B, LINC02338, LINC00374, DIAPH3-AS1, DIAPH3-AS2, LINC00434, LINC00378, MIR3169, LINC02339, LINC00358, LINC01075, LINC01074, LINC00459, LINC00448, LINC00376, LINC00395, OR7E156P, LOC102723968, LINC00355</i>
10	q14.2- q14.3	915.021	<i>DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1</i>
11	q14.2- 14.3	1,041.713	<i>SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, -AS1, RNASEH2B</i>
12	q14.2- q14.3	3,300.588	<i>SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A</i>
13	q14.2- q14.3	1,598.398	<i>RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42</i>
14	q14.2- q14.3	1,125.486	<i>DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42</i>
15	q14.2- 14.3	952.933	<i>SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1</i>

16	q14.2-14.3	1,931.342	<p><i>FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42</i></p>
17	q14.11-q21.33	27,930.146	<p><i>ELF1, WBP4, KBTBD6, KBTBD7, MTRF1, RGCC, VWA8, DGKH, AKAP11, TNFSF11, EPSTI1, DNAJC15, ENOX1, CCDC122, LACC1, TSC22D1, NUFIP1, GTF2F2, TPT1, SLC25A30, COG3, SIAH3, ZC3H13, CPB2, LCP1, LRCH1, ESD, HTR2A, SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2, DHRS12, ATP7B, ALG11, UTP14C, NEK5, NEK3, THSD1, VPS36, CKAP2, SUGT1, CNMD, PCDH8, OLFM4, PCDH17, DIAPH3, TDRD3, PCDH20, PCDH9, TPTE2P5, SUGT1P3, MIR3168, LOC101929140, NAA16, OR7E37P, MIR5006, VWA8-AS1, LINC02341, FAM216B, LINC01050, LINC00428, LINC00400, ENOX1-AS2, LINC00284, LINC00390, SMIM2-AS1, SMIM2, SMIM2-IT1, MIR8079, SERP2, TUSC8, SC22D1-AS1, LINC00407, LINC00330, GPALPP1, LOC101929259, KCTD4, SNORA31B, SNORA31, TPT1-AS1, SLC25A30-AS1, ERICH6B, LINC01055, SPERT, CPB2-AS1, LRRC63, LINC00563, RUBCNL, LINC01198, HTR2A-AS1, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A, SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703, TMEM272, CCDC70, LOC101929657, MRPS31P5, LINC02333, TPTE2P3, HNRNPA1L2, MIR759, LINC01065, LINC00558, LINC00458, MIR1297, MIR5007, PRR20A, PRR20E, PRR20D, PRR20C, PRR20B, LINC02338, LINC00374, DIAPH3-AS1, DIAPH3-AS2, LINC00434, LINC00378,</i></p>

			<i>MIR3169, LINC02339, LINC00358, LINC01075, LINC01074, LINC00459, LINC00448, LINC00376, LINC00395, OR7E156P, LOC102723968, LINC00355, LINC01052, MIR548X2, MIR4704, PCDH9-AS2, PCDH9-AS3, PCDH9-AS4, LINC00364</i>
18	q14.2- q14.3	3,847.678	<i>SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2, DHRS12, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A, SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703</i>
19	q14.2- q14.3	343.639	<i>DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, ST13P4</i>
	q14.3	256.781	<i>DLEU7, DLEU-7AS1, RNASEH2B-AS1</i>
20	q14.2- q14.3	4,552.855	<i>SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2, DHRS12, ATP7B, ALG11, UTP14C, NEK5, NEK3, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A, SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703, TMEM272, CCDC70, LOC101929657, MRPS31P5, LINC02333</i>
21	13q14.2- q14.3	3,195.397	<i>SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, LEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1,</i>

			<i>C13orf42</i>
22	q14.2- q14.3	954.328	<i>DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, -AS1, RNASEH2B</i>
23	q14.2- q14.3	1,235.833	<i>SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1</i>
24	q13.3- 14.3	14,104.779	<i>LHFPL6, COG6, FOXO1, MRPS31, SLC25A15, ELF1, WBP4, KBTBD6, KBTBD7, MTRF1, RGCC, VWA8, DGKH, AKAP11, TNFSF11, EPST11, DNAJC15, ENOX1, CCDC122, LACC1, TSC22D1, NUFIP1, GTF2F2, TPT1, SLC25A30, COG3, SIAH3, ZC3H13, CPB2, LCP1, LRCH1, ESD, HTR2A, SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2, DHRS12, ATP7B, ALG11, UTP14C, NEK5, NEK3, THSD1, VPS36, CKAP2, SUGT1, CNMD, PCDH8, OLFM4, MIR4305, LINC00332, LINC00548, LINC00598, MIR320D1, TPTE2P5, MIR621, SUGT1P3, MIR3168, LOC101929140, NAA16, OR7E37P, MIR5006, VWA8-AS1, LINC02341, FAM216B, LINC01050, LINC00428, LINC00400, ENOX1-AS2, LINC00284, LINC00390, SMIM2-AS1, SMIM2, SMIM2-IT1, MIR8079, SERP2, TUSC8, TSC22D1-AS1, LINC00407, LINC00330, GPALPP1, LOC101929259, KCTD4, SNORA31B, SNORA31, TPT1-AS1, SLC25A30-AS1, ERICH6B, LINC01055, SPERT, CPB2-AS1, LRRC63, LINC00563, RUBCNL, LINC01198, HTR2A-AS1, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2, PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A, SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703, TMEM272, CCDC70, LOC101929657, MRPS31P5, LINC02333, TPTE2P3,</i>

			<i>HNRNPA1L2, MIR759, LINC01065</i>
25	q14.2- q14.3	1,041.713	<i>SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, -AS1, RNASEH2B</i>
26	q14.2- q14.3	1,071.725	<i>SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, -AS1, RNASEH2B</i>
27	q14.2- q14.3	4,977.463	<i>LRCH1, ESD, HTR2A, SUCLA2, NUDT15, MED4, ITM2B, RB1, LPAR6, RCBTB2, CYSLTR2, FNDC3A, MLNR, CAB39L, SETDB2, PHF11, RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, INTS6, WDFY2 HTR2A-AS1, LINC00562, MED4-AS1, LINC00441, LINC00462, LOC105370203, CDADC1, SETDB2-PHF11, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1, C13orf42, FAM124A, SERPINE3, MIR5693, INTS6-AS1, MIR4703</i>
28	q14.2- q14.3	1,382.264	<i>EBPL, KPNA3, SPRYD7, DLEU2, TRIM13, KCNRG, MIR16-1, MIR15A, DLEU1, RNASEH2B, GUCY1B2, CTAGE10P, MIR3613, ST13P4, DLEU1-AS1, DLEU7, DLEU7-AS1, RNASEH2B-AS1</i>

Delesyon 13q büyüklüklerine göre sınıflandırma yaptığımızda 2 Mb'dan büyük delesyonlar sınıf 2, 2 Mb'dan küçük delesyonlar sınıf 1 olarak tanımlanmıştır. Sonuçlarımıza göre olgularımızın 14'ünde sınıf 2 13q delesyonu saptanmıştır ve bu olgularında *RB1* genini içeren tip 2 delesyonlu olgular olduğu gözlenmiştir.

Kromozom 13q delesyon büyüklüğü (>2 mb) ile olguların evre, tedaviye başlama durumları ve 5 yıllık izlem sonuçları arasında istatistiksel olarak bir ilişki bulunmamıştır. Ayrıca delesyon büyüklüğü ile TTFT arasında da bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$) (şekil 4.2). Tablo 4.3.'de *RB1* gen delesyonu saptanan (>2 Mb del(13q)) olgu sayıları ve klinik bilgileri ile arasındaki ilişki yer almaktadır.

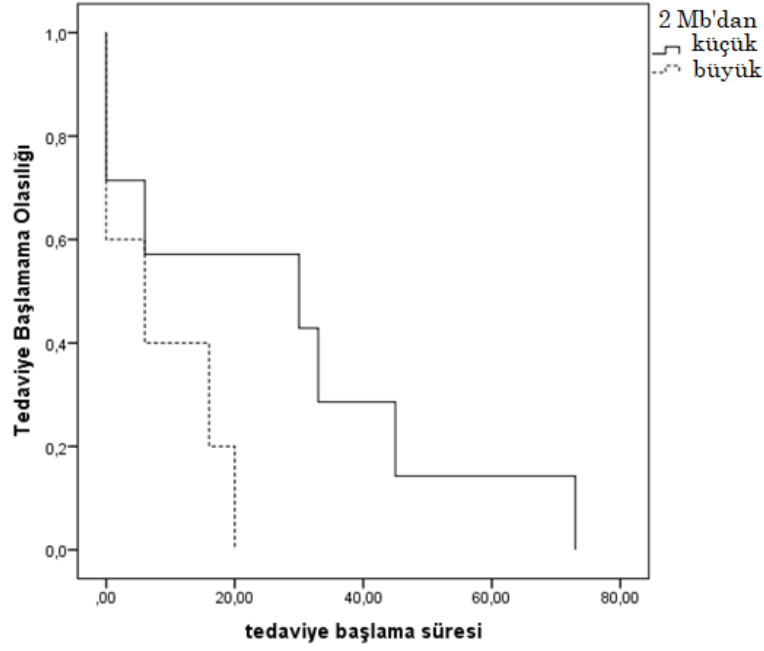
Çalışmamız sonucunda 13q14 delesyonlarının oldukça heterojen olduğu gözlenmektedir. Delesyon 13q14 bölgesinde lokalize olan delesyon saptanan

bazı genler; *ARL11* (16/28), *SETDB2* (15/28), *RCBTB1* (16/28), *DLEU7* (25/28)'dir. Bu gen delesyonları ile hastalık evresi, olguların tedavi alıp almaması, 5 yıl tedavisiz izlem altında olup olmaması ve TTFT arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.3.: *RB1* gen delesyonu sıklığı ve klinik bilgileri ile aralarındaki ilişki

	RB1 del. Pozitif (n / %)	RB1 del. Negatif (n / %)	p değeri
Tedavi alıp almama durumu			
Tedavi alan	5 (38,5)	7 (50)	>0,05
Tedavi almayan	8 (61,5)	7 (50)	
5 yıl içinde tedavi alıp almama durumu			
5 yıldır tedavisiz izlem	3 (23,1)	5 (38,5)	>0,05
5 içinde tedaviye başlayan	5 (38,5)	6 (46,2)	
5 yıldan az tedavisiz izlem	5 (38,5)	2 (15,4)	
Hastalık evresi			
Erken evre	10 (76,9)	9 (69,2)	>0,05
Geç evre	3 (23,1)	4 (30,8)	

- (Bazı klinik bilgilere ulaşlamamıştır).



Şekil 4.2: del(13q) büyüklüğü ve TFFT arasındaki ilişki

4.2. Diğer KSD ve LOH bulguları

Çalışmamızın sonuçları Agilent Teknolojileri firmasının %20 mozaik anomalilerin saptanması için belirttiği 0,15 log2 değerine göre analiz edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda toplamda beş bin iki yüz yirmi altı gen içeren yedi yüz altmış yedi kromozom bölgesinde KSD tespit edilmiştir. Tespit edilen anomalilerin yalnız pozitif olasılığını dışlamak için log2 değeri 0,15 ile tespit edilen 2 anomaliye yönelik FISH çalışması yapılmıştır (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4.: Log2 değeri 0,15 ile filtreleme sonucunda pozitif gözlenen anomalilere yönelik FISH çalışma sonuçları

Olgu no	Anomali saptanan bölge	Anomali	Log2 değeri	DLRSD	FISH sonucu
1	17q12-q21	Kayıp	-0,15	0,20	Negatif
24	10q23	Kayıp	-0,16	0,24	Negatif
24	15q11.2-q13.1	Artış	0,16	0,24	Negatif

Yapılan FISH çalışması sonucunda negatif sonuçlar elde edilmesi sebebiyle del(13q) olduğu bilinen olgular için en düşük log2 değeri 0,19 olan değer (olgu 6, tablo 5.2) kabul edilmiştir ve tekrar veriler analiz edilmiştir. Yeni log2 değeri ile KSD tespit edilen kromozom bölgesi iki yüz altmış iki adettir.

Çalışmamız sonucunda 1 olguda (olgu 14) del(13q)'nun izole olduğu saptanmış olup geriye kalan olgulardan 1 tanesinde del(13q14) dışında 1 kromozom bölgesinde, 4 olguda 2 kromozom bölgesinde KSD eşlik ederken, diğerlerine en az 3 anomali eşlik etmekteydi. En fazla KSD olgu 7'de saptanmış olup, altmış bir adet olduğu gözlenmiştir. En az iki olguda saptanan KSD ve LOH bilgileri tablo 4.5'de yer almaktadır.

Tablo 4.5.: Ortak KSD ve LOH saptanan bölgeler ve içerdikleri OMIM veritabanında tanımlı genler

Kromozom	Bölge	Anomali	Genler (En az iki olguda tekrarlayan)	Olgu sayısı
1	p31.3	artış	<i>JAK1</i>	2
1	p32.3	kayıp	<i>FAF1, CDKN2C, RNF11, EPS15, OSBPL9, NRDC, RAB3B, TXNDC12, ZFYVE9, ORC1, PRPF38A, ZCCHC11, GPX7, COA7, SCP2</i>	2
1	q32.3	kayıp	<i>SLC30A1, NEK2, LPGAT1, INTS7, DTL, PPP2R5A, NENF, ATF3, BATF3, NSL1, FLVCR1-AS1, FLVCR1, VASH2, RPS6KC1</i>	4
1	q42.2-q43.1	kayıp	<i>COA6, TARBP1, IRF2BP2, TOMM20, ARID4B, GGPS1, TBCE, B3GALNT2, GNG4, LYST, NID1, GPR137B, ERO1B</i>	4
2	2p12-p11.2 g	artış	<i>LRRTM4, REG3G, REG1B, REG1A, REG3A, CTNNA2, LRRTM1</i>	4
2	q14.3.1	kayıp	<i>MAP3K2, PROC, MYO7B, LIMS2, GPR17, POLR2D, SAP130, UGGT1, HS6ST1</i>	4

3	p25.1 g	artış	<i>TMEM43, XPC</i>	2
3	q22.1- q23	LOH	<i>CPNE4, ACPP, DNAJC13, ACAD11, ACKR4, UBA5, NPHP3, TMEM108, BFSP2, TOPBP1, TF, SRPRB, RAB6B, SLCO2A1, RYK, AMOTL2, ANAPC13, CEP63, KY, EPHB1, PPP2R3A, MSL2, PCCB, STAG1, SLC35G2, NCK1, IL20RB, SOX14, CLDN18, DZIP1L, A4GNT, DBR1, MRAS, ESYT3, CEP70, FAIM, PIK3CB, FOXL2, MRPS22, COPB2, RBP2, RBP1, NMNAT3, CLSTN2, SLC25A36, SPSB4, ZBTB38, RASA2, RNF7, GRK7, ATP1B3, TFDP2</i>	2
3	3q29.1	kayıp	<i>PPP1R2, APOD, MIR570, MUC20, MUC4, TNK2, TFRC, SLC51A, PCYT1A, TCTEX1D2, UBXN7, RNF168, WDR53, FBXO45, NRROS, CEP19, PIGX, PAK2, SENP5, NCBP2, PIGZ</i>	5
4	p13-p12	artış	<i>GUF1, GNPDA2, GABRG1, GABRA2,</i>	2
6	6q25-q27	LOH	<i>SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, LPAL2, LPA, PLG, MAP3K4, AGPAT4, PRKN, PACRG, CAHM, QKI</i>	2
7	q11.2- q11.22 l	kayıp	<i>TPST1, KCTD7, RABGEF1, SBDS, TYW1</i>	2
7	q11.23 g	artış	<i>ELN</i>	6
8	q11.21	LOH	<i>SNTG1, PXDNL, ST18,</i>	2
8	q24.22- q24.3 g	artış	<i>EFR3A, OC90, HHLA1, KCNQ3, LRRC6, TG, SLA, PTCSC1, WISP1, NDRG1, ST3GAL1, ZFAT, KHDRBS3, COL22A1,</i>	3
8	q24.3 g	artış	<i>RECQL4</i>	2
9	q34.3	artış	<i>NOTCH1</i>	13

10	10q25.1- q25.2	Kayıp / LOH	<i>SORCS1, XPNPEP1, ADD3, MXI1, SMNDC1, DUSP5, SMC3, RBM20, PDCD4, BBIP1, SHOC2, ADRA2A, GPAM, TECTB, ACSL5, VTI1A, TCF7L2</i>	3
11	p15.4	Kayıp / LOH	<i>ST5, AKIP1, ASCL3, NRIP3, SCUBE2, DENND5A, IPO7, ZNF143, WEE1, SWAP70, SBF2, ADM</i>	5
11	q13.1	artış	<i>MEN1</i>	3
11	q14.1- q14.2	kayıp	<i>DLG2, TMEM126B, TMEM126A, CREBZF, SYTL2, PICALM</i>	3
11	q23.3	LOH	<i>CASP12, CASP4, CASP5, CASP1, CARD16, CARD17, CARD18, GRIA4,</i>	2
11	q23.2	artış	<i>ZBTB16</i>	3
12	p11.21	kayıp	<i>DDX11, SINHCAF, DENND5B, ETFBKMT, H3F3C, BICD1</i>	5
13	q31.1- q31.3	artış	<i>SLITRK1, SLITRK6, SLITRK5</i>	3
13	q33.1- q33.2	artış	<i>DAOA-AS1, DAOA</i>	2
13	q14.4- q21.33	artış	<i>PCDH17, DIAPH3, TDRD3, PCDH20, PCDH9, KLHL1, ATXN8OS</i>	2
14	q13.1- q13.3	kayıp	<i>SPTSSA, EAPP, SNX6, CFL2, BAZ1A, SRP54, PPP2R3C, KIAA0391, PSMA6, NFKBIA, INSM2, RALGAPA1, PTSC3</i>	7
14	q21.3- q22.1	kayıp	<i>KLHDC1, KLHDC2, NEMF, RN7SL3, ARF6, VCPKMT, SOS2, L2HGDH, CDKL1, MAP4K5, ATL1, SAV1, NIN</i>	2
14	q32.12	kayıp	<i>TRIP11</i>	2

15	q15.1	kayıp	<i>BUB1B, PAK6, PLCB2, DISP2, KNSTRN, IVD, BAHD1, CHST14, KNL1</i>	2
16	p13.3	artış	<i>SLC9A3R2, NTHL1, TSC2</i>	8
16	p13.13	kayıp	<i>TNP2, PRM2, PRM1, RMI2, LITAF, SNN, TXNDC11, BCAR4, RSL1D1, GSPT1, TNFRSF17</i>	3
16	q23.1- q23.2	artış	<i>WVOX, MAF</i>	2
17	q11.2	kayıp	<i>NUFIP2, TAOK1, GIT1, ANKRD13B, SSH2, NSRP1, SLC6A4, BLMH, CPD, GOSR1, CRLF3, ATAD5, TEFM, ADAP2, RNF135, NF1</i>	2
17	q21.33	artış	<i>COL1A1</i>	10
18	p11.32- p11.31	kayıp	<i>NDC80, SMCHD1, EMILIN2, LPIN2, MYOM1, MYL12B, TGIF1, DLGAP1</i>	2
18	q12.1- q12.3	LOH	<i>KLHL14, ASXL3, NOLA4, DTNA, MAPRE2, ZNF397, ZNF271P, ZNF24, ZNF396, GALNT1, MIR187, RPRD1A, SLC39A6, ELP2, MOCOS, FHOD3</i>	2
19	p13.3	artış	<i>CNN2, ABCA7, ARHGAP45, POLR2E, GPX4, SBNO2, STK11, ATP5F1D, MIDN, CIRBP, EFNA2</i>	3
19	p13.2	artış	<i>NFIX, LYL1, TRMT1</i>	3
19	p13.12	artış	<i>BRD4</i>	3
19	q13.2	artış	<i>CIC, PAFAH1B3</i>	4
19	q13.32	artış	<i>KLC3, ERCC2</i>	2
X	p22.33- p22.31	artış	<i>PLCXD1, GTPBP6, PPP2R3B, SHOX, CRLF2, CSF2RA, IL3RA, SLC25A6, ASMTL, P2RY8, AKAP17A, ASMT</i>	3

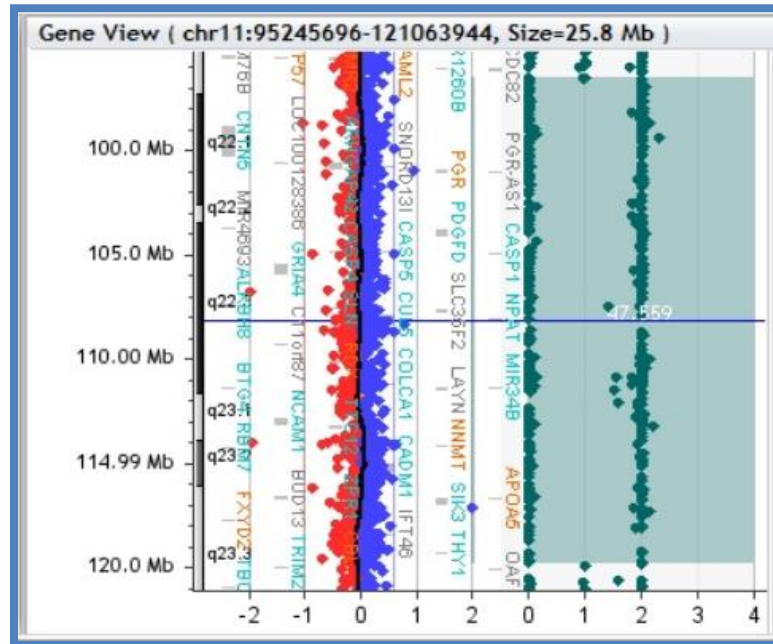
Olgu sayımızın ve tespit edilen anomalilerin sayısının az olması sebebiyle sağlıklı istatistiksel sonuçlar elde etmek amacıyla daha fazla olguda tespit edilen anomaliler için istatistiksel analizler yapılmıştır.

Kromozom 9 uzun kolunda saptanan (9q34.3) kopya sayısı artışı on üç olguda, 14q13.1-14q13.3 kromozom bölgesindeki kayıp 7 olguda gözlenmiş olup, 17q21.33 kromozom bölgesindeki artış 10 olguda tespit edilmiştir. Her üç KSD'nin de hastalık evresi, tedavi alıp almaması, 5 yıllık tedavisiz izlemde olup olmaması ve TTFT ile aralarında istatistiksel açıdan bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamız sonucunda 8 olguda tespit edilen 16p13.3 kromozom bölgesindeki kopya sayısı artışı sadece ileri hastalık evresi ile ilişkili bulunmuştur ($p<0,05$).

Ayrıca çalışmamız sonucunda olgu 6'da 11q22 bölgesinde *BIRC3* ve *BIRC2* genlerini içeren delesyon saptanmıştır.

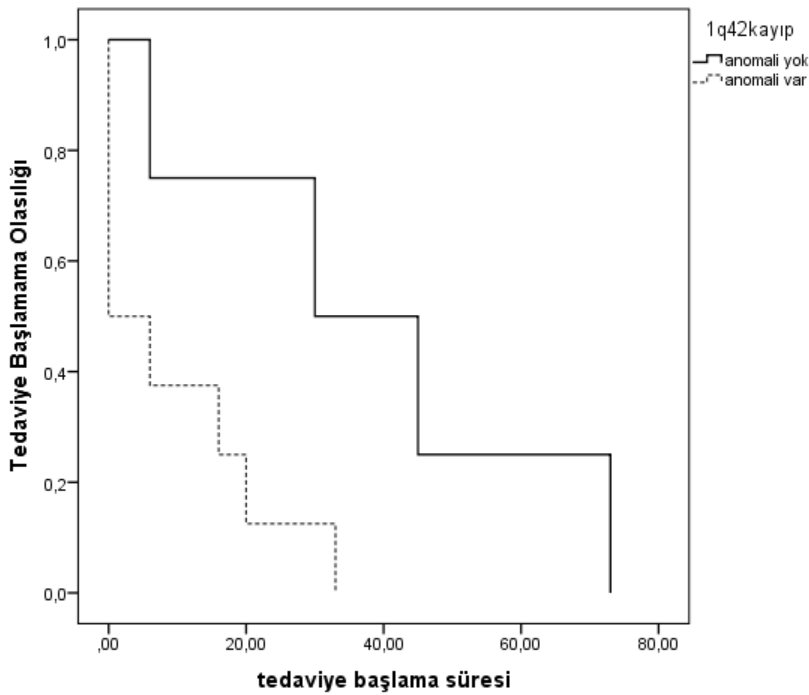
Tüm bunlara ek olarak çalışmamız sonucunda elde edilen verilere göre daha önce FISH yöntemi ile kopya sayısı değişikliği saptanmayan *ATM* gen bölgesinde kopya sayısı değişikliği olmaksızın bir olguda (olgu 19), LOH saptanmıştır (Şekil 4.2.).



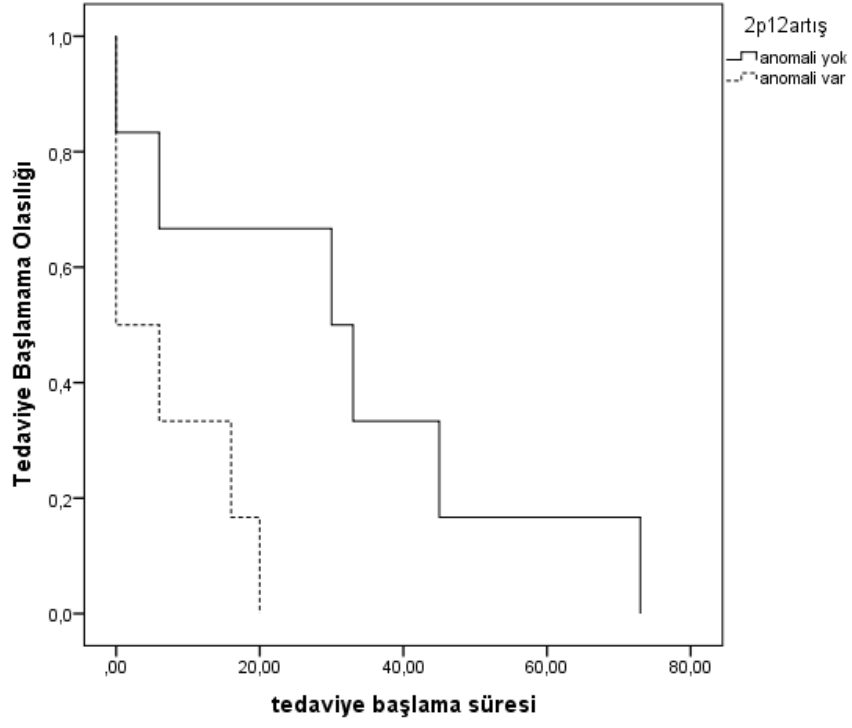
Şekil 4.3: Olgu 19'a ait kromozom 11'de saptanan LOH görüntüsü

Çalışmamızda daha önce belirtildiği gibi (bölüm 3.3.13) log2 değeri 0,15 olarak kabul edilmiştir. Bu log2 değeri ile yapılan analiz sonucunda 1q42.2-1q42.3 kromozom bölgesindeki kayıplar olgularımızın 9/30'unda (%30) saptanmış olup, ileri evre, tedavi alma, 5 yıl içinde tedavi alma ve kısa TTFT ile ilişkili bulunmuştur (p=0,01, p=0,004, p=0,001, p=0,04) (Şekil 4.2.). Log 2 değeri 0,19 olarak kabul edilip, yapılan filtreleme sonucunda 1q42.2-1q42.3 kromozom bölgesindeki kayıp 4 olgu da (olgu 4, 6, 7, 8) gözlenmiştir.

Log2 değeri 0.15 olarak kabul edilip yapılan filtreleme sonucunda 2p12-2p11.2 kromozom bölgesindeki kopya sayısı artışı 13/30 (%43,3) olguda saptanmış ve kısa TTFT ile ilişkili bulunmuşken (p=0,027) (şekil 4.3), log2 değeri 0,19 olarak kabul edildiğinde 4 olguda tespit edilmiştir (olgu 1, 3, 7, 18).



Şekil 4.4.: 1q42.2-q42.3 kopya sayısı kaybı ile TTFT arasındaki ilişki



Şekil 4.5.: 2p12-2p11.2 kopya sayısı artışı ile TTFT arasındaki ilişki

5. TARTIŞMA

İzole del(13q) KLL olgularında 13q14 delesyon büyüklüğünün ve genomdaki diğer kopya sayısı değişiklikleri (KSD)'nin etkisini araştırmayı amaçladığımız çalışmamız sonucunda log2 değeri 0,19 olarak yapılan filtreleme sonucu elde edilen bulgular bu bölümde tartışılacaktır. Ayrıca log2 değeri birbirinden farklı iki filtreleme sonucunda elde edilen veriler daha sonra bölüm 5.4.'de tartışılacaktır.

Kopya sayısı değişiklikleri FISH yöntemi ile KLL olgularının yaklaşık %80'inde saptanmaktadır. Bu yöntem ile belirli hedeflere bakılabilmekte olup, rutinde KLL olguları del(11q), del(17p), +12 ve del(13q) anomalileri açısından FISH yöntemi ile değerlendirilmektedir. Bu anomalilerin prognostik önemleri olup, del(11q) ve del(17p) kötü prognostik, izole del(13q) iyi prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir. Kromozomal kopya sayısı değişikliklerinin KLL'de sık gözlenmesi sebebiyle array yönteminin KLL olguları için uygun bir yöntem olduğu yapılan çalışmalarda savunulmaktadır (O'Malley et al., 2011).

5.1. Del(13q) saptama oranları

Çalışmamıza FISH ile izole del(13q) saptanan otuz iki olgu dahil edilmiştir. Ancak 2 olgumuzun DNA kalitesinin kötü olması sebebiyle array çalışması tamamlanamamıştır. Literatürde de belirtildiği gibi optimum sonuçlar için degrade olmamış DNA gerekmektedir (Higgins, 2008). Çalışmamızdaki bu 2 olgunun periferik kan örneklerinin uzun süre -20°C'de beklemiş olması nedeniyle DNA kalitesinin olumsuz etkilenmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Array çalışması yapılmadan önce tümör yükünün en az %25-30 olması gerektiği ve array çalışmalarının sensitivitesinin anomalili klonun büyüklüğüne bağlı olduğu belirtilmektedir. Array teknolojisi ile yapılan çalışmalarda anomalinin saptanması için anomali oranının en az %25-30 olması gerektiği de ayrıca belirtilmektedir (Sargent et al., 2009; Setlur et al., 2010). Array çalışması yaptığımız otuz izole del(13q) olgunun 28'inde array ile del(13q) saptanmıştır. Daha önce yapılan FISH çalışması sonuçlarına

baktığımızda array ile del(13q) saptanmayan iki olgunun del(13q) oranları%9,9 ve %10'dur (olgu 29, 30). Bu oranlar arrayin anomaliyi saptayabilmesi için gereken orandan çok daha düşüktür. Literatürde de FISH ile aCGH sonuçlarının uyumsuz olduğu olgular raporlanmıştır ve bunların büyük bir kısmının del(13q) ilişkili olduğu bildirilmiştir. Delesyon 13q ile ilgili FISH ve aCGH uyumsuzluk gösterdiği çalışmalar tablo 5.1.'de yer almaktadır.

Tablo 5.1: del(13q) ilişkili FISH ve aCGH sonuçlarının uyumsuzluk gösterdiği çalışmalar

			FISH	Array	Araştırmacılar
FISH ve aCGH ile uyumsuz sonuç gösteren olgu sayısı	6	pozitif	-	7	O'Malley ve ark. (O'Malley et al., 2011)
		negatif	3	-	
	4	pozitif	3	-	Tyybakinoja ve ark. (Tyybakinoja, Vilpo, & Knuutila, 2007)
		negatif	-	1	
	5	pozitif	3	-	Patel ve ark. (Patel et al., 2008)
		negatif	-	2	
	3	pozitif	3	-	Kay ve ark. (Kay et al., 2010)
	1	pozitif	1	-	Hagenkord ve ark. (Hagenkord et al., 2010)
	4	pozitif	4	-	Dal Bo ve ark. (Dal Bo et al., 2011)
2	pozitif	2	-	Bizim çalışmamız	

Patel ve ark.'larının yaptığı çalışmada da FISH ile saptanan fakat aCGH ile saptanmayan 3 del(13q) anomalisinin FISH ile klon büyüklüğünün düşük olduğu (%6-12) gözlenmektedir. Hagenkord ve ark.larının çalışmasında da aCGH ile tespit edilemeyen 13q delesyon oranı %16'dır. Kay ve ark. array ile tespit edilemeyen anomalilerin FISH ile pozitiflik oranının %4,5 ile %12 arasında, Dal Bo ve ark. ise %5 ile %10 arasında değiştiğini ve bu düşük oranlar sebebiyle array ile del(13q)'nun tespit edilemediğini savunmuşlardır.

Genellikle FISH ile aCGH arasındaki uyumsuzluğun del(13q) anomalisi ile ilgili olduğunu ve bu anomalinin iyi prognoz ile ilişkili olması sebebiyle aCGH'in rutinde kullanılabileceği savunulmuştur. Array CGH ile tamamen normal sonuç elde edilmesi veya normal sonuca agresif kliniğin eşlik etmesi durumunda FISH testinin yapılması önerilmiştir (O'Malley et al., 2011).

Çalışmamızda del(13q) saptanan yirmi sekiz olgunun FISH delesyon oranlarına bakıldığında ise array ile del(13q) saptanmamasının tek sebebinin düşük mozaik oranı olmadığı gözlenmiştir. Array çalışması sonucunda del(13q) saptanan olgularda delesyon oranı düşük olgular olduğu farkedilmiştir. Dağılım oranları (Derivative Log Ratio Standard Deviation, DLRSD) ile birlikte ele aldığımızda (tablo 5.2.) dağılım oranının düşük olmasının anomali saptanmasında önemli olduğu gözlenmiştir (olgu 30 ve olgu 14). Ancak olgu 29 ile olgu 5'i karşılaştırdığımızda her ikisinin de dağılım oranının 0,17 olduğu ve delesyon oranlarının yakın olduğu gözlenmiştir. Olgu 29'da del(13q) saptanmamasının sebebi tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, del(13q) oranının laboratuvarımız FISH cut-off değerine (%8) yakın olması dikkat çekici bulunmuştur. Ancak FISH cut-off değerine yakın diğer olgularda array ile de del(13q)'nun saptanması sebebiyle FISH cut-off değerinde saptanan del(13q)'nun raporlanması gerekliliği bir kez daha ortaya koyulmuştur.

Literatürde array yönteminin saptayabileceği mozaik oranının %25-30 olarak belirtilmesi sebebiyle rutinde FISH'in yerini tamamen alamayacağı savunulmaktadır (Setlur et al., 2010). Biz çalışmamızda %8,8 oranında mozaik del(13q)'yu saptamış bulunmaktayız. Ancak klinik uygulamalarda array çalışmaları yapılması durumunda, belirsizliklere yer bırakmamak adına en az %25 delesyon oranı bulunan veya tümör yükünün en az %25 olduğu bilinen KLL olgularında array çalışması yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Tablo 5.2.: %30'dan düşük oranda del(13q) saptanan olguların del(13q) anomalisine ait FISH delesyon oranları, array sonuçları, log₂ değerleri ve olguların DLRSD değerleri

Olgu no	FISH delesyon oranı (%)	Array sonucu	Log ₂ değeri	DLRSD
30	10	-	-	0,25
29	9,9	-	-	0,17
24	21,96	+	0,23	0,24
14	10,7	+	0,3	0,14
13	23	+	0,21	0,17
12	9,8	+	0,24	0,18
6	11,3	+	0,19	0,18
5	8,8	+	0,2	0,17
3	12,5	+	0,2	0,21

5.2. Del(13q) Büyüklüğü

5.2.1. MDR bölgesi

Kronik lenfositik lösemi olgularında del(13q) izole olarak saptandığında iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir ve FISH yöntemi ile KLL olgularının %50'sinde saptanmaktadır. Ancak FISH yöntemi delesyon büyüklüğü hakkında bilgi vermemektedir. İzole del(13q) saptanan olguların kliniğinin heterojenite göstermesi sebebiyle delesyon büyüklüğünün klinik etkisi araştırılmaya başlanmıştır.

Tablo 5.3.'de literatürde bildirilen delesyon büyüklükleri ve MDR bölgesinde lokalize gen bilgileri yer almaktadır. Bizim çalışmamız sonucunda tespit edilen delesyon büyüklüğünün literatürde bildirilen delesyon büyüklüklerinin sınırları içerisinde yer aldığı gözlenmiştir.

Delesyonlu bölgede lokalize genler açısından literatür bilgilerine bakıldığında MDR bölgelerinde hastalık patogenezinin sorumlu tutulan miR15a/16-1, *DLEU1* ve *DLEU2* genleri bizim çalışmamız dahil neredeyse tüm çalışmalarda ortak olmasına rağmen bazı küçük farklılıklar söz konusudur (Tablo 5.3.). Grygalewicz ve ark.'ları tüm olgularının MDR bölgelerinde miR3613'ü saptadıklarını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda array ile del(13q) saptanan 28 olgunun 27'sinde miR3613'ün delesyona uğradığı tespit edilmiştir. Yine tüm olgularında *ST13P4* geninin delesyonlu olduğunu belirten Tybakinoja ve ark.ları ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da tüm olgularda *ST13P4* delesyonu saptanmıştır (Grygalewicz et al., 2016; Tybakinoja et al., 2007).

ST13P4 geni ilk kez 2002 yılında tanımlanmış olup, ST13 tümör supressör gen ailesinin bir üyesidir (Sossey-Alaoui, Kitamura, Head, & Cowell, 2002). Veri tabanlarında *ST13P4* delesyonları olası patojenik olarak sınıflandırılmaktadır. Tybakinoja ve ark.larının yaptıkları çalışmada yirmi KLL olgusu yer almakta olup, bunların %50'sinde 13q delesyonu saptanmıştır. Tybakinoja ve ark.larının çalışmalarında ve bizim çalışmamızda tüm olgularda *ST13P4* delesyonu saptanması ve olası patojenik olarak sınıflandırılması bu genin KLL patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Aynı şekilde miR3613 delesyonlarının da patojenik ve olası patojenik olarak sınıflandırıldığı bazı retinoblastoma olguları raporlanmıştır ve MDR bölgesinde delesyona uğrama sıklığının yüksek olması KLL patogenezinde önemli rol oynadığını destekler niteliktedir.

Tablo 5.3.: del(13q) büyüklükleri ve MDR bölgelerinin içerdikleri genler

Çalışma ekibi	Delesyon büyüklüğü	MDR bölgesindeki genler
Tyybäkinöja ve ark. (Tyybakinoja et al., 2007)	0.79 Mb - 29.33 Mb	<i>TRIM13, KCNRG, DLEU2, DLEU1, ST13P4, MIR15A/MIR16-1</i>
Sargent ve ark. (Sargent et al., 2009)	0,8-33.2 Mb	-
Pfeifer ve ark. (Pfeifer et al., 2007)	0,5-37 Mb	-
Hagenkord ve ark. (Hagenkord et al., 2010)	0,812-31,369 Mb	-
Grygalewicz (Grygalewicz et al., 2016)	0.34-38,97 Mb	TRIM13, miR-3613, KCNRG, DLEU2, miR16-1, miR-15a, DLEU1
Ouillette ve ark. (Ouillette et al., 2012)	0.198–73.775 Mb	-
Parker ve ark. (Parker et al., 2011)	0,84–96.2Mb	-
Mosca ve ark. (Mosca et al., 2010)	0,29-56 Mb	-
Bizim çalışmamız	0,34-28,81 Mb	<i>TRIM13, KCNRG, DLEU2, miR-15a/16-1 DLEU1, ST13P4</i>

- : Bilinmemekte

5.2.2. Tip 1 ve tip 2 del(13q)

Çalışmamız sonucunda del(13q) büyüklüğünün heterojenite gösterdiği gözlenmiştir. Delesyon büyüklüğünün heterojenite göstermesinin klinik etkisi henüz açığa kavuşmuş değildir.

Delesyon 13q büyüklüğünün prognostik etkisini açıklamak amacıyla yapılan bir çalışmada iki yüz elli beş KLL olgusunda SNP array çalışması yapılmış olup, hasta grubunun %20'sini oluşturan tip 2 del(13q)'ların daha

agresif klinik gösterdiği ve kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu savunulmuştur (Ouillette et al., 2011).

Yapılan bir başka çalışmada FISH ile del(13q) saptanan kırk KLL olgusunda delesyon büyüklüğünün araştırılması amaçlanmıştır. Olgularının %41'inde SNP array yöntemi ile *RB1* gen delesyonu saptanmış olup, agresif klinik ile aralarında bir ilişki bulunmamıştır (Grygalewicz et al., 2016).

İki yüz kırk sekiz izole del(13q) KLL olgusu ile delesyon büyüklüğünün ve yüzdesinin prognostik önemini araştırdıkları çalışmada doksan olguya *RB1* gen bölgesini hedefleyen FISH çalışması yapılmış olup, olguların %50'sinde *RB1* delesyonu saptanmıştır. İki yüz kırk sekiz olgunun %50'sinin (126/248) delesyon yüzdesi %60'ın üzerindedir. Delesyon yüzdesinin %60'dan yüksek olması kısa TTFT ve OS ile ilişkili olduğunu savunmuşlardır. Delesyon büyüklüğü ile birlikte delesyon yüzdesi de göz önünde bulundurulduğunda sadece kısa TTFT ile ilişkilendirilmiştir. Sadece *RB1* delesyonu ile TTFT ve OS arasında bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir (Huang et al., 2016).

İki yüz seksen sekiz KLL olgusu ile yapılan, %32,5 oranında del(13q) saptanan bir çalışma, 119 olgudan mono nükleer hücre izole edilen 1. grup ve 169 olgudan periferik kan elde edilen 2. gruptan oluşmaktadır. Her iki grupta sırasıyla %47,3 ve %59,2 oranında tip 1 del(13q) saptanmıştır. Çalışmayı yapan ekip delesyon tipleri ile TTFT ve OS arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir (Houldsworth et al., 2014).

Üç yüz kırk iki izole del(13q) saptanan ve rastgele seçilmiş iki yüz altmış beş KLL hastasında FISH yöntemi del(13q) büyüklüğünün ve yüzdesinin prognostik önemini araştırıldığı çalışmada tip2 del(13q) 135/342 (%39,5) izole del(13q) olguda saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda del(13q) oranının %70'den az ve tip 1 olması durumunda uzun TTFT, del(13q) oranının %70'den fazla olması (tip 1 veya tip 2) ya da %70'den az del(13q) tip 2 delesyonun kısa TTFT ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada delesyon büyüklüğünün ve yüzdesinin bir arada değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (Dal Bo et al., 2011).

Literatür verilerine baktığımızda tip 2 del(13q)'nın prognostik etkisi hakkında çelişkili veriler olduğu gözlenmektedir. Bizim çalışmamızda da olgularımızın %50'sinde *RB1* gen delesyonu pozitif saptanmıştır. Ancak hastalık evresi ve TTFT ile ilişki bulunmamıştır. Tüm bu veriler sonucunda, rutinde *RB1* gen delesyonunun bakılması gerekliliği ileride yapılacak çalışmalar sonucunda netlik kazanacaktır. Ayrıca yapılan çalışmalarda del(13q) klon büyüklüğünün kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmekte olup, bizim çalışmamızda olgu sayısının az olması sebebiyle delesyon oranları (>%60 del(13q), 4/10 tedavi almakta) ve büyüklüğünün bir arada istatistiksel olarak değerlendirilmesi mümkün olmamıştır.

Ayrıca *RB1* gen delesyonu açısından çalışmamız sonucunda array ve FISH sonuçlarının %85 uyum gösterdiği gözlenmiştir. Array çalışması sonucunda on dört olguda *RB1* gen delesyonu saptanırken, FISH ile on dört olgusunun 2'sinde negatif sonuç elde edilmiştir. Bu iki hastada del(13q) ve *RB1* gen delesyonlarının düşük oranda (%10 civarında) olduğu gözlenmekte olup, *RB1* gen delesyonlarının incelenmesi açısından array yönteminin daha etkin olacağı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak tüm bu veriler doğrultusunda daha geniş vaka serileri ile del(13q) klon ve delesyon büyüklüğünün prognostik etkisinin araştırılması gerektiğini ve FISH yönteminin yanı sıra array çalışmalarının da yapılması gerektiğini önermekteyiz.

5.3.3. 13q14'te lokalize diğer genler

Çalışmamız sonucunda del(13q) büyüklüğünün 0,34-28,81 Mb arasında değişkenlik gösterdiği ve içerdikleri genler açısından oldukça heterojen olduğu tespit edilmiştir. Bu heterojenitenin klinik heterojenite ile ilişkisini araştırmak amacıyla istatistiksel analiz yapmak için uygun sayıdaki olguda tespit edilen gen bölgelerini inceledik.

Delesyon 13q büyüklük heterojenitesini araştırmayı amaçlayan Parker ve ark.ları del(13q)'yu 2 sınıfa ayırmıştır. Minimal delesyonlu bölgeye ek olarak *FLJ31945*, *ST13P4*, *DLEU1* ve *DLEU7* genlerinin dahil olduğu, 2 Mb'a kadar uzanan delesyonları sınıf 1, çok daha fazla gen içeren, daha büyük

delesyonları sınıf 2 olarak tanımlamışlardır. Delesyonları *RBI*'e göre sınıflandırmak yerine önerdikleri bu sınıflandırmanın hastalık progresyonunu ön görmeye daha etkin olduğunu savunan ekip, tanı anında sınıf 2 delesyonu olan olguların progresyon gösteren olgular olduğunu belirtmişlerdir (Parker et al., 2011).

Bizim çalışmamızda tüm olgularımızın *ST13P4*, *DLEU1* delesyonları açısından pozitif olmasına rağmen 2 olgumuzda *DLEU7* delesyonu saptanmamıştır. Bu sebeple bu sınıflandırmanın bizim olgularımız için uygun olmadığı düşünülmüştür. Olgularımızı delesyon büyüklüğüne göre sınıflandırdığımızda (>2 Mb ve <2Mb) ise hastalık evresi, TTFT, tedavi alıp almamaları ile aralarında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Olgularımızı tip 1 ve tip 2 del(13q) olarak sınıflandırmanın yanı sıra *RBI* ve *DLEU2* genlerinin arasında lokalize olan genleri incelediğimizde *SETDB2*, *ARL11*, *SPRYD7*, *PHF11*, *RCBTB1* ve *DLEU7* gibi genlerinde delesyona uğradığı saptanmıştır (%53, %57, %23, %53, %57, %87). Bu genlerdeki KSD ile olgularımızın hastalık evresi, TTFT, tedavi alıp almamaları arasında bir ilişki bulunmamıştır. Delesyon 13q heterojenitesinin araştırıldığı çalışmalarda bu genlerdeki KSD'ler raporlanmış olup, klinik önemleri henüz bilinmemektedir (Hagenkord et al., 2010; Nava-Rodriguez et al., 2019). Ancak Parker ve ark.ları *SETDB2*, *RCBTB1* ve *PHF11* delesyonlarını hastalık progresyonu ile ilişkilendirmişlerdir (Parker et al., 2011). Söz konusu olan bu genlerdeki delesyonlar veritabanlarında patojenik olarak sınıflandırılmıştır.

Tüm bu veriler 13q14 bölgesinde MDR dışındaki genlerin KLL patogeneğinde rol aldıklarını destekler niteliktedir. Ancak klinik önemlerinin açıklanamamış olması sebebiyle izole del(13q) saptanan olgulardaki klinik heterojenitenin açıklanması için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

5.3. Diğer KSD'ler

Delesyon 13q14'ün solid tümörlerde ve sağlıklı ileri yaş bireylerde görülme sıklığının araştırıldığı bir çalışmada del(13q)'nun ileri yaş ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun sebebini açıklamak amacıyla öne sürdükleri olasılıklar arasında del(13q) saptanan sağlıklı, ileri yaş bireylerin henüz KLL bulguları vermemiş bireyler olma ihtimallerinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bir diğer olasılık olarak artan yaş ile genom onarımının zayıflaması sonucunda 13q14 delesyonlarının meydana gelmesi şeklinde açıklamışlardır. Üçüncü ve en düşük ihtimal olarak germ hücreleri ile del(13q)'nun kalıtılması olarak belirtmişlerdir. Kesin sonuçlar için oldukça geniş olgu sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirmişlerdir (Machiela et al., 2016). Bu veriler sonucunda del(13q)'nun KLL için başlatıcı bir aberasyon olduğu ve klinik heterojeniteye genomdaki diğer mutasyonların sebep olma ihtimalinin araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

Çalışmamız sonucunda saptanan 13q14 kromozom bölgesinin dışında saptanan KSD'ler arasında 16p13.3 kromozom bölgesinde saptanan artış ileri hastalık evresi ile ilişkili bulunmuştur. Ancak literatürde bu bölgenin kaybının saptandığı ve klinik önemi hakkında bilgi verilmeyen çalışma dışında (Tyybakinoja et al., 2007), bu bölgedeki KSD ile ilgili bir bilgi bulunamamıştır. Veritabanları bu bölgedeki KSD ve içerdiği genler açısından incelendiğinde *NTHL1* geninin çerçeve kayması ve splicing mekanizmasını etkileyen mutasyonlarının kolorektal kanserlerde patojenik olarak sınıflandırıldığı gözlenmiştir. Yine *TSC2* geninin neoplaziler için patojenik mutasyonları raporlanmıştır. Çalışmamız sonucunda tespit edilen 16p13.3 bölgesindeki kopya sayısı değişikliği ulaştığımız bilgiler doğrultusunda bir ilk olup, klinik öneminin net olarak ortaya konulması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Olgularımızın on üçünde, KLL'de mutasyonlarının prognostik önemi hakkında oldukça bilgi sahibi olduğumuz *NOTCH1* geninin lokalize olduğu 9q34.3 bölgesinde artış saptanmış olup, olgularımızın klinik bilgileri ile aralarında bir ilişki bulunmamıştır. Ancak hem tümör supressör hem de

onkogen gibi görev yaptığı bilinen *NOTCH1* geninin yüz on altı kolorektal kanserli olgularda FISH ile amplifikasyonu saptanmış ve kısa OS ile ilişkilendirilmiştir (Arcaroli et al., 2016). Daha fazla sayıda KLL olgusu ile *NOTCH1* kopya sayısı artışının görülme sıklığı ve prognostik öneminin araştırılması gerekmektedir.

COL1A1 gen bölgesinin içeren 17q21.33 gen bölgesindeki artış 10 olgumuzda saptanmış olup, bu durum olgularımızın klinik bilgileri ile ilişkili bulunmamıştır. Ancak veritabanlarında *COL1A1* kopya sayısı artışı iki karsinoma olgusunda raporlanmış olup, prognostik önemi bilinmemektedir.

Kromozom 14'ün q13.1-q13.3 bölgesinde 7 olguda tespit ettiğimiz kayıp ile ilgili literatürde daha önce bir olgu raporlanmamış olup, bu bölgedeki genleri araştırdığımızda sadece *NFKBIA* genindeki bir patojenik mutasyon dışında patojenik olarak sınıflandırılmış varyantlarının raporlanmadığı gözlenmiştir. Sadece bir çalışmada akciğer kanseri olgularında 14q13.3 bölgesinin hem kaybının hem de artışının olduğu raporlanmış olup, içerdiği genler açısından bizim bulgularımız ile uyum göstermemektedir (Harris et al., 2011). Bu bilgilere ek olarak bizim verilerimizde de 14q13 kayıplarının klinik bulgular ile ilişkili bulunmamış olması, bu bölgedeki KSD'lerin KLL'de prognostik etkisi olma ihtimalini düşürmektedir. Bu anomali gözlenmiş olsa da net bilgiler elde edilebilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamız sonucunda olgu 6'da 11q22.2 bölgesinde kopya sayısı kaybı gözlenmiş olup, bu bölgede ikisi de onkogen olan *BIRC3* ve *BIRC2* genleri lokalizedir. Kopya sayısı değişikliğinden bağımsız olarak akciğer kanserinde overekspresyonları gösterilmiştir. Patojenik olarak sınıflandırılmış mutasyonu bulunmayan *BIRC2*'ye karşın, *BIRC3*'de patojenik mutasyonlar tanımlanmıştır ve KLL'de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Baliakas et al., 2015). Mutasyon gösteren *BIRC3*'ün diğer alelinde delesyonların saptandığını ve genellikle *ATM* geni ile birlikte delesyona uğradığını belirten Houldsworth ve ark.ları KLL olgularında yaptıkları array çalışması sonucunda 2 olguda *BIRC3* delesyonu saptamışlardır. Olguların her ikisinde de *ATM* KSD normal olup, olgulardan biri tedavi edilmiş diğeri tedavi almamış olgulardır

(Houldsworth et al., 2014). Yapılan bir başka çalışmada del(11q) olgularının %80'inde *BIRC3* geninin delesyona uğradığını ve bu olgularında %40'ına *ATM* gen delesyonunun eşlik ettiği belirtilmiştir. Prognostik etkilerini araştırdıklarında *ATM* geninin *BIRC3* delesyonlarına göre daha kötü prognoz ile ilişkili olduğunu, *BIRC3* delesyonlarının OS ve progresyonsuz yaşam süresi ile aralarında bir ilişki olmadığı savunulmuştur (Rose-Zerilli et al., 2014). Bizim olgumuzda da *ATM* gen delesyonu negatif olup, tanı anından sonra 16. ayda tedaviye başlamıştır ve hastalık evresi III'dür. Ancak olgu 6'da tüm genomda del(13q) haricinde yirmi sekiz KSD tespit edilmiş olup, *RBI* gen delesyonu pozitifdir. Sonuç olarak izole del(13q) KLL olgularının klinik heterojenitesinin açıklanması için, saptanan anomalilerin prognostik önemlerinin ortaya konulması oldukça önemlidir. Bu sebeple daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Olgu 19 III. evre KLL olup, tanı anında tedaviye başlamıştır. Toplamda del(13q) hariç 8 KSD saptanmış olup, bunlardan ikisi 9q34.3 artışı ve 14q13 kaybıdır. Delesyon 13q tip 1 olarak tespit edilmiştir. Kopya sayısı değişikliği olarak kötü prognostik önemi olduğu bilinen bir anomali saptanmamış olmasına rağmen, 11. kromozomda LOH tespit edilmiş olup, bu bölge KLL'de kötü prognoz belirtici olan *ATM* genini içermektedir. Bu da olgunun kliniğini açıklamak için yeterli görünmektedir. Kopya sayısı değişikliklerinin KLL'deki önemi bilinmekte olup, bu anomalilerin tespit edilmesi için rutinde FISH kullanılmaktadır. Ancak olgu 19'daki gibi LOH'ların tespiti oldukça önemli olup, SNP array dışında bir yöntemle tespit edilmesi mümkün değildir.

Kronik lenfositik lösemi olgularında nadir KSD'leri raporlayan array çalışmaları yer almaktadır. Setlur ve ark.larının yaptıkları çalışmada 18p11.32-q11.1, 4p16.3-p11 kayıpları ve 2p25.3-p11.2 artışı saptanmış olup, bu üç KSD'ninde kötü prognoz ile ilişkili olduğu savunulmuştur (Setlur et al., 2010). Yaptıkları array çalışması sonucunda KSD'leri prognostik önemine göre sınıflandıran Houldsworth ve ark.ları 2p, 3q, 8q, 17q artışları ile 7q, 8p, 11q, 17p, 18p11.32 kayıplarını kötü prognostik, 1p36.32, 7p22.3, 12, 18p, 18q, 19 artışları ile 4p15.1, 5p, 6q21, 7p22.3 kayıplarını orta prognostik sınıfa dahil olduklarını belirtmişlerdir (Houldsworth et al., 2014). Bizim çalışmamızda da

18p11.32-p22.31 bölgesinin kaybının tespit edildiği 3 olgumuz (olgu 6, 7, 18) yer almakta olup, 3 olgudan 1'inin içerdiği gen bölgeleri diğerlerinden farklılık göstermektedir. Ancak bu 3 olgunun da 3. evre ve tedavi alan olgular olduğu gözlenmiştir. Bizim verilerimiz de 18p kayıplarının kötü prognostik bir biyobelirteç olabileceğini destekler niteliktedir.

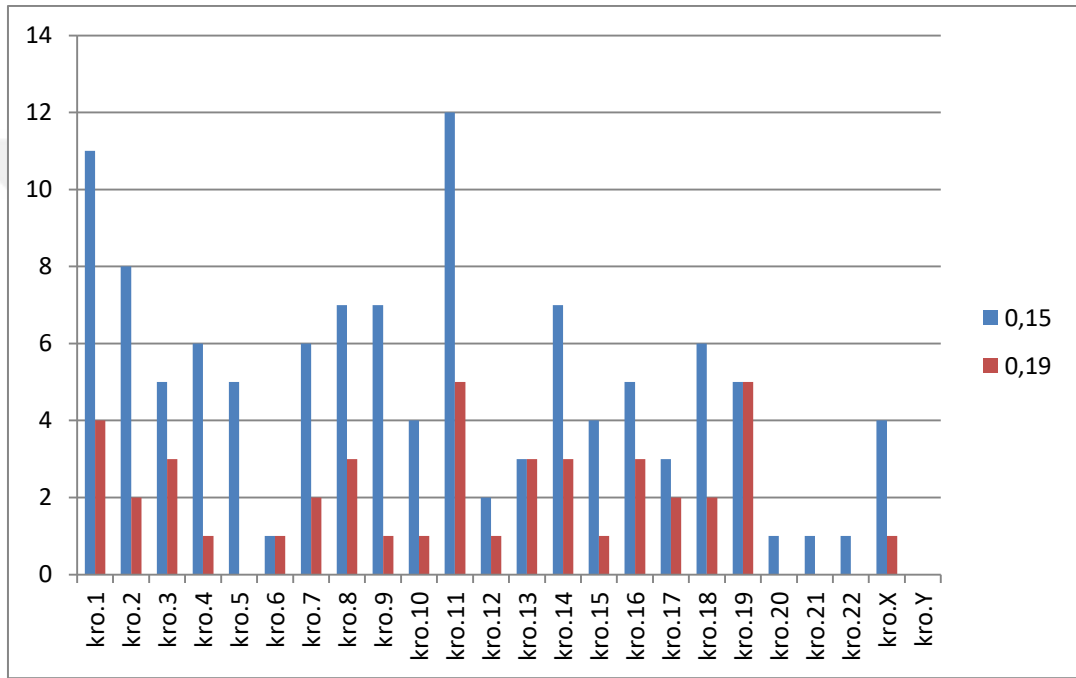
Kay ve ark.ları genom boyunca gözlenen kompleks KSD'lerin prognostik önemlerini araştırdıkları çalışmada, on beşden fazla KSD varlığının kısa progresyonsuz yaşam süresi ile ilişkili olduğunu, tedaviye kötü yanıt verdiklerini ve beklenmedik şekilde yüksek genomik anomalileri olan KLL hastalarının tedaviye kadar geçen sürelerinin uzun olduğunu ve bunun da olguların terapötik kriterleri sağlayıncaya kadar geçen sürede genomik defekt biriktirdiğini savunmuşlardır. İleride yapılacak çalışmaların bu verileri doğrulaması sonucunda KLL hastalarının genomik karmaşıklık açısından izlemenin uygun olabileceğini belirtmişlerdir (Kay et al., 2010). Bizim çalışmamızda 4 olguda (olgu 1, 6, 7, 25) on beşden fazla KSD saptanmış olup, olgu 1 ve 25 tedavisiz izlem altında olup, tanı alalı sırasıyla 73 ve 28 ay olduğu gözlenmiştir. Diğer iki olgumuz tedavi almakta olup, tedavi yanıtları konusunda bilgiye ulaşamamıştır. Sonuç olarak tanı alalı kısa süre olmuş, tedavisiz izlem altında olan olguların hastalık seyirlerinin ve tedavi alan olguların tedaviye yanıtlarının takip edilmesi gerektiğini, elde edilen verilerin array sonuçları ile birlikte tekrar değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

5.4. Log2 değerleri

Neoplazi örnekleri ile array çalışmasının en büyük problemlerinden birisi örneklerin mozaik anomaliler içermesidir. Daha önce de belirtildiği gibi (bölüm 2.2.1) array çalışılacak dokunun %25-30 tümör yükünün olması ya da anomalili klon büyüklüğünün en az %25 olması gerektiği belirtilmektedir (Higgins et al., 2008; Patel et al., 2008; Sargent et al., 2009).

Literatür verilerine baktığımızda KLL olguları ile yapılan çalışmalarda log2 değerlerinin 0,15, 0,1 (Houldsworth et al., 2014; Sargent et al., 2009) ve 0,20 (Kay et al., 2010) olarak belirlendiği gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda üretici firmanın (Agilent Teknolojileri) %20 oranında mozaik, kopya sayısı kayıpları için önermiş olduğu 0,15 log2 değeri ile filtreleme yapılmıştır. Ancak daha sonra DLRSD değeri yüksek olgularda düşük log2 değeri saptanan anomalilere yönelik FISH çalışmalarımızın sonucunun negatif çıkması üzerine log2 değeri 0,19 olarak filtreleme yapılarak tekrar analiz yapılmıştır. İki farklı log2 değeri ile yapılan filtreleme sonucunda tespit edilen anomaliler arasındaki fark şekil 5.1'deki grafikte anlatılmaktadır.



Şekil 5.1.: İki farklı log2 değeri ile yapılan analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Log2 değeri -0,15 olduğunda 9 olguda tespit edilen 1q42.2-q43.1 kromozom bölgesindeki kayıp kısa TTFT, geç evre, tedaviye başlama ile ilişkili bulunmuş olup, log2 değeri -0,19 olarak yapılan filtreleme sonucunda 4 olguda saptanmıştır. Bu 4 olgunun tümünün 5 yıldan kısa sürede tedaviye başladığı tespit edilmiştir. Literatür verilerinde KLL'de array ile yapılan çalışmalarda 1q42 kayıpları daha önce raporlanmamış olup, KLL için prognostik bir marker olma potansiyeline sahip olduğunu düşünmekteyiz. Ancak bu verileri destekleyecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç söz konusudur.

Yine log2 değeri -0,15 olarak filtreleme yapıldığında on üç olguda tespit edilen ve kısa TTFT ile ilişkili bulunan 2p12-p11.2 kromozom bölge artışı, log2

değeri -0,19 olarak filtreleme yapıldığında 4 olguda saptanmıştır. Bu 4 olgunun ikisi (olgu 7 ve 18) tanı anında tedaviye başlarken, diğer ikisi (olgu 1 ve 3) tedavisiz izlem altındadır. Literatür verilerine baktığımızda 2p kromozom artışları kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Ancak kromozom bölgelerine baktığımızda 2p16, 2p11 ve 2p24 olarak çeşitlilik gösterdiği gözlenmiştir (Grygalewicz et al., 2016; Houldsworth et al., 2014; Patel et al., 2008; Pfeifer et al., 2007; Setlur et al., 2010). Houldsworth kromozom 2 tüm kısa kol artışlarının kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ve aynı zamanda 18p kayıpları ile de ilişkili olduğunu belirtmiştir (Houldsworth et al., 2014). Bizim tanı anında tedaviye başlayan 2 olgumuzda da 2p artışına 18p kaybının eşlik ettiği tespit edilmiştir. Tüm bu veriler doğrultusunda 2p artışlarının KLL'de kötü prognostik bir biyobelirteç olarak kabul edilme potansiyeli yüksek olup, hasta takibi açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak izole del(13q) KLL olgularında klinik heterojenite üzerinde del(13q) büyüklüğünün ve genomdaki diğer KSD'lerin etkisini araştırdığımız çalışmamızda del(13q) büyüklüğünün oldukça heterojen olmasının yanı sıra, genomda da birçok KSD ve LOH'lar tespit edilmiştir. Çalışmamız sonucunda bu heterojenliğin klinik öneminin açığa kavuşmasına yardımcı olacak veriler elde edilmiştir. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin klinik önemlerinin ortaya koyulması için daha fazla hasta grupları ile yapılan, daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu ortaya koyulmuştur. Böylelikle ileride yeni prognostik önemi olan anomalilerin tanımlanacağını ve ileride yeni terapötik hedefler belirleneceğini ön görmekteyiz. aCGH+SNP yönteminin KSD ve LOH'ları tek bir çalışma ile tespit edebiliyor olmasının bu araştırmalar için bir avantaj olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Amacı iyi prognostik biyobelirteç olarak sınıflandırılan izole del(13q) saptanan KLL olgularındaki klinik heterojeniteye, del(13q) büyüklüğünün ve genomdaki diğer KSD'lerin etkisini araştırmak olan çalışmamıza otuz iki izole del(13q) saptanan KLL olgusu dahil edilmiştir.

Çalışmamız sonucunda;

- Otuz iki olgunun 2'sinde DNA kalitesinin kötü olması sebebiyle otuz olguda aCGH+SNP çalışması tamamlanmış olup, otuz olgunun yirmi sekizinde del(13q) saptanmıştır.
- Yirmi sekiz olgunun on dördünün tip 2 del(13q) olduğu tespit edilmiştir. Olguların klinik bulguları ile aralarında bir ilişki saptanmamıştır.
- FISH ile *RB1* gen delesyonu negatif olan 2 olguda aCGH+SNP yöntemi ile *RB1* gen delesyonu saptanmıştır.
- Delesyon 13 büyüklüğünün 0,34 - 28,81 Mb arasında olduğu ve içerdiği genler açısından heterojenite gösterdiği saptanmıştır.
- 16p13.3 kromozom bölgesindeki kopya sayısı artışı 8 olguda saptanmış olup, bu durum ileri hastalık evresi ile ilişkilendirilmiştir.
- *NOTCH1* gen bölgesindeki artış on üç, 14q13.1-14q13.3 kromozom bölgesindeki kayıp 7 olguda ve *COL1A1* gen bölgesindeki artış 10 olguda saptanmış olup, olguların klinik bilgileri ile ilişkili bulunamamıştır.
- Kromozom 2 kısa kol artışı ve 1q42 kayıpları saptanan olguların kötü prognoza sahip olduğu gözlenmiştir.
- Bir olguda *BIRC3* gen delesyonu saptanmıştır.
- Bir olguda *ATM* gen bölgesini içeren LOH tespit edilmiştir.
- Log2 değeri 0,15 ile filtreleme yapıldığında elde edilen verilerin bazılarının FISH ile konfirmasyonu yapıp, array sonuçlarında yanlış pozitif veriler elde edildiği gösterilmiştir.

Çalışmamız sonucunda array analizlerinin duyarlılığı için klon büyüklüğünün ve DNA kalitesinin önemli olduğu bir kez daha ortaya koyulmuştur. Ayrıca DLRSD değeri yüksek olgularda yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak adına log2 değerinin oldukça önemli olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamız sonucunda del(13q) büyüklüğünün oldukça heterojen olması sebebiyle tip 1 ve tip 2 del(13q) sınıflandırmasının yerine, delesyona uğrayan genlerin prognostik etkilerinin araştırılması gerektiğini önermekteyiz.

Ayrıca 13q14 bölgesinin dışında saptanan nadir KSD'lerin prognostik etkileri hakkında kısıtlı bilgi bulunması sebebiyle bu nadir KSD'lerin prognostik etkilerinin de araştırılması gerektiği önerilerimiz arasında yer almaktadır.

Ek olarak KSD gözlenmeyen bölgelerde oluşacak LOH'ların klinik etkisinin olabileceği gözlenmiş olup, hasta takibinde LOH analizlerinin önemli olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak del(13q) büyüklüğü ve genomdaki KSD'lerin KLL prognozu üzerindeki etkilerinin araştırılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu ve aCGH+SNP yöntemi ile tüm genomdaki KSD'ler, KSD büyüklükleri ve LOH analizleri yapılabildiği için izole del(13q) KLL patogenezinin açığa kavuşmasında aCGH+SNP etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Amin, N. A., & Malek, S. N. (2016). Gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, 43(2), 215-221. doi:10.1053/j.seminoncol.2016.02.002
- Arcaroli, J. J., Tai, W. M., McWilliams, R., Bagby, S., Blatchford, P. J., Varella-Garcia, M., . . . Messersmith, W. A. (2016). A NOTCH1 gene copy number gain is a prognostic indicator of worse survival and a predictive biomarker to a Notch1 targeting antibody in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 138(1), 195-205. doi:10.1002/ijc.29676
- Autore, F., Strati, P., Laurenti, L., & Ferrajoli, A. (2018). Morphological, immunophenotypic, and genetic features of chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12: a comprehensive review. *Haematologica*, 103(6), 931-938. doi:10.3324/haematol.2017.186684
- Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Sutton, L. A., Rossi, D., Minga, E., Villamor, N., . . . Rosenquist, R. (2015). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 29(2), 329-336. doi:10.1038/leu.2014.196
- Bosch, F., & Dalla-Favera, R. (2019). Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. doi:10.1038/s41571-019-0239-8
- Braga, T. V., Evangelista, F. C. G., Gomes, L. C., Araujo, S., Carvalho, M. D. G., & Sabino, A. P. (2017). Evaluation of MiR-15a and MiR-16-1 as prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pharmacother*, 92, 864-869. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.144
- Buccheri, V., Barreto, W. G., Fogliatto, L. M., Capra, M., Marchiani, M., & Rocha, V. (2018). Prognostic and therapeutic stratification in CLL: focus on 17p deletion and p53 mutation. *Ann Hematol*, 97(12), 2269-2278. doi:10.1007/s00277-018-3503-6
- Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., & Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467), 338-345. doi:10.1038/nature12625
- Chena, C., Avalos, J. S., Bezares, R. F., Arrossagaray, G., Turdo, K., Bistmans, A., & Slavutsky, I. (2008). Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol*, 81(2), 94-99. doi:10.1111/j.1600-0609.2008.01086.x
- Condoluci, A., & Rossi, D. (2019). Genetic mutations in chronic lymphocytic leukemia: impact on clinical treatment. *Expert Rev Hematol*, 12(2), 89-98. doi:10.1080/17474086.2019.1575130

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Crombie, J., & Davids, M. S. (2017). IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, *92*(12), 1393-1397. doi:10.1002/ajh.24808
- Dal Bo, M., Rossi, F. M., Rossi, D., Deambrogi, C., Bertoni, F., Del Giudice, I., . . . Gattei, V. (2011). 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, *50*(8), 633-643. doi:10.1002/gcc.20885
- Dighiero, G., & Hamblin, T. J. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*, *371*(9617), 1017-1029. doi:10.1016/s0140-6736(08)60456-0
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., . . . Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, *343*(26), 1910-1916. doi:10.1056/nejm200012283432602
- Durak, B., Akay, O. M., Aslan, V., Ozdemir, M., Sahin, F., Artan, S., & Gulbas, Z. (2009). Prognostic impact of chromosome alterations detected by FISH in Turkish patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, *188*(2), 65-69. doi:10.1016/j.cancergencyto.2008.08.019
- Erzurumluoglu E., Artan S., (2018). Prenatal Sitogenetik Anomalilerde İleri Tanı Yöntemi Olarak Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon. *Türkiye Klinikleri J Med Genet-Special Topics*, *3*(1), 63-9
- Gaidano, G., Foa, R., & Dalla-Favera, R. (2012). Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*, *122*(10), 3432-3438. doi:10.1172/jci64101
- Garg, R., Wierda, W., Ferrajoli, A., Abruzzo, L., Pierce, S., Lerner, S., . . . O'Brien, S. (2012). The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, *118*(14), 3531-3537. doi:10.1002/cncr.26593
- Grygalewicz, B., Woroniecka, R., Rygier, J., Borkowska, K., Rzepecka, I., Lukasik, M., . . . Pienkowska-Grela, B. (2016). Monoallelic and biallelic deletions of 13q14 in a group of CLL/SLL patients investigated by CGH Haematological Cancer and SNP array (8x60K). *Mol Cytogenet*, *9*, 1. doi:10.1186/s13039-015-0212-x
- Guarini, A., Marinelli, M., Tavolaro, S., Bellacchio, E., Magliozzi, M., Chiaretti, S., . . . Foa, R. (2012). ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica*, *97*(1), 47-55. doi:10.3324/haematol.2011.049270

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Hagenkord, J. M., Monzon, F. A., Kash, S. F., Lilleberg, S., Xie, Q., & Kant, J. A. (2010). Array-based karyotyping for prognostic assessment in chronic lymphocytic leukemia: performance comparison of Affymetrix 10K2.0, 250K Nsp, and SNP6.0 arrays. *J Mol Diagn*, *12*(2), 184-196. doi:10.2353/jmoldx.2010.090118
- Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, *92*(9), 946-965. doi:10.1002/ajh.24826
- Hallek, M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*, *94*(11), 1266-1287. doi:10.1002/ajh.25595
- Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A. M., Busch, R., Mayer, J., . . . Stilgenbauer, S. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, *376*(9747), 1164-1174. doi:10.1016/s0140-6736(10)61381-5
- Harris, T., Pan, Q., Sironi, J., Lutz, D., Tian, J., Sapkar, J., . . . Locker, J. (2011). Both gene amplification and allelic loss occur at 14q13.3 in lung cancer. *Clin Cancer Res*, *17*(4), 690-699. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1892
- Hernandez-Sanchez, M., Rodriguez-Vicente, A. E., Hernandez, J. A., Lumbreras, E., Sarasquete, M. E., Martin, A. A., . . . Hernandez-Rivas, J. M. (2016). MiRNA expression profile of chronic lymphocytic leukemia patients with 13q deletion. *Leuk Res*, *46*, 30-36. doi:10.1016/j.leukres.2016.04.008
- Higgins, R. A., Gunn, S. R., & Robetorye, R. S. (2008). Clinical application of array-based comparative genomic hybridization for the identification of prognostically important genetic alterations in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn Ther*, *12*(5), 271-280. doi:10.1007/bf03256292
- Houldsworth, J., Guttapalli, A., Thodima, V., Yan, X. J., Mendiratta, G., Zielonka, T., . . . Chaganti, R. S. (2014). Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, *55*(4), 920-928. doi:10.3109/10428194.2013.845882
- Huang, S. J., Gillan, T. L., Gerrie, A. S., Hrynchak, M., Karsan, A., Ramadan, K., . . . Bruyere, H. (2016). Influence of clone and deletion size on outcome in chronic lymphocytic leukemia patients with an isolated deletion 13q in a population-based analysis in British Columbia, Canada. *Genes Chromosomes Cancer*, *55*(1), 16-24. doi:10.1002/gcc.22294

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Jiang, Y., Chen, H. C., Su, X., Thompson, P. A., Liu, X., Do, K. A., . . . Plunkett, W. (2016). ATM function and its relationship with ATM gene mutations in chronic lymphocytic leukemia with the recurrent deletion (11q22.3-23.2). *Blood Cancer J*, 6(9), e465. doi:10.1038/bcj.2016.69
- Kay, N. E., Eckel-Passow, J. E., Braggio, E., Vanwier, S., Shanafelt, T. D., Van Dyke, D. L., . . . Fonseca, R. (2010). Progressive but previously untreated CLL patients with greater array CGH complexity exhibit a less durable response to chemoimmunotherapy. *Cancer Genet Cytogenet*, 203(2), 161-168. doi:10.1016/j.cancergencyto.2010.09.003
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., . . . Dalla-Favera, R. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, 17(1), 28-40. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.019
- Machiela, M. J., Zhou, W., Caporaso, N., Dean, M., Gapstur, S. M., Goldin, L., . . . Chanock, S. J. (2016). Mosaic 13q14 deletions in peripheral leukocytes of non-hematologic cancer cases and healthy controls. *J Hum Genet*, 61(5), 411-418. doi:10.1038/jhg.2015.166
- Maleki, Y., Alahbakhshi, Z., Heidari, Z., Moradi, M. T., Rahimi, Z., Yari, K., . . . Bahremand, F. (2019). NOTCH1, SF3B1, MDM2 and MYD88 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett*, 17(4), 4016-4023. doi:10.3892/ol.2019.10048
- Molica, S., Shanafelt, T. D., Giannarelli, D., Gentile, M., Mirabelli, R., Cutrona, G., . . . Morabito, F. (2016). The chronic lymphocytic leukemia international prognostic index predicts time to first treatment in early CLL: Independent validation in a prospective cohort of early stage patients. *Am J Hematol*, 91(11), 1090-1095. doi:10.1002/ajh.24493
- Mosca, L., Fabris, S., Lionetti, M., Todoerti, K., Agnelli, L., Morabito, F., . . . Neri, A. (2010). Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res*, 16(23), 5641-5653. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-10-0151
- Nabhan, C., & Rosen, S. T. (2014). Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review. *JAMA*, 312(21), 2265-2276. doi:10.1001/jama.2014.14553
- Nadeu, F., Delgado, J., Royo, C., Baumann, T., Stankovic, T., Pinyol, M., . . . Campo, E. (2016). Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 127(17), 2122-2130. doi:10.1182/blood-2015-07-659144

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Nava-Rodriguez, M. P., Dominguez-Cruz, M. D., Aguilar-Lopez, L. B., Borjas-Gutierrez, C., Magana-Torres, M. T., & Gonzalez-Garcia, J. R. (2019). Genomic instability in a chronic lymphocytic leukemia patient with mono-allelic deletion of the DLEU and RB1 genes. *Mol Cytogenet*, 12, 2. doi:10.1186/s13039-019-0417-5
- O'Malley, D. P., Giudice, C., Chang, A. S., Chang, D., Barry, T. S., Hibbard, M. K., . . . Chen, S. T. (2011). Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol*, 33(3), 238-244. doi:10.1111/j.1751-553X.2010.01284.x
- O'Reilly, A., Murphy, J., Rawe, S., & Garvey, M. (2018). Chronic Lymphocytic Leukemia: A Review of Front-line Treatment Options, With a Focus on Elderly CLL Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 18(4), 249-256. doi:10.1016/j.clml.2018.02.003
- Ouillette, P., Collins, R., Shakhan, S., Li, J., Li, C., Shedden, K., & Malek, S. N. (2011). The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 17(21), 6778-6790. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-0785
- Ouillette, P., Li, J., Shaknovich, R., Li, Y., Melnick, A., Shedden, K., & Malek, S. N. (2012). Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 51(12), 1125-1132. doi:10.1002/gcc.21997
- Parker, H., Rose-Zerilli, M. J., Parker, A., Chaplin, T., Wade, R., Gardiner, A., . . . Strefford, J. C. (2011). 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 25(3), 489-497. doi:10.1038/leu.2010.288
- Patel, A., Kang, S. H., Lennon, P. A., Li, Y. F., Rao, P. N., Abruzzo, L., . . . Cheung, S. W. (2008). Validation of a targeted DNA microarray for the clinical evaluation of recurrent abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, 83(7), 540-546. doi:10.1002/ajh.21145
- Pfeifer, D., Pantic, M., Skatulla, I., Rawluk, J., Kreutz, C., Martens, U. M., . . . Veelken, H. (2007). Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood*, 109(3), 1202-1210. doi:10.1182/blood-2006-07-034256
- Puiggros, A., Blanco, G., & Espinet, B. (2014). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int*, 2014, 435983. doi:10.1155/2014/435983

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Puiggros, A., Delgado, J., Rodriguez-Vicente, A., Collado, R., Aventin, A., Luno, E., . . . Espinet, B. (2013). Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *Br J Haematol*, *163*(1), 47-54. doi:10.1111/bjh.12479
- Rose-Zerilli, M. J., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Rodriguez, A. E., Chaplin, T., . . . Strefford, J. C. (2014). ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*, *99*(4), 736-742. doi:10.3324/haematol.2013.098574
- Sargent, R., Jones, D., Abruzzo, L. V., Yao, H., Bonderover, J., Cisneros, M., . . . Luthra, R. (2009). Customized oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization as a clinical assay for genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn*, *11*(1), 25-34. doi:10.2353/jmoldx.2009.080037
- Setlur, S. R., Ihm, C., Tchinda, J., Shams, S., Werner, L., Cho, E. K., . . . Brown, J. R. (2010). Comparison of familial and sporadic chronic lymphocytic leukaemia using high resolution array comparative genomic hybridization. *Br J Haematol*, *151*(4), 336-345. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08341.x
- Song, J., & Shao, H. (2015). SNP Array in Hematopoietic Neoplasms: A Review. *Microarrays (Basel)*, *5*(1). doi:10.3390/microarrays5010001
- Sossey-Alaoui, K., Kitamura, E., Head, K., & Cowell, J. K. (2002). Characterization of FAM10A4, a member of the ST13 tumor suppressor gene family that maps to the 13q14.3 region associated with B-Cell leukemia, multiple myeloma, and prostate cancer. *Genomics*, *80*(1), 5-7. doi:10.1006/geno.2002.6792
- Tyybakinoja, A., Vilpo, J., & Knuutila, S. (2007). High-resolution oligonucleotide array-CGH pinpoints genes involved in cryptic losses in chronic lymphocytic leukemia. *Cytogenet Genome Res*, *118*(1), 8-12. doi:10.1159/000106435
- Van Dyke, D. L., Shanafelt, T. D., Call, T. G., Zent, C. S., Smoley, S. A., Rabe, K. G., . . . Kay, N. E. (2010). A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, *148*(4), 544-550. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07982.x
- Wang, C., & Wang, X. (2013). The role of TP53 network in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Int J Clin Exp Pathol*, *6*(7), 1223-1229.

EKLER DİZİNİ

EK -1: AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU



TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI 20.03.2018
ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR ONAY FORMU
VERSİYON NO:2

Çalışmanın adı: “Kronik Lenfositik Lösemi Olgularında 13q Delesyon Büyüklüğünün CGH+SNP-Array Yöntemi İle Araştırılması”

Sorumlu araştırmacı: Doç. Dr. Beyhan Durak Aras (ESOGÜ, Tıbbi Genetik ABD.)

“Kronik Lenfositik Lösemi Olgularında 13q Delesyon Büyüklüğünün SNP-Array Yöntemi İle Araştırılması” isimli, **araştırma** amacıyla yapılan çalışmaya davetli bulunmaktasınız. Çalışmaya katılmayı kabul etmeden önce aşağıdaki bilgileri okuyunuz. İhtiyaç duymanız halinde hekiminizle iletişime geçiniz.

Çalışmanın amacı nedir?

Kronik Lenfositik Lösemi olgularının önemli bir kısmını oluşturan ve hastalık seyri için iyi olarak kabul edilen kromozom 13 kayıplarına sahip olguların klinikleri oldukça farklıdır. Bu farklılığı açıklamak amacıyla kromozom 13 kaybı saptanan olgularda daha ileri yöntem ile bu kayıpların farklılıklarını araştırmayı ve kliniğe etkisini ortaya koymayı amaçlıyoruz. Böylelikle daha etkin tedavi seçenekleri için yapılan çalışmalara katkıda bulunmayı hedefliyoruz.

Çalışmaya kaç kişi katılacak?

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Hematoloji Bilim Dalı'nda KLL tanısı almış, toplam 48 kişi katılacaktır.

Araştırma tedavimi değiştirecek mi?

Hayır. Sadece bir tüp kan alınacak ve laboratuarda gerekli çalışmalar yürütülecektir.

Verdiğim kan örneği ile hangi çalışmalar yapılacak?

Alınan kan örneğinden DNA elde edilecek. Elde edilen DNA örneği genetik analiz yöntemleri ile kromozom 13 kayıplarının farklılıklarını analiz edilip, veriler klinik bilgiler ile istatistiksel olarak karşılaştırılacak.

Kimlik bilgilerim nasıl kullanılacak?

Çalışma ekibi kişisel bilgilerinizi araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır. Çalışma sonuçları, çalışma bittiğinde literatürde yayımlanabilir ancak kimlik bilgileriniz kesinlikle açıklanmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoriteleri orijinal tıbbi kayıtlarınıza

ulaşabilir. Bu formu onayladığınız takdirde, yukarıda adı geçen kurumların bilgilerinize ulaşmasına onay vermiş olacaksınız ancak ilgili mevzuat gereği kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır. Çalışmanın yayımlanması durumunda dahi bilgileriniz gizli tutulacaktır.

Gerek duymam halinde çalışmadan ayrılabilir miyim?

Evet. Çalışmadan istediğiniz zaman herhangi bir yaptırım olmaksızın isteğinize bağlı olarak çalışmadan ayrılabilirsiniz.

Çalışmaya katılmamanın yararı ne olacaktır?

Yukarıda belirttiğimiz gibi, çalışmanın amaçları arasında yer alan, kromozom 13 kayıplarının klinik etkisinin ortaya konulması ve daha etkin tedavi seçenekleri için yapılacak çalışmalara katkı sağlamak amacıyla yapılacak çalışmamıza katkınız olacaktır.

Daha fazla bilgi almak istediğimde kiminle iletişime geçebilirim?

Adı: Sevgi Işık

Görevi: Araştırma Görevlisi (ESOGÜ, Tıp Fak. Tıbbi Genetik AD.)

Tel: 0-222-2392979 / 4441

Bilgilendirilmiş gönüllü olur onay formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı hakkında bilgi verilen çalışma ile ilgili sözlü ve yazılı olarak, aşağıda belirtilen hekim tarafından bilgi verildi. Çalışmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli ve ya gerekçesiz ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Verdiğim biyolojik örneğin,

- Sadece yukarıda adı geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.*
- Eğitim ve araştırma amacıyla ileride yapılacak tüm çalışmalarda kullanılabileceğine izin veriyorum.*
- Hiçbir şekilde örneğimin çalışılmasına izin vermiyorum.*

Bilgi veren hekim:

Gönüllünün adı, soyadı:

İmza:

Tarih:

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Sevgi Işık

Doğum tarihi ve yeri : 16.07.1986 Eskişehir

Uyruğu : TC

Medeni durumu : Evli

İletişim adresleri : ESOGÜ Tıp Fak. Tıbbi Genetik AD.

Eğitim Durumu (Tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru ilköğretim, lise, üniversite, yabancı dil / diller) :

İlkokul : Eskişehir Battalgazi İlköğretim Okulu

Ortaokul : Eskişehir Battalgazi İlköğretim Okulu

Lise : Eskişehir Cumhuriyet Lisesi

Üniversite : ESOGU FEF Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : ESOGU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD.

Doktora : ESOGU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD.

Yabancı Dil : İngilizce

Mesleki Deneyim : Araştırma görevlisi (2010-...)

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: Tıbbi Genetik Derneği

Yayımlar : (Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.)

Bilimsel Etkinlikler Burslar :

Ödüller :

Projeler :

Sözlü Konferans veya Seminerler :

Kurslar ve Eğitim Programları :

