

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

PEDİYATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ OLGULARINDA GENETİK RİSK  
FAKTÖRLERİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ VE SURVİVİN EKSPRESYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ

EFSUN EREN KELEŞ

ŞUBAT

2020

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

PEDİYATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ OLGULARINDA GENETİK RİSK  
FAKTÖRLERİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ VE SURVİVİN EKSPRESYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ

EFSUN EREN KELEŞ

Danışman Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan KARABULUT

ŞUBAT

2020

## ETİK BEYAN

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

Efsun Eren Keleş

İmzası

## ONAY

Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan KARABULUT danışmanlığında Efsun EREN KELEŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 27 Şubat 2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Aytekin AKYOL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Erkan YURTÇU

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan KARABULUT

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

Pediyatrik Akut Lenfoblastik Lösemi Olgularında Genetik Risk Faktörlerinin Prognostik Önemi ve Survivin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Efsun Eren Keleş

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan Karabulut

Survivin solid tümörlerde ve hemotolojik malignansilerde yüksek düzeyde eksprese olan bir proteindir. Survivin öncül-mRNA'sından 5 farklı mRNA oluşmaktadır. Bu transkriptlerden yaban tip survivin,  $\Delta$ Ex3 ve 3B'nin antiapoptotik, 2B ve 2 $\alpha$ 'nın ise proapoptotik özellikte olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında survivin ve varyantlarının mRNA düzeyindeki ekspresyonu, standart-yüksek risk gruplarına ayrılan 35 pediyatrik ALL hastasının ilk tanı ve remisyon dönemlerinde kantitatif real time PZR yöntemi ile incelenmiştir. Tedaviye hızlı ve yavaş yanıt veren hastaların ilk tanı örneklerinin ekspresyon düzeyleri de karşılaştırılarak tedaviye yanıtta etkili olabilecek survivin varyant(lar)ı araştırılmıştır.

Çalışmamızda yaban tip survivin ve  $\Delta$ Ex3 en düşük, 2 $\alpha$  ve 3B ise en yüksek ekspresyon düzeyine sahip varyantlar olarak bulunmuştur. Hasta-kontrol grubu karşılaştırmasında, hasta grubunda yaban tip survivin ve  $\Delta$ Ex3 ekspresyon düzeylerinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. Risk grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise  $\Delta$ Ex3/YT ekspresyon düzeyi oranının standart risk grubunda daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar yaban tip survivin,  $\Delta$ Ex3 ve 2 $\alpha$ +2B/3B ekspresyon oranının pediyatrik ALL gelişimi için risk oluşturabileceğini ve  $\Delta$ Ex3/YT'nin risk sınıflandırması için kullanılabileceğini düşündürmektedir.

2020, 126 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Pediyatrik akut lenfoblastik lösemi, survivin, kantitatif real time PZR

## ABSTRACT

PhD Thesis

Prognostic importance of genetic risk factors in pediatric acute lymphoblastic leukemia and their effects on survivin expression

Efsun Eren Keleş

Ankara University Biotechnology Institute

Asst. Prof. Halil Gürhan Karabulut

Survivin is a protein expressed in high level in solid tumors and hematological malignancies. Alternative splicing of survivin pre-mRNA produces five different mRNAs. It is thought that wild type survivin,  $\Delta$ Ex3 and 3B are antiapoptotic whereas 2B and 2 $\alpha$  are proapoptotic.

In this thesis, expression of survivin and its variants were investigated by quantitative real time PCR method at mRNA level both at first diagnosis and in remission periods of 35 patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia divided into high and standart risk groups. In addition, by comparing expression levels of survivin and its variants between patients with rapid and slow early response to treatment in standard and high risk groups, survivin variant(s) that may affect the response to treatment was also investigated.

In our study expression levels of wild-type and  $\Delta$ Ex3 variant were found to be higher in patient group.  $\Delta$ Ex3/WT expression rate was higher in standard than in the high risk group. Therefore, it was concluded that wild type survivin,  $\Delta$ Ex3 and ratio of 2 $\alpha$ +2B/3B expression may be a risk factor for pediatric B ALL and  $\Delta$ Ex3/WT may be used in risk classification.

2020, 126 pages

**Keywords:** Pediatric acute lymphoblastic leukemia, survivin, quantitative real time PCR

## TEŞEKKÜR

Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hatice Iğın Ruhi başta olmak üzere, Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan Karabulut'a, Dr. Öğr. Üyesi Timur Tuncalı'ya, ve Dr. Öğr. Üyesi Nüket Y. Kutlay'a bilimsel ve mesleki gelişimime değerli katkılarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Değerli hocam tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan Karabulut'a bilimsel yaklaşımı ve tecrübesiyle değer biçilemez desteği için;

Değerli hocalarım Prof. Dr. Ajlan Tükün'e ve Prof. Dr. Mehmet Ertem'e kıymetli katkılarından dolayı şükranlarımı sunuyorum.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematolojisi ve Onkolojisi Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Gülsan Yavuz'a ve Prof. Dr. Handan Dinçaslan'a çok teşekkür ediyorum. Hasta bilgilerine ulaşmamda yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Hasan Fatih Çakmaklı'ya, Uzm. Dr. Başak Adaklı Aksoy'a ve istatistiksel analiz konusundaki yardımları için Doç. Dr. Kenan Köse'ye;

Hayatımın her safhasında yanımda olan ve aldığım her kararda ve her koşulda beni destekleyen annem, babam ve kardeşime; her zaman yanımda olan ve beni sabırla destekleyen sevgili eşim Erhan'a ve hayatımın anlamı canım kızım Nil'e;

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 1002 Hızlı Destek Programı (proje no: 114S535 )'na ve emeği geçen tüm çalışanlarına;

Saygı ve sevgi dolu içten teşekkürlerimi sunarım.

Efsun Eren Keleş

Şubat, 2020

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ONAY</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>18</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1. PEDİYATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ</b> .....	<b>20</b>
2.1.1.EPIDEMİYOLOJİ VE ETİYOLOJİ .....	20
2.1.2.ALL'DE MORFOLOJİK SINIFLANDIRMA .....	21
2.1.3.ALL'DE İMMÜNOFENOTİPLENDİRME .....	22
2.1.3.1. B Hücreli ALL .....	23
2.1.3.2. T Hücreli ALL .....	24
2.1.4.AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE WHO SINIFLAMASI.....	25
2.1.5.PROGNOSTİK FAKTÖRLER.....	25
2.1.5.1. Genetik Risk Faktörleri.....	26



2.1.6.DİĞER PROGNOSTİK FAKTÖRLER.....	29
2.1.7.TEDAVİ.....	30
2.1.8.TEDAVİYE YANIT .....	32
<b>2.2. SURVİVİN GENİ VE PROTEİNİNİN YAPISI .....</b>	<b>33</b>
2.2.1.SURVİVİNİN FONKSİYONLARI .....	34
2.2.1.1. Survivin Apoptozdaki Rolü .....	34
2.2.1.2. Survivin Hücre Bölünmesindeki Rolü.....	36
2.2.1.3. Survivin Otofajideki Rolü.....	37
2.2.1.4. Survivin DNA Tamir Mekanizmasındaki Rolü.....	37
2.2.2.SURVİVİN VARYANLARI.....	38
2.2.3.TÜMÖROGENEZDE SURVİVİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARI.....	41
2.2.4.SURVİVİN GEN EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ .....	43
2.2.5.SURVİVİNİN NORMAL DOKULAR VE TÜMÖR DOKULARINDA EKSPRESYONU .....	44
2.2.6.HEMATOLOJİK MALİGNENSİLERDE SURVİVİNİN ROLÜ.....	45
2.2.7.SURVİVİNE YÖNELİK TEDAVİ YAKLAŞIMLARI .....	47
2.2.7.1. Transkripsiyonel İnhibitörler .....	48
2.2.7.2. Post-translasyonel İnhibisyon .....	49
2.2.7.3. İmmünoterapi.....	50
2.2.7.4. Gen Tedavisi .....	50
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAC .....</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b><u>52</u></b>

<b>4.1. MATERYAL .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2. YÖNTEM .....</b>	<b>53</b>
4.2.1.KULLANILAN CİHAZLAR.....	53
4.2.2.KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER .....	53
4.2.3.SOLUSYONLARIN HAZIRLANMASI.....	54
4.2.4.cDNA SENTEZİ.....	55
4.2.5.HOUSEKEEPİNG GEN VE YABAN TİP SURVİVİN İÇİN PRİMER TASARIMI.....	55
4.2.6.KANTİTATİF REAL TİME PZR STANDARTLARININ HAZIRLANMASI .....	57
4.2.7.GAPDH HOUSEKEEPİNG GENİ VE SURVİVİN VARYANTLARI İÇİN KANTİTATİF REAL TİME PZR.....	59
4.2.8.İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME .....	60
<b><u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b><u>63</u></b>
<b>5.1.GAPDH VE YABAN TİP SURVİVİN PZR ÜRÜNLERİNİN ÖZGÜNLÜĞÜNÜN DOĞRULANMASI .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2. KANTİTATİF REAL TİME PZR .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME .....</b>	<b>72</b>
5.3.1.HASTA-KONTROL GRUPLARI ARASINDA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	72
5.3.2.STANDART-YÜKSEK RİSK GRUPLARI ARASINDA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ .....	73
5.3.3.TANI-REMİSYON DÖNEMLERİ ARASINDA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	75
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</u></b>	<b><u>76</u></b>

<b>6.1. TARTIŞMA</b> .....	<b>76</b>
6.1.1.HASTA-KONTROL GRUPLARI DEĞERLENDİRMESİ .....	77
6.1.2.STANDART-YÜKSEK RİSK GRUPLARI DEĞERLENDİRMESİ .....	78
6.1.3.TANI-REMİSYON DÖNEMLERİ DEĞERLENDİRMESİ.....	79
6.1.4. TEDAVİYE YANITTA ETKİLİ VARYANTLARIN DEĞERLENDİRMESİ.....	80
<b>6.2. SONUÇLAR</b> .....	<b>82</b>
<b><u>KAYNAKLAR</u></b> .....	<b><u>83</u></b>
<b><u>EKLER</u></b> .....	<b><u>106</u></b>
Ek 1. Etik Kurul onayı.....	106
Ek 2. GAPDH ve survivin varyantlarının tanı ve remisyon dönemlerine ait ekspresyon düzeyleri .....	108
Ek 3. Kontrol grubu GAPDH housekeeping gen ve tüm survivin varyantlarının ekspresyon düzeyleri .....	116
Ek 4. Hastaların risk sınıflama tablosu.....	117
<b><u>ÖZGEÇMİŞ</u></b> .....	<b><u>119</u></b>
<b><u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR</u></b> .....	<b><u>120</u></b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Survivin protein yapısının şematik gösterimi.....	33
Şekil 2.2 Bcl-2 ailesi proteinlerinin şematik gösterimi. ....	34
Şekil 2.3. IAP ailesi proteinlerinin şematik gösterimi.....	35
Şekil 2.4. Survivin'in apoptoz inhibitörü fonksiyonu.....	36
Şekil 2.5. Survivin'in mitozdaki fonksiyonu. ....	37
Şekil 2.6. Survivin öncül mRNA'sı ve alternatif ayıklanma ürünlerinin şematik gösterimi. .....	40
Şekil 2.7. Tümörgenezde survivin'in moleküler mekanizmaları.....	43
Şekil 2.8. Survivini hedefleyen farklı stratejiler.....	47
Şekil 4.1. Survivin ve varyantlarının kantitatif real time PZR çalışmasında kullanılan primerlerin yerleşimi .....	56
Şekil 4.2. Yaban tip survivin için tasarlanan primerlerin yerleşimi .....	56
Şekil 4.3. İstatistik değerlendirmede kullanılan gruplar ve yapılan karşılaştırmalar. ....	61
Şekil 5.1. GAPDH (a) ve yaban tip survivin (b) kısmi dizi analizi görüntüsü.....	63
Şekil 5.2. GAPDH ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü .....	64
Şekil 5.3. Yaban tip survivin ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü .....	65
Şekil 5.4. Survivin $\Delta$ Ex3 ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü .....	65
Şekil 5.5. Survivin 2B ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü.....	66
Şekil 5.6. Survivin 3B ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü.....	66
Şekil 5.7. Survivin 2 $\alpha$ ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü .....	67
Şekil 5.8. GAPDH kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	67

Şekil 5.9. Yaban tip survivin kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	68
Şekil 5.10. Survivin $\Delta Ex3$ kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	68
Şekil 5.11. Survivin 2B kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	68
Şekil 5.12. Survivin 3B kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	69
Şekil 5.13. Survivin $2\alpha$ kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	69
Şekil 6.1. Tanı-remisyon dönemleri değerlendirmesinde $\Delta Ex3/YT$ ekspresyon oranı sonuçlarının şematik gösterimi .....	80
Şekil 6.2. Tedaviye yanıtta etkili varyantların değerlendirmesinde $\Delta Ex3/YT$ ekspresyon oranı sonuçlarının şematik gösterimi .....	80
Şekil 6.3. Tedaviye yanıtta etkili varyantların değerlendirmesinde $2\alpha+2B/3B$ ekspresyon oranı sonuçlarının şematik gösterimi .....	81

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Akut lösemilerde etiyoloji .....	21
Çizelge 2.2. Akut lenfoblastik lösemide FAB sınıflaması .....	22
Çizelge 2.3. Akut lenfoblastik lösemide histokimyasal boyanma özellikleri.....	22
Çizelge 2.4. ALL'de WHO sınıflaması .....	25
Çizelge 4.1. Risk sınıflamasında kullanılan kriterler .....	52
Çizelge 4.2. PZR içeriği .....	57
Çizelge 4.3. Dizi Analizi PZR koşulu .....	57
Çizelge 4.4. GAPDH ve survivin varyantları için primer dizileri .....	58
Çizelge 4.5. PZR içeriği .....	58
Çizelge 4.6. PZR koşulu.....	59
Çizelge 4.7. Kantitatif real time PZR içeriği .....	60
Çizelge 4.8. Kantitatif real time PZR koşulu.....	60
Çizelge 4.9. Gruplar arası karşılaştırmalarda kullanılan istatistiksel yöntemler ve elde edilmesi beklenen bilgiler.....	62
Çizelge 5.1. Survivin ve varyantlarının ekspresyon düzeyleri .....	70
Çizelge 5.2. Survivin ve varyantlarının oranlarının ekspresyon düzeyleri.....	71
Çizelge 5.3. Hasta-kontrol grupları istatistik değerlendirme sonuçlarına ait <i>p</i> ve medyan (M) değerleri .....	72
Çizelge 5.4. Standart-yüksek risk grupları istatistik değerlendirme sonuçlarına ait <i>p</i> ve medyan (M) değerleri .....	74
Çizelge 5.5. Survivin ve varyantlarının tanı-remisyon dönemleri istatistik değerlendirme sonuçlarına ait <i>p</i> ve medyan (M) değerleri.....	75

## SİMGELER DİZİNİ

ABHL	Anaplastik büyük hücreli lenfoma
AF	Asit fosfataz
<i>AFF1</i>	AF4-FMR2 family member 1
<i>ALK</i>	Anaplastik lenfoma kinaz
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
ANAE	Alfa naftil asetat esteraz
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
<i>ARID5B</i>	AT rich interactive domain 5B
ATLL	Adult T cell leukemia/lymphoma (Yetişkin T hücreli lösemi)
Bcl-2	B cell lymphoma 2
<i>BCR-ABL1</i>	Breakpoint cluster region- ABL protooncogene 1
bç	Baz çifti
BFM	Berlin Frankfurt Münster
BH	Bcl-2 homology
BIR	Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat
<i>BIRC5/6</i>	Baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat containing 5/6
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNAE	Beta naftil asetat esteraz
°C	Santigrat derece
CARD	Caspase recruitment domain
CCG	Children's Cancer Group
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CD	Cluster of differentiation
CDE	Cell cycle dependent element (Hücre döngüsü bağımlı element)
CDK	Siklin bağımlı kinaz
<i>CDKN2A/B</i>	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A/B
cDNA	Komplementer DNA
<i>CEBP</i>	CCAAT enhancer binding protein
CHR	Cell cycle genes homology region
cIAP1/2	Cellular IAP1/2
COG	Children's Oncology Group
CPC	Chromosomal passenger complex (Kromozomal geçiş kompleksi)

<i>CRLF2</i>	Cytokine receptor like factor 2
CRM1	Chromosome region maintenance 1
DBBHL	Diffuz büyük B hücreli lenfoma
dH <sub>2</sub> O	Distile H <sub>2</sub> O
DIABLO	Direct IAP binding protein with low PI
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNA-PKcs	DNA dependent protein kinase catalytic subunit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EFS	Event free survival (Olaysız sağkalım)
<i>EPOR</i>	Erythropoietin receptor
ETV6	Ets variant 6
FAB	French American British
<i>FBXW7</i>	F box And WD repeat domain containing 7
FISH	Fluorescence in situ hybridization
g	Gram
GADD45	Growth arrest and DNA damage inducible 45
GAPDH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz
GATA3	GATA binding protein 3
H2AX	H2A histone family member X
HBXIP	Hepatitis B virus X interacting protein
HKHN	Hematopoetik kök hücre nakli
HLA-DR	Human leukocyte antigen DR
<i>HOXA</i>	Homeobox A
Hsp 90	Heat shock protein 90
HTLV-1	Human T cell lymphotropic virus type 1
IAP	Inhibitor of apoptosis protein (Apoptoz inhibitörü protein)
<i>ID4</i>	Inhibitor of DNA binding 4
Ig	Immunoglobulin
IGF1	Insulin like growth factor 1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü 1)
<i>IGH</i>	Immunoglobulin heavy locus
IKZF1/2	Ikaros family zinc finger 1/2
IL3	Interleukin 3 (İnterlökin 3)



ILP2	IAP like protein 2
INCENP	Inner sentromere protein
iAMP21	Intrachromosomal amplification of chromosome 21
JAK	Janus kinaz
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KAE	Kloroasetat esteraz
KHOAK	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
KMML	Kronik myelomonositik lösemi
KML	Kronik miyeloid lösemi
Ku70	ATP dependent DNA helicase II 70 kDa subunit
<i>LMO1/2</i>	LIM domain only 1/2
M	Medyan
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDS	Myeloproliferatif sendrom
<i>MEIS1</i>	Meis homeobox 1
mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MGP	Metil green pronin
ml	Mililitre
ML-IAP	Melanoma IAP
<i>MLL</i>	Mixed lineage leukemia
MLS	Mitochondrial localization signal
mM	Milimolar
MPH	Myeloproliferatif hastalık
MPO	Myeloperoksidaz
MRH	Minimal rezidüel hastalık
mRNA	Mesajcı RNA
MTOC	Microtubule organizing center (Mikrotübül organize edici bölge)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
<i>MYC</i>	Avian myelocytomatosis virus
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NCI	National Cancer Institute (Ulusal kanser enstitüsü)
NES	Nükleer export sinyali
NF- $\kappa$ B	Nükleer faktör kappa B
NHEJ	Non homologous end joining
N1ICD	Notch-1 intracellular domain
NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1
OS	Overall survival (Genel sağkalım)
<i>P2RY8</i>	Purinergic receptor P2Y, G protein coupled 8
<i>PARI</i>	Pseudoautosomal region 1
PAS	Periyodik asit schiff
<i>PAX5</i>	Paired box 5
<i>PBX1</i>	Pre B cell leukemia homeobox 1
Ph	Philadelphia
PKA	Protein kinase A
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinaz
pmol	Pikomol
POG	Pediatric Oncology Group
Pre B	Prekürsör B
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Ras	Rat sarcoma
<i>RBI</i>	Retinoblastoma 1
RER	Rapid early response (Erken hızlı yanıt)
RING	Really interesting new gene
RNAi	RNA interferans
RT-PZR	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
<i>RUNX1</i>	Runt related transcription factor 1
S-2B	Survivin 2B
S-2 $\alpha$	Survivin 2 $\alpha$
S-3B	Survivin 3B
SER	Slow early response (Erken yavaş yanıt)
siRNA	Small interfering RNA
SJCRH	St. Jude Children's Research Hospital
SMAC	Second mitochondria derived activator of caspase
Smad-2	Mothers against decapentaplegic homolog 2

sn	Saniye
SS	Sudan siyahı
SSS	Santral sinir sistemi
S-YT	Survivin yaban tip
S-ΔEx3	Survivin ΔEx3
<i>TAL1</i>	T cell acute lymphocytic leukemia 1
TBE	Tris borik asit EDTA
<i>TCF3</i>	Transkripsiyon faktörü 3
TdT	Terminal deoksinükleotid transferaz
<i>TLX1-HOX11</i>	T cell leukemia homeobox 1/ homeo box 11
<i>TLX3-HOX11L2</i>	T cell leukemia homeobox 3/ homeobox 11 like 2
<i>TP53</i>	Tümör proteini 53
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TYK2	Tirozin kinaz 2
VIAP	Viral inhibitor of apoptosis protein (Viral apoptoz inhibitörü protein)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
Wnt-2	Wingless type MMTV integration site family member 2
Wt	Wild type (Yaban tip)
XIAP	X chromosome linked IAP
μl	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

ALL (akut lenfoblastik lösemi), lenfohematopoetik hücrelerin olgunlaşma aşamasında duraklamaları sonucu malign özellikteki klonların çoğalması ile karakterize heterojen bir hastalıktır. Çocukluk çağı malignitelerinin %25-30'unu oluşturmaktadır. ALL sadece çocukluk çağının en sık görülen malign hastalığı olması açısından değil, tedavide elde edilen başarılar açısından da bu dönemin önemli bir hastalığıdır.

Survivin, normal dokularda yok denecek kadar az düzeylerde iken lösemilerin de dahil olduğu birçok kanser türünde ekspresyonu aşırı derecede artan önemli bir proteindir. Hücre bölünmesi ve apoptoz yanında otofaji ve DNA tamirinde de görev almaktadır.

Survivin proteininin önemli bir özelliği de aynı transkripsiyon ürününün alternatif ayıklanması ile sentezlenen ve apoptotik/proapoptotik olmak üzere birbirine zıt işlevlere sahip varyantlarının bulunmasıdır. Pediyatrik ALL ile ilgili yapılan çalışmalarda daha çok yaban tip survivin ile 2B ve  $\Delta$ Ex3 varyantı incelenmiştir. Bizim çalışmamızda proapoptotik ve apoptotik farklı özelliklere sahip 2 $\alpha$  ve 3B varyantları da dahil edilerek survivin proteininin fonksiyonel açıdan önem taşıyan tüm varyantlarının ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak ilk tanı ve remisyon dönemlerindeki ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ile prognoz ve tedavide öncelik verilmesi gereken survivin varyantı/varyantlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda standart ve yüksek riskli grupta tedaviye hızlı ve yavaş yanıt veren hastaların ilk tanı örneklerindeki survivin ve varyantlarının ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak sadece tedaviye yanıtta etkili olan değil, başlı başına risk faktörü olabilecek dolayısıyla risk sınıflamasını ve planlanan tedaviyi değiştirebilecek survivin varyantının belirlenmesi de amaçlanmıştır.

Survivin, çoğunluğu solid doku tümörleri olmak üzere malign hastalıkların tedavisinde tedavi hedefi olarak belirlenmiştir. Tedaviye yönelik çalışmalar içerisinde survivin ekspresyonunun engellenmesine yönelik olarak YM155, LY2181308 ve SPC3242 gibi bileşikler ve oligonükleotidlerin kullanıldığı faz II aşamasına gelmiş çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu bileşikler proapoptotik/apoptotik tüm survivin varyantlarının ekspresyon düzeyini azaltmaktadır. Oysa survivin 2 $\alpha$  ve 2B varyantları proapoptotik özellikte olduğundan bu varyantların ekspresyonunun korunması ve spesifik olarak antiapoptotik özellikte olan yaban tip survivin ile  $\Delta$ Ex3 ve 3B varyantlarının

ekspresyonunun baskılanması tedavi açısından daha etkili bir yol olacaktır. Hastalığın takibinde ise (relaps, tedavi süresi belirleme vb) antiapoptotik özellikteki diğer varyantların izlenmesi akılcı gelmektedir.



## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1. PEDİYATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ**

Akut lenfoblastik lösemi kemik iliğinde bulunan lenfoid öncül hücrelerde hücre farklılaşmasının herhangi bir safhasında meydana gelen, çok basamaklı somatik mutasyonlar sonucu gelişen malign bir hastalıktır. Tipik klinik, biyolojik ve prognostik özellikler gösteren farklı alt tipleri bulunmaktadır (1). Prognostik faktörler göz önüne alınarak tanı anında ve takip sırasında hastanın risk grubunun doğru olarak belirlenmesi ve tedavi yaklaşımının söz konusu veriler ışığında yönlendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle tüm hastalar için uygun olabilecek ortak bir tedavi yaklaşımından söz edilememektedir .

#### **2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ VE ETİYOLOJİ**

ALL çocuklarda en sık görülen kanser türüdür. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %25-30'unu oluşturmaktadır. Yeni tanı almış lösemilerin %75'ini, akut lösemilerin %80'ini oluşturmaktadır (1). Ancak bu sıklık başta genetik ve çevresel faktörler olmak üzere birçok nedene bağlı olarak değişebilmektedir (2). ALL'nin en sık görüldüğü yaş 2 ile 6 yaş arasındadır, 3-4 yaşlarında pik yapmaktadır (3). 0-14 yaş arası insidansı Amerika Birleşik Devletleri'nde 3-4/100000, ülkemizde ise 4,1/100000 olarak bildirilmektedir (4). Çocukluk çağı ALL olgularında yapılan çalışmalarda kız/erkek oranı 1/1.2 olarak belirlenmiştir (3). Akut lösemilerin etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte patogenezinde rol oynayan faktörler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Akut lenfoblastik lösemide prognozun belirlenmesi ve klonal farklılaşmanın normal hematopoezin hangi aşamasında olduğunun saptanması açısından blastların sınıflandırılması önem taşımaktadır. Blastların morfolojik, immünofenotipik, biyokimyasal ve genetik özelliklerine bakılarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır.

Çizelge 2.1. Akut lösemilerde etiyoloji (5)

Çevresel faktörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• İyonize edici radyasyon</li><li>• Kimyasal ajanlar (benzen vb.)</li><li>• İlaçlar (alkilleyici ajanlar vb.)</li></ul>
Genetik faktörler	<p>Kromozomal hastalık:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Trizomi 21 (10 yaşından önce lösemi riski 1/95)</li></ul> <p>Kromozomal kırık sendromları:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Bloom sendromu (30 yaşından önce lösemi riski 1/8)</li><li>• Fankoni anemisi (16 yaşından önce lösemi riski 1/12)</li></ul> <p>Lösemi riskinin arttığı diğer genetik hastalıklar:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Konjenital agamaglobulinemi</li><li>• Poland sendromu</li><li>• Shwachman-Diamond sendromu</li><li>• Ataxia telenjektazi</li><li>• Li-Fraumeni sendromu</li><li>• Nörofibromatozis</li><li>• Diamond-Blankfan anemisi</li><li>• Kostmann hastalığı</li></ul>

### 2.1.2. ALL'DE MORFOLOJİK SINIFLANDIRMA

1976 yılında FAB (French American British) çalışma grubu tarafından ALL hastalarının periferik yayma ve kemik iliği aspirasyon preparatları morfolojik olarak incelenmiş, hücrelerin büyüklüğü, çekirdek şekli, çekirdekçik sayısı, sitoplazmanın bazofili derecesi esas alınarak lenfoblastlar L1, L2, L3 olmak üzere 3 alt tipe ayrılmıştır (6) (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Akut lenfoblastik lösemide FAB sınıflaması (5)

Sitolojik özellikler	L1	L2	L3
Hücre boyutu	Küçük	Büyük, heterojen	Büyük, homojen
Nükleer kromatin	Homojen	Değişken, heterojen	Noktalı ve homojen
Nükleus şekli	Düzdün konturlu, bazen çentikli	Düzensiz, sıklıkla çentikli	Düzdün konturlu, oval-yuvarlak
Nükleolus	Görülmez ya da silik, küçük	Bir ya da daha fazla, sıklıkla belirgin	Belirgin, bir ya da daha fazla veziküler
Sitoplazma boyutu	Dar	Değişken, sıklıkla büyük	Orta derecede büyük
Sitoplazmanın bazofili durumu	Hafif ya da orta, nadiren yoğun	Değişken, bazen yoğun	Çok yoğun
Sitoplazmik vakuol	Değişken	Değişken	Sıklıkla belirgin

Blastların morfolojilerini tespit etmede FAB sınıflamasına yardımcı olmak amacıyla histolojik boyama yöntemi kullanılmaktadır. Blastların bazı boyaları almamaları ile az ya da çok almaları lösemi tipini belirlemek açısından önemli olmaktadır. Çizelge 2.3.'de alt grupların histokimyasal boyanma özellikleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. Akut lenfoblastik lösemide histokimyasal boyanma özellikleri (7)

FAB	MPO	SS	AF	KAE	ANAE	BNAE	PAS	MYP	Fe	TdT
L1	-	-/np	+*	-	+/z	-/z	+/-	+	-	+
L2	-	-/np	+*	-	-/z	-/z	+/-	+	-	+
L3	-	-	+*	-	-	-	+/-	+	-	-

**np:** nadir pozitif, **\***: T ALL'de unipolar pozitif, **z:** zayıf, **MPO:** Myeloperoksidaz, **SS:** Sudan siyahı, **AF:** Asit fosfataz, **KAE:** Kloroasetat esteraz, **ANAE:** Alfa naftil asetat esteraz, **BNAE:** Beta naftil asetat esteraz, **PAS:** Periyodik asit schiff, **MYP:** Metil yeşil pironin, **TdT:** Terminal deoksinükleotid transferaz

### 2.1.3. ALL'DE İMMÜNOFENOTİPLENDİRME

ALL'de blastların farklılaşma aşamasını belirlemek amacıyla monoklonal antikordlardan yararlanılarak immünofenotiplendirme yapılmaya başlanmış, bu amaçla yüzey antijenleri kullanılmıştır. FAB sınıflamasının yetersiz kalması, yüzey antijenlerinin kullanılmaya başlaması ile immünofenotiplendirme ALL sınıflamasında önemli basamaklardan biri haline



gelmiştir. CD (cluster of differentiation) olarak ifade edilen bu lökosit antijenlerinin tiplerinin belirlenmesi amacıyla immünofloresan, immünohistokimya ve akım sitometrisi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

ALL, immünofenotiplendirme ile B ve T hücre kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. B ve T hücreli ALL ise farklılaşmanın başladığı evreye göre alt gruplara ayrılmaktadır.

2008'den önce WHO (World Health Organization) B lenfoblastik lösemiye prekürsör B lenfoblastik lösemi olarak sınıflamıştır ve bu terminoloji onu olgun B hücreli ALL'den ayırmak için hala kullanılmaktadır.

### 2.1.3.1. B Hücreli ALL

**Prekürsör B hücreli ALL:** Sitoplazmik CD79a, CD19, HLA-DR (Human leukocyte antigen-DR) ve B hücre ile ilişkili diğer antijenlerin ekspresyonu ile belirlenmektedir. Pediyatrik ALL'nin %80-85'ini oluşturmaktadır. Prekürsör B hücreli ALL üç ana alt tipe ayrılmaktadır (8):

**Pro B ALL (Prepre B ALL):** CD10 negatiftir. Hücrelerin hepsi CD19, HLA-DR ve TdT ekprese etmektedir. Bu lösemi tipi pediyatrik ve erişkin ALL hastalarının yaklaşık %10'undan sorumludur (9). İnfantlarda en yaygın görülen fenotiptir ve *MLL* yeniden düzenlenmeleri ile ilişkilidir (8).

**Common ALL:** Lösemik hücreler CD19 ve TdT'ye ilaveten CD10'u eksprese ederlerse bu ileri matürasyonu işaret etmektedir. Pediyatrik ve erişkin ALL hastalarının %60 kadarında görülmektedir (9). Hastalar çoğunlukla iyi prognoza sahiptir (8).

**Pre B ALL:** Hücreler sitoplazmik Ig (immunoglobulin) içermektedir. Diğer belirteçlerin ekspresyonu common ALL ile benzerdir. Pediyatrik ALL'lerin %20-25'inde görülmektedir ve hastaların %25'inde t(1;19) bulunmaktadır (10).

**Olgun B hücreli ALL:** Aynı zamanda Burkitt lenfoma olarak adlandırılan, ALL'nin en olgun tipidir. Lösemik hücrelerin yüzeylerinde tek bir hafif zincirli immünooglobülin eksprese etmeleri ile teşhis edilmektedir. Hücreler L3 morfolojisindedir ve genellikle *c-MYC* gen translokasyonlarına sahiptirler. Prekürsör B hücreli ALL'den tamamen farklı bir tedavi

uygulanarak, non-Hodgkin lenfoma için olan tedavi temel alınmaktadır. Pediyatrik ALL'lerin yaklaşık %2'sinde görülmektedir (8).

### 2.1.3.2. T Hücreli ALL

Lösemik blastlardaki T hücre ile ilişkili antijenlerin ekspresyonuna göre belirlenmektedir (11). Bütün blastlar sitoplazmik CD3, CD7 yüzey antijeni ve değişen oranlarda TdT, CD34, CD2 ve CD5 antijenlerini eksprese etmektedirler. Sıklıkla erkek cinsiyet, ileri yaş, lökositozis ve mediastinal kitlenin varlığı ile ilişkilidir (12). T hücreli ALL, pediyatrik ALL vakalarının %15'inde ve yetişkin ALL vakalarının %25'inde görülmektedir (13). T hücreli ALL için kabul edilen az sayıda prognostik faktör bulunmaktadır ve B fenotipli ALL'de yaygın olan sitogenetik anomaliler T hücreli ALL'de daha nadir olmaktadır (14). T hücreli ALL'de *TAL1* (T cell acute lymphocytic leukemia 1), *LMO1/2* (LIM domain only 1/2), *TLX1-HOX11* (T cell leukemia homeobox 1/ homeobox 11) ve *TLX3-HOX11L2* (T cell leukemia homeobox 3/ homeobox 11 like 2) gibi transkripsiyon faktörlerini kodlayan birçok gende çoklu kromozomal translokasyonlar tanımlanmıştır. Pediyatrik T hücreli ALL hastalarının yaklaşık %5-10'unda *TLX-HOX11* translokasyonu sonucunda oluşan ekspresyon gözlenmektedir (15). Ayrıca kriptik t(5,14) (q35;q32) translokasyonunun sonucu oluşan *TLX3-HOX11L2*'nin aşırı ekspresyonu pediyatrik T hücreli ALL hastalarının yaklaşık %20'sinde meydana gelmektedir ve bütün vakalarda görülmemesine rağmen tedavide başarısız olma riski yüksek olmaktadır (16). T hücreli ALL'de NOTCH sinyal yolağı genellikle *NOTCH1* (Neurogenic locus notch homolog protein 1) ve *FBXW7* (F-Box And WD repeat domain containing 7) ile aktive edilmektedir (17). T hücreli ALL'lerin yaklaşık %50'sinde *NOTCH1* genini aktive eden mutasyonlar ve %15'inde *FBXW7* genini inaktive eden mutasyonlar görülmektedir. Olguların %60'ında bu genlerden en az birinde mutasyon sonucu NOTCH yolağı aktivasyonu görülmektedir. T hücreli ALL pre T ALL ve olgun T ALL olmak üzere iki immünolojik kategoriye ayrılmaktadır (9).

#### 2.1.4. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE WHO SINIFLAMASI

ALL sınıflaması WHO tarafından 2008 yılında güncellenmiştir (18) (Çizelge 2.4.). Bu sınıflama immünofenotiplendirmenin yanında asıl olarak genetik özellikler de ön plana alınarak yapılmıştır.

Çizelge 2.4. ALL'de WHO sınıflaması (18)

1) B lenfoblastik lösemi/lenfoma
B lenfoblastik lösemi/lenfoma, başka şekilde tanımlanmamış
Tekrarlayan genetik anomali ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(9;22)(q34;q11.2) <i>BCR-ABL</i> 1 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(v;11q23);MLL yeniden düzenlenmeleri ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(12;21)(p13;q22) <i>TEL-AML1(ETV6-RUNX1)</i> ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
Hiperdiploidi ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
Hipodiploidi ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(5;14)(q31;q32) <i>IL3-IGH</i> ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(1;19)(q23;p13.3) <i>TCF3-PBX1</i> ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
2) T lenfoblastik lösemi/lenfoma

#### 2.1.5. PROGNOSTİK FAKTÖRLER

NCI (National Cancer Institute) tarafından yapılan risk sınıflamasına göre pediyatrik ALL hastaları temel olarak iki risk grubuna ayrılmaktadır. Buna göre beyaz küre sayısının 50,000 mm<sup>3</sup>/µL'nin altında, yaşın ≥ 1 ve <10 yıl olması standart risk grubu olarak tanımlanırken; beyaz küre sayısının 50,000 mm<sup>3</sup>/µL'nin üstünde, yaşın <1 ve ≥10 olması yüksek risk grubu olarak tanımlanmaktadır (8).

Buna ek olarak immünofenotip (B ya da T hücreli ALL), genetik anomaliler, tedaviye yanıt ve SSS (santral sinir sistemi) tutulumu da risk grubunun belirlenmesinde dikkate alınan faktörler arasında sayılmaktadır (8).

Bununla beraber COG (Children's Oncology Group) ve BFM (Berlin Frankfurt Münster) gibi çalışma grupları tarafından gerçekleştirilen klinik çalışmalar kendi risk sınıflamalarını

oluşturmuşlardır. COG'de NCI kriterlerine ek olarak 1 yaş altı, testis tutulumu ve MRH (minimal residüel hastalık) gibi faktörler de risk sınıflamasında dikkate alınırken, BFM protokolünde ağırlıklı olarak MRH durumu dikkate alınmaktadır (8).

Bazı çalışmalar ALL'de kız cinsiyetin erkek cinsiyete oranla daha iyi prognoza sahip olduğunu göstermiştir (19). Erkeklerde kızlara oranla daha kötü prognoza sahip olmasının sebeplerinden biri testis relapsıdır (19). Ancak erkek hastalarda sebebi bilinmemekle birlikte aynı zamanda kemik iliği ve SSS relapsı konusunda da risk artışı gözlenmektedir. Yapılan çalışmalar erkeklerde kız hastalara yakın düzeyde tedaviye sonuç alındığını gösterse de (20) geniş klinik çalışmalar sağkalım oranlarının erkeklerde düşük olduğunu göstermektedir (21).

Sağkalım oranlarında etnik farklılıklar da gözlenebilmektedir. Siyah ve hispanik çocuklarda beyaz çocuklara oranla daha düşük sağkalım oranı görülmektedir (22). Asyalı çocuklarda ise sağkalımın beyaz çocuklara oranla daha iyi olduğu rapor edilmiştir. Tedavi sonuçlarındaki bu farklılık ALL alt tiplerinden kaynaklanabilmektedir. Hispanik çocuklarda T hücreli ALL insidansı yüksek olmakta ve prekürsör B hücreli ALL'li olanlarda ise iyi genetik faktörlerin oranı düşük olmaktadır. Aynı zamanda farklı ırk/etnik gruplarda kalıtsal olan genetik varyasyonlar da ALL insidansı ve tedavisinde etkili olmaktadır. Hispanik çocuklarda daha sık görülen *ARID5B* (AT rich interactive domain 5B) geni tek nükleotid polimorfizmi hem ALL'ye yatkınlık hem de relapsta etkili olmaktadır (23).

#### **2.1.5.1. Genetik Risk Faktörleri**

**t(9;22)(q34;q11).** KML (kronik miyeloid lösemi)'de görülen Ph (Philadelphia) kromozomu oluşumu ile sonuçlanmaktadır (9). Bu translokasyon çocukluk ALL vakalarının %3-5'inde görülmekte ve tanıda yüksek yaş, yüksek lökosit sayısı ve sıklıkla SSS tutulumu ile ilişkilendirilmektedir (24). İmmünofenotip tipik olarak pre B ALL (prekürsör B akut lenfoblastik lösemi)'dir (9). Hastaların küçük bir kısmında konvensiyonel sitogenetik analizde ve FISH (fluorescence in situ hybridization) analizinde Ph kromozomu görülemezken, RT-PZR (revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) ile *BCR-ABL1* (Breakpoint cluster region- ABL protooncogene 1) transkripti tespit edilebilmekte ve Ph negatif/*BCR-ABL1* pozitif ALL olarak bilinmektedir (25). Translokasyon kriptik olduğunda kantitatif RT-PZR'a alternatif olarak iki renkli FISH probu ile de tespit edilebilmektedir (26). Bütün yaş gruplarında t(9;22) translokasyonu varlığı kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (9). Ancak yeni hedef tedaviler sonucu (imatini ve türevleri)

prognozda belirgin iyileşme bildirilmektedir. KML’de olduğu gibi ALL’de de translokasyon sonucunda 22q11’deki *BCR* geninin 5’ucundaki dizi 9q34’de bulunan *ABL1* geninin 3’dizisi ile birleşmekte ve *BCR-ABL1* füzyonu oluşmaktadır. ALL’de kırılma *BCR* ve *ABL* genlerinde sırasıyla ekzon 1 ve ekzon 2 (e1a2) arasında oluşmakta ve minör kırık bölgesi (m-bcr) adını almaktadır. Bu kırık neticesinde 7kb mRNA ve 190 kDa büyüklüğünde bir protein oluşmaktadır (9). Kırılma ekzon 13 ve ekzon 14 (b2a2) ya da ekzon 14 ve ekzon 15 (b3a2) arasında olduğunda 8.5 kb mRNA ve 210 kDa büyüklüğünde bir protein oluşmaktadır ve bu form daha çok KML’de görülmektedir (27). Her iki *BCR-ABL1* füzyon proteininin fonksiyonu da anormaldir ve aktif bir tirozin kinaz oluşturmaktadır (9).

**t(12;21)(p13;q22).** Bu translokasyon ile *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)* füzyon geni oluşmaktadır. Genellikle 2-9 yaş arasında olan, düşük beyaz küre sayısına sahip B ALL fenotipli hastalarda ortaya çıkmaktadır (28). Çocukluk dönemi ALL’inde %25-30 oranında görülen ve iyi prognoz ile ilişkilendirilen bu translokasyonun prognozun gelişmesinde önemli bir yeri bulunmaktadır (29). Çalışmalar *ETV6-RUNX1* füzyonunun çocuklarda daha iyi bir olaysız sağkalım (event free survival-EFS) ve genel sağkalım (overall survival-OS) meydana getirdiğini göstermektedir (30). Diğer B ALL fenotipli hastalarla kıyaslandığında t(12;21)(p13;q22) translokasyonuna sahip hastalarda geç relaps sıklığı yüksek bulunmuştur (31).

***MLL (mixed lineage leukemia) (11q23) yeniden düzenlenmeleri.*** Pediyatrik ALL vakalarının yaklaşık %5’inde meydana gelmektedir ve çoğunda tedavi başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (32). Sık meydana gelen yeniden düzenlenmeler t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), t(11;19)(q23;p13) ve t(10;11)(p12;q23)’dir (33). En sık meydana gelen 11q23 yeniden düzenlenmesi t(4;11)(q21;q23)’dir ve pediyatrik ALL vakalarının %2’sinde görülmektedir (34). *MLL* ve *AFF1(AF4-FMR2 family member 1 gene)* genleri arasında füzyon oluşmasına neden olmakta ve *MLL-AFF1* transkripti meydana gelmektedir (9). Bu translokasyona sahip hastalar genellikle infantlardır ve yüksek beyaz küre sayısına sahiptirler (35). Diğer yaş gruplarına oranla SSS tutulumları daha fazla olmaktadır ve başlangıç tedavisine geç yanıt vermektedirler (35). Olaysız sağkalım oranı ise %35 civarında olmaktadır (36).

**Yüksek hiperdiploidi.** 51-65 kromozomun varlığı ile ya da DNA indeksinin 1.16’dan yüksek olması ile tanımlanmaktadır. Prekürsör B hücreli ALL hastalarının % 20-25’inde görülmekte ve iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir (37). Hiperdiploidi DNA indeksinin

ölçülmesi ile ya da karyotip analizi ile değerlendirilmektedir. Normal karyotipe sahip vakalarda ya da standart sitogenetik analizin başarısız olduğu durumlarda hiperdiploidi interfaz FISH yöntemi ile tespit edilebilmektedir (8). Yüksek hiperdiploidi genellikle klinik iyi prognostik faktörlerin (yaşın 1-10 arasında olması ve düşük beyaz küre sayısı) varlığında meydana gelmektedir ve bağımsız bir prognostik faktördür (38). Hiperdiploid lösemi hücrelerinin apoptoza girmeye meyilli olması ve yüksek miktarda metotreksat/aktif poliglutam metabolitlerini biriktirmeleri bu vakalarda tedavinin iyi bir şekilde sonuçlanmasını açıklayabilmektedir (39). Diğer sitogenetik gruplar ile karşılaştırıldığında, t(12;21)(p13;q22) ile birlikteliğinde daha iyi sonuçlar elde edilmektedir (9). POG (Pediatric Oncology Group) ve CCG (Children's Cancer Group)'ye göre trizomi 4, 10, 17'ye sahip hastalarda tedavi iyi bir şekilde sonuçlanmaktadır (36). POG'de yapılan araştırma sonuçları trizomi 17 durumuna bakılmaksızın trizomi 4 ve 10'a sahip hastaların en iyi prognoza sahip olduğunu göstermiştir (40).

**Hipodiploidi.** 46'dan az kromozom varlığı ile karakterize edilmektedir. B ALL vakalarının %5-8'inde görülmektedir (41). Hipodiploid B ALL'lerin çoğunda 45 kromozom bulunmaktadır. Geriye kalan hipodiploidi vakaları daha nadir olarak yüksek hipodiploidi (40-45), düşük hipodiploidi (30-39) ve near haploid (25-29) gruplardır (9). <40 kromozom genellikle zayıf prognoz ile ilişkilendirilmektedir. B ALL vakalarında near haploid ve düşük hipodiploidi için 3 yıllık olaysız sağkalım oranı %30 civarında olmaktadır (42). Hipodiploid vakalarda duplikasyonla yeniden hiperdiploid karyotip oluşması maskelenmiş hipodiploid ALL olarak adlandırılmaktadır ve bu durumun doğru genetik sınıflandırmayı ve uygun tedavi dozunu engellediği ifade edilmiştir (43).

Near haploidi ve düşük hipodiploidi pediyatrik ALL'lerin %1'inden daha azında meydana gelmektedir. Her iki anomali de yüksek risk ile ilişkilendirilmektedir (9). Near haploid ALL vakalarında Ras (Rat sarcoma) ve reseptör tirozin kinaz sinyal yolağı ile aynı zamanda Ikaros gen ailesindeki genler değişime uğramaktadır. Düşük hipodiploidi vakalarında *P53*, *RBI* (Retinoblastoma 1) ve *IKZF2* (Ikaros family zinc finger 2) genlerinde değişimler görülmüştür. Hem near haploid hem düşük hipodiploid ALL vakalarında Ras ve PI3K (fosfatidilinositol 3 kinaz) sinyal yollarında aktivasyon görülmektedir. Bu değişimlerin hücreleri rapamycin gibi PI3K inhibitörlerine karşı hassaslaştırdığı ve bu nedenle bu inhibitörlerin tedavide kullanılabileceği ifade edilmektedir (44).

## 2.1.6. DİĞER PROGNOTİK FAKTÖRLER

**t(1;19)(q23;p13.3).** Bu translokasyon ile 19p13'deki *TCF3* (transkripsiyon faktörü 3) geninin transaktivasyon bölgeleri ile 1q23'deki *PBX1* (pre B cell leukemia homeobox 1) geninin DNA bağlanma bölgesi arasında *TCF3-PBX1(E2A-PBX1)* füzyon geni oluşmaktadır (45). Çoğunlukla pre B ALL hastalarında meydana gelmekte ve bütün pediyatrik ALL hastalarının yaklaşık %6'sında görülmektedir. t(1;19) translokasyonuna sahip hastalar diğerlerine göre yüksek beyaz küre sayısına sahiptir. t(1;19) önceleri kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, yoğun tedavi protokollerinin uygulanması ile günümüzde daha iyi prognoz elde edilebilmektedir (10).

**IGH@ translokasyonları.** Kromozom 14q32'de immünoglobülin ağır zinciri lokusunda bulunan IGH@ yeniden düzenlenmeleri B ALL de %5'in altında bir sıklıkta nadir olarak meydana gelmekte ve zayıf prognoz ile ilişkilendirilmektedir (46). En sık görülen IGH partnerleri Xp22.3/Yp11.3'de bulunan PAR1 (pseudoautosomal region 1) bölgesindeki *CRLF2* (cytokine receptor like factor 2), 6p22'deki *ID4* (inhibitor of DNA binding 4) ve *CEBP* (CCAAT enhancer binding protein) ailesi üyeleridir (47). IGH ve *EPOR* (erythropoietin receptor) arasındaki translokasyonlar sporadik olarak görülen diğer translokasyonlar olarak rapor edilmiştir (46).

**iAMP21 (intrachromosomal amplification of chromosome 21).** iAMP21, 21. kromozomda *RUNX1* geninin üç ya da daha fazla kopyasının varlığı olarak tanımlanmaktadır (48). iAMP21, pediyatrik B ALL hastalarının yaklaşık %2'sinde meydana gelmektedir ve standart tedavi uygulandığında zayıf prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Aynı zamanda bu hastalar erken ve geç relaps için risk artışına sahiptirler (49). 5 yıllık olaysız sağkalım yaklaşık % 29 ve genel sağkalım %71 oranındadır (50). Son çalışmalar iAMP21 anomalisi olan hastalarda yüksek risk protokolü ile tedavi sonucunda daha iyi bir prognoz elde edildiğini göstermiştir (51). iAMP21 anomalisi olan çocukların %35'inde meydana gelen bir başka anomali de PAR1 bölgesindeki bir delesyon sonucunda oluşan ve *CRLF2* geninin aşırı ekspresyonu ile sonuçlanan *P2RY8-CRLF2* füzyonudur (47). *IKZF* (Ikaros family zinc finger), *CDKN2A* (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A), *PAX5* (paired box 5), *ETV6* (Ets variant 6) ve *RBI* genlerini etkileyen anomaliler ile X kromozomu kazanımı iAMP21 ile ilişkilendirilmektedir (49).

***BCR-ABL1 benzeri ve BCR-ABL1+(Ph<sup>+</sup>) B ALL'de IKZF1 mutasyonları.*** *BCR-ABL1* benzeri B ALL, Ph<sup>+</sup>B ALL'ye benzer bir gen ekspresyon profili göstermektedir ancak *BCR-ABL1* yeniden düzenlenmesi bulunmamaktadır (52). Bu vakalar pediyatrik B ALL'lerin %15'inde görülmekte, kötü prognoz ve artmış relaps riski ile ilişkilendirilmektedir (53). Lenfoid transkripsiyon faktörü Ikaros'u kodlayan *IKZF1* (Ikaros family zinc finger 1) genindeki delesyonlar ve mutasyonlar Ph<sup>+</sup> B ALL'nin %70'inde ve *BCR-ABL1* benzeri B ALL'nin %40'ında görülmektedir (52). Yapılan son çalışmalarda, tirozin kinaz inhibitörleri ve kemoterapi ile birleştirilmiş bir tedaviye rağmen, *IKZF1* delesyonlarına sahip Ph<sup>+</sup> B ALL hastaları, imatinib tedavisine bakılmaksızın, kötü tedavi sonucu ile ilişkilendirilmiştir. *IKZF1* geninde sık görülen anomalilere ek olarak *BCR-ABL1* benzeri B ALL vakalarının %50'sinden fazlasında *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri ile eş zamanlı olarak *JAK* (Janus Kinase) mutasyonları görülmektedir (54). Genom çaplı asosiyasyon çalışmaları sonucunda *BCR-ABL1* benzeri ALL'de hassasiyet oluşmasını sağlayan ve *CRLF2* yeniden düzenlenmeleri, *JAK* mutasyonları ve *IKZF1* delesyonları ile ilişkili olduğu gösterilen *GATA3* (GATA binding protein 3) ve rs3824662 olmak üzere iki lokus tanımlanmıştır (55).

***JAK mutasyonları ve CRLF2 yeniden düzenlenmeleri.*** Cinsiyet kromozomlarının psödootozomal bölgesinde yerleşmiş bir sitokin reseptör geni olan *CRLF2*'deki değişiklikler B ALL vakalarının %5-10 kadarında meydana gelmektedir (56). *CRLF2*'nin aşırı ekspresyonuna neden olan kromozomal anomaliler *IGH* (immunoglobulin heavy locus) lokusu ile *CRLF2* arasındaki translokasyon ve *P2RY8-CRLF2* füzyonu ile sonuçlanan delesyonlardır (49).

*JAK* gen ailesi, *JAK-STAT* yolağında bulunan *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* ve *TYK2* genlerinden oluşmaktadır (57). *BCR-ABL1* benzeri B ALL'de *JAK* mutasyonları ile eş zamanlı olarak oluşan *IKZF1* ve *CDKN2A/B* değişimleri kötü bir tedavi sonucuyla ilişkilendirilmektedir. Ayrıca Down sendromu ile ilişkili ALL'lerin %60'ında *JAK2* mutasyonları ile *CRLF2* arasında korelasyon tanımlanmıştır (58).

### **2.1.7. TEDAVİ**

ALL'de tedavi, kullanılan tedavi protokollerine ve risk gruplarına göre değişmekle birlikte remisyon indüksiyonu, SSS, konsolidasyon (güçlendirme) ve idame tedavisi olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır.



Remisyon indüksiyonunda amaç lösemik hücrelerin %99'undan fazlasını yok etmek ve normal hematopoezin yeniden başlamasını sağlamaktır (59). Glukokortikoid (prednizolon ya da deksametazon), vinkristin ve üçüncü bir ilaçtan (asparginaz, antrasiklin ya da her ikisi) oluşan kemoterapötikler 4 hafta süre ile uygulanmaktadır. Ancak BFM, SJCRH (St. Jude Children's Research Hospital) gibi protokollerde ve COG yüksek risk prekürsör B protokolünde tedavi dört ya da daha fazla sayıda ilaç ile sürdürülmektedir (8). Modern kemoterapi ve destek tedavisi ile yeni tanı almış pre B ALL hastalarının %97-99'u remisyonla girmektedir. T hücreli ALL hastalarında ve yüksek beyaz küre sayısına sahip hastalarda bu oran daha az olmaktadır (60). Remisyonla girmeyen hastaların yaklaşık yarısı toksisite nedeniyle hayatını kaybederken diğer yarısında da tedaviye direnç gelişmektedir (61).

Konsolidasyon tedavisine, indüksiyon tedavisi sonunda ve normal hematopoez bulguları saptanınca başlanmaktadır. Tedavinin bu bölümünde amaç tüm blastları temizleyerek olası relapsı önlemektir. Modern kemoterapi protokollerinin çoğunda remisyon sağlandıktan hemen sonra yoğun kemoterapi ile erken reindüksiyon programı uygulanmaktadır. Uygulanan kemoterapötikler hastanın risk grubu ve uygulanan tedavi protokolüne göre değişmekle birlikte, kullanılan protokollerin çoğunda kemoterapinin 16-20. haftalarında geç reindüksiyon uygulanmaktadır (62). COG protokolünde yüksek riskli hastalar için ek reindüksiyon fazları tedaviye dahil edilmekte, düşük riskli hastalar için ilaç toksisitesini minimuma indirmek amacıyla bazı aşamalar tedaviden çıkarılmaktadır (8).

Remisyon sağlanan ALL hastalarında relapsların SSS kaynaklı olduğu ve kemoterapötik ilaçların beyin omurilik sıvısına geçmediğinin anlaşılmasının üzerine, SSS'ne yönelik tedavi ALL tedavisinin önemli bir kısmını oluşturmuştur (63). Genel olarak intratekal kemoterapi, SSS'ye yönelik sistemik kemoterapi ve kraniyal radyasyon uygulanmaktadır. Farmakolojik tedavi yanında hem SSS tutulumu olanlar için hem de profilaksi amacıyla ALL'li çocuk hastaların çoğunda yüksek dozlarda radyoterapi uygulanmıştır. Ancak tedavinin geç yan etkilerinin olduğunun anlaşılması ile intratekal kemoterapi tedavisi kraniyal radyasyonun yerini almıştır. Yeni protokollerde radyoterapi yüksek beyaz küre sayısına sahip T hücreli ALL hastaları ve yüksek riskli (yüksek beyaz küre sayısı ve/veya sitogenetik anomaliler ve/veya SSS3 tutulumu) pre B ALL'li hastalar ile sınırlı olmaktadır (35).

İdame tedavisinde amaç remisyonun sürekliliğinin sağlanmasıdır. Yapılan çalışmalar ile idame tedavi süresinin optimum 2-3 yıl arasında olduğu belirlenmiştir. Tedaviye 3 yıldan

daha fazla devam etmenin tedavi sonucuna bir katkı sağlamadığı bildirilmiştir (64). Hastalara 6-merkaptopurin ve metotraksat tedavisi uygulanmaktadır. Birçok protokolde idame tedavisi boyunca SSS için kemoterapi uygulamasına devam edilmektedir. Hem ilaç toksisitesi açısından hem de kemoterapi ajanlarına uyumun belirlenmesi açısından hastaların idame tedavisi boyunca izlenmeleri önemlidir. 6-merkaptopurin ile tedaviye uyum sağlayamayan hastalar artmış relaps riski ile ilişkilendirilmiştir (65).

Bazı klinik çalışmalarda çok yüksek risk grubundaki hastalara allojenik HKHN (Hematopoetik kök hücre nakli) uygulaması, erken kemik iliği relapsı (tedavi altında ya da tedavi sonrası ilk 6 ay içinde) ve erken izole SSS relapsı (tedavinin ilk 18 ayı içerisinde) olanlarda standart bir tedavi yaklaşımı olarak önerilmektedir. *BCR-ABL* pozitif ALL tedavisinde, uygun akraba donörü olan hastalarda HKHN ile hem olaysız sağkalım hem de genel sağkalımda belirgin iyileşme bildirilmiştir. Ancak imatinib'in klinik kullanıma girmesi sonrası elde edilen veriler *BCR-ABL* pozitif ALL tedavisinde HKHN'nin yerini sorgulatmaktadır (66).

#### **2.1.8. TEDAVİYE YANIT**

Tedaviye erken yanıtın değerlendirilmesi prognoz, risk grubu seçimi, tedavinin devamının planlanması (tedavi yoğunluğu, süresi, seçilecek ilaçlar ve tedavi modelleri- HKHN, radyoterapi gibi) açısından önemlidir. Erken yanıtın değerlendirilmesinde farklı gruplar farklı kriterler kullanmaktadır. Örneğin BFM grubu 8. gün steroid yanıtını periferik kandaki blast sayısı ile değerlendirirken, COG 8. gün ve/veya 15. gün kemik iliği morfolojisi dikkate alınarak tanımlanmış olan RER/SER (rapid early response/slow early response: erken hızlı yanıt/erken yavaş yanıt) kullanmaktadır. Ancak induksiyon tedavisinin sonunda (COG için 29. gün) kemik iliği aspirasyonu ile remisyonun değerlendirilmesi ya da günümüzde gittikçe önemini arttıran MRH değerlendirilmesi tüm dünyada ortak yanıt kriterleri olarak kullanılmaktadır (67).

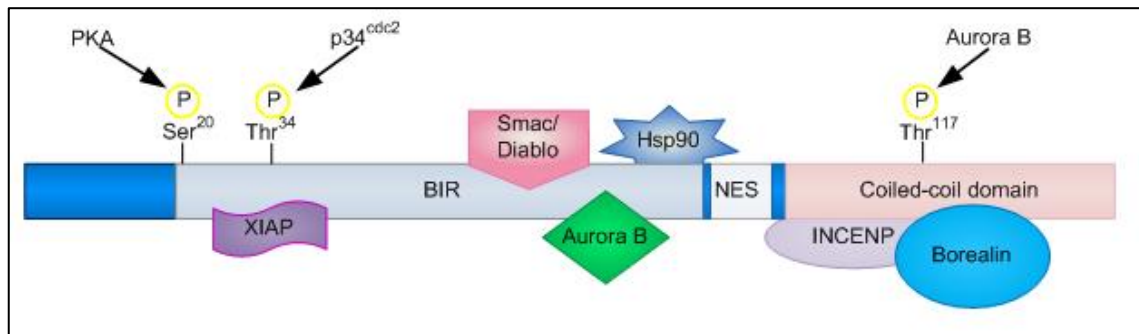
**RER.** 8. günde M1 kemik iliği (M1: kemik iliği lenfoblast oranının %5'in altında olması) ve 29. günde MRH negatifliği ya da 8. günde M2/M3 (M2: kemik iliği lenfoblast oranının %5-25 arasında olması, M3: kemik iliği lenfoblast oranının %25'in üzerinde olması), 15. günde M1 kemik iliği ve 29. günde MRH negatifliği erken hızlı yanıt olarak tanımlanmaktadır (68), (69).

**SER.** 15. günde M2/M3 kemik iliği ya da 29. günde MRH pozitifliği erken yavaş yanıt olarak tanımlanmaktadır (68), (69).

**MRH.** Tedavi sırasında ya da sonrasında, hastalıkla ilgili herhangi bir bulgu olmaması ve klinik ve mikroskopik olarak tam remisyona değeriendirilmesine rağmen lösemik hücrelerin az sayıda da olsa varlığı MRH olarak tanımlanmaktadır. Lösemik hücre düzeyinin % 0.01'in altında olması MRH negatif olarak tanımlanırken, % 0.01 ya da üzerinde olması MRH pozitif olarak tanımlanmaktadır. MRH varlığı hastalığın relapsında rol oynayan en önemli faktörlerden birisidir ve bu nedenle tespit edilmesi son derece önem taşımaktadır (8). Günümüzde MRH tayininde akım sitometrisi ve kantitatif real time PZR gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile rutin olarak  $1/10^4$  oranında lösemik hücre varlığı tespit edilebilmektedir (70).

## 2.2. SURVİVİN GENİ VE PROTEİNİNİN YAPISI

Survivin geni (*BIRC5*: Baculoviral IAP repeat containing 5) 14.5 kb büyüklüğünde olup 17q25.3'de yer almaktadır (71). 4 ekzon ve 3 introndan oluşmaktadır. Proteini 16.3 kDa büyüklüğündedir ve 142 aminoasitten oluşmaktadır. IAP (apoptoz protein inhibitörü) ailesinin en küçük üyesidir, diğer IAP proteinlerinden farklı olarak tek bir BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat) bölgesi içermektedir (72). Bu bölge kaspazları inhibe etme fonksiyonu için gereklidir. Aynı zamanda karboksil ucunda alfa helikal sarılmış sarmal (coiled coil) bölgesi içermektedir. Ancak diğer IAP proteinlerinde bulunan RING (really interesting new gene) finger bölgesi bulunmamaktadır (73) (Şekil 2.1.).



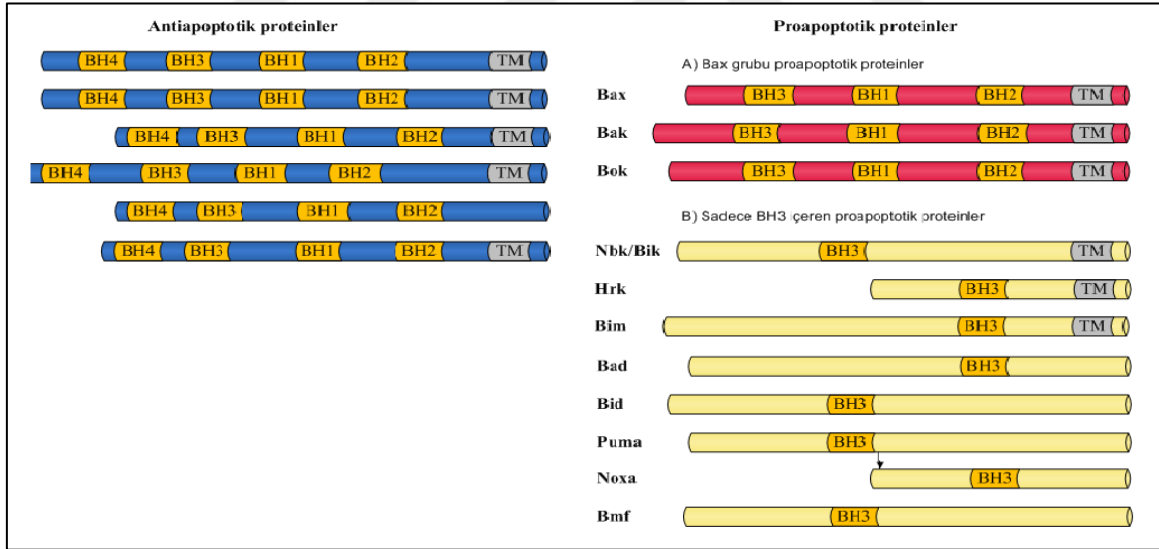
Şekil 2.1. Survivin protein yapısının şematik gösterimi. Fosforilasyon bölgeleri [(Thr34 (p34<sup>cdc2</sup>); Thr 117 (Aurora B), Ser 20 (PKA)], Bilinen proteinlere bağlanma bölgeleri [(Lys15-Met38 (XIAP); Leu64 ve Leu87 (SMAC/DIABLO); Asp70 ve Asp71 (Aurora B); Lys79-Lys90 (Hsp90); Lys112 ve Lys120 (INCENP); Lys110, Lys121 ve Arg132 (Borealin)]. Pennati ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır (74)

## 2.2.1. SURVİVİNİN FONKSİYONLARI

Survivin, IAP ailesinin bir üyesidir. Apoptozda rol oynayan bir protein olarak bilinmesinin yanı sıra mitotik eksen ve mikrotübül dinamiklerini düzenleyerek hücre bölünmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Otofaji ve DNA tamirinde görev aldığı gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (75).

### 2.2.1.1. Survivin Apoptozdaki Rolü

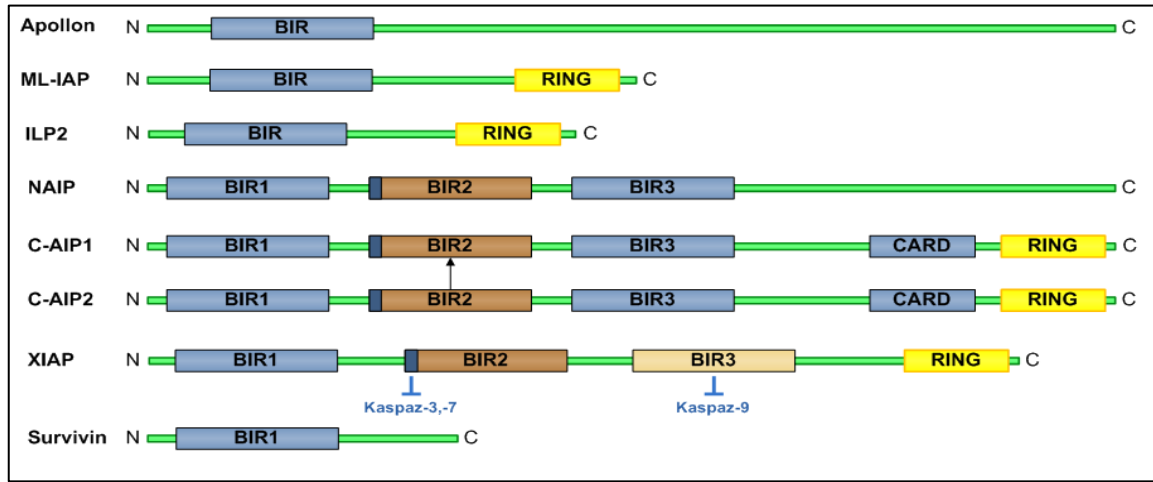
Hücre ölümünün programlı bir şekilde kontrol edildiği, doku homeostasisi için önemli bir süreç olan apoptoz ekstrinsik (ölüm reseptörleri) ve intrinsik (mitokondriyal) olmak üzere iki farklı yolak ile gerçekleşmektedir (76). Kaspaz aktivasyonu her iki yolak için de esansiyeldir. İntrinsik yolda bulunan anahtar düzenleyicilerin birçoğu Bcl-2 (B cell lymphoma 2) ve IAP ailesine aittir. Bcl-2 ailesi üyeleri BH (Bcl-2 homology) bölgelerinden en az birini içermeleri ile karakterize edilmekte ve birbirine zıt etkili proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerden meydana gelmektedir (Şekil 2.2.) (77).



Şekil 2.2. Bcl-2 ailesi proteinlerinin şematik gösterimi. Taylor ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır (78)

IAP, intrinsik yolda düzenleyici rol oynayan diğer bir protein ailesidir. IAP ailesi üyeleri, sayıları 1-3 arasında değişen ve antiapoptotik fonksiyon için gerekli olan BIR bölgesini içerirler. Birçok IAP'nin karboksil ucunda RING bölgesi bulunurken, bazılarında CARD (caspase recruitment domain) bölgesi bulunmaktadır (79). Bu ailenin iyi tanımlanmış üyeleri XIAP (X chromosome linked IAP), cIAP1 (cellular IAP1), cIAP2 (cellular IAP2), BIRC6 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 6) (Bruce/Apollon), ML-IAP

(melanoma IAP), ILP2 (IAP like protein 2), NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) ve survivindir (80) (Şekil 2.3.).

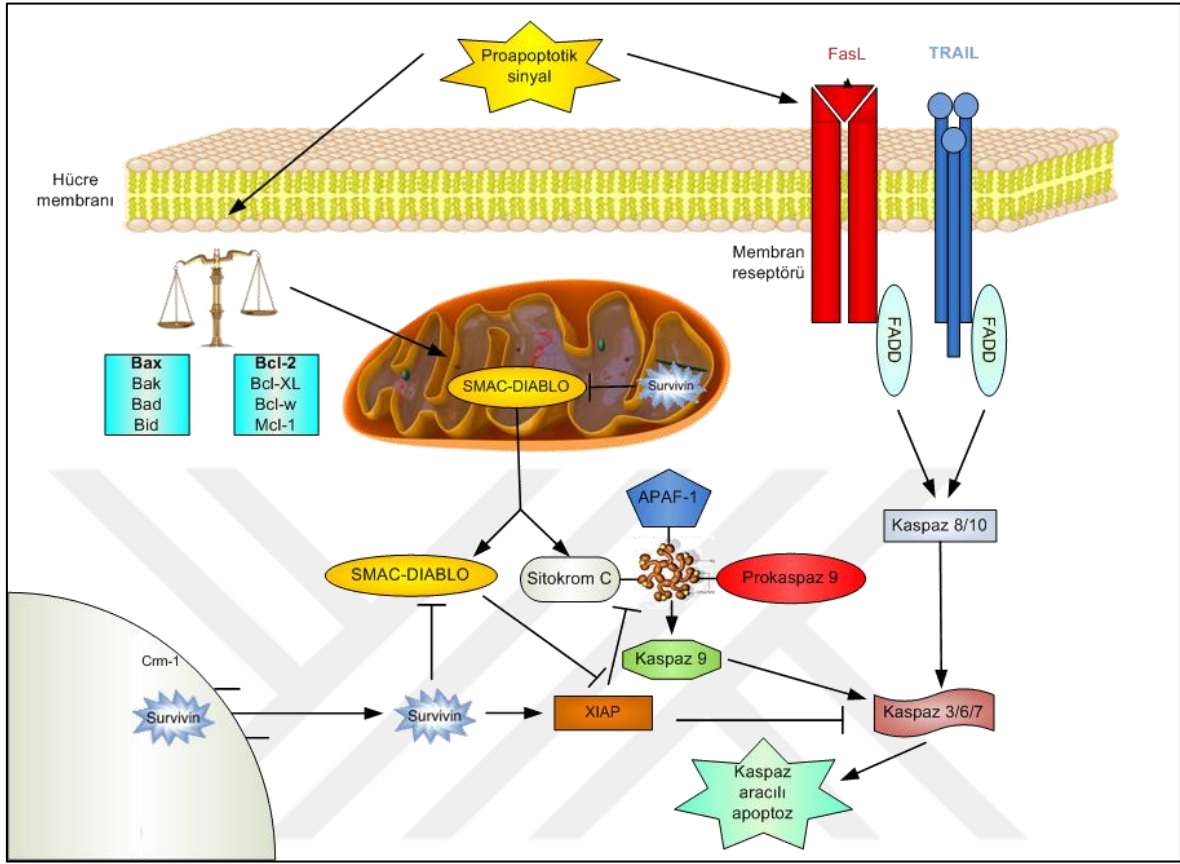


Şekil 2.3. IAP ailesi proteinlerinin şematik gösterimi. NAIP, c-IAP1, c-IAP2 ve XIAP'de BIR2 bölgesinin önünde bulunan bağlayıcı peptid kaspaz 3 ve kaspaz 7'yi, XIAP'deki BIR3 bölgesi ise kaspaz 9'u inhibe etmektedir. Mobahat ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır (77)

Ekstrinsik yolak TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) ve FasL (Fas ligand) gibi ligandların hücredeki reseptörlerine bağlanması ile aktive edilir. Başlatıcı kaspazlar olan prokaspaz 8 ve 10'un kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktif hale getirmesiyle hücrede yıkım süreci başlamaktadır. İntrinsik yolakda ise kemoterapi ve iyonize radyasyon gibi uyarılar hücrede proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin oranını etkilemekte, sitokrom c mitokondriden salınmakta, APAF1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ve kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom yapısı meydana gelmektedir. Apoptozom oluşumuyla aktif olan kaspaz 9, kaspaz 3 ve 7'yi aktif hale getirmekte ve hücredeki yıkım başlamaktadır (77).

Daha önce yapılan çalışmalar survivinin diğer IAP ailesi üyeleri gibi aktif kaspaz 3, kaspaz 7 ve kaspaz 9'a doğrudan bağlanarak fonksiyonlarını engellediğini göstermiştir (81). Fakat bu durum survivinin kaspazlara bağlanmayı sağlayan yapısal bölgelerden yoksun olması nedeni ile yeteri kadar açıklayıcı olmamaktadır (77). Son çalışmalar survivinin XIAP (X linked IAP) ile etkileşime girdiğini ve XIAP'nin kaspaz 9'u inhibe etmek için stabil kalmasını sağlayarak apoptozu önlediğini göstermiştir. Ayrıca survivinin apoptozom oluşumunu engelleyerek kaspaz 9 aktivasyonunu baskılamak için HBXIP (hepatitis B virus X interacting protein) ile etkileşimde bulunduğu gösterilmiştir (82). Bütün bu bilgiler ışığında survivinin apoptozu inhibe etmesinde, kaspazlara direkt bağlanması yerine diğer

moleküller ile işbirliği içerisinde olduğu hipotezi daha fazla kabul görmektedir (83) (Şekil 2.4.).



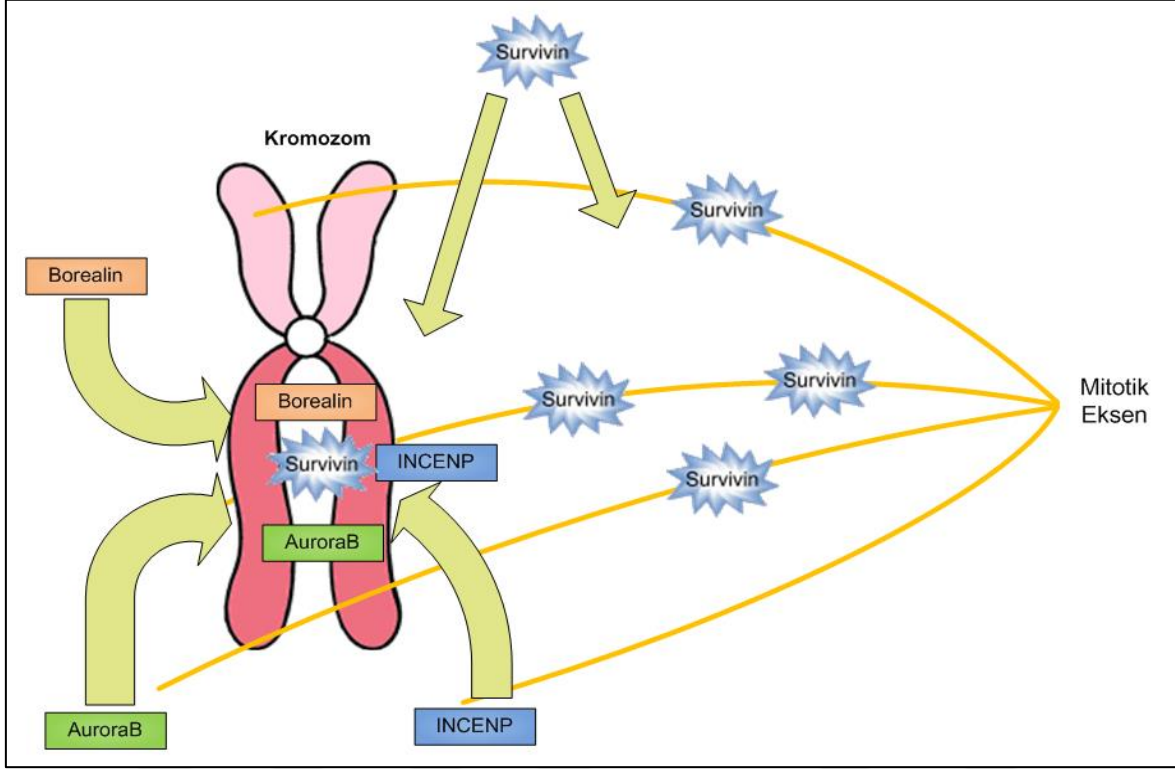
Şekil 2.4. Survivin'in apoptoz inhibitörü fonksiyonu (83)

### 2.2.1.2. Survivin'in Hücre Bölünmesindeki Rolü

Survivin, mitozun düzenlenmesinde anahtar bir yapı olan CPC (chromosomal passenger complex)'nin bir bileşenidir. İğ iplikçiklerinin oluşumu ve sitokinezin tamamlanması için survivin'in INCENP (inner centromere protein), Aurora B (84) ve Borealin/Dasra B (85) proteinleri ile fiziksel iletişimi gereklidir. Survivin, hücre döngüsünün G2/M fazında fosforillenmiş histon H3'e bağlanmakta ve mitotik kinaz Aurora B'yi aktif hale getirmektedir (86). CPC ve Auroranın, survivin'in BIR bölgesi vasıtasıyla etkileşimi mitozun tamamlanması için kritik bir süreçtir.

Genomun korunması ve mikrotübül dinamiklerinin kontrolü gibi fonksiyonları, survivin'in mitoz boyunca hücre döngüsü bağımlı bir şekilde transkripsiyonunu, posttranslasyonel düzenlemeler olarak da p34<sup>cdc2</sup> (87) ve Aurora B kinazlar ile fosforilasyonu ve ubiquitinasyonunu gerektirmektedir (88). Ayrıca, survivin'in mikrotübüller ile etkileşiminin mitozun başında bozulması onun antiapoptotik fonksiyonlarının kaybı ve kaspaz 3

aktivitesinin artması ile sonuçlanmaktadır (89). Bu sonuçlar survivinin kanser hücrelerinde yalnızca apoptozu inhibe etmediğini aynı zamanda proliferatif aktiviteyi arttırdığını göstermektedir (90) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Survivin'in mitozdaki fonksiyonu. Mita ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır (83)

### 2.2.1.3. Survivin'in Otofajideki Rolü

Yapılan çalışmalar survivinin otofaji ile de ilişkili olduğunu göstermiştir. Apoptoz indükleyici TRAIL'a cevap olarak insan glioma hücrelerinde otofaji düzenleyicisi Beclin 1 ve survivin arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir (91). Daha sonra CCL2'nin (chemokine (C-C motif) ligand 2) PC3 prostat kanser hücrelerini otofajik hücre ölümünden PI3K-AKT survivin yolağı ile korumakta olduğu gösterilmiştir (92). Birlikte ele alındığında bu çalışmalar survivin ekspresyon artışının otofajiyi inhibe ettiğini bunun yanında survivin ekspresyonunun azalmasının ise otofajiyi ilerlettiğini göstermiştir (75).

### 2.2.1.4. Survivin'in DNA Tamir Mekanizmasındaki Rolü

Survivin'in mitoz, apoptoz ve otofajinin yanında DNA tamir mekanizmasında da yer aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Sahip olduğu NES (nükleer export sinyali) sayesinde çekirdek ve sitoplazma arasında mekik dokumakta ve sitoplazmaya CRM1 (Chromosome

region maintenance 1) yapısı vasıtasıyla geçmektedir. Çekirdeğe geçmesi ile DNA tamir mekanizmasının NHEJ (Nonhomologous end joining) yolağında görev yapan Ku70 (ATP dependent DNA helicase II 70 kDa subunit) ekspresyonu artmakta ve kanser hücrelerinin DNA çift zincir kırıklarının tamir yetenekleri artmaktadır (93). Capalbo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada radyasyona maruz kalmayı takiben survivinin DNA-PKcs (DNA dependent protein kinase catalytic subunit), MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), Ku70 ve H2AX (H2A histone family member X) ile kompleks oluşturduğunu göstermişlerdir (94). Ayrıca iyonize radyasyona maruz kalan glioblastoma hücrelerinde survivinin, DNA-PKcs, MDC1, Ku70 ve H2AX ile birlikte lokalizasyonu gösterilmiştir (95).

### 2.2.2. SURVİVİN VARYANTLARI

Alternatif ayıklanma ile survivin öncül-mRNA (pre-mRNA)'sından 5 farklı mRNA oluşmaktadır. Bu transkriptlerden yaban tip survivin, survivin 2B, survivin  $\Delta$ Ex3, survivin 3B ve survivin 2 $\alpha$  olmak üzere fonksiyonel olarak birbirinden farklı 5 protein sentezlenmektedir.

**Yaban tip survivin.** *BIRC5* geni 14.5 kb büyüklüğünde olup 17q25.3'de yer almaktadır. 4 ekzon ve 3 introndan oluşmaktadır. Proteini ise 16.3 kDa büyüklüğündedir ve 142 aminoasitten oluşmaktadır. Antiapoptotik özelliindedir (Şekil 2.6.) (72).

**Survivin  $\Delta$ Ex3.** İlk olarak Mahotka ve arkadaşları tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır. Ekzon 1, 2 ve 4'den oluşmaktadır.  $\Delta$ Ex3 proteininin molekül ağırlığı 15.9 kDa'dır ve 137 aminoasitten oluşmaktadır (Şekil 2.6.). Karboksil ucunda 81-91 aminoasitleri arasında nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içermektedir. Hücre bölünmesinin G1 ve G2 fazları boyunca çekirdekte (%56), sitoplazmada (%22) ve daha azı ise mitokondri de bulunmaktadır.

Renal hücre karsinoması, gastrik karsinoma, medulloblastoma gibi birçok malignenside survivin  $\Delta$ Ex3'ün aşırı düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir. Proliferasyon ve apoptoz inhibisyonunda görev alırken yaban tip survivin ile heterodimerize olmaktadır. Yaban tip survivinin,  $\Delta$ Ex3 ile heterodimerizasyonunun mitokondri bağımlı apoptozun inhibisyonunda esansiyel olduğu ve birlikte yerleşimlerinin yaban tip survivinin antiapoptotik fonksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (96). Yapısal ve fonksiyonel olarak KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) tarafından oluşturulan VIAP (Viral inhibitor of apoptosis protein) ile çok benzerdir. Her iki protein de de kesintiye uğramış bir BIR bölgesi, MTS (mitochondrial



targeting signal) ve BH2 bölgesi bulunmaktadır.  $\Delta$ Ex3'nin antiapoptotik fonksiyon sırasında Bcl-2 ve aktif kaspaz-3 ile etkileşime girdiği ve  $\Delta$ Ex3'ün kanser hücresinin genotoksik tedavilere karşı hassasiyetinin artırılması için Chk2 (checkpoint kinase 2) tarafından fosforile edildiği bildirilmiştir (97).

**Survivin 2B.** İlk olarak Mahotka ve arkadaşları tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır. Tüm ekzonlara ilaveten ekzon 2B olarak tanımlanan ve aslında intron 2'nin eklenmesi ile oluşmuş 69 bp'lik kriptik bir ekzon daha içermektedir. Proteini 18.5 kDa'dır ve 165 aminoasitten oluşmaktadır (Şekil 2.6) (98). Kesintiye uğramış bir BIR bölgesi içerdiğinden dolayı antiapoptotik özelliğinin azaldığı düşünülmektedir (99). Proteinin büyük bir bölümünün sitoplazmada (%52) ve diğer kısımlarının çekirdek (%22) ve mitokondride (%13) yerleştiği gösterilmiştir (96).

Ling ve arkadaşları tarafından survivin 2B'nin potansiyel proapoptotik bir molekül olarak rol oynadığı, yaban tip survivinin antiapoptotik özelliklerini azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda yaban tip survivin gibi mitokondride yerleşebilmenin yanısıra MTOC (mikrotübül organize edici bölge)'deki  $\gamma$ -tubulin ile etkileşime girerek tubulin polimerizasyonunu etkilediği gösterilmiştir (100). Survivin 2B ekspresyonunun benign lezyonlarda malign lezyonlara göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (101). Bu durum tümör farklılaşması ve invazyon ile ters bir korelasyon göstermektedir. Ek olarak Islam ve arkadaşları survivin 2B ekspresyonunun bazı nöroblastomalarda baskın olduğunu göstermişler ve iyi prognoz ile ilişkilendirmişlerdir (102). Buna karşın yumuşak doku sarkoması ve akut miyeloid lösemide yapılan çalışmalar artmış survivin 2B ekspresyonunu kötü prognoz ile ilişkilendirmişlerdir (103).

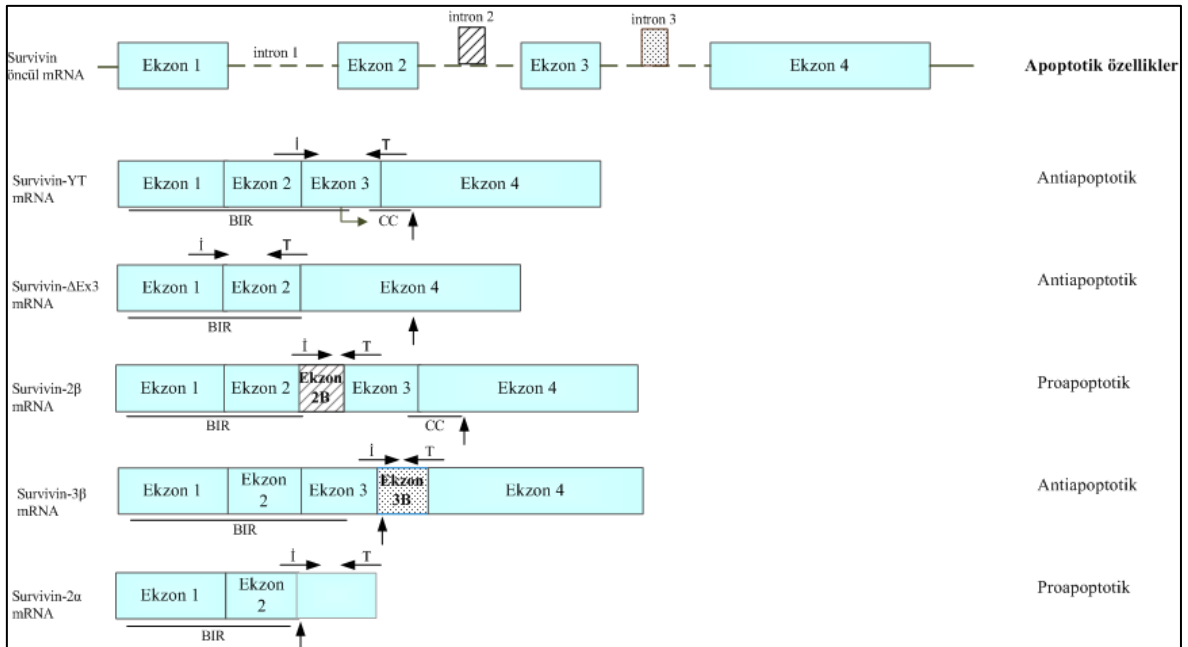
**Survivin 3B.** İlk olarak Badran ve arkadaşları tarafından 2004'de tanımlanmıştır. Tüm ekzonları, aynı zamanda ekzon 3B olarak adlandırılan, intron 3'ün eklenmesi ile oluşmuş kriptik bir ekzon daha içermektedir (104). 3B proteini 12.5 kDa'dır ve 120 amino asitten oluşmaktadır (Şekil 2.6.). Eksiksiz bir BIR bölgesi içermesi ve kaspaz 6 aktivasyonunu engellemesi nedeniyle antiapoptotik özellikte olduğu kabul edilmektedir. NES bölgesi içerdiği ve CPC'nin bir bileşeni olarak hücre bölünmesinde fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (105).

Sawai ve arkadaşları survivin 3B'nin 5 fluorourasil ile muamele edilen kolon kanseri hücrelerinde invazyon inhibisyonunu azalttığını göstermişlerdir 3B'nin baskılanmasının

apoptozda artış meydana getirdiği rapor edilmiştir (106). Ayrıca 3B'nin ektopik ekspresyonu ile kanser hücrelerinin immün sistemin kontrol noktasından kaçarak aktif hale geldiği bildirilmiş, sonrasında yapılan bir çalışma ile de immün sistem dirençliliğinin Fas-FasL ile aktif hale gelen kaspaz 8 ile etkileşim aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (97).

**Survivin 2 $\alpha$ .** Caldas ve arkadaşları tarafından 2005'te tanımlanmıştır. Ekzon 1-2 ve aynı zamanda 197 bp'lik bir intron 2'den oluşmaktadır. Ekzon 3'ten önce stop kodonu içermesi nedeni ile kısaltmaya uğradığından survivinin en küçük varyantıdır. 2 $\alpha$  proteini 74 aminoasitten oluşmuştur. BIR bölgesi kesintiye uğramıştır ve üçüncü alfa heliks yapısı içermemektedir. Survivin antiapoptotik fonksiyonu BIR bölgesi ve karboksil ucundaki sarılmış sarmal bölgesi ile sağlandığından, antiapoptotik özellikte olamayacağı öngörülmektedir (107) (Şekil 2.6.). Bu protein hem sitoplazmada hem de çekirdekte yerleşim göstermektedir. İmmünopresipitasyon çalışmaları 2 $\alpha$ 'nın yaban tip survivin ile fiziksel etkileşimini göstermiştir (97).

Hücre dizilerinde yapılan çalışmalar 2 $\alpha$ 'nın yaban tip survivinin sitoplazmik yerleşimini değiştirdiğini ve antiapoptotik özelliğini azalttığını göstermiştir. Ayrıca malign hücrelerde kemoterapiye dirençli olan tümör hücrelerinin kemoterapiye karşı hassaslaştırılması amacıyla kullanılabileceği ifade edilmiştir (96).



Şekil 2.6. Survivin öncül mRNA'sı ve alternatif ayıklanma ürünlerinin şematik gösterimi. Yatay oklar primer yerleşimlerini (İ: İleri, T: Ters) ve dikey oklar stop kodonlarını göstermektedir. BIR, baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat. CC, coiled coil domain. Pennati ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır (74)

### 2.2.3. TUMÖROGENEZDE SURVİVİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARI

**Survivin ve p53:** Tümör baskılayıcı protein p53 hücre döngüsünün ilerlemesini engellemekte ve p21<sup>cip1</sup>, *GADD45* (growth arrest and DNA damage inducible 45), siklin G ve *BAX* (Bcl-2 associated protein ) gibi birçok hedef genin transkripsiyonunu aktif hale getirerek apoptozu indüklemektedir (108). Birçok çalışma p53'ün survivin ekspresyonunu transkripsiyonel seviyede baskıladığını ve survivinin kısmi fonksiyon kaybının p53 aracılı apoptozda aracılık ettiğini göstermiştir (109) (Şekil 2.7.)(A). Diğer taraftan survivin de p53 ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada akciğer kanseri hücrelerinde survivinin aşırı ekspresyonunun p53 bağımlı apoptozu doz bağımlı bir yol ile engellediği gösterilmiş ve survivinin p53 bağımlı apoptotik yolu düzenlediği öne sürülmüştür (110). Ayrıca, survivinin p53 ekspresyonunu kaspaz3-MDM2 (mouse double minute homolog 2) yapısı ile düzenlediği ve degradasyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Adriyamisin ile muamele edilmiş MCF7 meme kanseri hücrelerinde survivinin aşırı ekspresyonunun hem p53 hem de MDM2 mRNA seviyesini azalttığı bildirilmiştir. Daha sonra yapılan bir çalışma ise MDM2'nin survivin aracılı inhibisyonunun p53'ün degradasyonunda artma ile sonuçlandığını ve böylece survivin aşırı ekspresyonunun p53 protein seviyesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir (111).

**Survivin ve Wnt/ $\beta$ -katenin:** Wnt/ $\beta$ -katenin sinyali meme, kolorektal, akciğer, prostat gibi birçok kanser türünün gelişiminde aktif hale gelmektedir (112).  $\beta$ -katenin tümör geniz boyunca sitoplazmada birikmekte, çekirdeğe geçerek  $\beta$ -katenin/TCF (T cell factor) transkripsiyonel aktivatörünü indüklemektedir. Sonrasında survivin, *cMyc* ve *VEGF* gibi hedef genlerin ekspresyonları artmaktadır (Şekil 2.7.)(B). Artan survivin ekspresyonu, hücreleri apoptozdan korumakta ve hücre proliferasyonunu artırmaktadır (113). Yapılan bir çalışmada herseptin'in meme kanseri hücrelerinde  $\beta$ -katenin degradasyonunu indüklediği ve  $\beta$ -katenin/TCF kompleksi oluşumunu engelleyerek survivin ekspresyonunu baskıladığı rapor edilmiştir.

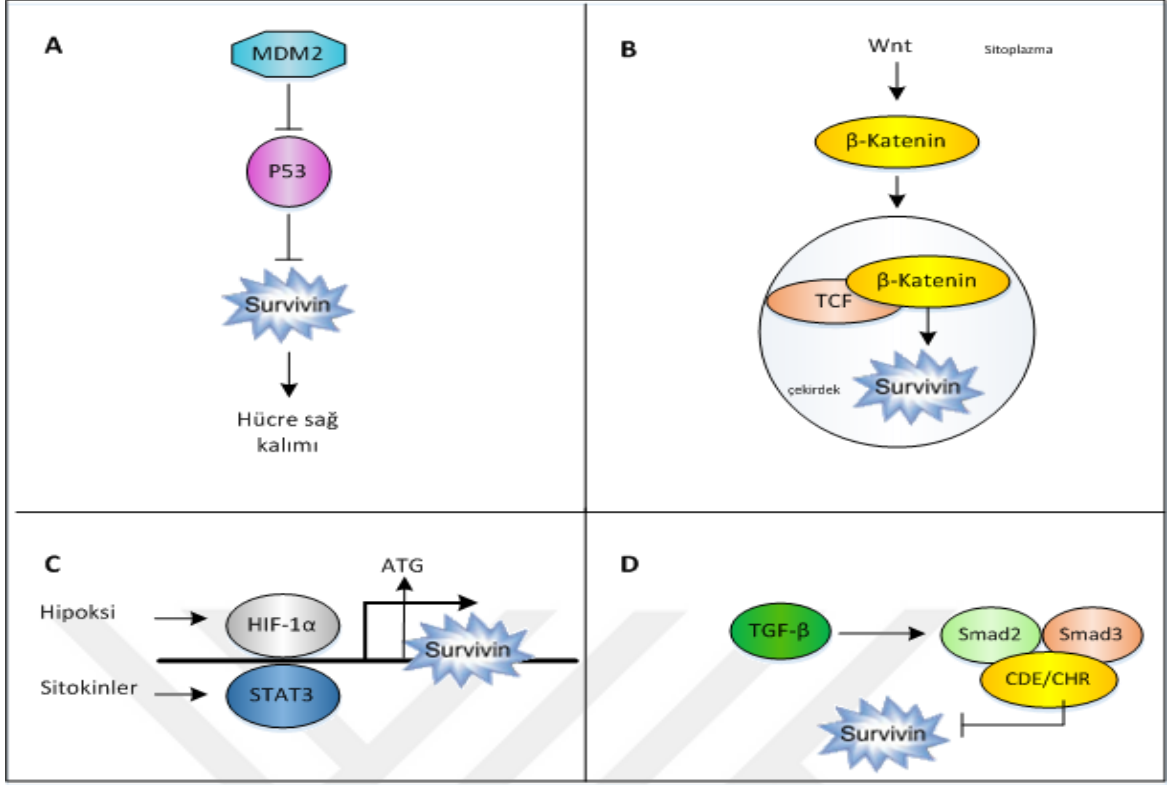
**Survivin ve hipoksi sinyali:** Hipoksik durumlara birçok kanserde sık rastlanmaktadır. Deneysel çalışmalar ve klinik denemeler hipoksinin tümör anjiyogenezi, metastaz ve töröpatik direnç gibi birçok biyolojik sürece katkıda bulunduğunu göstermiştir (114). Hücreler hipoksiye karşı  $\alpha$  ve  $\beta$  dimerik yapısından oluşan HIF-1 transkripsiyon faktörünün indüklemesiyle gen ekspresyon değişikliklerine giderler (115). Hipoksik koşullar altında artan HIF-1 ekspresyonunun transkripsiyonunu aktive ettiği, hücresel fonksiyon için kritik

genlerden biri survivindir. Yapılan bir çalışmada HIF-1 $\alpha$ 'nın survivin promotoruna direk olarak bağlanabildiği ve HIF-1 $\alpha$ 'nın ekspresyonundaki azalmanın pankreas ve meme kanseri hücrelerinde survivin ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (116) (Şekil 2.7.)(C).

**Survivin ve STAT3:** Birçok kanser türünde sitokinler ya da büyüme faktörleri ile aktive edilen STAT3, tümör hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalmasında önemli rol oynamaktadır (117). STAT3 çekirdeğe yerleşebilmekte ve survivin gibi spesifik hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyebilmektedir. Lenfoma hücrelerinde STAT3 sinyali inhibisyonunun, survivinin transkripsiyonel baskılanmasının dahil olduğu bir mekanizma ile apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar ile STAT3'ün survivin promotoruna direk olarak bağlandığı ve ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (118) (Şekil 2.7.).

**Survivin ve Notch sinyal yolağı:** Notch sinyali doku morfogenez için kritik olduğu kadar hücrenin gelişimi, farklılaşması ve hayatta kalması için de önemlidir. Meme, prostat, akciğer kanserlerinin dahil olduğu birçok kanserde bu sinyal yolağında bozulma meydana gelmektedir. KHOAK (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri)'de yapılan bir çalışma ile Notch sinyalinin survivin ekspresyonunu düzenleyebildiği ve HIF-1 $\alpha$ 'in survivinin Notch-1'in aktif formu olan N1ICD (Notch-1 intracellular domain) ile etkileşiminde kofaktör olarak iş gördüğü bildirilmiştir (119).

**Survivin ve TGF- $\beta$  sinyali:** TGF- $\beta$  apoptoz, büyüme, farklılaşma, tümörgezi gibi birbirine zıt hücrel proselerde yer alan çok fonksiyonlu bir proteindir. Son yıllarda survivinin önemli bir negatif düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. TGF- $\beta$ , sinyal efektörleri olan Smad-2 (mothers against decapentaplegic homolog 2) ve Smad-3 ile birlikte tümör hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını kontrol etmektedir (120). Genel olarak TGF- $\beta$  sinyal yolağı survivin ekspresyonunu Smad2, Smad3 ve CDE/CHR (cell cycle dependent element/cell cycle genes homology region) den oluşan bir mekanizma ile baskılamaktadır (Şekil 2.7.)(D).



Şekil 2.7. Tümör genizde survivinin moleküler mekanizmaları. A. Yaban tip p53, survivin ekspresyonunu transkripsiyonel seviyede baskılar, B. Wnt sinyal yolağı aktivasyonu ile sitoplazmada biriken  $\beta$ -katenin çekirdeğe geçerek  $\beta$ -katenin/TCF yapısını oluşturur ve survivinin ekspresyonunun artmasına neden olur, C. HIF-1 ve STAT3 survivin promotörüne doğrudan bağlanır ve survivinin transkripsiyonel aktivatörü olarak çalışır, D. TGF- $\beta$  survivinin negatif düzenleyicisi olarak çalışır. TGF- $\beta$  sinyal yolağı survivin ekspresyonunu Smad 2 ve 3'e bağlı mekanizmalar boyunca transkripsiyonel olarak azaltır. Chen ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır (121)

#### 2.2.4. SURVİVİN GEN EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ

Survivin normal dokularda sentezi ve degradasyonu hücre döngüsü bağımlı bir yolla düzenlenmektedir. Promotor bölgesindeki spesifik diziler ile düzenlenen survivin transkripsiyonu G1 boyunca artmakta ve G2-M fazında 10 kat daha fazla olmaktadır (122). Survivin ekspresyonunun ve fonksiyonunun düzenlenmesi transkripsiyon, ayıklanma, protein degradasyonu ve hücrelerarası sekestrasyonun dahil olduğu çeşitli seviyelerde meydana gelmektedir.

Survivin ekspresyonu transkripsiyonel seviyede NF-kB (nuclear factor kappa B) ile düzenlenmektedir. Ayrıca, IGFI-mTOR (insulin like growth factor -mammalian target of rapamycin) sinyalinin survivin ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (123). Ras onkogen ailesi üyeleri ve antiapoptotik faktör Wnt-2 (Wingless type MMTV integration site family member 2) de survivin ekspresyonunun artmasını sağlayan faktörler arasındadır (124). Diğer

tarafından survivinin transkripsiyonu p53 ve p75 ile baskılanmaktadır (118). Transkripsiyonu takiben survivin mRNA'sının alternatif ayıklanması ile farklı ekspresyon özelliklerine sahip dört izoform oluşmaktadır (125). Survivin degradasyonu hücre döngüsünün G1 fazında ubiquitin proteozom yoluyla gerçekleşmekte, Hsp 90 (heat shock protein 90)'a bağlandığı zaman ise stabil olarak kalmaktadır (126).

### **2.2.5. SURVİVİNİN NORMAL DOKULAR VE TÜMÖR DOKULARINDA EKSPRESYONU**

Survivin ekspresyonu normal dokularda gelişimsel olarak düzenlenmektedir. Farklılaşan birçok dokuda ya hiç bulunmamakta ya da çok düşük seviyelerde mevcut olmaktadır (72). Ancak CD34+ kemik iliği hücrelerinden köken alan kök hücreleri, bazal epitel hücreleri, timositler ve serviks bazal epitel hücreleri gibi hızlı bölünen normal hücrelerde az düzeyde eksprese edilmektedir (71). Yapılan son çalışmalar survivinin embriyonik gelişim, hematopoetik hücre proliferasyonu, T hücre gelişimi, vasküler endotel hücre homeostasisi gibi birçok süreçte fizyolojik bir rolü olduğunu göstermiştir (127). İlginç olarak, survivin yüksek derecede farklılaşmış dokuların bazılarında da rapor edilmiştir (128). Survivin sığınlarda travmatik beyin hasarı sonrası nöral hücre sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir (129). Buna ek olarak, survivin ekspresyonu düşük olan farelerde yapılan çalışmada survivinin böbreğin apoptozdan korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir (130).

Normal dokularda eksprese olmasına karşın, survivinin ekspresyon düzeyi transforme hücrelerde olduğundan daha az olmaktadır. Birçok çalışma survivinin kolon, akciğer, beyin gibi birçok solid tümör tipinde ve hematolojik malignansilerde yüksek düzeyde eksprese olduğunu göstermiştir. Ekspresyonu çeşitli benign ve neoplastik lezyonda tespit edilmiştir (81). Kanseri hücrelerinde yüksek düzeydeki ekspresyonu tümör agresifliği ile ilişkilendirilmektedir. Solid tümör ve hematolojik malignansilerin farklı tiplerinde yapılan çalışmalar yüksek düzeydeki survivin proteininin tümör ilerlemesinde prediktif olabileceğini göstermiştir (131).

Survivin ekspresyonunu düzenleyen birçok mekanizma açıklanmıştır. Normal overlerde survivin geni metilasyon ile susturulmaktadır. Ancak over kanserinde demetile hale gelmekte ve transkripsiyonel olarak aktif olmaktadır (132). p53 gibi transkripsiyonel

faktörlerin çeşitli insan kanseri hücre dizilerinde survivin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (110).

## **2.2.6. HEMATOLOJİK MALİGNENSİLERDE SURVİVİNİN ROLÜ**

Survivin ekspresyonu lenfoma, akut lenfoblastik lösemi, gibi birçok hematolojik malignenside çalışılmış ve aşırı ekspresyonu zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

Carter ve arkadaşlarının 511 AML hastasında yaptıkları çalışmada survivin ekspresyonu kemik iliği hücrelerinde periferik kan lösemik hücrelerine oranla yüksek bulunmuştur. Ek olarak CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>AML kök/progenitor hücredeki survivin seviyesi toplam CD34<sup>+</sup>AML hücresine oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.05) (133).

Bir başka çalışmada, survivin ekspresyonunun HTLV-1 (Human T cell lymphotropic virus type 1) ile ilişkili ATLL (Yetişkin T hücreli lösemi/lenfoma)'li hastalarda prognostik öneme sahip olabileceği öne sürülmektedir. Bu hastalarda kronik formu ile kıyaslandığında hastalığın daha agresif olan akut alt tipinde survivin ekspresyonu yüksek bulunmuştur (134).

Nadir görülen T hücreli lenfomalardan biri olan ABHL (anaplastik büyük hücreli lenfoma) hastalarında yapılan bir çalışmada, survivin ekspresyonu immünohistokimya ile çalışılmış ve sitoplazmik lokalizasyon pozitif bulunmuştur. ALK (anaplastik lenfoma kinaz) negatif hastalar ile kıyaslandığında (%47) ALK pozitif ABHL hastalarının survivini %63 oranında eksprese ettiği görülmüştür. ALK pozitif survivin negatif hastalarda 5 yıllık sağ kalım %100 iken, ALK negatif survivin negatif hastalarda %89 olmaktadır. ALK pozitif survivin pozitif hastalarda ise 5 yıllık sağ kalımın %34 olduğu ifade edilmiştir (135).

Tröger ve arkadaşları 66 pediyatrik akut lenfoblastik lösemi hastasında yaptıkları çalışmada survivinin lösemik hücrelerin %65'inde yüksek oranda eksprese edildiğini bulmuşlardır. Ayrıca survivin aşırı ekspresyonunun yüksek relaps ve ölüm riski ile ilişkili olduğu rapor edilmiş, düşük survivin 2B ekspresyonu ile yüksek risk grubu arasında yakın bir ilişki bulunmuştur (136).

Esh ve arkadaşları pediyatrik akut lenfoblastik lösemide flow sitometri ile yaptıkları çalışmada relapsdaki hastaların remisyonda olanlara oranla çok daha yüksek yaban tip survivin ekspresyonuna sahip olduğunu göstermişlerdir (137).

Nakagawa ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise RT-PZR ve immünohistokimya yöntemleri kullanılmış, ALL ve KLL'de yaban tip survivinin aşırı eksprese olduğu bulunmuştur. Ayrıca survivinin ALL'de çekirdekte KLL'de ise daha çok sitoplazmada yerleştiği ifade edilmiştir (138).

Ahmed ve arkadaşları yetişkin AML hastalarında immunoassay/ELİSA yöntemi ile yaptıkları çalışmada yaban tip survivinin kemik iliği blast hücrelerinde TNF- $\alpha$  geni ve Ph kromozomu varlığı ile pozitif bir korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (139).

Huang ve arkadaşları AML hücrelerinde survivini YM155 ile tek başına ya da diğer kemoteröpatik ajanlar ile etkisiz hale getirmişlerdir (140).

Invernizzi ve arkadaşları survivin ekspresyonunu KMML (kronik myelomonositik lösemi), MDS (Myelodisplastik sendrom) ve diğer myeloproliferatif sendromlarda değerlendirmişler, KMML'de survivin seviyesini MDS ve AML'den daha yüksek bulmuşlardır ( $p<0.0001$ ). Ayrıca KMML ve MDS'de apoptozu normal kontroller ve diğer lösemi alt tipleri ile kıyasladıklarında kayda değer ölçüde yüksek bulmuşlardır. Proliferasyon ise normal kontroller, MDS ve KMML'de birbirinden önemli derecede farklı bulunmamıştır, en düşük seviyeler ise AML ve MPH (myeloproliferatif hastalık)'de rapor edilmiştir ( $p<0.0001$ ). KMML'de survivin ekspresyonu ile blast hücre yüzdesi, apoptoz ve proliferasyon arasında korelasyon gözlenmemiştir (141).

Wagner ve arkadaşları yetişkin ve çocuk AML'de yaptıkları bir çalışmada RT-PZR ile yaban tip survivin, survivin 2B ve survivin  $\Delta$ Ex3'ün ekspresyon düzeylerini araştırmış, yaban tip survivin ve varyantları ile maturasyon evresi, FAB alttipi, immünofenotip ya da sitogenetik risk grupları arasında korelasyon bulmamışlardır. Yetişkin AML'de düşük survivin 2B ekspresyonu genel sağkalım ( $p<0.05$ , ortalama sağkalım zamanı 19 ay-9 ay) ve olaysız sağkalım ( $p<0.01$ , 27  $\leftrightarrow$  10 ay) ile korele bulunmuştur. Çocuk AML'de ise yüksek survivin  $\Delta$ Ex3 ekspresyonu daha kısa genel sağkalım ( $p<0.05$ , 24  $\leftrightarrow$  43 ay) ile ilişkili bildirilmiştir (142).

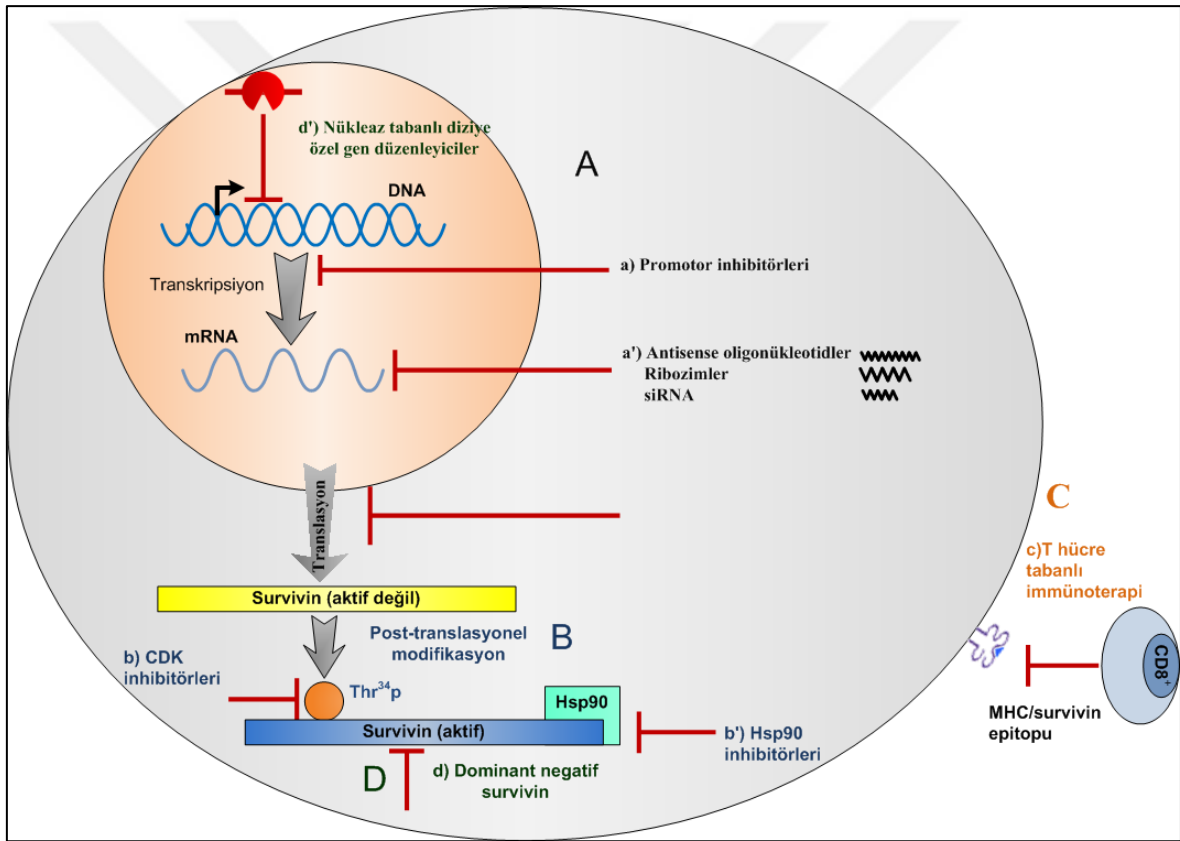
Moore ve arkadaşları tarafından 306 pediyatrik AML hastasında yaban tip survivin, survivin 2B ve survivin  $\Delta$ Ex2 (ekzon 2'nin delesyonu ile oluşmuş, ilk defa araştırmacılar tarafından tanımlanan bir varyant) varyantları çalışılmış ve yaban tip survivinin bütün hastalarda eksprese olduğu görülmüştür. Buna rağmen yaban tip survivin ekspresyonu klinik sonuç ile uyumlu bulunmamıştır. Yüksek survivin 2B/survivin  $\Delta$ Ex2 oranı ( $\geq 1$ ) artmış WBC sayısı,



monositik fenotip, +8 sitogenetik, düşük complete remisyon ve yüksek indüksiyon başarısızlığı ile uyumlu bulunmuştur. Zayıf indüksiyon cevabı ile tutarlı olarak survivin 2B/ $\Delta$ Ex2 oranı  $\geq 1$  olanlar, 5 yıllık sağkalım oranları (genel sağkalım %36-60,  $p$ : 0.011; olaysız sağkalım %23-53,  $p$ : 0.001) ve artmış relaps riski ( $p$ : 0.056) ile de uyumlu bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda klinik cevabın survivin  $\Delta$ Ex2'den daha çok survivin 2B'den kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (143).

## 2.2.7. SURVİVİNE YÖNELİK TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Survivini kanser tedavisinde hedef olarak kullanmak için birçok araştırma yapılmıştır (144). Bu çalışmalar dört ana gruba ayrılarak incelenebilir (Şekil 2.8.):



Şekil 2.8. Survivini hedefleyen farklı stratejiler. A. Survivin transkripsiyonunu hedef alan inhibitörler: promotor inhibitörleri (a), antisense oligonükleotidler, ribozimler ve siRNA'lar (a'), B. Survivinin post-translasyonel seviyede inhibisyonu: CDK inhibitörleri (b), Hsp90 inhibitörleri (b'), C. İmmünoterapi: CD8+ T lenfositlerin spesifik survivin epitoplarına karşı sitotoksik aktivitesine dayanan aşılar (c), D. Dominant negatif survivin mutantları ile survivin fonksiyonunu engelleyen gen terapisi yaklaşımları (d), nükleaz bazlı genom düzenleyiciler (d'). Mobahat ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır (77)

### 2.2.7.1. Transkripsiyonel İnhibitörler

**Promotor inhibitörleri.** YM155, düşük ağırlıklı antagonist moleküller içerisinde gittikçe artan bir öneme sahiptir. Akciğer ve kolon gibi farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalarda survivinin promotor aktivitesini ve sonrasında ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca prostat kanseri ve lenfoma ksenograft modeller kullanarak yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (145). YM155'nin hormon dirençli prostat kanseri hastalarında dosetaxel ve prednisolone ile uygulanabilirliği için yapılan çalışma faz I, DBBHL (diffuz büyük B hücreli lenfoma) ve melanoma hastalarında yapılan çalışma ise faz II aşamasındadır (77).

**Antisense oligonükleotidler.** Hedef genin RNA dizisine hibridize olarak ekspresyonunu baskılayan kısa, tek iplikli RNA ya da DNA dizileridir. İlk olarak Grossman ve arkadaşları, survivin antisense oligonükleotid transfeksiyonunun insan melanoma hücre dizisinde apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir (146). Akciğer, tiroid, sarkoma ve lenfoma gibi farklı tümör tiplerinden elde edilen hücre dizilerinde de uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Kimyasal olarak sentezlenen küçük oligonükleotidler şeklinde ya da ekspresyon vektörleri ile hücreye aktarılan antisense oligonükleotidlerin, survivin mRNA'sını inhibe ederek hücre proliferasyonunda azalmaya yol açtığı, aynı zamanda kaspaz bağımlı apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (74). Ayrıca, survivinin antisense oligonükleotid aracılı ekspresyon azalmasının tümör hücrelerini TRAIL (147), cisplatin (148), taxol (149), imatinib (150) ve etoposide (148) gibi sitotoksik ilaçlara ve iyonize radyasyona karşı hassaslaştırdığı gösterilmiştir. Antisense oligonükleotidlerin kullanımı ile ilgili umut veren çalışmalara rağmen, hedeflenen mRNA'nın etkin olarak parçalanamaması ve *in vivo* ortamdaki instabilitesi bu yöntemin dezavantajları arasındadır. Bu olumsuzluklarına rağmen ilk antisense oligonükleotid LY2181308'in ileri kanserli hastalarda faz 1 aşaması tamamlanmış ve faz II aşamasına geçilmesi planlanmaktadır (151).

**Ribozimler.** Survivin inhibisyonu için antisense oligonükleotidlere alternatif olarak tasarlanmış olan ribozimler, hedef RNA'yı endonükleolitik aktivite ile etkisiz hale getirmektedir. En yaygın çalışılanları çekiçbaşı ribozimlerdir (152). Meme ve prostat kanserlerinden elde edilen hücre dizilerinde RZ1 ve RZ2 ile PC-3 ve DU145 ribozimleri ile yapılan çalışmalarda survivin ekspresyonunun önemli derecede azaldığı ve aynı zamanda apoptozun indüklendiği rapor edilmiştir. Melanoma hücre dizisi JR8'de yapılan bir çalışmada ise transfekte klonların parental hücrelerden daha düşük survivin düzeyine sahip

oldukları gösterilmiştir (153). Aynı zamanda bu hücrelerde radyasyon (154) ile cisplatin (155) ve topotecan (156) gibi sitotoksik ajanlar ile yapılan tedavide kaspaz 9 bağımlı apoptotik cevabın artmış olduğu bildirilmiştir. Ribozimlerin dezavantajları kolaylıkla degrade olmaları ve hücre trafiğinde değişikliklere neden olmalarıdır. Henüz klinik deneme aşamasında olan bir ilaç bulunmamaktadır (77).

**siRNA (small interfering RNA)'lar.** siRNA'lar gen ekspresyonunu inhibe eden kısa, çift iplikli RNA molekülleridir. İlk olarak Carvalho ve arkadaşları survivin inhibisyonu için HeLa hücrelerinde RNAi (RNA interferans) kullanmışlardır. siRNA'lar ile transfeksiyondan 60 saat sonra kültürde survivin tespit edilmemiş ve survivinin olmadığı bu hücrelerde mitozun geciktiği ve kromozomların yanlış hizalandığı görülmüştür (157). Farklı tümör hücreleri ile ilgili yapılan çalışmalarda survivinin RNAi aracılı baskılanması ile tümör hücresinin proliferasyonunun azaldığı ve kaspaz bağımlı apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (158). Survivin ve varyantlarıyla ilgili yapılan bir çalışmada yaban tip survivinin ekspresyonundaki azalmanın, mesane kanseri hücrelerinin radyosensitivitesinde önemli bir artışa sebep olduğu ancak survivin  $\Delta$ Ex3 ve 2B varyantlarının siRNA aracılı inhibisyonunun tümör hücrelerinde kemosenitivite artışıyla sonuçlanmadığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise cisplatin, gemcitabin ya da mitomycin C'ye maruz bırakılan hücrelerde bütün survivin varyantlarının inhibe olduğu ve bu durumun hücrelerin yaşamlarını sürdürme potansiyelinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (159).

#### 2.2.7.2. Post-translasyonel İnhibisyon

**Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri.** Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, survivinin antiapoptotik aktivitesi için kritik bir öneme sahip olan, Thr<sup>34</sup> rezidüsünden fosforilasyonunu engelleyerek survivini etkisiz hale getirmekte ve yıkımını sağlamaktadır. Ayrıca flavopiridol ve purvalonol A gibi CDK (siklin bağımlı kinaz) inhibitörlerinin mitotik bir inhibitör olan taxol ile birlikte uygulandığında, HeLa hücrelerinde survivin ekspresyonunu engelleyerek apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (160).

**Hsp90 inhibitörleri.** Hsp90-survivin kompleksini inhibe etmeye yönelik gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, survivin Lys79-Leu87 dizilerinden oluşan ve hücre içine kolaylıkla geçebilen shepherdin molekülü tanımlanmıştır. Shepherdin'in Hsp90 ile etkileşimde bulunan Akt, CDK6 (siklin bağımlı kinaz 6) ve telomeraz gibi moleküllerin de stabilizasyonunu engellediği bildirilmiştir (161). Ayrıca shepherdin'in meme ve prostat gibi

farklı kanser türlerinde kaspaz bağımlı olan ve olmayan hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (162). Shepherdin ile ilgili ön klinik faz çalışmaları devam etmektedir (77).

### **2.2.7.3. İmmünoterapi**

Survivin proteinini immünoterapi ile inhibe etmek amacıyla *in vivo* ve *in vitro*'da ön çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar ile sitotoksik T lenfositlerin (CD8+) spesifik survivin epitoplarına karşı sitolitik bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bilgi lenfoma ve pankreas kanserleri fare modellerinde yapılan araştırmalar ile doğrulanmış ve survivini temel alan antikanser aşı çalışmaları, en güçlü immünodominant T hücre reaksiyonu sağlayabilecek epitop arayışına odaklanmıştır. Önemli bir toksisiteye rastlanmaması yöntemin avantajları arasındadır. Bu aşuların birçoğu faz I ya da faz II aşamasında bulunmaktadır (77).

### **2.2.7.4. Gen Tedavisi**

Survivini gen tedavisi ile etkisiz hale getirmek için dominant negatif moleküller yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk olarak sistein aminoasitinin alanin ile değiştirilmesiyle (Cys84Ala/C84A) elde edilen survivin dominant negatif mutant molekülü melanoma hücrelerine transfekte edilmiş ve bu hücrelerde apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (146). Bununla birlikte hücrelerin cisplatin ve 5-florourasil gibi kemoteropatik ilaçlara karşı duyarlılığının arttığı bildirilmiştir (163). Treonin aminoasitinin alanin ile değiştirilmesiyle elde edilen ikinci bir dominant negatif mutant molekül (Thr34Ala/T34A) daha tanımlanmıştır. Akciğer, meme, servikal, prostat, kolorektal gibi birçok kanser türünde fosforile olmayan T34A mutant survivin taşıyan adenovirüs vektörü ile transdüksiyona uğrayan hücrelerde survivin, CDK2-siklin B1 tarafından fosforile edilememiş, survivin-kaspaz 9 kompleksinde ayrılma meydana gelmiştir. Apoptozu indüklemesinin yanısıra, T34A molekülünün tümör hücrelerinde anjiyogenezi baskıladığı gösterilmiştir (164).

Son zamanlarda nükleaz tabanlı ve diziye özel “gen editing” tekniklerini içeren çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. ZFN (Zinc finger nuclease), TALEN (Transcription activator like effector nuclease) ya da CRISPR/Cas (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat) gibi nükleazlar normal hücrelere minimum etki gösterirken, kanser hücrelerinde survivinin etkisiz hale getirilmesinde başarılı olmaktadır (77).

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Survivin (*BIRC5*) gen ekspresyonu embriyonik gelişim sırasında artmakta fakat normal erişkin dokularda ekspresyonu yok denecek kadar az düzeylere inmektedir. Yapılan çalışmalarda survivin ekspresyonunun normal dokulara oranla akciğer, meme, kolon kanseri gibi solid tümörlerin yanında lösemilerin de dahil olduğu hematolojik malignensilerde aşırı düzeyde arttığı bulunmuştur. Bu sebeple prognostik bir belirteç ve terapötik bir hedef olarak kullanılıp kullanılmayacağı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Survivin proteininin aynı transkripsiyon ürününün alternatif ayıklanması ile sentezlenen ve apoptotik/proapoptotik olmak üzere birbirine zıt işlevlere sahip varyantları bulunmaktadır. Yabancı tip survivin, ΔEx3 ve 3B varyantlarının antiapoptotik, 2B ve 2α varyantlarının ise proapoptotik olduğu düşünülmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda çoğunlukla yabancı tip survivin, ΔEx3 ve 2B varyantları araştırılmıştır. Çalışmamızda ise 2α ve 3B varyantları da dahil edilerek survivin proteininin fonksiyonel açıdan önem taşıyan tüm varyantlarının ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda pediatrik akut lenfoblastik lösemi hastalarında;

- genetik risk faktörleri ve survivin ekspresyonu arasındaki ilişkinin varlığı,
- risk sınıflaması ve dolayısı ile tedavi yaklaşımını değiştirebilecek survivin varyant(lar)ının,
- standart ve yüksek riskli grupta tedaviye hızlı ve yavaş yanıt veren hastaların ilk tanısında çalışılmış olan gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasıyla tedaviye yanıtta etkili olabilecek survivin varyant(lar)ının ve,
- ilk tanı ve remisyon dönemlerindeki ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ile prognoz ve takipte spesifik olarak öncelik verilmesi gereken survivin varyant(lar)ının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla; yaş, beyaz küre sayısı ve genetik risk faktörlerinin varlığına bağlı olarak standart ve yüksek riskli olmak üzere iki gruba ayrılan pediatrik akut lenfoblastik lösemi hastalarının ilk tanı ve remisyon dönemlerinde survivin ve varyantlarının mRNA düzeyindeki ekspresyonları kantitatif real time PZR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

Bu çalışmaya 2009-2015 yılları arasında AÜTF Çocuk Hematolojisi ve Onkolojisi bölümünden prekürsör B ALL tanısıyla sevk edilen, ilk tanı ile remisyon dönemlerine (tedaviye başladıktan sonra 28. gün) ait RNA örnekleri bulunan 35 hasta (kız=9, erkek=26) dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak kemik iliği transplantasyonu için 6 sağlıklı vericinin kemik iliğinden izole edilen RNA örnekleri kullanılmıştır. Çalışmaya A.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alınarak başlanmıştır (Ek 1.).

Hastalar yaş, beyaz küre sayısı ( $\text{mm}^3/\mu\text{L}$ ), SSS/testis tutulumu, sitogenetik inceleme, t(9;22), t(4;11), t(12;21), trizomi 4, trizomi 10 ve 11q23 MLL mutasyonları bulgularına göre standart ve yüksek riskli olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (165) (Çizelge 4.1.) (Ek 4.). Tedaviye başladıktan sonraki ikinci haftada tedaviye verilen yavaş ya da hızlı yanıtı göre de standart risk grubundaki hastalar standart-yavaş (SY)(n=9) ve standart-hızlı (SH)(n=11), yüksek risk grubundaki hastalar ise yüksek-yavaş (YY)(n=6) ve yüksek-hızlı (YH)(n=9) olmak üzere alt gruplara ayrılmıştır (Şekil 4.3.) (68), (69).

Çizelge 4.1. Risk sınıflamasında kullanılan kriterler (165)

Kriter	Yüksek risk grubu	Standart risk grubu
Yaş	<1 ve $\geq 10$ yaş	$\geq 1$ ve <10 yaş
Beyaz küre sayısı	$\geq 50,000 \text{ mm}^3/\mu\text{L}$	<50,000 $\text{mm}^3/\mu\text{L}$
Ekstramedülar tutulum	Testis ya da santral sinir sistemi tutulumu	Yok
Genetik bulgular	t(9;22)(q34;q11) ya da t(4;11)(q21;q23) ya da hipodiploidi	t(12;21)(p13;q22) ya da trizomi 4 ve 10

## 4.2. YÖNTEM

Kantitatif RT-PZR ile hasta ve kontrol grubunda GAPDH (gliseraldehid 3 fosfat dehidrojenaz) housekeeping geni ile yaban tip survivin, survivin  $\Delta$ Ex3, survivin 2B, survivin 3B ve survivin 2 $\alpha$  gen ekspresyonları çalışılmıştır.

### 4.2.1. KULLANILAN CİHAZLAR

- Termal döngü cihazı (Eppendorf Mastercycler Gradient)
- Elektroforez güç kaynağı (Biometra Electrophoresis Power Supply E452)
- Elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd.)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 200 Imaging System)
- Kantitatif real time PZR cihazı (Roche LightCycler 2.0)
- Otomatik dizi analizi cihazı (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer)
- Florometre (İnvitrogen Qubit 2.0)
- Vorteks (Velp scientifica)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf mini spin)
- Plate santrifüjü (Eppendorf 5430)

### 4.2.2. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

- High Pure RNA Isolatın Kit (Roche, Katalog no: 11828665001)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kiti (Roche, Katalog no: 04896866001)
- LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (Roche, Katalog no: 12239264001)
- LightCycler Kapiller (Roche, Katalog no: 04929292001)
- Yaban tip survivin, survivin 2B, survivin  $\Delta$ Ex3, survivin 3B, survivin 2 $\alpha$  ve GAPDH'ye özgü primerler (Gene Link)

- PZR temizleme kiti (Thermo Scientific GeneJET, Katalog no: K0701)
- dNTP karışımı, 100 mM (Thermo Scientific, Katalog no: R0181)
- Taq polimeraz kiti, 5U/μl (Biomatik, Katalog no: A1003)
- Agaroz (Multicell, Katalog no: 800015EG)
- Tris base (Multicell, Katalog no: 600127LG)
- Borik asit (Merck, Katalog no: 100165)
- EDTA (Applichem, Katalog no: A11041000)
- NaOH tablet (Applichem, Katalog no: S8045)
- Bromofenol mavisi (Applichem, Katalog no: A23310025)
- Ksilen siyanol (Applichem, Katalog no: A14080010)
- Gliserol (Amresco, Katalog no:E520)
- Etidyum bromür (Sigma-Aldrich, Katalog no: E8751)
- 50 bç moleküler ağırlık standardı, 0.1 μg/μl (Thermo Scientific, Katalog No: SM0373)
- Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich, Katalog No: G50150)
- ExoSAP-IT (GML, Katalog No: 78250)
- Bigdye<sup>®</sup> Terminator (Applied Biosystems, Katalog No: 4336917)

#### **4.2.3. SOLUSYONLARIN HAZIRLANMASI**

5x TBE (1 L): 54 g Tris base, 27,5 g Borik asit ve 20 ml 0,5 mM EDTA karıştırılarak dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanmış ve solüsyon +4°C’de saklanmıştır.

0,5 M EDTA (100 ml): 18,61 g EDTA ve 2 g NaOH, 80 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözülmüştür. pH 8.0’e ayarlanarak dH<sub>2</sub>O ile hacim 100 ml’ye tamamlanmış ve solüsyon +4°C’de saklanmıştır.



Etidyum bromür (10 ml): 100 mg Etidyum bromür, 10 ml dH<sub>2</sub>O içinde vorteks ile karıştırılmıştır. Hazırlanan solüsyon alüminyum folyo ile sarılarak +4°C’de saklanmıştır.

6x yükleme tamponu: 0,025 g bromofenol mavisi, 0,025 g ksilen siyanol ve 0,3 ml gliserol karıştırılarak dH<sub>2</sub>O ile hacmi 1 ml’ye tamamlanmıştır.

Sefadex: 14 ml dH<sub>2</sub>O’ya 1 g sephadex eklenerek karıştırılmıştır. Yeni hazırlanan sephadex, ilk kullanımdan önce 30 dakika bekletilmiş ve +4°C’de saklanmıştır.

%2 agaroz jel: 1,8 g agaroz hassas terazide tartılarak 90 ml 1X TBE solüsyonu içerisine eklenmiş ve ısıtılarak çözülmüştür. Sonrasında üzerine 0.5 µl etidyum bromür eklenerek karıştırılmıştır.

#### **4.2.4. cDNA SENTEZİ**

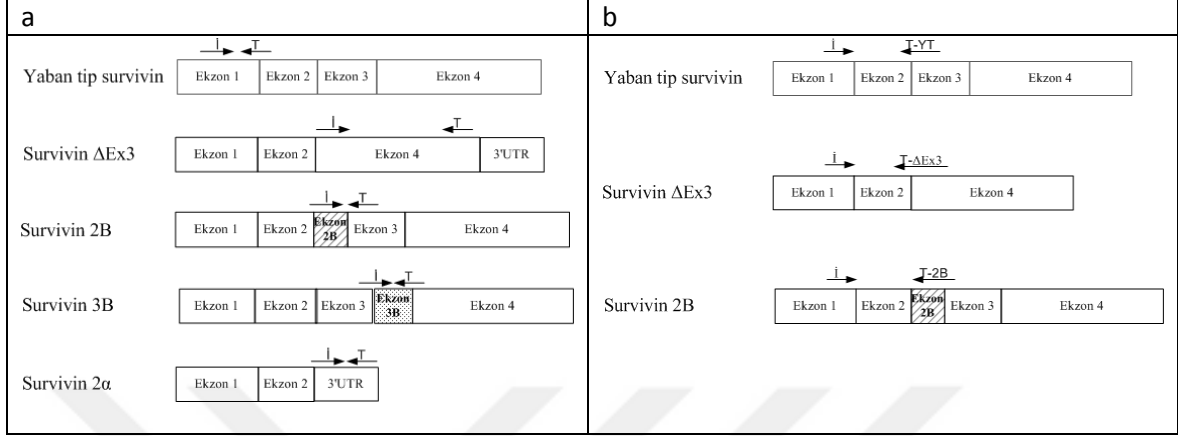
Çalışmada kullanılan RNA örnekleri High Pure RNA Isolation Kit ile izole edilmiş arşiv RNA örnekleridir. cDNA sentezi Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti ve hekzamer primer kullanılarak kullanıcı kitapçığında belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir hasta için 10 µl RNA, 2 µl random hekzamer primer (600 pmol/µl) ve 1µl dH<sub>2</sub>O karışımı tüplere dağıtılmış, 65°C’de 10 dakika inkübe edilerek buz üzerine konulmuştur. 4 µl 5x transkriptaz reaksiyon tamponu, 0.5 µl RNAaz inhibitörü (40U/µl), 2 µl dNTP karışımı, 0.5 µl ters transkriptaz (20U/µl) kullanılarak 7 µl’lik karışımlar hazırlanmış ve buz üzerindeki tüplere dağıtılmıştır. 25°C’de 10 dakika, 50°C’de 1 saat ve 85°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir.

#### **4.2.5. HOUSEKEEPİNG GEN VE YABAN TİP SURVİVİN İÇİN PRİMER TASARIMI**

Literatürde survivin ile ilgili yapılan çalışmalarda housekeeping gen olarak kullanılan genler çoğunlukla GAPDH, G6PD ve β aktindir. Bu nedenle bu çalışmada GAPDH, G6PD ve β aktin genleri için primer tasarımı yapılmış, PZR özgünlüğü ve kantitatif RT-PZR etkinliği açısından kıyaslanmıştır. Çalışmalar sonucunda GAPDH primerlerinin kullanılmasına karar verilmiştir (Çizelge 4.4.).

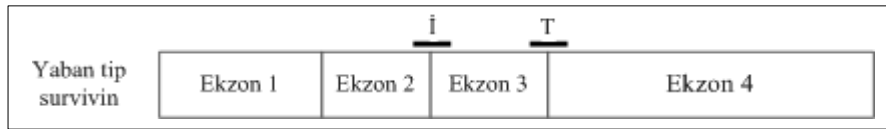
Yaban tip survivin ekspresyonu için daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan ve sıklıkla refere edilen primer çiftleri Span (166) ya da Pavlidou ve arkadaşları (167) tarafından tanımlanmış primerlerdir (Şekil 4.1.). Span ve arkadaşları tarafından yaban tip survivin için

kullanılan primerlerin NCBI Primer BLAST analizinde makalede söylenenin aksine survivinin bütün varyantlarına bağlanabildiği, yine Pavlidou ve arkadaşları tarafından kullanılan primerlerin analizinde yaban tip survivin için kullanılan primerlerin aynı zamanda survivin 3B varyantına da bağlandığı görülmüştür.



Şekil 4.1. Survivin ve varyantlarının kantitatif real time PZR çalışmasında kullanılan primerlerin yerleşimi (İ: ileri primer, T: ters primer, YT: yaban tip) (a-Span ve ark. (166), b-Pavlidou ve ark. (167))

Bu nedenle bu çalışmada yaban tip survivin için kullanılmak üzere NCBI primer BLAST kullanılarak yeni primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin BLAST ile yapılan incelemesinde yaban tip survivin dışında hiçbir varyanta bağlanmadıkları kontrol edilmiş ve PZR ürünlerinin özgünlükleri agaroz jel elektroforezi ve dizi analizi ile doğrulanmıştır. Yaban tip survivin primerlerinin yerleşimi Şekil 4.2.'de, dizileri ise Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Yaban tip survivin için tasarlanan primerlerin yerleşimi (İ:ileri primer, T:ters primer)

Tasarlanan GAPDH ve survivin yaban tip primerlerinin doğruluklarının test edilmesi amacıyla PZR ürünleri Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer cihazı kullanılarak dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi öncesi PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6), PZR sonrası temizleme işlemi için ExoSAP-IT™ enzimatik temizleme ürünü kullanılmıştır. Protokol doğrultusunda 5 µL PZR ürünü, 2 µl ExoSAP-IT reaktifi 0,2 ml'lik PZR tüpünde karıştırılmıştır. Karışım 37°C'de 15 dakika; 80°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

PZR ürünleri temizlendikten sonra aynı primerler kullanılarak dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için hazırlanan karışım ve uygulanan koşullar Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. GAPDH ve yaban tip survivin için dizi analizi PZR içeriği

Malzeme Adı	Malzeme Miktarı
Bigdye Terminator	1 µl
Bigdye Terminator Sekans tamponu	2 µl
İleri ya da ters primer (1 pmol/l)	2 µl
Temizlenmiş PZR ürünü	2 µl
dH2O	3 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 4.3. GAPDH ve yaban tip survivin için dizi analizi PZR koşulu

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
96 °C	1 dk	25 döngü
96 °C	30 sn	
50 °C	5 sn	
60 °C	4 dk	
4 °C	∞	

#### 4.2.6. KANTİTATİF REAL TIME PZR STANDARTLARININ HAZIRLANMASI

Kantitatif real time PZR için kullanılan standartlar, PZR ürünleri kullanılarak hazırlanmıştır. Bu amaçla GAPDH housekeeping gen ve her bir survivin varyantı için sentezletirilen cDNA oligoları kalıp olarak kullanılarak PZR yapılmış, elde edilen PZR ürünleri Thermo Scientific GeneJET PZR temizleme kiti ile temizlendikten sonra %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Qubit 2.0 florometre kullanılarak ölçülen PZR ürünlerinden, ölçüm sonuçlarına göre  $3 \times 10^{10}$ - $3 \times 10^0$  kopya/µl arası seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Kullanılan primer dizileri ile PZR karışımı ve koşulları Çizelge 4.4, Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. GAPDH ve survivin varyantları için primer dizileri (İ:ileri primer, T:tters primer, \*: 167, \*\*: 166)

Bölge	Dizi (5'→3')	Referans diziler	Lokasyon	Amplikon boyu (bp)
GAPDH	İ: CATCTTCCAGGAGCGAGA	NM_002046.5	413-430	112
	T:CAAATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT		501-524	
Survivin-YT	İ: TGACGACCCCATAGAGGAACA	NM_001168.2	331-351	138
	T:CCTTTGCAATTTTGTTCCTGGCTC		444-467	
Survivin-AEx3*	İ: CCACCGCATCTCTACATTCA	NM_001012270.1	169-188	184
	T: TTTCTTTGCATGGGGTC		335-352	
Survivin-2B**	İ: GCACGGTGGCTTACGCCTG	NM_001012271.1	351-369	90
	T:AACCGGACGAATGCTTTTTATGTTC		415-440	
Survivin-3B**	İ: CAGATTCAGGGAGGGACTGG	AB154416.1	377-396	60
	T: CAAACATCAGGCTCTTCCTCG		416-436	
Survivin 2α**	İ:GCTTTGTTTTGAACTGAGTTGTCAA	AY927772.1	293-317	81
	T: GCAATGAGGGTGGAAAGCA		355-373	

Çizelge 4.5. GAPDH ve survivin varyantları için PZR içeriği

Malzeme Adı	Hacim	Son konsantrasyon
dNTP (5 mM)	0.8 µl	0.2 mM
Tampon (10X)	2 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.2 µl	1.5 mM
İleri primer (10 µM)	2 µl	0.5 µM
Ters primer (10 µM)	2 µl	0.5 µM
dH <sub>2</sub> O	8 µl	-
Taq polimeraz (5U/µl)	0.2 µl	1U
Kalıp DNA (cDNA oligo)	2 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 4.6. GAPDH ve survivin varyantları için PZR koşulu

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94 °C	4 dk	
94 °C	30 sn	25 döngü
56 °C	30 sn	
72 °C	45 sn	
72 °C	5 dk	
4 °C	∞	

#### 4.2.7. GAPDH HOUSEKEEPING GENİ VE SURVİVİN VARYANTLARI İÇİN KANTİTATİF REAL TIME PZR

35 hastanın ilk tanı ve remisyon dönemlerine ait cDNA örnekleri kullanılarak GAPDH geni ve her bir survivin varyantı kantitatif RT-PZR ile çalışılmıştır. Örneklere ait ekspresyon düzeylerinin kantitasyonunda GAPDH için  $3 \times 10^7$ - $3 \times 10^3$ , yaban tip survivin için  $3 \times 10^4$ - $3 \times 10^0$ , ΔEx3 varyantı için  $3 \times 10^4$ - $3 \times 10^1$ , 2B varyantı için  $3 \times 10^5$ - $3 \times 10^1$ , 3B varyantı için  $3 \times 10^5$ - $3 \times 10^2$  ve 2α varyantı için  $3 \times 10^6$ - $3 \times 10^2$  kopya/μl arasında seri dilüsyonlar içeren standartlar kullanılmıştır. Tüm standart ve örnekler ikişer kez çalışılmış ve her bir çalışmada negatif kontrol kullanılmıştır.

Kantitatif real time PZR reaksiyonları için LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green 1 kiti kullanılmış, PZR karışımı ve koşulları üretici firmanın önerisi doğrultusunda Çizelge 4.7. ve Çizelge 4.8.'deki gibi uygulanmıştır. Kantitatif real time PZR uygulamalarında touchdown PZR kullanılmıştır. Annealing sıcaklığı 68°C'den başlanmış ve ilk 20 döngü, her döngüde 0.5°C azaltılarak gerçekleştirilmiş ve sonrasında 58°C ile devam edilmiş, sonrasında melting curve analizi yapmak için cihaz 95°C'ye getirildikten sonra 40°C'ye soğutulup 30 saniye bekletilmiş ve sonrasında saniyede 0.5°C artacak şekilde 85°C'ye ısıtılmıştır.

Çizelge 4.7. GAPDH ve survivin varyantları için Kantitatif real time PZR içeriği

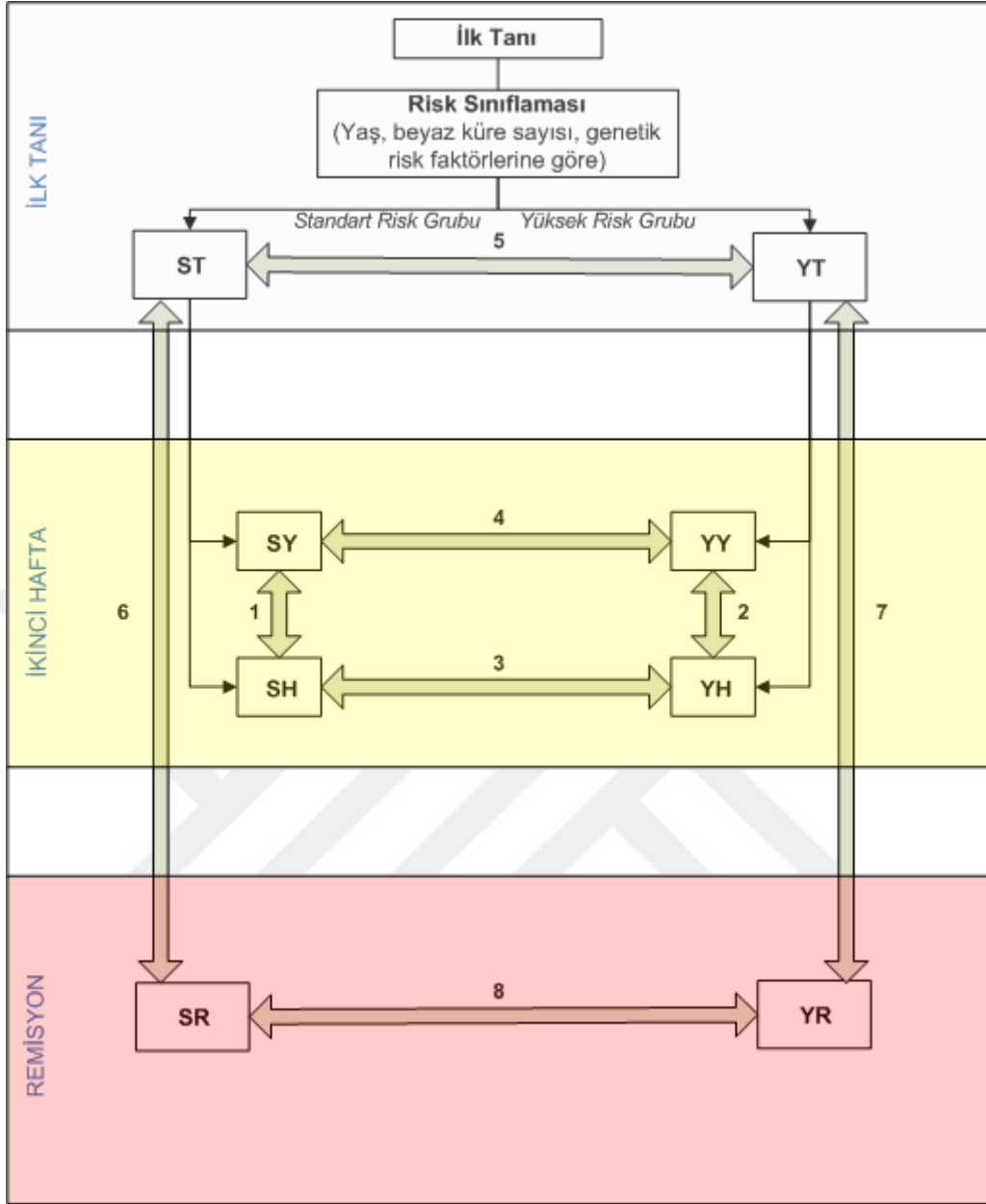
Malzeme Adı	Hacim	Son konsantrasyon
LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green 1 (10X)	2 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.6 µl	2 mM
İleri primer (10 µM)	2 µl	0.5 µM
Ters primer (10 µM)	2 µl	0.5 µM
dH <sub>2</sub> O	10.4 µl	-
Kalıp (cDNA)	2 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 4.8. Kantitatif real time PZR koşulu

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	10 dk	45 döngü
95 °C	10 sn	
68-58 °C	10 sn	
72 °C	15 sn	
4 °C	∞	

#### 4.2.8. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME

Hasta ve kontrol grubu arasında yapılan istatistik değerlendirme ile hastalık için risk oluşturabilecek survivin varyant(lar)ı araştırılmıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. Hasta grubunun kendi içerisinde yapılan istatistik değerlendirmede izlenen yol Şekil 4.3’de, kullanılan istatistiksel yöntemler ise Çizelge 4.9.’da gösterilmiştir.



Şekil 4.3. İstatistik değerlendirmede kullanılan gruplar ve yapılan karşılaştırmalar. **ST**: Standart risk grubundaki hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, **YT**: Yüksek risk grubundaki hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, **SY**: Standart risk grubundaki yavaş yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, **SH**: Standart risk grubundaki hızlı yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, **YY**: Yüksek risk grubundaki yavaş yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, **YH**: Yüksek risk grubundaki hızlı yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, **SR**: Standart risk grubundaki hastaların remisyon dönemindeki ekspresyon çalışması, **YR**: Yüksek risk grubundaki hastaların remisyon dönemindeki ekspresyon çalışması

Çizelge 4.9. Gruplar arası karşılaştırmalarda kullanılan istatistiksel yöntemler ve elde edilmesi beklenen bilgiler

Karşılaştırmalar	Kullanılan istatistiksel yöntem	Elde edilmesi beklenen bilgiler
<div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 5px;">ST</div> <div style="font-size: 2em;">↔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;">YT</div> <span>(5)</span> </div>	Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri	Risk sınıflamasında etkili olabilecek varyant(lar)
<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 5px;">SY</div> <div style="font-size: 2em;">↔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;">SH</div> <span>(1)</span> </div> <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 5px;">YY</div> <div style="font-size: 2em;">↔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;">YH</div> <span>(2)</span> </div> </div>	Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri	Standart ve yüksek riskli grupta yavaş ya da hızlı cevabın oluşmasında etkili olan ve tedavi hedefi olabilecek varyantlar
<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 5px;">SY</div> <div style="font-size: 2em;">↔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;">YY</div> <span>(3)</span> </div> <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 5px;">SH</div> <div style="font-size: 2em;">↔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;">YH</div> <span>(4)</span> </div> </div>	Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri	Standart ve yüksek riskli grupta yavaş ya da hızlı cevabın oluşmasında etkili olan ve tedavi hedefi olabilecek varyantların birbirinden farklı olup olmadığı
<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 5px;">ST</div> <div style="font-size: 2em;">↔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;">SR</div> <span>(6)</span> </div> <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 5px;">YT</div> <div style="font-size: 2em;">↔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;">YR</div> <span>(7)</span> </div> </div>	Wilcoxon W testi	Prognoz ve takipte etkili olabilecek survivin varyantı
<div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 5px;">SR</div> <div style="font-size: 2em;">↔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;">YR</div> <span>(8)</span> </div>	Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri	5, 6 ve 7 numaralı karşılaştırmaların doğrulanması

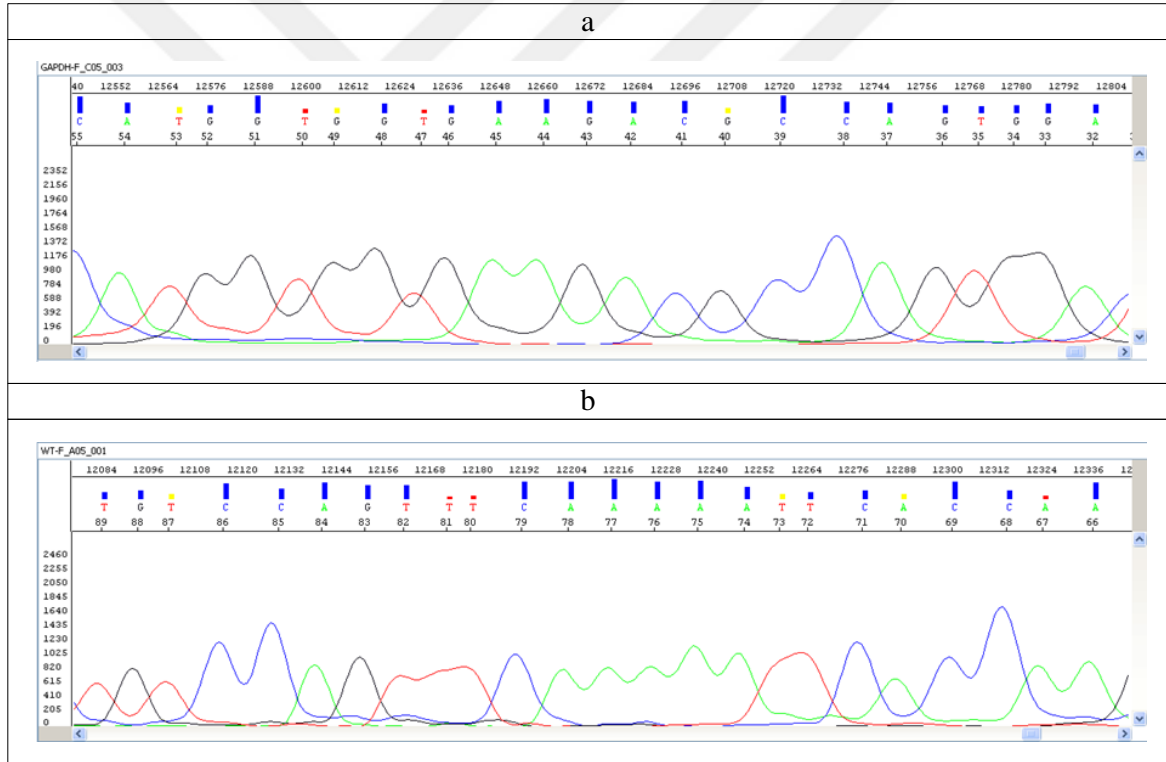


## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada SY grubunda 9, SH grubunda 11, YY grubunda 6 ve YH grubunda 9 olmak üzere toplam 35 hasta yer almıştır.

### 5.1. GAPDH VE YABAN TIP SURVİVİN PZR ÜRÜNLERİNİN ÖZGÜNLÜĞÜNÜN DOĞRULANMASI

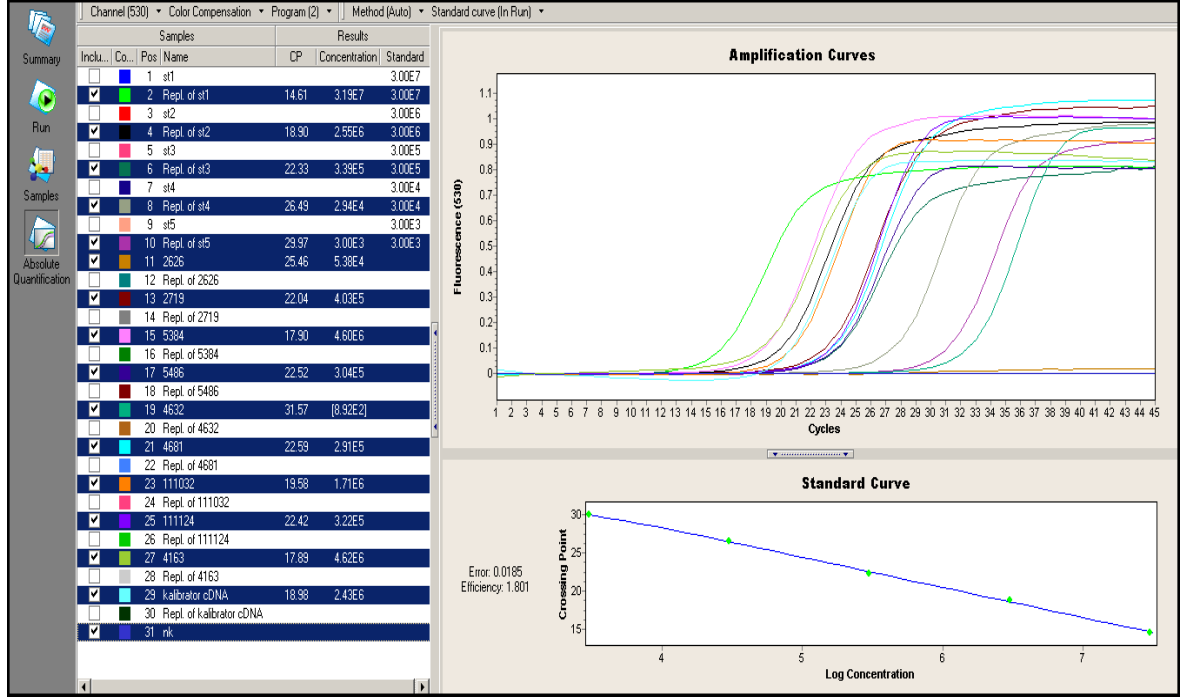
GAPDH ve yaban tip survivin için PZR reaksiyonu tasarlanan yeni primerlerle gerçekleştirilmiştir. PZR ürünlerinin özgünlükleri agaroz jel elektroforezi ve dizi analizi ile kontrol edilmiştir (Şekil 5.1.). Her iki bölge de jel elektroforezinde beklenen uzunlukta ve tek bir bant gözlenmiş, dizi analizinde ise hedef bölgelerin referans dizileri ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



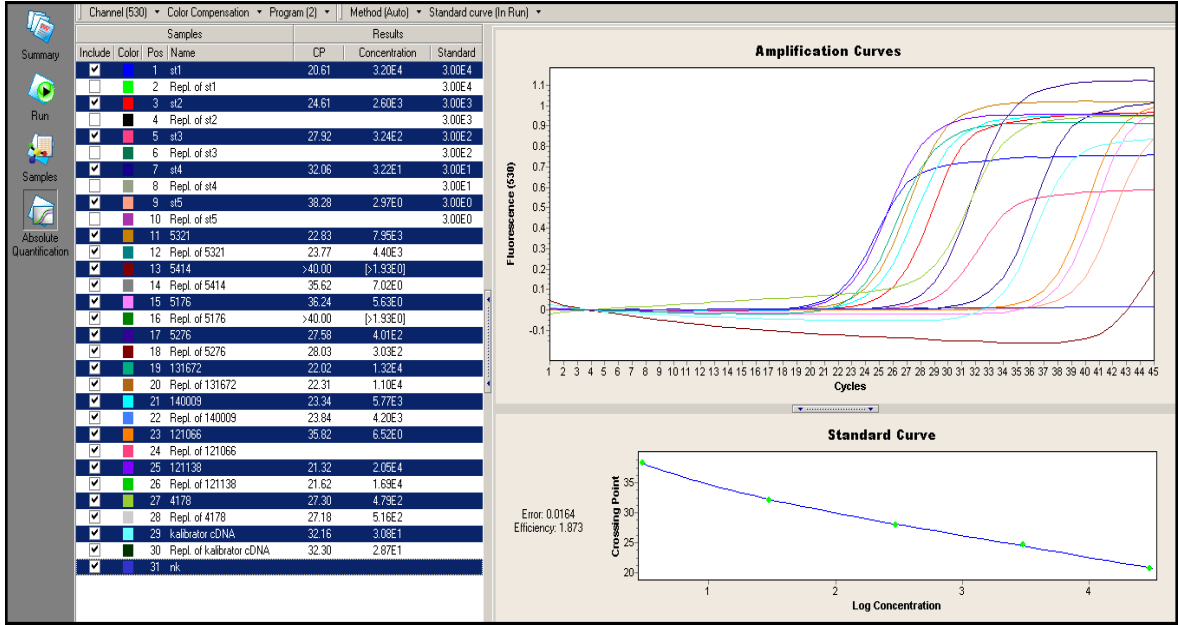
Şekil 5.1. GAPDH (a) ve yaban tip survivin (b) kısmi dizi analizi görüntüsü

## 5.2. KANTİTATİF REAL TİME PZR

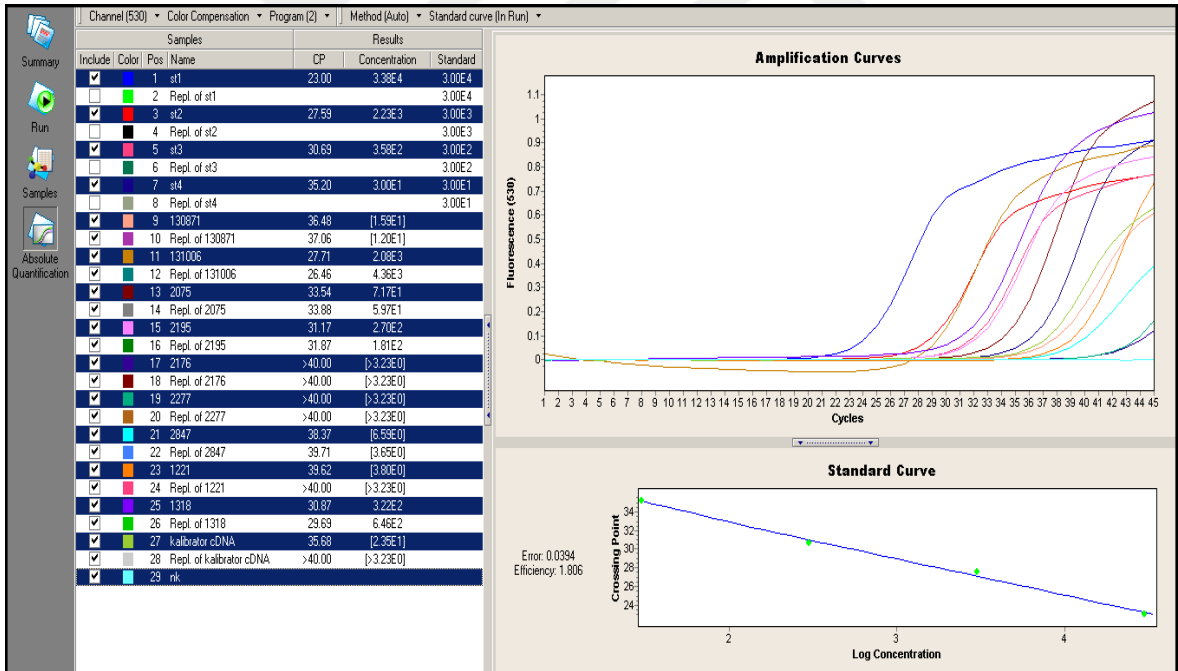
GAPDH ve tüm survivin varyantlarına ait örnek kantitatif RT-PZR görüntüleri Şekil 5.2., Şekil 5.3., Şekil 5.4., Şekil 5.5., Şekil 5.6. ve Şekil 5.7.'de verilmiştir.



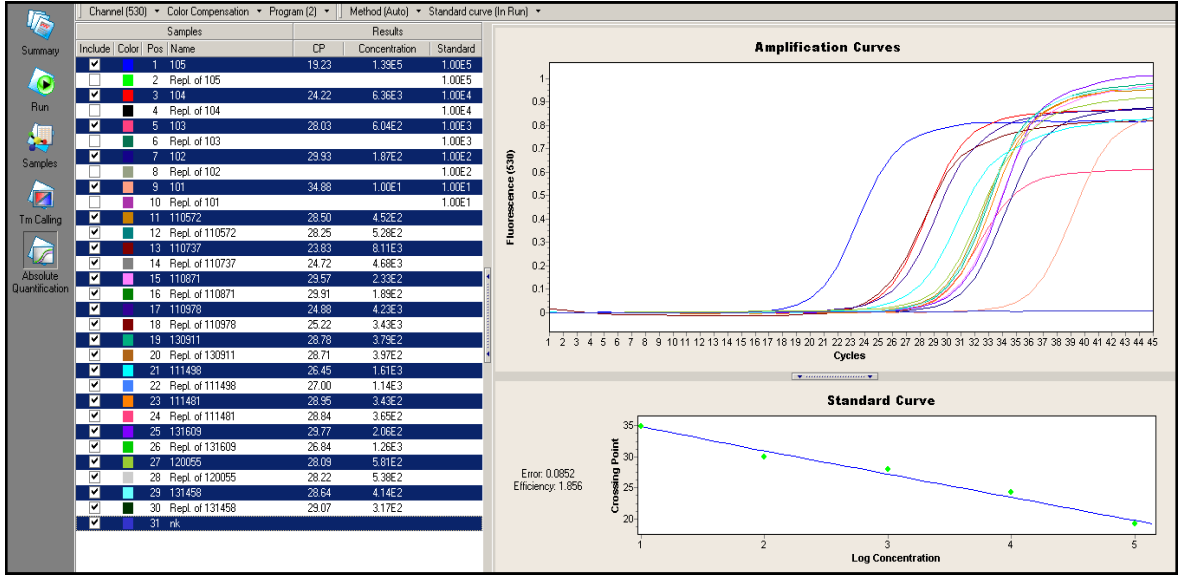
Şekil 5.2. GAPDH ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü st1:  $3 \times 10^7$  kopya/ $\mu$ l, st2:  $3 \times 10^6$  kopya/ $\mu$ l, st3:  $3 \times 10^5$  kopya/ $\mu$ l, st4:  $3 \times 10^4$  kopya/ $\mu$ l, st5:  $3 \times 10^3$  kopya/ $\mu$ l standartlar. 11-28 nolu kapillerler hastalara ait ilk tanı ve remisyon örnekleri, nk: negatif kontrol



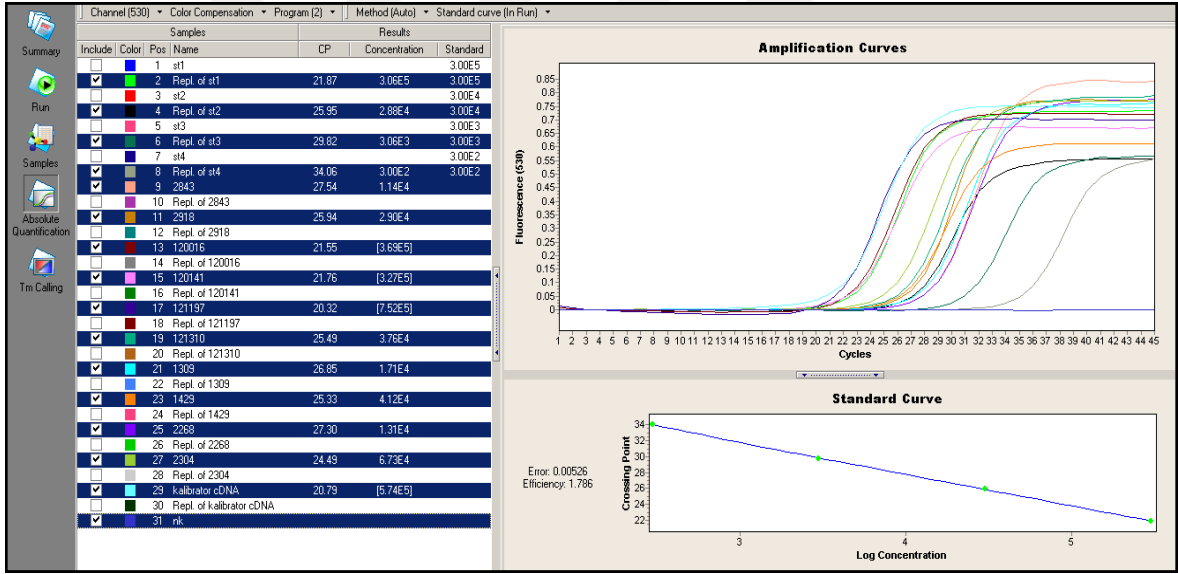
Şekil 5.3. Yaban tip survivin ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü st1:  $3 \times 10^4$  kopya/ $\mu$ l, st2:  $3 \times 10^3$  kopya/ $\mu$ l, st3:  $3 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l, st4:  $3 \times 10^1$  kopya/ $\mu$ l, st5:  $3 \times 10^0$  kopya/ $\mu$ l standartlar. 11-28 nolu kapillerler hastalara ait ilk tanı ve remisyon örnekleri, nk: negatif kontrol



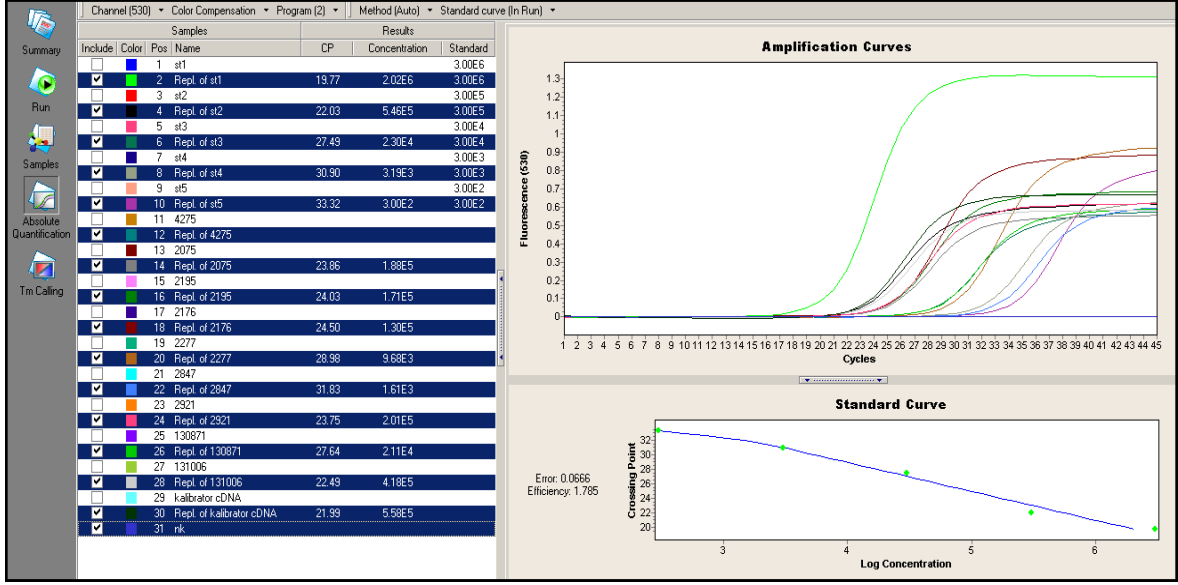
Şekil 5.4. Survivin  $\Delta$ Ex3 ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü st1:  $3 \times 10^4$  kopya/ $\mu$ l, st2:  $3 \times 10^3$  kopya/ $\mu$ l, st3:  $3 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l, st4:  $3 \times 10^1$  kopya/ $\mu$ l standartlar. 9-28 nolu kapillerler hastalara ait ilk tanı ve remisyon örnekleri, nk: negatif kontrol



Şekil 5.5. Survivin 2B ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü st1:  $3 \times 10^5$  kopya/ $\mu$ l, st2:  $3 \times 10^4$  kopya/ $\mu$ l, st3:  $3 \times 10^3$  kopya/ $\mu$ l, st4:  $3 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l, st5:  $3 \times 10^1$  kopya/ $\mu$ l standartlar. 11-28 nolu kapillerler hastalara ait ilk tanı ve remisyon örnekleri, nk: negatif kontrol



Şekil 5.6. Survivin 3B ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü st1:  $3 \times 10^5$  kopya/ $\mu$ l, st2:  $3 \times 10^4$  kopya/ $\mu$ l, st3:  $3 \times 10^3$  kopya/ $\mu$ l, st4:  $3 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l. 9-28 nolu kapillerler hastalara ait ilk tanı ve remisyon örnekleri, nk: negatif kontrol

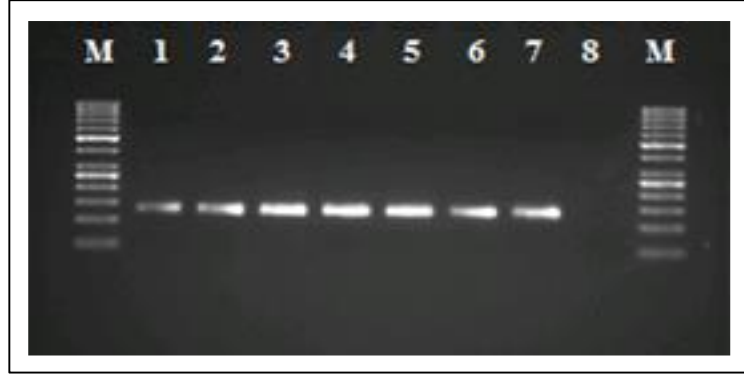


Şekil 5.7. Survivin 2a ekspresyonu kantitatif real time PZR görüntüsü st1:  $3 \times 10^6$  kopya/ $\mu$ l, st2:  $3 \times 10^5$  kopya/ $\mu$ l, st3:  $3 \times 10^4$  kopya/ $\mu$ l, st4:  $3 \times 10^3$  kopya/ $\mu$ l, st5:  $3 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l. 11-28 nolu kapillerler hastalara ait ilk tanı ve remisyon örnekleri, nk: negatif kontrol.

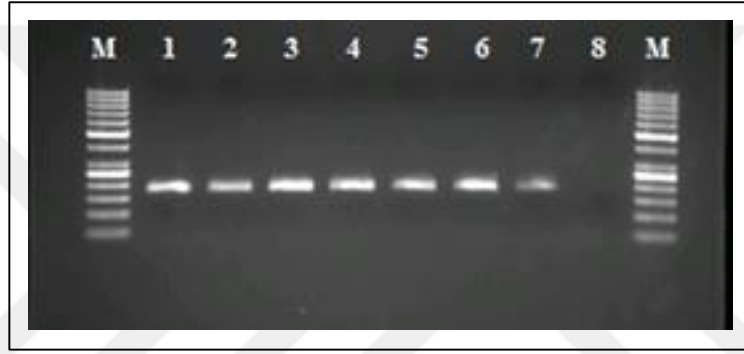
Kantitatif real time PZR reaksiyonlarının özgünlüğünün kontrol edilmesi amacıyla PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 5.8., Şekil 5.9., Şekil 5.10., Şekil 5.11., Şekil 5.12. ve Şekil 5.13.).



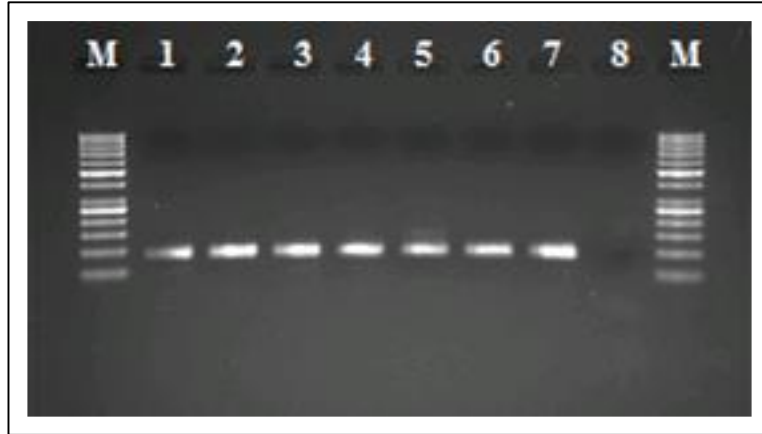
Şekil 5.8. GAPDH kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 50 bç moleküler ağırlık standardı; 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 bç. 1 nolu kuyu  $10^7$  kopya/ $\mu$ l standart, 2-7 nolu kuyular hasta örnekleri, 8 nolu kuyu negatif kontrol, PZR ürün boyu: 112 bç.



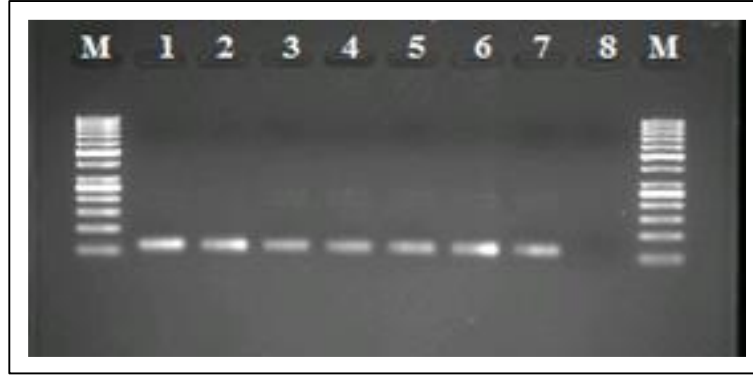
Şekil 5.9. Yaban tip survivin kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü, M: 50 bç moleküler ağırlık standardı; 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 bç. 1 nolu kuyu  $10^4$  kopya/ $\mu$ l standart, 2-7 nolu kuyular hasta örnekleri, 8 nolu kuyu negatif kontrol, PZR ürün boyu: 138 bç.



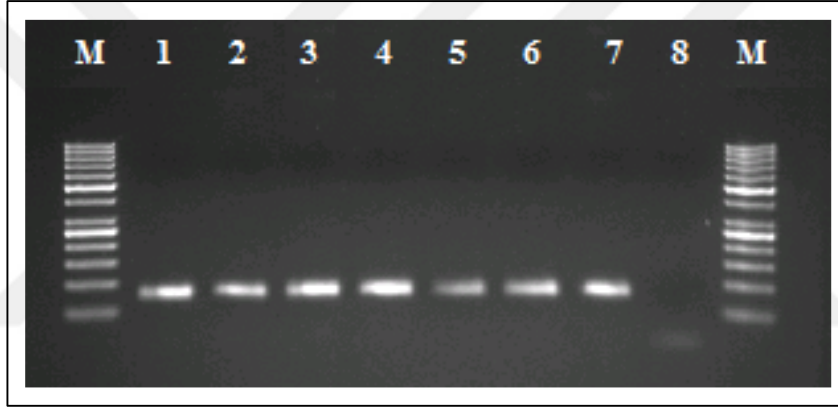
Şekil 5.10. Survivin  $\Delta$ Ex3 kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü, M: 50 bç moleküler ağırlık standardı; 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 bç. 1 nolu kuyu  $10^4$  kopya/ $\mu$ l standart, 2-7 nolu kuyular hasta örnekleri, 8 nolu kuyu negatif kontrol, PZR ürün boyu: 184 bç.



Şekil 5.11. Survivin 2B kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü, M: 50 bç moleküler ağırlık standardı; 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 bç. 1 nolu kuyu  $10^5$  kopya/ $\mu$ l standart, 2-7 nolu kuyular hasta örnekleri, 8 nolu kuyu negatif kontrol, PZR ürün boyu: 90 bç.



Şekil 5.12. Survivin 3B kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü, M: 50 bç moleküler ağırlık standardı; 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 bç. 1 nolu kuyu  $10^5$  kopya/ $\mu$ l standart, 2-7 nolu kuyular hasta örnekleri, 8 nolu kuyu negatif control, PZR ürün boyu: 60 bç.



Şekil 5.13. Survivin 2α kantitatif real time PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 50 bç moleküler ağırlık standardı; 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 bç. 1 nolu kuyu  $10^6$  kopya/ $\mu$ l standart, 2-7 nolu kuyular hasta örnekleri, 8 nolu kuyu negatif control, PZR ürün boyu: 81 bç.

Hasta grubunda GAPDH ve survivin varyantlarının tanı ve remisyon dönemlerine ait ekspresyon düzeyleri Ek.2’de gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait sonuçlar ise Ek.3’te verilmiştir. Survivin ve varyantlarının ekspresyon düzeyleri Çizelge 5.1. ile survivin ve varyantlarının oranlarının ekspresyon düzeyleri Çizelge 5.2.’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Hasta grubunda survivin ve varyantlarının ekspresyon düzeyleri

Gruplar		Ortalama ± standart sapma (ortanca) değerleri				
		S-YT	S- ΔEx3	S-2B	S-3B	S-2α
ST		0.00185 ± 0.00075 (0.00052)	0.00502 ± 0.00467 (0.00025)	0.00893 ± 0.00220 (0.00510)	0.13258 ± 0.03453 (0.09090)	0.06898 ± 0.01734 (0.04605)
YT		0.00130 ± 0.00050 (0.00048)	0.00016 ± 0.00004 (0.00015)	0.05468 ± 0.1792 (0.00380)	0.79880 ± 0.60040 (0.12945)	0.11115 ± 0.02252 (0.07858)
SR		0.00283 ± 0.00058 (0.00250)	0.00095 ± 0.00019 (0.00049)	0.01031 ± 0.00149(0.00839)	0.08026 ± 0.01128 (0.08113)	0.04863 ± 0.00818 (0.03622)
YR		0.00208 ± 0.00061 (0.00123)	0.00035 ± 0.00011 (0.00015)	0.01920 ± 0.00805 (0.00878)	0.27312 ± 0.10476 (0.12907)	0.10883 ± 0.01796 (0.10735)
SY	Tanı	0.00085 ± 0.00048 (0.00018)	0.00026 ± 0.00011 (0.00012)	0.00327 ± 0.00062 (0.00279)	0.13126 ± 0.17473 (0.12596)	0.05970 ± 0.01200 (0.05663)
	Remisyon	0.00287 ± 0.00104 (0.00250)	0.00112 ± 0.00037 (0.00079)	0.00637 ± 0.00187 (0.00521)	0.07673 ± 0.01313 (0.09416)	0.04405 ± 0.01264 (0.03688)
SH	Tanı	0.00267 ± 0.00129 (0.00103)	0.00891 ± 0.00850 (0.00037)	0.01357 ± 0.00344 (0.12871)	0.13367 ± 0.06261 (0.07253)	0.07656 ± 0.03052 (0.02220)
	Remisyon	0.00280 ± 0.00068 (0.00251)	0.00082 ± 0.00018 (0.00048)	0.01353 ± 0.00176 (0.01312)	0.08315 ± 0.01803 (0.07447)	0.05237 ± 0.01113 (0.03556)
YY	Tanı	0.00065 ± 0.00025 (0.00049)	0.00015 ± 0.00004 (0.00017)	0.01002 ± 0.00598 (0.00500)	0.12587 ± 0.03082 (0.11495)	0.07988 ± 0.01972 (0.07845)
	Remisyon	0.00140 ± 0.00070 (0.00051)	0.00052 ± 0.00026 (0.00016)	0.03219 ± 0.01956 (0.01378)	0.43111 ± 0.25357 (0.19511)	0.13825 ± 0.03567 (0.15671)
YH	Tanı	0.00172 ± 0.00081 (0.00048)	0.00016 ± 0.000074 (0.00005)	0.08445 ± 0.77177 (0.00380)	1.24743 ± 0.99405 (0.16405)	0.13199 ± 0.03437 (0.12643)
	Remisyon	0.00253 ± 0.00090 (0.00184)	0.00023 ± 0.00007 (0.00013)	0.01053 ± 0.00246 (0.00869)	0.16779 ± 0.04188 (0.11797)	0.08922 ± 0.01706 (0.08025)



Çizelge 5.2. Hasta grubunda survivin ve varyantlarının oranlarının ekspresyon düzeyleri

Gruplar		Ortalama ± standart sapma (ortanca) değerleri		
		$\Delta Ex3/YT$	2B/YT	$2\alpha+2B/3B$
ST		1.09207 ± 0.41317 (0.39291)	21.51667 ± 5.93650 (9.27090)	0.85019 ± 0.15378 (0.51099)
YT		0.19497 ± 0.34612 (0.14843)	21.79123 ± 7.75000 (8.71900)	0.65040 ± 0.07552 (0.67858)
SR		0.59506 ± 0.18343 (0.36637)	12.62639 ± 5.32617 (4.72120)	0.79844 ± 0.73206 (0.80577)
YR		0.40987 ± 0.17540 (0.19378)	29.01715 ± 8.85755 (11.76806)	5.42593 ± 4.69412 (0.79204)
SY	Tanı	0.75059 ± 0.18349 (0.51204)	26.70144 ± 11.31093 (10.02008)	0.47968 ± 0.73644 (0.45703)
	Remisyon	0.89504 ± 0.39144 (0.41923)	16.35440 ± 11.56854 (2.40528)	0.64959 ± 0.08439 (0.53532)
SH	Tanı	1.37146 ± 0.74186 (0.300000)	17.27459 ± 5.83144 (5.46125)	1.15333 ± 0.24026 (1.18750)
	Remisyon	0.34961 ± 0.05055 (0.33252)	9.57621 ± 2.88666 (5.22689)	0.92024 ± 0.10274 (0.91841)
YY	Tanı	0.26440 ± 0.41902 (0.26243)	15.18888 ± 4.72585 (13.30552)	0.83424 ± 0.11706 (0.89325)
	Remisyon	0.80153 ± 0.40012 (0.44051)	45.22402 ± 14.68899 (40.60442)	12.57326 ± 11.71337 (1.05318)
YH	Tanı	0.14868 ± 0.45751 (0.94814)	26.19279 ± 12.64209 (7.12564)	0.52783 ± 0.07894 (0.58706)
	Remisyon	0.14877 ± 0.04153 (0.12243)	18.21257 ± 10.12161 (3.57947)	0.66105 ± 0.07163 (0.67142)

### 5.3. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME

#### 5.3.1. HASTA-KONTROL GRUPLARI ARASINDA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hasta ve kontrol grubu arasında yapılan değerlendirme sonucunda hastalara ait tanı örneklerinde yaban tip survivin ve  $\Delta\text{Ex3}$  varyantı ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu görülmüştür (sırasıyla  $p=0.036$  ve  $p=0.003$ ). Çalışmamızda  $2\alpha$  ve  $3B$  varyantlarının ekspresyon düzeyleri -literatürde yer alan sonuçların aksine- yaban tip,  $\Delta\text{Ex3}$  ve  $2B$  ekspresyon düzeylerinden çok daha yüksek bulunmuştur. Ancak hasta-kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda  $2\alpha$  ve  $3B$  varyantları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte hasta grubunda cinsiyetler arasında da değerlendirme yapılmış ancak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Literatürdeki çalışmalarda çoğunlukla yaban tip,  $\Delta\text{Ex3}$  ve  $2B$  varyantları araştırılmıştır ve bu çalışmalarda varyantların tek tek ekspresyon düzeyleri yanında  $\Delta\text{Ex3}/\text{YT}$  ve  $2B/\text{YT}$  ekspresyon oranları da değerlendirilmiştir (99), (168), (169). Bizim çalışmamızda, ekspresyon düzeyleri düşük bulunmasına rağmen, literatürdeki sonuçlarla kıyaslama yapabilmek amacıyla  $\Delta\text{Ex3}/\text{YT}$  ve  $2B/\text{YT}$  ekspresyon oranları da değerlendirilmiştir. Bununla birlikte  $2\alpha$ ,  $2B$  ve  $3B$  ekspresyon düzeyinin yüksek bulunması,  $2B$  ve  $2\alpha$ 'nın proapoptotik,  $3B$ 'nin antiapoptotik özellikte olması nedeniyle  $2\alpha+2B/3B$  ekspresyon düzeyi oranları da değerlendirmeye alınmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında yapılan değerlendirmede  $\Delta\text{Ex3}/\text{YT}$  ve  $2B/\text{YT}$  oranlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır.  $2\alpha+2B/3B$  oranının ise hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu görülmüştür ( $p=0.036$ ). İstatistik değerlendirmeye ait sonuçlar Çizelge 5.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 5.3. Hasta-kontrol grupları istatistik değerlendirme sonuçlarına ait  $p$  ve medyan (M) değerleri, S: survivin, YT: yaban tip

Gruplar	S-YT	S- $\Delta\text{Ex3}$	S-2B	S-3B	S- $2\alpha$	$\Delta\text{Ex3}/\text{YT}$	2B/YT	$2\alpha+2B/3B$
Hasta (tamı) ↔ Kontrol	$p=0,036^*$	$p=0,003^*$	$p=0,077$	$p=0,712$	$p=0,097$	$p=0,796$	$p=0,971$	$p=0,036^*$
	M=0,00048 (Hasta)	M=0,00015 (Hasta)						M=0,60452 (Hasta)
	M=0,00007 (Kontrol)	M=0,00011 (Kontrol)						M=0,32578 (Kontrol)

\*: istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

### 5.3.2. STANDART-YÜKSEK RİSK GRUPLARI ARASINDA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Standart ve yüksek riskli hasta gruplarında yaban tip survivin ve  $\Delta Ex3$  ekspresyon düzeyleri aşırı derecede düşük bulunurken, 2B, 2 $\alpha$  ve 3B varyant ekspresyon düzeyleri yüksek bulunmuştur. Her iki risk grubunda survivin ve varyantları tanı dönemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamazken, standart ve yüksek risk gruplarının remisyon dönemine ait (SR  $\leftrightarrow$  YR) ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında  $\Delta Ex3$  ekspresyon düzeyinin standart risk grubunun remisyon döneminde ( $p=0,003$ ), 3B ve 2 $\alpha$  ekspresyon düzeyinin ise yüksek riskli grubun remisyon döneminde daha yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla  $p=0,004$  ve  $p=0.006$ ).

Survivin 2B varyantının tedaviye yavaş cevap veren standart risk grubunda (SY) hızlı cevap veren gruba göre (SH) daha yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p=0.011$ ). Her iki risk grubunda tedaviye hızlı yanıt veren hastalarda yapılan karşılaştırmada (SH $\leftrightarrow$ YH) ise survivin 3B varyantının ekspresyon düzeyinin yüksek riskli grupta daha fazla olduğu belirlenmiştir ( $p=0.025$ ).

Standart ve yüksek riskli hasta gruplarının hem tanı hem remisyon dönemlerindeki ekspresyon düzeyleri kıyaslandığında ((SY+SH (tanı)  $\leftrightarrow$  YY+YH (tanı) ve SY+SH (remisyon)  $\leftrightarrow$  YY+YH (remisyon)) her iki dönemde de  $\Delta Ex3/YT$  oranının standart risk grubunda yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla tanı örneklerinde  $p=0.003$ , remisyon örneklerinde  $p=0.046$ ).

Hastalar risk grupları arasında SY, SH, YY ve YH olmak üzere dört ayrı gruba ayrılarak değerlendirildiğinde  $\Delta Ex3/YT$  ve 2 $\alpha$ +2B/3B ekspresyon düzeyi oranlarının her ikisinde de yüksek risk grubunda tedaviye yavaş cevap veren grupta (YY) hızlı cevap veren gruba göre (YH) daha yüksek olduğu gözlenmiştir (sırasıyla  $p=0.034$  ve  $p=0.045$  ). 2 $\alpha$ +2B/3B ekspresyon düzeyi oranının ise sadece standart risk grubunda anlamlı olduğu ve tedaviye hızlı cevap veren (SH) grupta yavaş cevap veren (SY) gruba göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p=0.020$ ).

Yavaş ve hızlı yanıt veren hastalar arasında her iki risk grubunda yapılan karşılaştırmada (SY $\leftrightarrow$ YY ve SH $\leftrightarrow$ YH) yüksek risk grubunda hem yavaş hem de hızlı yanıt veren hastalarda  $\Delta Ex3/YT$  ve 2 $\alpha$ +2B/3B ekspresyon düzeyi oranının anlamlı olduğu bulunmuştur (sırasıyla

SY↔YY için  $\Delta Ex3/YT$   $p=0.025$  ve  $2\alpha+2B/3B$   $p=0.045$ ; SH↔YH için  $\Delta Ex3/YT$   $p=0.025$  ve  $2\alpha+2B/3B$   $p=0.030$ ). İstatistik değerlendirmeye ait sonuçlar Çizelge 5.4.'da sunulmuştur.

Çizelge 5.4. Standart-yüksek risk grupları istatistik değerlendirme sonuçlarına ait  $p$  ve medyan (M) değerleri, S: survivin, YT: yaban tip

Gruplar	*SY+*SH (tanı) ↔ *YY+*YH (tanı)	SY+SH (remisyon) ↔ YY+YH (remisyon)	SY ↔ SH	YY ↔ YH	SY ↔ YY	SH ↔ YH
<b>S-YT</b>	$p=0,841$	$p=0,334$	$p=0,160$	$p=0,556$	$p=0,409$	$p=0,676$
<b>S- <math>\Delta Ex3</math></b>	$p=0,062$	$p=0,003^*$ M=0,00049 (SY+SH) M= 0,00015 (YY+YH)	$p=0,184$	$p=0,480$	$p=0,556$	$p=0,063$
<b>S-2B</b>	$p=0,868$	$p=0,484$	$p=0,011^*$ M=0,00279 (SY) M=0,01287 (SH)	$p=0,724$	$p=0,346$	$p=0,305$
<b>S-3B</b>	$p=0,110$	$p=0,004^*$ M=0,08113 (SY+SH) M=0,12907 (YY+YH)	$p=0,063$	$p=0,239$	$p=0,724$	$p=0,025^*$ M=0,07253 (SH) M=0,16405 (YH)
<b>S-2<math>\alpha</math></b>	$p=0,062$	$p=0,006^*$ M= 0,03622 (SY+SH) M=0,10735 (YY+YH)	$p=0,425$	$p=0,480$	$p=0,289$	$p=0,138$
<b><math>\Delta Ex3/YT</math></b>	$p=0,003^*$ M= 0,39291 (SY+SH) M=0,14843 (YY+YH)	$p=0,046^*$ M=0,36637 (SY+SH) M= 0,19378 (YY+YH)	$p=0,210$	$p=0,034^*$ M=0,26243 (YY) M=0,09481 (YH)	$p=0,025^*$ M=0,51204 (SY) M=0,26243 (YY)	$p=0,025^*$ M=0,30000 (SH) M=0,09481 (YH)
<b>2B/YT</b>	$p=0,739$	$p=0,172$	$p=0,518$	$p=0,814$	$p=0,906$	$p=0,470$
<b>2<math>\alpha</math>+2B/3B</b>	$p=0,714$	$p=0,841$	$p=0,020^*$ M=0,45703 (SY) M=1,18750 (SH)	$p=0,045^*$ M=0,89325 (YY) M=0,58706 (YH)	$p=0,045^*$ M=0,45753 (SY) M=0,89325 (YY)	$p=0,030^*$ M=1,18750 (SH) M=0,58706 (YH)

\*SY: Standart risk grubundaki yavaş yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, SH: Standart risk grubundaki hızlı yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, YY: Yüksek risk grubundaki yavaş yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, YH: Yüksek risk grubundaki hızlı yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, \*\*: istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

### 5.3.3. TANI-REMİSYON DÖNEMLERİ ARASINDA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Survivin ve varyantlarının tanı ve remisyon dönemindeki ekspresyon düzeyleri kıyaslandığında yüksek risk grubunda farklılık görülmezken  $\Delta Ex3$  ekspresyon düzeyinin standart risk grubunun remisyon döneminde daha yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p=0.017$ ). İstatistik değerlendirmeye ait sonuçlar Çizelge 5.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.5. Survivin ve varyantlarının tanı-remisyon dönemleri istatistik değerlendirme sonuçlarına ait  $p$  ve medyan (M) değerleri, S: survivin, YT: yaban tip

Gruplar	*SY+*SH (tanı) ↔ SY+SH (remisyon)	*YY+*YH (tanı) ↔ YY+YH (remisyon)
S-YT	$p=0,086$	$p=0,307$
S- $\Delta Ex3$	$p=0,017^{**}$ M= 0,00025(SY+SH) (tanı) M=0,00049(SY+SH) (remisyon)	$p=0,156$
S-2B	$p=0,232$	$p= 0,363$
S-3B	$p=0,247$	$p=0,776$
S-2 $\alpha$	$p=0,433$	$p=0,820$
$\Delta Ex3$ /YT	$p=0,433$	$p=0,140$
2B/YT	$p=0,108$	$p=0,570$
2 $\alpha$ +2B/3B	$p=0,502$	$p=0,140$

\*SY: Standart risk grubundaki yavaş yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, SH: Standart risk grubundaki hızlı yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, YY: Yüksek risk grubundaki yavaş yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, YH: Yüksek risk grubundaki hızlı yanıt veren hastaların ilk tanı dönemindeki ekspresyon çalışması, \*\*: istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

Survivin, yapısal ve fonksiyonel olarak IAP'nin üyesi, evrim boyunca korunmuş bir proteindir. Hem hücre bölünmesi hem de apoptozun düzenlenmesinde görev almaktadır. Diğer IAP'lerin aksine fetal dokuda ekspresyon düzeyi yüksek olmasına karşın, normal erişkin dokuda ekspresyonu düşük olmaktadır (72). Ancak survivin ekspresyonunun yumuşak doku sarkoması (103), meme kanseri (170), mide kanseri (99), renal hücre sarkoması (171) gibi birçok kanser türünde aşırı düzeylerde arttığı bulunmuştur.

Literatürdeki çalışmaların çoğunluğu hematolojik olmayan malignensilerde yapılan (172), (173), (174), (169) ve yaban tip survivin, ΔEx3 ile 2B varyantını içeren çalışmalardır. Bu çalışmaların hemen tamamında en yüksek düzeyde ekspresyon düzeyine sahip olan survivin formu yaban tip survivin olarak göze çarpmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi bu çalışmalarda yaban tip survivin için kullanılan primerlerin makalelerde söylenenin aksine diğer survivin varyantlarına da bağlandığı görülmektedir. Diğer varyantların da çoğaltılmasını önlemek amacıyla sadece yaban tip survivine özgü yeni primerlerin tasarlandığı bizim çalışmamızda yaban tip survivin, en düşük düzeyde ekspresyon gösteren varyantlardan biri olarak bulunmuş, en yüksek ekspresyon düzeyine sahip varyantların ise 3B, 2α ve 2B olduğu görülmüştür. NCBI Primer BLAST analizinde Span ve arkadaşları (166) tarafından yaban tip survivin için kullanılan primerlerin survivinin bütün varyantlarına bağlandığı, Pavlidou ve arkadaşları (167) tarafından yaban tip survivin için kullanılan primerlerin ise aynı zamanda survivin 3B varyantına da bağlandığı görülmektedir. Bu durum, bu çalışmalarda yaban tip survivin ekspresyon düzeyinin yüksek bulunmasının aslında 3B varyantı ekspresyonundan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda 3B varyantı ekspresyon düzeyinin yüksek bulunması da bu bilgi ile uyumlu olmaktadır.

Hematolojik malignensilerde survivin ile ilgili çalışmaların birçoğu protein seviyesindedir. Birçok çalışmada yaban tip survivin ALL'de zayıf prognoz ve relaps ile ilişkilendirilmiştir (136), (137), (175). Ancak survivinin varyantlarının dahil edilmediği bu araştırmalarda, yüksek ekspresyon seviyesinin yaban tip survivin dışında (proapoptotik ya da antiapoptotik) başka varyant/varyantların ekspresyon düzeylerinin yüksekliğinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Pediatrik ALL hasta grubunda ise mRNA seviyesinde survivin ve

varyantları ile ilgili yapılan tek bir çalışma bulunmaktadır. 20 hasta ve 5 kontrolün yer aldığı bu çalışmada tedaviye yanıt ve tanı/remisyon dönemlerine ait ekspresyon düzeyleri sorgulanmamış, sadece yaban tip, ΔEx3 ve 2B varyantlarının ekspresyon düzeyi incelenmiştir. 2B varyantı ekspresyon düzeyi düşüklüğünün yüksek risk grubuna yakınlık ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (171). Çalışmamızda ise 3B ve 2α varyantları da dahil edilmiş, standart ve yüksek risk grupları arasında tanı döneminde survivin ve varyantlarının ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

### **6.1.1. HASTA-KONTROL GRUPLARI DEĞERLENDİRMESİ**

Çalışmamızda ΔEx3 varyantı da yaban tip survivin gibi en düşük düzeyde ekspresyon gösteren varyantlardan biri olmasına rağmen hasta ve kontrol grubu arasında yapılan analizde yaban tip survivin ve ΔEx3 varyantı ekspresyon düzeylerinin hasta grubunda yüksek olduğu bulunmuştur. Yaban tip survivinde bulunan ekzon 3, ΔEx3 varyantında bulunmadığından antiapoptotik fonksiyon için esansiyel olan BIR bölgesi kesintiye uğramıştır. Buna rağmen ΔEx3'ün antiapoptotik özellikte olduğu ve yüksekliğinin de tümör gelişimi ve evresi ile ilişkili olduğu yönünde birçok çalışma bulunmaktadır (101). Survivin çoğunlukla homodimerik yapıda bulunmaktadır. Diğer varyantlar ile de heterodimerizasyon yaptığı ve bu heterodimerizasyonun onun hücre içi yerleşimini değiştirdiği bilinmektedir (176). Yapılan çalışmalarda ΔEx3'ün -sahip olduğu MLS (mitochondrial localization signal) bölgesi nedeniyle- yaban tip survivin ile heterodimerizasyonunun onu mitokondriye yönlendirebildiği ve bu durumun mitokondri bağımlı apoptozun inhibisyonunda esansiyel olduğu belirtilmiştir (168). ΔEx3'ün yaban tip survivin ile sitoplazma ve mitokondride birlikte yerleşiminin yaban tip survivin antiapoptotik fonksiyonunu arttırdığı da bildirilmiştir (177). Yaban tip survivin ve ΔEx3'ün hasta grubunda yüksek bulunması, bu varyantların antiapoptotik özellikte olması ve hücre proliferasyonunu arttırması nedeniyle beklenebilecek bir durumdur.

Hasta grubunda 2α, 2B ve 3B varyantları ekspresyon düzeyleri yüksek düzeylerde bulunmuş olmasına rağmen yapılan istatistiksel incelemede anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak ekspresyon düzeyleri yüksek olan bu varyantların 2α+2B/3B (proapoptotik/antiapoptotik) ekspresyon düzeyi oranları da değerlendirmeye alındığında, 2α+2B/3B oranı hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur.

2 $\alpha$  varyantı ile yapılan transfeksiyon çalışmalarında, sadece 2 $\alpha$  ile transfekte olan hücrelerde kaspaz 3 aktivasyonunun 2 $\alpha$ 'nın yaban tip survivin ile birlikte transfekte olduğu hücrelere kıyasla daha fazla bulunması ve aynı zamanda 2 $\alpha$  varyantında BIR bölgesinin kesintiye uğramış olması, bu varyantın proapoptotik özelliğe sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanında yaban tip survivinin antiapoptotik özelliğini azalttığı ve hücreleri kemoterapiye karşı hassaslaştırdığı bildirilmiştir (96).

2B'nin BIR bölgesi kesintiye uğradığından bu varyantın antiapoptotik özelliğinin azaldığı düşünülmektedir (98). Yapılan çalışmalarda, survivin 2B'nin potansiyel proapoptotik bir molekül olarak rol oynadığı, yaban tip survivinin antiapoptotik özelliklerini azalttığı ve benign lezyonlarda malign lezyonlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (102).

3B varyantının eksiksiz bir BIR bölgesi içermesi ve kaspaz 6 aktivasyonunu engellemesi nedeniyle antiapoptotik özelliğini koruduğu düşünülmektedir (178). Ayrıca çeşitli dokulara ait kanser örneklerinde yapılan çalışmada tümör oluşumu, gelişimi ve yayılımında 3B'nin rolü olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise kolon kanseri hücrelerinde 5-Fluorourasil'in invazyon inhibitörü etkisini azaltarak tümör hücrelerinde kemoterapiye direnç oluşturduğu gösterilmiştir (106).

Hasta grubunda 2 $\alpha$ +2B/3B oranının daha yüksek bulunması kanser hücrelerinin apoptotik davranışını değiştirebilir. Bu iki yol ile olabilir: 3B'nin yaban tip survivin ile benzerliğinden dolayı 2B, 3B'nin de doğal antagonisti olabilir ve 3B'nin ekspresyonunun azalması proapoptotik varyantların etkisini güçlendirebilir. Bir başka şekilde bütün survivin varyantları ortak bir hnRNA prekürsöründen meydana geldiği için 3B ekspresyonunun azalması daha proapoptotik varyantların oluşumu ile sonuçlanabilir. Bu nedenle 2 $\alpha$  ve 2B ekspresyonu yüksekliğinin hasta grubunda öne çıkması muhtemel olabilir.

Elde edilen bu bilgilere dayanarak yaban tip survivin,  $\Delta$ Ex3 ve 2 $\alpha$ +2B/3B oranının ekspresyon düzeylerinin pediatrik ALL gelişimi için risk oluşturabileceği düşünülmektedir.

### **6.1.2. STANDART-YÜKSEK RİSK GRUPLARI DEĞERLENDİRMESİ**

Çalışmamızda standart ve yüksek risk grubu arasında yaban tip survivin ve  $\Delta$ Ex3 ekspresyonları açısından bir farklılık bulunmamasına rağmen,  $\Delta$ Ex3/YT ekspresyon düzeyi oranı standart risk grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Literatürdeki bir çalışmada  $\Delta$ Ex3/YT oranı malign beyin tümörü hücrelerinde ve servikal karsinomda yüksek



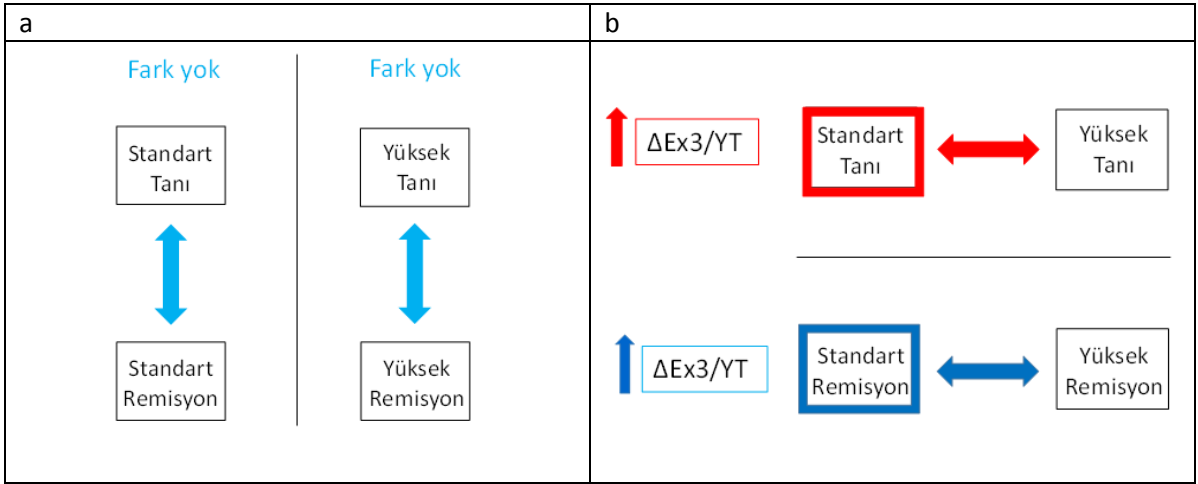
bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise  $\Delta\text{Ex3/YT}$  oranı meme kanseri hücrelerinde tümör evresi ile ilişkili bulunurken, kolorektal adenokarsinomda zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşın renal hücre karsinomasında gerçekleştirilen çalışmada  $\Delta\text{Ex3/YT}$  oranı tümör evresi ile ilişkili bulunmamıştır.

Survivinin biri karboksil ucunda, diğeri ise merkezi bölgede bulunan iki NES yapısına sahip olduğu düşünülmektedir. Merkezi NES yapısı, yakınında yer alan dimerizasyon bölgesi ile örtüştüğünden, homodimerizasyon yaban tip survivinin sitoplazmaya çıkışını önleyebilir (179). Yaban tip survivinin antiapoptotik fonksiyonu daha çok sitoplazmik lokalizasyonundan kaynaklandığı için homodimerizasyon onun antiapoptotik fonksiyonunu azaltabilir. Benzer bir şekilde,  $\Delta\text{Ex3/YT}$  heterodimer oluşumu yaban tip survivinin nukleer lokalizasyon sinyaline sahip olan  $\Delta\text{Ex3}$  ile birlikte çekirdeğe yerleşmesini sağlayabilir. Bizim çalışmamızda  $\Delta\text{Ex3/YT}$  ekspresyon oranının yüksek risk grubunda daha düşük bulunması yaban tip survivin'in çekirdeğe yerleşimine neden olan heterodimer oluşumunun azalması ve dolayısıyla daha agresif bir davranış ile ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda standart ve yüksek risk grubu arasında yapılan değerlendirmede  $2\alpha+2B/3B$  ekspresyon düzeyi oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte ekspresyon düzeyi oranının standart risk grubunda anlamlı derecede yüksek bulunması,  $\Delta\text{Ex3/YT}$  oranının risk sınıflamasında kullanılabileceğini düşündürmektedir.

### **6.1.3. TANI-REMİSYON DÖNEMLERİ DEĞERLENDİRMESİ**

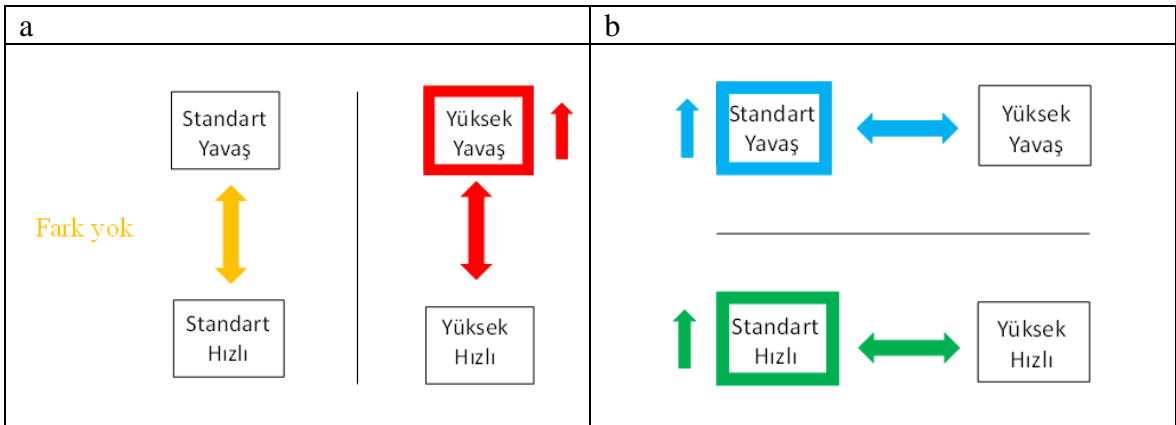
Yüksek risk grubunda survivin ve varyantlarının tanı ve remisyon dönemindeki ekspresyon düzeyleri arasında bir farklılık görülmezken, standart risk grubunun remisyon döneminde  $\Delta\text{Ex3}$  ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ekspresyon düzeyi oranları açısından risk gruplarının kendi tanı ve remisyon dönemleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 6.1.)(a). Bununla birlikte standart ve yüksek risk gruplarının tanı ve remisyon dönemlerindeki ekspresyon oranları kıyaslandığında  $\Delta\text{Ex3/YT}$  oranının her iki dönemde de standart risk grubunda daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.1.)(b). Bu sonuçlar  $\Delta\text{Ex3/YT}$  oranının tanı-remisyon ayırımından daha çok risk sınıflamasında rolü olabileceğini desteklemektedir.



Şekil 6.1. Tanı-remisyon dönemleri değerlendirilmesinde  $\Delta Ex3/YT$  ekspresyon oranı sonuçlarının şematik gösterimi

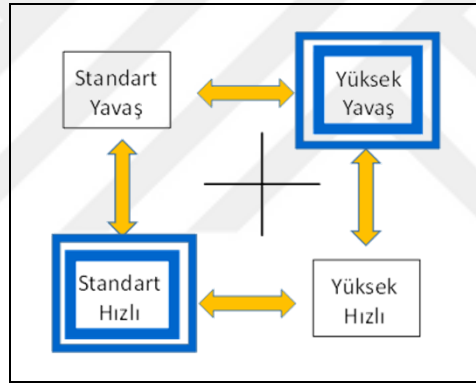
#### 6.1.4. TEDAVİYE YANITTA ETKİLİ VARYANTLARIN DEĞERLENDİRMESİ

Standart risk grubunda tedaviye yavaş ve hızlı yanıt veren hastaların  $\Delta Ex3/YT$  ekspresyon düzeyi oranı kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yüksek risk grubunda yavaş ve hızlı yanıt veren hastalar kıyaslandığında ise yavaş cevap veren hastaların  $\Delta Ex3/YT$  ekspresyon düzeyi oranı hızlı yanıt veren hastalara göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 6.2.)(a). Standart ve yüksek risk grubunda tedaviye yavaş cevap veren hastalar kıyaslandığında standart risk grubunda yavaş yanıt veren hastaların  $\Delta Ex3/YT$  ekspresyon düzeyi oranının yüksek olduğu gözlenmiştir. Standart ve yüksek risk grubunda tedaviye hızlı cevap veren hastalar kıyaslandığında ise standart risk grubunda hızlı yanıt veren hastalarının  $\Delta Ex3/YT$  ekspresyon düzeyi oranının yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.2.)(b). Bu sonuçlar  $\Delta Ex3/YT$  oranının tedaviye yanıtta etkili varyant olmaktan çok risk sınıflamasında kullanılabileceğini desteklemektedir.



Şekil 6.2. Tedaviye yanıtta etkili varyantların değerlendirilmesinde  $\Delta Ex3/YT$  ekspresyon oranı sonuçlarının şematik gösterimi

Standart risk grubunda tedaviye yavaş ve hızlı yanıt veren hastalar kıyaslandığında standart risk grubunun hızlı yanıt veren hastalarında  $2\alpha+2B/3B$  ekspresyon düzeyi oranının yüksek olduğu bulunmuştur. Yüksek risk grubunda yavaş ve hızlı yanıt veren hastalar kıyaslandığında ise yavaş cevap veren hastaların hızlı yanıt veren hastalara göre daha yüksek  $2\alpha+2B/3B$  ekspresyon düzeyi oranına sahip olduğu bulunmuştur. Standart ve yüksek risk grubunda tedaviye yavaş cevap veren hastalar kıyaslandığında yüksek risk grubunun yavaş yanıt veren hastalarında  $2\alpha+2B/3B$  ekspresyon düzeyi oranının yüksek olduğu gözlenmiştir. Standart ve yüksek risk grubunda tedaviye hızlı cevap veren hastalar kıyaslandığında ise standart risk grubunun hızlı yanıt veren hastalarında  $2\alpha+2B/3B$  ekspresyon düzeyi oranının yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.3.). Bu sonuçlar,  $2\alpha+2B/3B$  oranının standart riskli grupta hızlı cevap, yüksek riskli grupta yavaş cevap ile ilgili olabileceği izlenimi vermektedir.



Şekil 6.3. Tedaviye yanıtta etkili varyantların değerlendirilmesinde  $2\alpha+2B/3B$  ekspresyon oranı sonuçlarının şematik gösterimi

Survivin inhibisyonunu hedef alan çalışmalarda kullanılan YM155 ve LY2181308 isimli bileşikler ya da oligonikleotidler tüm survivin varyantlarının inhibisyonuna neden olmaktadır. Oysa survivinin proapoptotik ve antiapoptotik özellikte birbirine zıt fonksiyona sahip varyantları bulunduğundan tümünün değil proapoptotik varyantların korunmasının ve sadece antiapoptotik özellikte olan varyantların inhibisyonunun tedavide daha etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle varyant spesifik olmayan tedavi yaklaşımları yerine antiapoptotik varyantların inhibisyonunun prognoz ve tedavi üzerinde daha olumlu etki oluşturabileceği düşünülmektedir.

## 6.2. SONUÇLAR

Çalışmamızda yaban tip survivin ve  $\Delta Ex3$  en düşük,  $2\alpha$  ve  $3B$  ise en yüksek ekspresyon düzeyine sahip varyantlar olarak bulunmuştur.

Yaban tip survivin,  $\Delta Ex3$  ve  $2\alpha+2B/3B$  oranı ekspresyon düzeylerinin hasta grubunda yüksek bulunması, bu varyantların pediyatrik ALL gelişimi için risk oluşturabileceğini düşündürmektedir.

$\Delta Ex3/YT$  oranı ekspresyon düzeyinin standart risk grubunda anlamlı derecede yüksek bulunması,  $\Delta Ex3/YT$  oranının risk sınıflamasında kullanılabileceğini düşündürmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*. 1995;75(8):2186-95. PubMed PMID: 7697611.
2. Greaves MF, Colman SM, Beard ME, Bradstock K, Cabrera ME, Chen PM, et al. Geographical distribution of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: second report of the collaborative group study. *Leukemia*. 1993;7(1):27-34. PubMed PMID: 8418376.
3. Tekgündüz E, Demir M, Akpınar S. Prognostik Faktörler Işığında Akut Lenfoblastik Lösemi. *International Journal of Hematology and Oncology*. 2010;20(1):57-66.
4. Aksu Uzunhan T, Karakaş Z. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. *J Child*. 2012;12(1):6-15. doi: doi:10.5222/j.child.2012.006.
5. Lanzkowski P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 5th ed. USA: Academic Press; 2011. 1053 p.
6. Foa R, Vitale A. Towards an integrated classification of adult acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2002;6(2):181-99; discussion 200-2. PubMed PMID: 12196215.
7. Margolin J, Pohlack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1997.
8. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment 2015 [updated 2015 October 30]. Available from: <http://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq>.
9. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2009. 737 p.
10. Hunger SP. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood*. 1996;87(4):1211-24. PubMed PMID: 8608207.
11. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of

anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*. 2000;95(11):3310-22. PubMed PMID: 10828010.

12. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, Lehmann L, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol*. 2003;21(19):3616-22. doi: 10.1200/JCO.2003.10.116. PubMed PMID: 14512392.

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

14. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6306-15. doi: 10.1200/JCO.2005.05.047. PubMed PMID: 16155013.

15. Bergeron J, Clappier E, Radford I, Buzyn A, Millien C, Soler G, et al. Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. *Blood*. 2007;110(7):2324-30. doi: 10.1182/blood-2007-04-079988. PubMed PMID: 17609427.

16. Cave H, Suci S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, et al. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood*. 2004;103(2):442-50. doi: 10.1182/blood-2003-05-1495. PubMed PMID: 14504110.

17. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-71. doi: 10.1126/science.1102160. PubMed PMID: 15472075.

18. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262. PubMed PMID: 19357394.

19. Pui CH, Boyett JM, Relling MV, Harrison PL, Rivera GK, Behm FG, et al. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1999;17(3):818-24. PubMed PMID: 10071272.

20. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med.* 2009;360(26):2730-41. doi: 10.1056/NEJMoa0900386. PubMed PMID: 19553647; PubMed Central PMCID: PMCPMC2754320.
21. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2012;30(14):1663-9. doi: 10.1200/JCO.2011.37.8018. PubMed PMID: 22412151; PubMed Central PMCID: PMCPMC3383113.
22. Bhatia S. Influence of race and socioeconomic status on outcome of children treated for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Pediatr.* 2004;16(1):9-14. PubMed PMID: 14758108.
23. Xu H, Cheng C, Devidas M, Pei D, Fan Y, Yang W, et al. ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(7):751-7. doi: 10.1200/JCO.2011.38.0345. PubMed PMID: 22291082; PubMed Central PMCID: PMCPMC3295551.
24. Crist W, Carroll A, Shuster J, Jackson J, Head D, Borowitz M, et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. *Blood.* 1990;76(3):489-94. PubMed PMID: 2378982.
25. Van Rhee F, Kasprzyk A, Jamil A, Dickinson H, Lin F, Cross NC, et al. Detection of the BCR-ABL gene by reverse transcription/polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization in a patient with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 1995;90(1):225-8. PubMed PMID: 7786793.
26. Kearney L. The impact of the new fish technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haematol.* 1999;104(4):648-58. PubMed PMID: 10192422.
27. Groffen J, Heisterkamp N. The BCR/ABL hybrid gene. *Baillieres Clin Haematol.* 1987;1(4):983-99. PubMed PMID: 3332859.

28. Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, Linda SB, Kurtzberg J, et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2008;26(13):2186-91. doi: 10.1200/JCO.2007.14.3552. PubMed PMID: 18445843; PubMed Central PMCID: PMC4485397.
29. Attarbaschi A, Mann G, Konig M, Dworzak MN, Trebo MM, Muhlegger N, et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia*. 2004;18(10):1611-6. doi: 10.1038/sj.leu.2403471. PubMed PMID: 15356655.
30. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, Poon WM, Vattikuti S, Cardoso A, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *Blood*. 2006;107(11):4508-13. doi: 10.1182/blood-2005-08-3451. PubMed PMID: 16493009; PubMed Central PMCID: PMC1895800.
31. Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT, Jeha S, Ribeiro RC, Rubnitz JE, et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia*. 2012;26(2):265-70. doi: 10.1038/leu.2011.227. PubMed PMID: 21869842; PubMed Central PMCID: PMC3345278.
32. Pui CH, Chessells JM, Camitta B, Baruchel A, Biondi A, Boyett JM, et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*. 2003;17(4):700-6. doi: 10.1038/sj.leu.2402883. PubMed PMID: 12682627.
33. Chessells JM, Harrison CJ, Kempinski H, Webb DK, Wheatley K, Hann IM, et al. Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. *Leukemia*. 2002;16(5):776-84. doi: 10.1038/sj.leu.2402468. PubMed PMID: 11986937.
34. Johansson B, Moorman AV, Haas OA, Watmore AE, Cheung KL, Swanton S, et al. Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*. 1998;12(5):779-87. PubMed PMID: 9593281.



35. Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol.* 2008;9(3):257-68. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70070-6. PubMed PMID: 18308251.
36. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia.* 2005;19(5):734-40. doi: 10.1038/sj.leu.2403673. PubMed PMID: 15789069.
37. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48(8):637-60. doi: 10.1002/gcc.20671. PubMed PMID: 19415723.
38. Dastugue N, Suci S, Plat G, Speleman F, Cave H, Girard S, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood.* 2013;121(13):2415-23. doi: 10.1182/blood-2012-06-437681. PubMed PMID: 23321258.
39. Synold TW, Relling MV, Boyett JM, Rivera GK, Sandlund JT, Mahmoud H, et al. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 1994;94(5):1996-2001. doi: 10.1172/JCI117552. PubMed PMID: 7525652; PubMed Central PMCID: PMC294625.
40. Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, Look AT, Borowitz MJ, Crist WM, et al. Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood.* 1992;79(12):3316-24. PubMed PMID: 1596572.
41. Heerema NA, Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Lee MK, Hutchinson R, et al. Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. *Blood.* 1999;94(12):4036-45. PubMed PMID: 10590047.

42. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2004;125(5):552-9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04948.x. PubMed PMID: 15147369.
43. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2007;110(4):1112-5. doi: 10.1182/blood-2006-07-038299. PubMed PMID: 17473063; PubMed Central PMCID: PMCPMC1939895.
44. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(3):242-52. doi: 10.1038/ng.2532. PubMed PMID: 23334668; PubMed Central PMCID: PMCPMC3919793.
45. Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML. The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood.* 1991;77(4):687-93. PubMed PMID: 1671560.
46. Dyer MJ, Akasaka T, Capasso M, Dusanj P, Lee YF, Karran EL, et al. Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? *Blood.* 2010;115(8):1490-9. doi: 10.1182/blood-2009-09-235986. PubMed PMID: 20042721.
47. Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2009;114(13):2688-98. doi: 10.1182/blood-2009-03-208397. PubMed PMID: 19641190.
48. Harewood L, Robinson H, Harris R, Al-Obaidi MJ, Jalali GR, Martineau M, et al. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia.* 2003;17(3):547-53. doi: 10.1038/sj.leu.2402849. PubMed PMID: 12646943.
49. Rand V, Parker H, Russell LJ, Schwab C, Ensor H, Irving J, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2011;117(25):6848-55. doi: 10.1182/blood-2011-01-329961. PubMed PMID: 21527530.

50. Moorman AV, Richards SM, Robinson HM, Strefford JC, Gibson BE, Kinsey SE, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood*. 2007;109(6):2327-30. doi: 10.1182/blood-2006-08-040436. PubMed PMID: 17095619.
51. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*. 2014;28(5):1015-21. doi: 10.1038/leu.2013.317. PubMed PMID: 24166298; PubMed Central PMCID: PMC4283797.
52. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125-34. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70339-5. PubMed PMID: 19138562; PubMed Central PMCID: PMC4283797.
53. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, Vignetti M, Paoloni F, Cilloni D, et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5202-7. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6408. PubMed PMID: 19770381.
54. van der Veer A, Zaliouva M, Mottadelli F, De Lorenzo P, Te Kronnie G, Harrison CJ, et al. IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. *Blood*. 2014;123(11):1691-8. doi: 10.1182/blood-2013-06-509794. PubMed PMID: 24366361.
55. Perez-Andreu V, Roberts KG, Harvey RC, Yang W, Cheng C, Pei D, et al. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nat Genet*. 2013;45(12):1494-8. doi: 10.1038/ng.2803. PubMed PMID: 24141364; PubMed Central PMCID: PMC4039076.
56. Cario G, Zimmermann M, Romey R, Gesk S, Vater I, Harbott J, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-

BFM 2000 protocol. *Blood*. 2010;115(26):5393-7. doi: 10.1182/blood-2009-11-256131. PubMed PMID: 20378752.

57. Smith CA, Fan G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol*. 2008;39(6):795-810. doi: 10.1016/j.humpath.2008.02.004. PubMed PMID: 18538168.

58. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(11):1243-6. doi: 10.1038/ng.469. PubMed PMID: 19838194; PubMed Central PMCID: PMC2783810.

59. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60457-2. PubMed PMID: 18358930.

60. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010;24(2):265-84. doi: 10.1038/leu.2009.257. PubMed PMID: 20010625.

61. Prucker C, Attarbaschi A, Peters C, Dworzak MN, Potschger U, Urban C, et al. Induction death and treatment-related mortality in first remission of children with acute lymphoblastic leukemia: a population-based analysis of the Austrian Berlin-Frankfurt-Munster study group. *Leukemia*. 2009;23(7):1264-9. doi: 10.1038/leu.2009.12. PubMed PMID: 19212332.

62. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354(2):166-78. doi: 10.1056/NEJMra052603. PubMed PMID: 16407512.

63. Clarke M, Gaynon P, Hann I, Harrison G, Masera G, Peto R, et al. CNS-directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Childhood ALL Collaborative Group overview of 43 randomized trials. *J Clin Oncol*. 2003;21(9):1798-809. doi: 10.1200/JCO.2003.08.047. PubMed PMID: 12721257.

64. Childhood ALLCG. Duration and intensity of maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia: overview of 42 trials involving 12 000 randomised children. *Lancet*. 1996;347(9018):1783-8. PubMed PMID: 8667921.
65. Bhatia S, Landier W, Shangguan M, Hageman L, Schaible AN, Carter AR, et al. Nonadherence to oral mercaptopurine and risk of relapse in Hispanic and non-Hispanic white children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2094-101. doi: 10.1200/JCO.2011.38.9924. PubMed PMID: 22564992; PubMed Central PMCID: PMC3601449.
66. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, De Lorenzo P, Klingebiel T, Peters C, et al. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet*. 2005;366(9486):635-42. Epub 2005/08/23. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66998-X. PubMed PMID: 16112299.
67. P Stephen MH. Development and Refinement of Augmented Treatment Regimens for Pediatric High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *American Society of Clinical Oncology*. 2012:611-5.
68. Phase III Randomized Study of Different Combination Chemotherapy Regimens in Pediatric Patients With Newly Diagnosed Standard Risk B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia [updated 2019 April 6]. Available from: <http://www.ped-onc.org/diseases/ALLtrials/COG0331.html>.
69. Phase III Randomized Study of Dexamethasone Versus Prednisone During Induction and High-Dose Methotrexate With Leucovorin Rescue Versus Escalating-Dose Methotrexate Without Leucovorin Rescue During Interim Maintenance I in Patients With Newly Diagnosed High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia [updated 2019 April 6].
70. Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998;12(12):2006-14. Epub 1998/12/09. PubMed PMID: 9844931.
71. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):46-54. doi: 10.1038/nrc968. PubMed PMID: 12509766.

72. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997;3(8):917-21. PubMed PMID: 9256286.
73. Muchmore SW, Chen J, Jakob C, Zakula D, Matayoshi ED, Wu W, et al. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol Cell.* 2000;6(1):173-82. PubMed PMID: 10949038.
74. Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(4):463-76. doi: 10.1517/14728222.12.4.463. PubMed PMID: 18348682.
75. Coumar MS, Tsai FY, Kanwar JR, Sarvagalla S, Cheung CH. Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality? *Cancer Treat Rev.* 2013;39(7):802-11. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.02.002. PubMed PMID: 23453862.
76. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(12):979-87. doi: 10.1038/nrd2656. PubMed PMID: 19043449.
77. Mobahat M, Narendran A, Riabowol K. Survivin as a preferential target for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2494-516. doi: 10.3390/ijms15022494. PubMed PMID: 24531137; PubMed Central PMCID: PMC3958864.
78. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231-41. doi: 10.1038/nrm2312. PubMed PMID: 18073771.
79. Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci.* 1997;22(5):155-6. PubMed PMID: 9175472.
80. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(6):401-10. doi: 10.1038/nrm830. PubMed PMID: 12042762.
81. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene.* 2003;22(53):8581-9. doi: 10.1038/sj.onc.1207113. PubMed PMID: 14634620.
82. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.* 2003;22(11):2729-40.

doi: 10.1093/emboj/cdg263. PubMed PMID: 12773388; PubMed Central PMCID: PMC156760.

83. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5000-5. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0746. PubMed PMID: 18698017.

84. Honda R, Korner R, Nigg EA. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell.* 2003;14(8):3325-41. doi: 10.1091/mbc.E02-11-0769. PubMed PMID: 12925766; PubMed Central PMCID: PMC181570.

85. Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, et al. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol.* 2004;166(2):179-91. doi: 10.1083/jcb.200404001. PubMed PMID: 15249581; PubMed Central PMCID: PMC172304.

86. Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J, Stukenberg PT. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2002;13(9):3064-77. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0092. PubMed PMID: 12221116; PubMed Central PMCID: PMC124143.

87. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(24):13103-7. doi: 10.1073/pnas.240390697. PubMed PMID: 11069302; PubMed Central PMCID: PMC17185.

88. Vong QP, Cao K, Li HY, Iglesias PA, Zheng Y. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science.* 2005;310(5753):1499-504. doi: 10.1126/science.1120160. PubMed PMID: 16322459.

89. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 1998;396(6711):580-4. doi: 10.1038/25141. PubMed PMID: 9859993.

90. Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol*. 2002;11(1):33-40. PubMed PMID: 11854600.
91. Niu TK, Cheng Y, Ren X, Yang JM. Interaction of Beclin 1 with survivin regulates sensitivity of human glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 2010;584(16):3519-24. doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.018. PubMed PMID: 20638385; PubMed Central PMCID: PMC3210451.
92. Roca H, Varsos Z, Pienta KJ. CCL2 protects prostate cancer PC3 cells from autophagic death via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent survivin up-regulation. *J Biol Chem*. 2008;283(36):25057-73. doi: 10.1074/jbc.M801073200. PubMed PMID: 18611860; PubMed Central PMCID: PMC2529129.
93. Jiang G, Ren B, Xu L, Song S, Zhu C, Ye F. Survivin may enhance DNA double-strand break repair capability by up-regulating Ku70 in human KB cells. *Anticancer Res*. 2009;29(1):223-8. PubMed PMID: 19331153.
94. Capalbo G, Dittmann K, Weiss C, Reichert S, Hausmann E, Rodel C, et al. Radiation-induced survivin nuclear accumulation is linked to DNA damage repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;77(1):226-34. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.12.001. PubMed PMID: 20394854.
95. Reichert S, Rodel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M, et al. Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol*. 2011;101(1):51-8. doi: 10.1016/j.radonc.2011.06.037. PubMed PMID: 21852011.
96. Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer*. 2005;4(1):11. doi: 10.1186/1476-4598-4-11. PubMed PMID: 15743529; PubMed Central PMCID: PMC554981.
97. Sah NK, Seniya C. Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumour Biol*. 2015;36(9):6623-31. Epub 2015/08/08. doi: 10.1007/s13277-015-3865-5. PubMed PMID: 26245993.



98. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.* 1999;59(24):6097-102. Epub 2000/01/08. PubMed PMID: 10626797.
99. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, et al. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer.* 2002;86(5):737-43. Epub 2002/03/05. doi: 10.1038/sj.bjc.6600153. PubMed PMID: 11875736; PubMed Central PMCID: PMCPMC2375298.
100. Ling X, Cheng Q, Black JD, Li F. Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin. *J Biol Chem.* 2007;282(37):27204-14. doi: 10.1074/jbc.M705161200. PubMed PMID: 17656368; PubMed Central PMCID: PMCPMC2827256.
101. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2005;92(2):212-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6602340. PubMed PMID: 15611788; PubMed Central PMCID: PMCPMC2361850.
102. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene.* 2000;19(5):617-23. doi: 10.1038/sj.onc.1203358. PubMed PMID: 10698506.
103. Taubert H, Kappler M, Bache M, Bartel F, Kohler T, Lautenschlager C, et al. Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients. *Oncogene.* 2005;24(33):5258-61. doi: 10.1038/sj.onc.1208702. PubMed PMID: 15856009.
104. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, et al. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(3):902-7. PubMed PMID: 14741722.
105. Knauer SK, Bier C, Schlag P, Fritzmann J, Dietmaier W, Rodel F, et al. The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle.* 2007;6(12):1502-9. Epub 2007/06/22. PubMed PMID: 17582222.

106. Sawai K, Goi T, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. Survivin-3B gene decreases the invasion-inhibitory effect of colon cancer cells with 5-fluorouracil. *Oncol Res.* 2010;18(11-12):541-7. PubMed PMID: 20939430.
107. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet.* 1998;351(9106):882-3. doi: 10.1016/S0140-6736(05)70294-4. PubMed PMID: 9525374.
108. Chumakov PM. Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochemistry (Mosc).* 2000;65(1):28-40. Epub 2000/03/07. PubMed PMID: 10702638.
109. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3247-57. Epub 2001/11/21. doi: 10.1074/jbc.M106643200. PubMed PMID: 11714700.
110. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene.* 2002;21(17):2613-22. doi: 10.1038/sj.onc.1205353. PubMed PMID: 11965534.
111. Wang Z, Fukuda S, Pelus LM. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene.* 2004;23(49):8146-53. Epub 2004/09/14. doi: 10.1038/sj.onc.1207992. PubMed PMID: 15361831.
112. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(1):11-26. Epub 2012/12/22. doi: 10.1038/nrc3419. PubMed PMID: 23258168.
113. Zhu H, Zhang G, Wang Y, Xu N, He S, Zhang W, et al. Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2010;101(5):1156-62. Epub 2010/03/25. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01528.x. PubMed PMID: 20331626.
114. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):393-410. Epub 2011/05/25. doi: 10.1038/nrc3064. PubMed PMID: 21606941.

115. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(4):331-71. Epub 2008/07/26. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.05.001. PubMed PMID: 18653375; PubMed Central PMCID: PMCPMC3682685.
116. Chen YQ, Zhao CL, Li W. Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha on transcription of survivin in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28:29. Epub 2009/02/28. doi: 10.1186/1756-9966-28-29. PubMed PMID: 19245702; PubMed Central PMCID: PMCPMC2663545.
117. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood.* 2003;101(8):2940-54. Epub 2002/12/14. doi: 10.1182/blood-2002-04-1204. PubMed PMID: 12480704.
118. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood.* 2003;101(4):1535-42. doi: 10.1182/blood-2002-07-2130. PubMed PMID: 12393476.
119. Chen Y, Li D, Liu H, Xu H, Zheng H, Qian F, et al. Notch-1 signaling facilitates survivin expression in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(1):14-21. Epub 2010/10/22. PubMed PMID: 20962575.
120. Yang J, Song K, Krebs TL, Jackson MW, Danielpour D. Rb/E2F4 and Smad2/3 link survivin to TGF-beta-induced apoptosis and tumor progression. *Oncogene.* 2008;27(40):5326-38. Epub 2008/05/28. doi: 10.1038/onc.2008.165. PubMed PMID: 18504435; PubMed Central PMCID: PMCPMC2762862.
121. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer.* 2016;7(3):314-23. Epub 2016/02/27. doi: 10.7150/jca.13332. PubMed PMID: 26918045; PubMed Central PMCID: PMCPMC4747886.
122. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1457-62. PubMed PMID: 9990045; PubMed Central PMCID: PMCPMC15484.

123. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol.* 1998;8(3):107-11. PubMed PMID: 9695819.
124. Sommer KW, Schamberger CJ, Schmidt GE, Sasgary S, Cerni C. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. *Oncogene.* 2003;22(27):4266-80. doi: 10.1038/sj.onc.1206509. PubMed PMID: 12833149.
125. Noton EA, Colnaghi R, Tate S, Starck C, Carvalho A, Ko Ferrigno P, et al. Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. *J Biol Chem.* 2006;281(2):1286-95. doi: 10.1074/jbc.M508773200. PubMed PMID: 16291752.
126. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, et al. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):13791-6. doi: 10.1073/pnas.2434345100. PubMed PMID: 14614132; PubMed Central PMCID: PMC283500.
127. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(5):1087-98. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0375. PubMed PMID: 16731740.
128. Deguchi M, Shiraki K, Inoue H, Okano H, Ito T, Yamanaka T, et al. Expression of survivin during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(1):59-64. PubMed PMID: 12220508.
129. Johnson EA, Svetlov SI, Wang KK, Hayes RL, Pineda JA. Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a survivin-dependent mechanism after traumatic brain injury in rats. *Exp Brain Res.* 2005;167(1):17-26. doi: 10.1007/s00221-005-2362-2. PubMed PMID: 16193270.
130. Kindt N, Menzebach A, Van de Wouwer M, Betz I, De Vriese A, Conway EM. Protective role of the inhibitor of apoptosis protein, survivin, in toxin-induced acute renal failure. *FASEB J.* 2008;22(2):510-21. doi: 10.1096/fj.07-8882com. PubMed PMID: 17804696.

131. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett.* 2007;249(1):49-60. doi: 10.1016/j.canlet.2006.12.020. PubMed PMID: 17275177.
132. Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001;7(12):542-7. Epub 2001/12/06. PubMed PMID: 11733216.
133. Carter BZ, Qiu Y, Huang X, Diao L, Zhang N, Coombes KR, et al. Survivin is highly expressed in CD34(+)/38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML. *Blood.* 2012;120(1):173-80. Epub 2012/05/31. doi: 10.1182/blood-2012-02-409888. PubMed PMID: 22645176; PubMed Central PMCID: PMC3390955.
134. Pise-Masison CA, Radonovich M, Dohoney K, Morris JC, O'Mahony D, Lee MJ, et al. Gene expression profiling of ATL patients: compilation of disease-related genes and evidence for TCF4 involvement in BIRC5 gene expression and cell viability. *Blood.* 2009;113(17):4016-26. doi: 10.1182/blood-2008-08-175901. PubMed PMID: 19131553; PubMed Central PMCID: PMC2673128.
135. Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis GZ. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1682-8. doi: 10.1200/JCO.2004.10.172. PubMed PMID: 15117990.
136. Troeger A, Siepermann M, Escherich G, Meisel R, Willers R, Gudowius S, et al. Survivin and its prognostic significance in pediatric acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2007;92(8):1043-50. Epub 2007/07/21. PubMed PMID: 17640858.
137. Esh AM, Atfy M, Azizi NA, El Naggar MM, Khalil EE, Sherief L. Prognostic significance of survivin in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2011;27(1):18-25. Epub 2012/03/02. doi: 10.1007/s12288-010-0053-z. PubMed PMID: 22379290; PubMed Central PMCID: PMC3102502.
138. Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, et al. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2004;28(5):487-94. doi: 10.1016/j.leukres.2003.10.013. PubMed PMID: 15068902.

139. Voelkl J, Lin Y, Alesutan I, Ahmed MS, Pasham V, Mia S, et al. Sgk1 sensitivity of Na(+)/H(+) exchanger activity and cardiac remodeling following pressure overload. *Basic Res Cardiol.* 2012;107(2):236. Epub 2012/01/04. doi: 10.1007/s00395-011-0236-2. PubMed PMID: 22212557.
140. Huang J, Lyu H, Wang J, Liu B. Influence of survivin-targeted therapy on chemosensitivity in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 2015;366(2):160-72. Epub 2015/07/01. doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.033. PubMed PMID: 26123662; PubMed Central PMCID: PMC4524353.
141. Invernizzi R, Travaglino E, Benatti C, Malcovati L, Della Porta M, Cazzola M, et al. Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 2006;76(6):494-501. Epub 2006/03/15. doi: 10.1111/j.0902-4441.2006.t01-1-EJH2588.x. PubMed PMID: 16529600.
142. Wagner M, Schmelz K, Wuchter C, Ludwig WD, Dorken B, Tamm I. In vivo expression of survivin and its splice variant survivin-2B: impact on clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2006;119(6):1291-7. doi: 10.1002/ijc.21995. PubMed PMID: 16619249.
143. Moore AS, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange BJ, Heerema NA, Franklin J, et al. BIRC5 (survivin) splice variant expression correlates with refractory disease and poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(4):647-52. Epub 2013/10/16. doi: 10.1002/pbc.24822. PubMed PMID: 24127439; PubMed Central PMCID: PMC4285339.
144. Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med.* 2005;9(2):360-72. PubMed PMID: 15963255.
145. Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res.* 2007;67(17):8014-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1343. PubMed PMID: 17804712.
146. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol.* 1999;113(6):1076-81. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00776.x. PubMed PMID: 10594755.

147. Azuhata T, Scott D, Griffith TS, Miller M, Sandler AD. Survivin inhibits apoptosis induced by TRAIL, and the ratio between survivin and TRAIL receptors is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 2006;41(8):1431-40. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2006.04.020. PubMed PMID: 16863850.
148. Sharma H, Sen S, Lo Muzio L, Mariggio A, Singh N. Antisense-mediated downregulation of anti-apoptotic proteins induces apoptosis and sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to chemotherapy. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(7):720-7. PubMed PMID: 15917659.
149. Fisker N, Westergaard M, Hansen HF, Hansen JB. Survivin mRNA antagonists using locked nucleic acid, potential for molecular cancer therapy. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007;26(10-12):1427-30. doi: 10.1080/15257770701542132. PubMed PMID: 18066798.
150. Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Cabreira-Hansen M, Beran M, McQueen T, et al. Regulation of survivin expression through Bcr-Abl/MAPK cascade: targeting survivin overcomes imatinib resistance and increases imatinib sensitivity in imatinib-responsive CML cells. *Blood.* 2006;107(4):1555-63. doi: 10.1182/blood-2004-12-4704. PubMed PMID: 16254145; PubMed Central PMCID: PMC1895411.
151. Sah NK, Munshi A, Hobbs M, Carter BZ, Andreeff M, Meyn RE. Effect of downregulation of survivin expression on radiosensitivity of human epidermoid carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66(3):852-9. doi: 10.1016/j.ijrobp.2006.06.049. PubMed PMID: 17011457.
152. Wochner A, Attwater J, Coulson A, Holliger P. Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme. *Science.* 2011;332(6026):209-12. Epub 2011/04/09. doi: 10.1126/science.1200752. PubMed PMID: 21474753.
153. Pennati M, Binda M, Colella G, Folini M, Citti L, Villa R, et al. Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. *J Invest Dermatol.* 2003;120(4):648-54. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12082.x. PubMed PMID: 12648230.

154. Berthelet J, Dubrez L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells*. 2013;2(1):163-87. doi: 10.3390/cells2010163. PubMed PMID: 24709650; PubMed Central PMCID: PMC3972657.
155. Pennati M, Colella G, Folini M, Citti L, Daidone MG, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated attenuation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *J Clin Invest*. 2002;109(2):285-6. doi: 10.1172/JCI14891. PubMed PMID: 11805141; PubMed Central PMCID: PMC150847.
156. Pennati M, Binda M, De Cesare M, Pratesi G, Folini M, Citti L, et al. Ribozyme-mediated down-regulation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to topotecan in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 2004;25(7):1129-36. doi: 10.1093/carcin/bgh107. PubMed PMID: 14764461.
157. Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 14):2987-98. Epub 2003/06/05. doi: 10.1242/jcs.00612. PubMed PMID: 12783991.
158. Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(42):15100-5. doi: 10.1073/pnas.0406665101. PubMed PMID: 15477601; PubMed Central PMCID: PMC524069.
159. Wuttig D, Kunze D, Fuessel S, Toma M, Stade J, Kotzsch M, et al. Are overexpressed alternative survivin transcripts in human bladder cancer suitable targets for siRNA-mediated in vitro inhibition? *Int J Oncol*. 2007;30(6):1317-24. PubMed PMID: 17487351.
160. Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, et al. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(8):1406-12. Epub 2002/10/05. PubMed PMID: 12363043.
161. Plescia J, Salz W, Xia F, Pennati M, Zaffaroni N, Daidone MG, et al. Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell*. 2005;7(5):457-68. doi: 10.1016/j.ccr.2005.03.035. PubMed PMID: 15894266.
162. Khan Z, Khan AA, Yadav H, Prasad G, Bisen PS. Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma. *Cell Mol Biol Lett*. 2017;22:8. Epub



2017/05/26. doi: 10.1186/s11658-017-0038-0. PubMed PMID: 28536639; PubMed Central PMCID: PMC5415770.

163. Tu SP, Jiang XH, Lin MC, Cui JT, Yang Y, Lum CT, et al. Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res.* 2003;63(22):7724-32. PubMed PMID: 14633697.

164. Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2003;9(7):2683-92. PubMed PMID: 12855648.

165. Hunger SP, Loh ML, Whitlock JA, Winick NJ, Carroll WL, Devidas M, et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(6):957-63. Epub 2012/12/21. doi: 10.1002/pbc.24420. PubMed PMID: 23255467; PubMed Central PMCID: PMC4045498.

166. Span PN, Tjan-Heijnen VC, Heuvel JJ, de Kok JB, Foekens JA, Sweep FC. Do the survivin (BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total survivin in breast cancer? *Clin Chem.* 2006;52(9):1693-700. doi: 10.1373/clinchem.2006.071613. PubMed PMID: 16873289.

167. Pavlidou A, Kroupis C, Goutas N, Dalamaga M, Dimas K. Validation of a real-time quantitative polymerase chain reaction method for the quantification of 3 survivin transcripts and evaluation in breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer.* 2014;14(2):122-31. doi: 10.1016/j.clbc.2013.10.012. PubMed PMID: 24325949.

168. Yamada Y, Kuroiwa T, Nakagawa T, Kajimoto Y, Dohi T, Azuma H, et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg.* 2003;99(4):738-45. Epub 2003/10/22. doi: 10.3171/jns.2003.99.4.0738. PubMed PMID: 14567610.

169. Fujino K, Ueda M, Takehara M, Futakuchi H, Kanda K, Yamashita Y, et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(6):383-8. doi: 10.1093/molehr/gal042. PubMed PMID: 16644787.

170. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Defrain C, Rebucci M, Lizard-Nacol S. Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene*. 2007;26(2):290-7. doi: 10.1038/sj.onc.1209784. PubMed PMID: 16847456.
171. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, et al. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2002;100(1):30-6. doi: 10.1002/ijc.10450. PubMed PMID: 12115583.
172. Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2004;216(2):147-55. doi: 10.1016/j.canlet.2003.12.020. PubMed PMID: 15533590.
173. Troger A, Siepermann M, Mahotka C, Wethkamp N, Bulle H, Laws HJ, et al. Role of survivin splice variants in pediatric acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Klin Padiatr*. 2007;219(3):127-33. doi: 10.1055/s-2007-973850. PubMed PMID: 17525905.
174. Nakano J, Huang C, Liu D, Masuya D, Yokomise H, Ueno M, et al. The clinical significance of splice variants and subcellular localisation of survivin in non-small cell lung cancers. *Br J Cancer*. 2008;98(6):1109-17. doi: 10.1038/sj.bjc.6604253. PubMed PMID: 18283319; PubMed Central PMCID: PMCPMC2275484.
175. Ahmed MB, Shehata HH, Moussa M, Ibrahim TM. Prognostic significance of survivin and tumor necrosis factor-alpha in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Biochem*. 2012;45(1-2):112-6. Epub 2011/09/22. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.08.1147. PubMed PMID: 21933669.
176. Pavlidou A, Kroupis C, Dimas K. Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5(5):883-94. Epub 2014/12/11. doi: 10.5306/wjco.v5.i5.883. PubMed PMID: 25493226; PubMed Central PMCID: PMCPMC4259950.
177. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Gadner H, Odenwald E, Harbott J, et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klin Padiatr*. 2005;217(6):310-20. doi: 10.1055/s-2005-872515. PubMed PMID: 16307416.

178. Vegran F, Boidot R. Survivin-3B promotes chemoresistance and immune escape by inhibiting caspase-8 and -6 in cancer cells. *Oncoimmunology*. 2013;2(11):e26328. Epub 2013/12/20. doi: 10.4161/onci.26328. PubMed PMID: 24353917; PubMed Central PMCID: PMC3862639.

179. Engelsma D, Rodriguez JA, Fish A, Giaccone G, Fornerod M. Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin. *Traffic*. 2007;8(11):1495-502. Epub 2007/08/24. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00629.x. PubMed PMID: 17714426.



## EKLER

### Ek 1. Etik Kurul onayı

#### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 30 10
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Pediyatrik ALL olgularında genetik risk faktörlerinin prognostik önemi ve survivin ekspresyonu üzerine etkisi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Halil Gürhan Karabulut			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz: Prospektif Çalışma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:10-407-13	Tarih: 24 Haziran 2013				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	M. Mellî
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Yurdadın
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Gürel
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Özçelikay
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Puralı
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Atbaşoğlu
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Öztürk
Prof.Dr.Serap SIVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Sivri
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Şenocak
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Çakır
Doç.Dr.Güngör UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Utkan
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Öztuna
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Kutlay
Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Kavas
Gülsüm ASLAN	Arkeoloji	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Aslan

\*:Toplantıda Bulunma

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Ek 2. GAPDH ve survivin varyantlarının tanı ve remisyon dönemlerine ait ekspresyon düzeyleri (S: survivin, YT: yaban tip)

Risk Grubu	Hasta No	TANI			REMİSYON			Survivin varyantları remisyon/tanı ekspresyon düzeyleri oranı
		Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayıs/μl)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayıs/μl)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	
STANDART YAVAŞ	1	GAPDH	1040000		GAPDH	3660000		
		S-YT	23,6	0,000022692	S-YT	2710	0,000740437	32,63
		S-ΔEx3	39,9	0,000038365	S-ΔEx3	1460	0,000398907	10,40
		S-2B	2250	0,002163462	S-2B	19100	0,005218579	2,41
		S-3B	131000	0,125961538	S-3B	376000	0,102732240	0,82
		S-2A	58900	0,056634615	S-2A	135000	0,036885246	0,65
	2	GAPDH	2380000		GAPDH	1040000		
		S-YT	98,9	0,000041555	S-YT	269	0,000258654	6,22
		S-ΔEx3	110	0,000046218	S-ΔEx3	209	0,000200962	4,35
		S-2B	6660	0,002798319	S-2B	5520	0,005307692	1,90
		S-3B	321000	0,134873950	S-3B	112000	0,107692308	0,80
		S-2A	315000	0,132352941	S-2A	126000	0,121153846	0,92
	3	GAPDH	814000		GAPDH	3410000		
		S-YT	132	0,000162162	S-YT	3270	0,000958944	5,91
		S-ΔEx3	90,6	0,000111302	S-ΔEx3	1260	0,000369501	3,32
		S-2B	1350	0,001658477	S-2B	12200	0,003577713	2,16
		S-3B	134000	0,164619165	S-3B	347000	0,101759531	0,62
		S-2A	61100	0,075061425	S-2A	255000	0,074780059	1,00
	4	GAPDH	824000		GAPDH	3010000		
		S-YT	136	0,000165049	S-YT	7800	0,002591362	15,70
S-ΔEx3		203	0,000246359	S-ΔEx3	3270	0,001086379	4,41	
S-2B		5610	0,006808252	S-2B	9620	0,003196013	0,47	
S-3B		143000	0,173543689	S-3B	36700	0,012192691	0,07	
S-2A		59000	0,071601942	S-2A	23600	0,007840532	0,11	
5	GAPDH	1500000		GAPDH	1200000			
	S-YT	851	0,000567333	S-YT	12,1	0,000010083	0,02	
	S-ΔEx3	409	0,000272667	S-ΔEx3	47,4	0,000039500	0,14	
	S-2B	2790	0,001860000	S-2B	1300	0,001083333	0,58	
	S-3B	92200	0,061466667	S-3B	113000	0,094166667	1,53	
	S-2A	48400	0,032266667	S-2A	54900	0,045750000	1,42	

Risk Grubu	Hasta No	TANI		
		Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)
STANDART YA YAŞ	6	<i>GAPDH</i>	595000	
		S-YT	2690	0,004521008
		S- $\Delta$ Ex3	673	0,001131092
		S-2B	1770	0,002974790
		S-3B	54200	0,091092437
		S-2A	8630	0,014504202
	7	<i>GAPDH</i>	7440000	
		S-YT	12100	0,001626344
		S- $\Delta$ Ex3	2680	0,000360215
		S-2B	44500	0,005981183
		S-3B	675000	0,090725806
		S-2A	264000	0,035483871
	8	<i>GAPDH</i>	2690000	
		S-YT	498	0,000185130
		S- $\Delta$ Ex3	255	0,000094796
		S-2B	4990	0,001855019
		S-3B	626000	0,232713755
		S-2A	230000	0,085501859
	9	<i>GAPDH</i>	5830000	
		S-YT	2300	0,000394511
		S- $\Delta$ Ex3	711	0,000121955
		S-2B	19600	0,003361921
		S-3B	620000	0,106346484
		S-2A	198000	0,033962264

REMİSYON			Survivin varyantları remisyon/tanı ekspresyon düzeyleri oranı
Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	
<i>GAPDH</i>	24100		
S-YT	63,6	0,002639004	0,58
S- $\Delta$ Ex3	76,3	0,003165975	2,80
S-2B	92,3	0,003829876	1,29
S-3B	689	0,028589212	0,31
S-2A	207	0,008589212	0,59
<i>GAPDH</i>	1990000		
S-YT	4980	0,002502513	1,54
S- $\Delta$ Ex3	1580	0,000793970	2,20
S-2B	10500	0,005276382	0,88
S-3B	244000	0,122613065	1,35
S-2A	133000	0,066834171	1,88
<i>GAPDH</i>	1180000		
S-YT	9330	0,007906780	42,71
S- $\Delta$ Ex3	1570	0,001330508	14,04
S-2B	11700	0,009915254	5,35
S-3B	48700	0,041271186	0,18
S-2A	14200	0,012033898	0,14
<i>GAPDH</i>	27400		
S-YT	227	0,008284672	21,00
S- $\Delta$ Ex3	75,5	0,002755474	22,59
S-2B	546	0,019927007	5,93
S-3B	2180	0,079562044	0,75
S-2A	621	0,022664234	0,67

Risk Grubu	Hasta No	TANI			REMİSYON			Survivin varyantları remisyon/tanı ekspresyon düzeyleri oranı
		Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	
STANDART HIZLI	10	<i>GAPDH</i>	5620000		<i>GAPDH</i>	9730000		
		S-YT	12300	0,002188612	S-YT	1740	0,000178828	0,08
		S- $\Delta$ Ex3	2100	0,000373665	S- $\Delta$ Ex3	482	0,000049538	0,13
		S-2B	23800	0,004234875	S-2B	44400	0,004563207	1,08
		S-3B	92800	0,016512456	S-3B	350000	0,035971223	2,18
		S-2A	86400	0,015373665	S-2A	346000	0,035560123	2,31
	11	<i>GAPDH</i>	3460		<i>GAPDH</i>	1230000		
		S-YT	52,1	0,015057803	S-YT	1230	0,001000000	0,07
		S- $\Delta$ Ex3	325	0,093930636	S- $\Delta$ Ex3	500	0,000406504	0,00
		S-2B	134	0,038728324	S-2B	8460	0,006878049	0,18
		S-3B	1170	0,338150289	S-3B	132000	0,107317073	0,32
		S-2A	972	0,280924855	S-2A	119000	0,096747967	0,34
	12	<i>GAPDH</i>	519000		<i>GAPDH</i>	433000		
		S-YT	10,8	0,000020809	S-YT	2430	0,005612009	269,69
		S- $\Delta$ Ex3	69,6	0,000134104	S- $\Delta$ Ex3	666	0,001538106	11,47
		S-2B	54,4	0,000104817	S-2B	5270	0,012170901	116,12
		S-3B	359000	0,691714836	S-3B	15500	0,035796767	0,05
		S-2A	139000	0,267822736	S-2A	9500	0,021939954	0,08
	13	<i>GAPDH</i>	680000		<i>GAPDH</i>	1750000		
		S-YT	2200	0,003235294	S-YT	12200	0,006971429	2,15
		S- $\Delta$ Ex3	789	0,001160294	S- $\Delta$ Ex3	2870	0,001640000	1,41
		S-2B	5160	0,007588235	S-2B	32000	0,018285714	2,41
		S-3B	13700	0,020147059	S-3B	37800	0,021600000	1,07
		S-2A	15100	0,022205882	S-2A	34700	0,019828571	0,89



Risk Grubu	Hasta No	TANI		
		Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayıs/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)
STANDART HIZLI	14	<i>GAPDH</i>	142000	
		S-YT	147	0,001035211
		S- $\Delta$ Ex3	44,1	0,000310563
		S-2B	3820	0,026901408
		S-3B	10300	0,072535211
		S-2A	8850	0,062323944
	15	<i>GAPDH</i>	5440000	
		S-YT	397	0,000072978
		S- $\Delta$ Ex3	26,3	0,000004835
		S-2B	14100	0,002591912
		S-3B	152000	0,027941176
		S-2A	55000	0,010110294
	16	<i>GAPDH</i>	3200000	
		S-YT	708	0,000221250
		S- $\Delta$ Ex3	320	0,000100000
		S-2B	44300	0,013843750
		S-3B	403000	0,125937500
		S-2A	201000	0,062812500
	17	<i>GAPDH</i>	10100000	
		S-YT	4800	0,000475248
		S- $\Delta$ Ex3	512	0,000050693
		S-2B	130000	0,012871287
		S-3B	832000	0,082376238
		S-2A	211000	0,020891089
	18	<i>GAPDH</i>	585000	
		S-YT	522	0,000892308
		S- $\Delta$ Ex3	223	0,000381197
		S-2B	9910	0,016940171
S-3B		3280	0,005606838	
S-2A		555	0,000948718	

Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayıs/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	Survivin varyantları remisyon/tanı ekspresyon düzeyleri oranı
<i>GAPDH</i>	243000		
S-YT	1230	0,005061728	4,89
S- $\Delta$ Ex3	409	0,001683128	5,42
S-2B	4280	0,017613169	0,65
S-3B	20100	0,082716049	1,14
S-2A	5840	0,024032922	0,39
<i>GAPDH</i>	321000		
S-YT	449	0,001398754	19,17
S- $\Delta$ Ex3	156	0,000485981	100,52
S-2B	5630	0,017538941	6,77
S-3B	71100	0,221495327	7,93
S-2A	40500	0,126168224	12,48
<i>GAPDH</i>	2960000		
S-YT	8720	0,002945946	13,32
S- $\Delta$ Ex3	1250	0,000422297	4,22
S-2B	36800	0,012432432	0,90
S-3B	349000	0,117905405	0,94
S-2A	155000	0,052364865	0,83
<i>GAPDH</i>	474000		
S-YT	1190	0,002510549	5,28
S- $\Delta$ Ex3	188	0,000396624	7,82
S-2B	6220	0,013122363	1,02
S-3B	35300	0,074472574	0,90
S-2A	26200	0,055274262	2,65
<i>GAPDH</i>	298000		
S-YT	1080	0,003624161	4,06
S- $\Delta$ Ex3	435	0,001459732	3,83
S-2B	5640	0,018926174	1,12
S-3B	12400	0,041610738	7,42
S-2A	7010	0,023523490	24,80

Risk Grubu	Hasta No	TANI		
		Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)
STANDART HIZLI	19	<i>GAPDH</i>	1060000	
		S-YT	3160	0,002981132
		S- $\Delta$ Ex3	834	0,000786792
		S-2B	7990	0,007537736
		S-3B	17100	0,016132075
		S-2A	16100	0,015188679
	20	<i>GAPDH</i>	165000	
		S-YT	542	0,003284848
		S- $\Delta$ Ex3	140	0,000848485
		S-2B	2960	0,017939394
		S-3B	12100	0,073333333
		S-2A	13800	0,083636364
YÜKSEK YAVAŞ	21	<i>GAPDH</i>	14300000	
		S-YT	8600	0,000601399
		S- $\Delta$ Ex3	2620	0,000183217
		S-2B	112000	0,007832168
		S-3B	1480000	0,103496503
		S-2A	1120000	0,078321678
	22	<i>GAPDH</i>	1730000	
		S-YT	657	0,000379769
		S- $\Delta$ Ex3	282	0,000163006
		S-2B	3270	0,001890173
		S-3B	443000	0,256069364
		S-2A	154000	0,089017341
	23	<i>GAPDH</i>	10600000	
		S-YT	2230	0,000210377
		S- $\Delta$ Ex3	331	0,000031226
		S-2B	76300	0,007198113
		S-3B	1340000	0,126415094
		S-2A	833000	0,078584906

Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	Survivin varyantları remisyona/tanı ekspresyon düzeyleri oranı
<i>GAPDH</i>	286000		
S-YT	205	0,000716783	0,24
S- $\Delta$ Ex3	144	0,000503497	0,64
S-2B	6230	0,021783217	2,89
S-3B	39100	0,136713287	8,47
S-2A	26700	0,093356643	6,15
<i>GAPDH</i>	2080000		
S-YT	1640	0,000788462	0,24
S- $\Delta$ Ex3	929	0,000446635	0,53
S-2B	11600	0,005576923	0,31
S-3B	81400	0,039134615	0,53
S-2A	56900	0,027355769	0,33
<i>GAPDH</i>	21600		
S-YT	76,2	0,003527778	5,87
S- $\Delta$ Ex3	35,2	0,001629630	8,89
S-2B	2770	0,128240741	16,37
S-3B	36100	1,671296296	16,15
S-2A	1640	0,075925926	0,97
<i>GAPDH</i>	404000		
S-YT	114	0,000282178	0,74
S- $\Delta$ Ex3	74,8	0,000185149	1,14
S-2B	11100	0,027475248	14,54
S-3B	160000	0,396039604	1,55
S-2A	68200	0,168811881	1,90
<i>GAPDH</i>	4350000		
S-YT	482	0,000110805	0,53
S- $\Delta$ Ex3	202	0,000046437	1,49
S-2B	36600	0,008413793	1,17
S-3B	962000	0,221149425	1,75
S-2A	1060000	0,243678161	3,10

Risk Grubu	Hasta No	TANI		
		Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayıs/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)
YÜKSEK YAVAŞ	24	<i>GAPDH</i>	3510000	
		S-YT	262	0,000074644
		S- $\Delta$ Ex3	79,2	0,000022564
		S-2B	3560	0,001014245
		S-3B	550000	0,156695157
		S-2A	560000	0,159544160
	25	<i>GAPDH</i>	10400000	
		S-YT	9480	0,000911538
		S- $\Delta$ Ex3	2110	0,000202885
		S-2B	29200	0,002807692
		S-3B	736000	0,070769231
		S-2A	673000	0,064711538
	26	<i>GAPDH</i>	45700	
		S-YT	80,9	0,001770241
		S- $\Delta$ Ex3	14,5	0,000317287
		S-2B	1800	0,039387309
		S-3B	1910	0,041794311
		S-2A	417	0,009124726
YÜKSEK HIZLI	27	<i>GAPDH</i>	2490000	
		S-YT	1460	0,000586345
		S- $\Delta$ Ex3	383	0,000153815
		S-2B	7950	0,003192771
		S-3B	210000	0,084337349
		S-2A	119000	0,047791165
	28	<i>GAPDH</i>	1290000	
		S-YT	2780	0,002155039
		S- $\Delta$ Ex3	203	0,000157364
		S-2B	7840	0,006077519
		S-3B	167000	0,129457364
		S-2A	90200	0,069922481

REMİSYON			Survivin varyantları remisyon/tanı ekspresyon düzeyleri oranı
Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayıs/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	
<i>GAPDH</i>	372000		
S-YT	1380	0,003709677	49,70
S- $\Delta$ Ex3	397	0,001067204	47,30
S-2B	6990	0,018790323	18,53
S-3B	62900	0,169086022	1,08
S-2A	53800	0,144623656	0,91
<i>GAPDH</i>	1060000		
S-YT	35	0,000033019	0,04
S- $\Delta$ Ex3	97,2	0,000091698	0,45
S-2B	1570	0,001481132	0,53
S-3B	33,6	0,000031698	0,00
S-2A	820	0,000773585	0,01
<i>GAPDH</i>	7050000		
S-YT	5260	0,000746099	0,42
S- $\Delta$ Ex3	1090	0,000154610	0,49
S-2B	61900	0,008780142	0,22
S-3B	910000	0,129078014	3,09
S-2A	1380000	0,195744681	21,45
<i>GAPDH</i>	3290000		
S-YT	7990	0,002428571	4,14
S- $\Delta$ Ex3	1280	0,000389058	2,53
S-2B	28600	0,008693009	2,72
S-3B	316000	0,096048632	1,14
S-2A	142000	0,043161094	0,90
<i>GAPDH</i>	2030000		
S-YT	623	0,000306897	0,14
S- $\Delta$ Ex3	72,3	0,000035616	0,23
S-2B	9190	0,004527094	0,74
S-3B	196000	0,096551724	0,75
S-2A	75400	0,037142857	0,53

Risk Grubu	Hasta No	TANI		
		Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)
YÜKSEK HIZLI	29	<i>GAPDH</i>	17500000	
		S-YT	5760	0,000329143
		S- $\Delta$ Ex3	411	0,000023486
		S-2B	18600	0,001062857
		S-3B	734000	0,041942857
		S-2A	261000	0,014914286
	30	<i>GAPDH</i>	4460000	
		S-YT	2030	0,000455157
		S- $\Delta$ Ex3	203	0,000045516
		S-2B	13300	0,002982063
		S-3B	427000	0,095739910
		S-2A	188000	0,042152466
	31	<i>GAPDH</i>	135000	
		S-YT	484	0,003585185
		S- $\Delta$ Ex3	39,9	0,000295556
		S-2B	4220	0,031259259
		S-3B	34900	0,258518519
		S-2A	19900	0,147407407
	32	<i>GAPDH</i>	1210000	
		S-YT	581	0,000480165
		S- $\Delta$ Ex3	65,7	0,000054298
		S-2B	4140	0,003421488
		S-3B	243000	0,200826446
		S-2A	195000	0,161157025
33	<i>GAPDH</i>	957000		
	S-YT	39,6	0,000041379	
	S- $\Delta$ Ex3	18,9	0,000019749	
	S-2B	3640	0,003803553	
	S-3B	157000	0,164054336	
	S-2A	121000	0,126436782	

Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	Survivin varyantları remisyon/tanı ekspresyon düzeyleri oranı
<i>GAPDH</i>	1920000		
S-YT	5170	0,002692708	8,18
S- $\Delta$ Ex3	259	0,000134896	5,74
S-2B	9130	0,004755208	4,47
S-3B	231000	0,120312500	2,87
S-2A	125000	0,065104167	4,37
<i>GAPDH</i>	271000		
S-YT	78,4	0,000289299	0,64
S- $\Delta$ Ex3	35,5	0,000130996	2,88
S-2B	3150	0,011623616	3,90
S-3B	50600	0,186715867	1,95
S-2A	39000	0,143911439	3,41
<i>GAPDH</i>	4730000		
S-YT	26300	0,005560254	1,55
S- $\Delta$ Ex3	3220	0,000680761	2,30
S-2B	43800	0,009260042	0,30
S-3B	558000	0,117970402	0,46
S-2A	469000	0,099154334	0,67
<i>GAPDH</i>	2330000		
S-YT	2870	0,001231760	2,57
S- $\Delta$ Ex3	225	0,000096567	1,78
S-2B	13800	0,005922747	1,73
S-3B	227000	0,097424893	0,49
S-2A	187000	0,080257511	0,50
<i>GAPDH</i>	110000		
S-YT	27,7	0,000251818	6,09
S- $\Delta$ Ex3	3,59	0,000032636	1,65
S-2B	2550	0,023181818	6,09
S-3B	52300	0,475454545	2,90
S-2A	13000	0,118181818	0,93

Risk Grubu	Hasta No	TANI		
		Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayıs/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)
YÜKSEK HIZLI	34	<i>GAPDH</i>	7200	
		S-YT	54	0,007500000
		S- $\Delta$ Ex3	5,12	0,000711111
		S-2B	5050	0,701388889
		S-3B	65900	9,152777778
		S-2A	1860	0,258333333
	35	<i>GAPDH</i>	131000	
		S-YT	55,1	0,000420611
		S- $\Delta$ Ex3	3,52	0,000026870
		S-2B	904	0,006900763
		S-3B	144000	1,099236641
		S-2A	41900	0,319847328

REMİSYON			
Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayıs/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)	Remission/diagnosis ratios of survivin and its splice variants' expression levels
<i>GAPDH</i>	958000		
S-YT	1770	0,001847599	0,25
S- $\Delta$ Ex3	343	0,000358038	0,50
S-2B	4210	0,004394572	0,01
S-3B	225000	0,234864301	0,03
S-2A	174000	0,181628392	0,70
<i>GAPDH</i>	1650000		
S-YT	13600	0,008242424	19,60
S- $\Delta$ Ex3	484	0,000293333	10,92
S-2B	37100	0,022484848	3,26
S-3B	140000	0,084848485	0,08
S-2A	56900	0,034484848	0,11

Ek 3. Kontrol grubu GAPDH housekeeping gen ve tüm survivin varyantlarının ekspresyon düzeyleri (S:survivin, YT:yaban tip)

Kontrol no	Gen	Ekspresyon düzeyi (kopya sayısı/ $\mu$ l)	GAPDH ile normalize edilmiş survivin varyantı ekspresyon düzeyi (varyant/GAPDH)
1	GAPDH	7850000	
	S-YT	1070	0,000136306
	S- $\Delta$ Ex3	50	0,000006369
	S-2B	98100	0,012496815
	S-3B	1790000	0,228025478
	S-2A	431000	0,054904459
2	GAPDH	5600000	
	S-YT	76,2	0,000013607
	S- $\Delta$ Ex3	33,8	0,000006035
	S-2B	82,1	0,000146607
	S-3B	2560	0,000457143
	S-2A	1830	0,000326786
3	GAPDH	3370000	
	S-YT	0,108	0,000000032
	S- $\Delta$ Ex3	57,5	0,000017062
	S-2B	26600	0,007893175
	S-3B	777000	0,230563798
	S-2 $\alpha$	250000	0,074183976
4	GAPDH	4570000	
	S-YT	3680	0,000805252
	S- $\Delta$ Ex3	240	0,000052516
	S-2B	2500	0,000547046
	S-3B	18900	0,004135667
	S-2 $\alpha$	10100	0,002210066
5	GAPDH	3520000	
	S-YT	2,37	0,000000673
	S- $\Delta$ Ex3	8,29	0,000002355
	S-2B	4820	0,001369318
	S-3B	1590000	0,451704545
	S-2 $\alpha$	300000	0,085227273
6	GAPDH	3850000	
	S-YT	3420	0,000888312
	S- $\Delta$ Ex3	266	0,000069090
	S-2B	2080	0,000540260
	S-3B	676000	0,175584416
	S-2 $\alpha$	11800	0,003064935

Ek 4. Hastaların risk sınıflama tablosu (SR: Standart risk grubu, YR: Yüksek risk grubu)

Hastalar			Yaş			Beyaz Küre Sayısı		Ekstramedüller Tutulum		Kötü Genetik Faktörler			İyi Genetik Faktörler				Tanıda Kemik İliği Blast Oranları (%)	Tanıda Risk Grubu
Numara	Cinsiyet	Yaş	<12 ay	≥1 ve <10 yaş	≥10 yaş	<50.000 mm <sup>3</sup>	>50.000 mm <sup>3</sup>	Testis	Santral Sinir Sistemi	BCR-ABL t(9;22)	MLL, t(4;11)	Hipodiploidi	t(12;21)	tri 4	tri 10	tri 17		
1	Kız	4 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	+	+	+	99	SR
2	Erkek	5 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	97	SR
3	Kız	9 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	85	SR
4	Erkek	3 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	+	+	+	90	SR
5	Erkek	6 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	92	SR
6	Erkek	3 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	96	SR
7	Kız	5 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	90	SR
8	Erkek	10 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	84	SR
9	Erkek	4 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	98	SR
10	Kız	3 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	90	SR
11	Kız	4 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	100	SR
12	Erkek	1 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	100	SR
13	Kız	5 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	90	SR
14	Erkek	1 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	96	SR
15	Erkek	4 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	+	+	-	-	85	SR
16	Erkek	4 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	+	-	-	-	98	SR
17	Erkek	3 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	96	SR
18	Kız	3 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	-	-	98	SR
19	Erkek	2 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	-	+	+	96	SR
20	Erkek	3 yaş		√		√		yok	yok	-	-	-	-	+	-	-	96	SR





## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Efsun Eren Keleş

**Doğum Yeri:** Ankara

**Doğum Tarihi:** 17.09.1979

**Medeni Hali:** Evli

**Yabancı Dili:** İngilizce

### **Eğitim Durumu**

**Lise:** İzmit Lisesi

**Lisans:** Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

**Yüksek Lisans:** Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji

### **Yayınlar ve Bildiriler**

#### **Bildiri:**

Eren Keleş E., Karabulut HG., Çakmaklı HF., Adaklı B., Köse SK., Uğur Dinçaslan H., Yavuz G., Ertem M., Tükün A. Expression of survivin and its splice variants in pediatric acute lymphoblastic leukemia. European J Human Genetics (2016) Vol.24, E-Suppl. 1, p:296

### **İş Tecrübesi**

**Kurumu:** Genmar Teşhis Ürünleri AR-GE Laboratuar Hizmetleri San. Tic. Ltd. Şti.

**Görevi:** Biyolog

**Yılları:** 2006-2017

**Kurumu:** Genomiks Yaşam Bilimleri San. Tic. Ltd. Şti.

**Görevi:** Biyolog

**Yılları:** 2018-halen

## TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Eren Keleş E., Karabulut HG., Çakmaklı HF., Adaklı B., Köse SK., Uğur Dinçaslan H., Yavuz G., Ertem M., Tükün A. Expression of survivin and its splice variants in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers* (2018), DOI 10.1089/gtmb.2018.0152.



## Expression of Survivin and Its Splice Variants in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia

Efsun Eren-Keleş,<sup>1</sup> Halil Gürhan Karabulut,<sup>2</sup> Hasan Fatih Çakmaklı,<sup>3</sup> Başak Adaklı,<sup>4</sup> Serdar Kenan Köse,<sup>5</sup>  
Handan Uğur-Dinçaslan,<sup>3</sup> Gülsan Yavuz,<sup>3</sup> Mehmet Ertem,<sup>3</sup> and Ajlan Tükün<sup>6</sup>

**Aims:** Survivin is involved in the inhibition of apoptosis and the regulation of cell division. In addition to wild-type survivin (survivin-wt), at least four splice variants with differential functions ( $\Delta$ Ex3 and 3B antiapoptotic, and 2 $\alpha$  and 2B proapoptotic) have been identified. Survivin is highly expressed in several cancers, including hematological malignancies. Although acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent malignancy in children, studies that investigated survivin expression in ALL are limited, and there is no study on 3B and 2 $\alpha$  expression in ALL. Therefore the expression of survivin-wt and its splice variants was investigated in pediatric B-cell ALL patients.

**Materials and Methods:** The expression of survivin-wt and its four splice variants was investigated by quantitative real-time polymerase chain reaction in archival RNA samples of 35 pediatric B-cell ALL patients. Patients were divided into high- and standard-risk groups according to age, white blood cell count, extramedullary involvement, and genetic risk factors; expression of survivin variants was compared between these two risk groups.

**Results:** We found that the ratio of survivin- $\Delta$ Ex3/wild type (WT) expression was higher in the low-risk group than in the high-risk group.

**Conclusion:** Comparative analysis between the high- and low-risk B-cell ALL groups indicated that the survivin- $\Delta$ Ex3/WT expression ratio could potentially be used in risk classification for pediatric B-cell ALL.

**Keywords:** pediatrics, acute lymphoblastic leukemia, precursor B-cell ALL, survivin, quantitative real-time PCR

### Introduction

**S**URVIVIN IS A MEMBER of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) gene family and is expressed at high levels in fetal tissue; however, survivin expression becomes restricted during development and is reduced to low levels in the majority of fully differentiated adult tissues (Li *et al.*, 2018). Analysis of gene expression in normal and tumor cells has revealed that survivin is overexpressed in tumor cells (Münscher *et al.*, 2018). An association between high survivin mRNA expression and aggressive tumor behavior has also been documented in several human cancers, including hematological malignancies (Münscher *et al.*, 2018) as well as solid tumors, such as bladder (Cui *et al.*, 2015), breast (Gibbons *et al.*, 2015), and colorectal cancer (Adamkov *et al.*, 2015).

Similar to other IAP family proteins, survivin blocks apoptosis induced by a variety of apoptotic triggers, and is known to bind and inhibit caspases 3 and 7, which act as terminal effectors in apoptotic protease cascades (Shojaei *et al.*, 2018). Although mostly known as an inhibitor of apoptosis, survivin can also regulate the process of cell division. It is expressed in a cell-cycle-dependent manner mostly in G2-M phase, and it serves its regulatory function in the cell division through its role in the chromosomal passenger complex, which regulates microtubule dynamics, stability, and mitotic progression (Giodini *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2018). Survivin overexpression in cancer promotes survival of aneuploidy cells, facilitates bypassing of cell cycle checkpoints, and increases angiogenesis, thereby using its cytoprotective character to ensure tumor progression (Santa Cruz Guindalini *et al.*, 2013). Therefore anticancer strategies have currently

<sup>1</sup>Central Laboratory, Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup>Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, School of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey.

<sup>4</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, Istinie University, Medicalpark Bahçelievler Hospital, Istanbul, Turkey.

<sup>5</sup>Department of Biostatistics, School of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey.

<sup>6</sup>Duzen Laboratories Group, Division of Medical Genetics, Ankara, Turkey.

focused on survivin status as a potential target for designing new approaches for cancer treatment (Garg *et al.*, 2016).

In addition to wild-type survivin (survivin-wt), at least four splice variants have been identified. The survivin gene has a 3 intron-4 exon structure that encodes a protein of 142 amino acids (Garg *et al.*, 2016). Survivin- $\Delta$ Ex3 lacks exon 3 and results in a protein of 137 amino acids. Survivin-2B is generated by retention of part of intron 2 and yields a protein of 165 amino acids (Braný *et al.*, 2017). Survivin-2 $\alpha$  consists of exons 1 and 2 and part of intron 2, and results in a small protein of 74 amino acids (Garg *et al.*, 2016). Survivin-3B retains part of intron 3 and results in a truncated protein of 120 amino acids (Sah and Seniya, 2015) (Fig. 1).

Although little is known about the function of these splice variants, evidence suggests that they may have distinct roles in carcinogenesis. Survivin-3B contains a complete baculovirus IAP repeat (BIR), which is critical for apoptosis inhibition (Végran *et al.*, 2013), and survivin- $\Delta$ Ex3 retains its antiapoptotic function despite the loss of exon 3. In contrast, survivin-2B has an attenuated antiapoptotic function (Sah and Seniya, 2015), and survivin-2 $\alpha$  can attenuate the antiapoptotic functions of survivin-wt in malignant cells (Braný *et al.*, 2017). These data indicate that survivin-3B and survivin- $\Delta$ Ex3 are probably antiapoptotic, whereas survivin-2B and survivin-2 $\alpha$  are proapoptotic.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer and accounts for a quarter of all malignancies diagnosed in children <15 years (Stacy *et al.*, 2015). Most patients with precursor B-cell ALL respond to standard treatment protocols and have a good prognosis, although certain patients require intensive therapeutic intervention (Tröger *et al.*, 2007). Although a number of studies in the literature have investigated survivin expression in a variety of malignancies, data on its expression in hematological malignancies, especially in ALL, are limited. Therefore, the aim of this study was to investigate the expression levels of survivin-wt and its splice variants in a group of pediatric patients with precursor B-cell ALL, and we hypothesized that the antiapoptotic variants should be high in high-risk group when compared with standard-risk group.

## Materials and Methods

### Patients and samples

Archival RNA obtained from bone marrow samples of 35 pediatric precursor B-cell ALL patients (female=9, male=26) who were referred to the Department of Medical Genetics at the Ankara University School of Medicine for routine genetic analysis between 2009 and 2015 were included in the study. The study was approved by the Institutional Ethical Committee of the Ankara University School of Medicine.

The expression of survivin-wt and its functional variants was investigated at the mRNA level. Expression data were analyzed in high- and standard-risk groups of patients classified according to age, white blood cell count, extramedullary involvement, and genetic risk factors (Hunger *et al.*, 2013) (Table 1; see Supplementary Table S1 for patient-specific data; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/gtmb](http://www.liebertpub.com/gtmb)). Expression data were also analyzed according to sex.

### Expression analyses

The expression levels of survivin-wt and its splice variants were investigated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using the LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I kit and LightCycler 2.0 instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) was used to normalize the expression levels of survivin-wt and its splice variants. RNA was isolated from the bone marrow samples using the Roche High Pure RNA isolation kit, and cDNA synthesis was performed using the First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Applied Science) with random hexamer primers according to the protocols provided by the manufacturer. The intron-spanning primers of survivin-wt and GAPDH were designed using NCBI/Primer-BLAST. The primers used for the quantification of survivin-2B, survivin-3B, survivin-2 $\alpha$ , and survivin- $\Delta$ Ex3 were previously described (Span *et al.*, 2006; Pavlidou *et al.*, 2014) (Table 2). The purity and specificity of the PCR products of GAPDH and survivin variants were verified by agarose gel electrophoresis and sequencing.

PCR products for each survivin variant and GAPDH were used as standards for the qRT-PCR assays. After purification with the GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), the PCR products were quantified using the Qubit<sup>®</sup> dsDNA Assay kit and Qubit 2.0 Fluorimeter (Thermo Fisher Scientific). Tenfold serial dilutions from  $3 \times 10^{10}$  to  $3 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L were prepared for generation of the standard curves. Serial dilutions of  $3 \times 10^7$ – $10^3$ ,  $3 \times 10^4$ – $10^0$ ,  $3 \times 10^4$ – $10^1$ ,  $3 \times 10^5$ – $10^1$ ,  $3 \times 10^5$ – $10^2$ , and  $3 \times 10^6$ – $10^2$  copies/ $\mu$ L were used for GAPDH, survivin-wt,  $\Delta$ Ex3, 2B, 3B, and 2 $\alpha$  variants, respectively. All samples and standards were run in duplicate in the presence of negative and positive controls.

### Statistical methods

All statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package version 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The Mann–Whitney *U* test was used in comparisons between standard- and high-risk groups. In comparison of expression levels between male and female patients, Wilcoxon test was used. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Validation of the purity and specificity of PCR products

Agarose gel electrophoresis and sequencing confirmed that the PCR products of GAPDH and survivin variants were specific for the corresponding mRNAs (Supplementary Figs. S1 and S2).

### Expression levels of survivin-wt and its variants in standard- and high-risk groups

The expression levels of survivin-wt and survivin- $\Delta$ Ex3 were extremely low in both standard- and high-risk groups, whereas survivin-2B, survivin-2 $\alpha$ , and survivin-3B showed much higher expression levels in both risk groups (Table 3, Supplementary Table S2). However, no statistically significant difference was



**FIG. 1.** Schematic diagram showing wild-type survivin and its splice variants. *Horizontal arrows* show primer locations (F: forward, R: reverse), and *vertical arrows* denote stop codons. BIR, baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat; CC, coiled coil domain.

TABLE 1. CRITERIA USED IN THE RISK CLASSIFICATION

Criteria	High-risk group	Standard-risk group
Age (years)	<1 and $\geq 10$	$\geq 1$ and <10
WBC count ( $\text{mm}^3$ )	$\geq 50,000$	<50,000
Extramedullary involvement	Testicular or central nervous system involvement	None
Genetic findings	t(9;22) (q34;q11) or t(4;11) (q21;q23) or hypodiploidy	t(12;21) (p13;q22) or trisomy 4 and 10

WBC, white blood cell.

observed between standard- and high-risk groups for survivin-wt and its variants (Table 3).

When the expression levels of survivin and its variants were compared according to sex, no statistically significant difference was observed between male and female patients.

#### Ratios of expression levels of survivin variants

Previous studies evaluated the ratios of survivin- $\Delta\text{Ex}3$ /wild type (WT) and 2B/WT expression. Therefore, we analyzed these ratios for our study population even though the expression levels of survivin- $\Delta\text{Ex}3$  and survivin-2B were low in our study. The survivin- $\Delta\text{Ex}3$ /WT ratio was significantly higher in standard- than in high-risk group. Since the expression levels of survivin-2 $\alpha$ , survivin-2B, and survivin-3B were high in our study and these proteins exhibit opposite functional properties (proapoptotic vs. antiapoptotic), we also evaluated the ratio of survivin-2 $\alpha$ +2B/3B but no statistically significant difference was observed between standard- and high-risk groups.

#### Discussion

Survivin is a bifunctional protein that suppresses apoptosis and regulates cell division. Survivin is undetectable in normal adult tissues but highly expressed in several types of cancers (He *et al.*, 2018); subsequently, its overexpression has been reported in common human cancers such as breast (Bon-

gianni *et al.*, 2015), pancreas (Theodoropoulos *et al.*, 2010), neck (Kostić *et al.*, 2013), and leukemias (Ahmed *et al.*, 2012).

Most previous studies of nonhematological malignancies analyzed the expression levels of only survivin-wt, survivin- $\Delta\text{Ex}3$ , and survivin-2B, and in nearly all of these analyses survivin-wt showed the highest level of expression. However, there are some discrepancies among these studies. For example, Pavlidou *et al.* (2014) found that survivin-wt was expressed at a higher level than survivin- $\Delta\text{Ex}3$  and survivin-2B; however, the higher expression of survivin-wt may have been caused by high expression of survivin-3B because the primers used for survivin-wt could also bind to survivin-3B. Similarly, in the study of Span *et al.* (2006) the primers used for survivin-wt were also able to bind to all other variants, and therefore the expression level indicated for survivin-wt actually represented the expression of all variants. For our study, we designed new forward and reverse primers specific for survivin-wt to prevent the amplification of other variants; as a result, survivin-wt was one of the isoforms with the lowest expression levels in our study, whereas survivin-3B and 2 $\alpha$  were expressed at the highest levels.

In most previous studies on ALL, expression level of survivin was investigated at protein level. In these studies, higher expression of survivin was found to be a risk factor for the development, poor prognosis and relapse in ALL (Troeger *et al.*, 2007; Esh *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2012). Nevertheless, since expression levels of each variant may be different from each other, higher expression levels may be the result of higher expression of only one variant (proapoptotic or antiapoptotic). To our knowledge, there is only one study in the literature investigating the expression levels of survivin-wt and its splice variants at mRNA level in pediatric ALL. That study included 20 patients, and only survivin-wt, survivin- $\Delta\text{Ex}3$ , and survivin-2B expression levels were investigated. The authors found an association between lower expression of survivin-2B and a tendency to high-risk group (Tröger *et al.*, 2007). In our study, we analyzed survivin-wt and its 4 functional splice variants in 35 pediatric ALL patients, and did not observe any difference in expression levels of survivin-wt and its splice variants between the two risk groups (Table 3).

Despite its proapoptotic properties, survivin-2 $\alpha$  is expressed at high levels in several tumors, and studies have

TABLE 2. SEQUENCES OF FORWARD AND REVERSE PRIMERS

Genes	Primer sequences (5' → 3')	Reference sequences	Locations	Amplicon size (bp)
<i>GAPDH</i>	F: CATCTCCAGGAGCGAGA R: CAAATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	NM_002046.5	413–430 501–524	112
<i>Survivin</i>	F: TGACGACCCCATAGAGGAACA R: CCTTTGCAATTTTGTCTTGCTC	NM_001168.2	331–351 444–467	138
<i>Survivin-<math>\Delta\text{Ex}3</math></i>	F: CCACCGCATCTCTACATTCA R: TTCCTTTGCATGGGGTC	NM_001012270.1	169–188 335–352	184
<i>Survivin-2B</i>	F: GCACGGTGGCTTACGCCTG R: AACCGGACGAATGCTTTTATGTTCC	NM_001012271.1	351–369 415–440	90
<i>Survivin-3B</i>	F: CAGATTCAGGGAGGGACTGG R: CAAACATCAGGCTCTTCCTCG	AB154416.1	377–396 416–436	60
<i>Survivin 2<math>\alpha</math></i>	F: GCTTTGTTTGAAGTGAAGTGTCAA R: GCAATGAGGGTGGAAAGCA	AY927772.1	293–317 355–373	81

*GAPDH*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene.

TABLE 3. EXPRESSION OF SURVIVIN VARIANTS IN STANDARD- AND HIGH-RISK GROUPS

Survivin variants	Standard-risk mean $\pm$ SD (median)	High-risk mean $\pm$ SD (median)	p <sup>a</sup>
WT	0.00185 $\pm$ 0.0033 (0.00052)	0.00130 $\pm$ 0.0019 (0.00048)	0.841
$\Delta$ Ex3	0.00502 $\pm$ 0.0209 (0.00025)	0.00016 $\pm$ 0.0001 (0.00015)	0.062
2B	0.00893 $\pm$ 0.0098 (0.00510)	0.05468 $\pm$ 0.1792 (0.00380)	0.868
3B	0.13258 $\pm$ 0.1544 (0.09090)	0.79880 $\pm$ 2.3253 (0.12945)	0.110
2 $\alpha$	0.06898 $\pm$ 0.0775 (0.04605)	0.11115 $\pm$ 0.0872 (0.07858)	0.062
$\Delta$ Ex3/WT	1.09207 $\pm$ 1.8477 (0.39292)	0.19497 $\pm$ 0.13405 (0.14843)	0.003
2B/WT	21.51667 $\pm$ 26.5488 (9.27091)	21.79123 $\pm$ 30.0156 (8.71900)	0.739
2 $\alpha$ + 2B/3B	0.85019 $\pm$ 0.6877 (0.51099)	0.65040 $\pm$ 0.2925 (0.67858)	0.714

<sup>a</sup>Mann-Whitney *U* test.

WT, wild type; SD, standard deviation.

suggested that it has the potential to attenuate the antiapoptotic effect of survivin-wt (Caldas *et al.*, 2005). In our study, survivin-3B and survivin-2 $\alpha$  had the highest expression levels. The increased level of survivin-2 $\alpha$  may be explained by its ability to antagonize survivin-3B and reduce its antiapoptotic effects or alter its function by changing its subcellular localization, since survivin-3B is similar to survivin-wt in structure.

In the study of Tröger *et al.* relative expression levels of proapoptotic/antiapoptotic variants (i.e., survivin-2B/survivin-wt/survivin- $\Delta$ Ex3) were found to be higher in standard-risk group. In our study, the expression levels of survivin-2 $\alpha$ , survivin-2B, and survivin-3B were found to be much higher than those of survivin-wt and survivin- $\Delta$ Ex3. In a similar way, we then evaluated the ratio of survivin-2 $\alpha$  + 2B/3B between standard- and high-risk groups, but no statistically significant difference was found.

In recent studies it was suggested that nuclear accumulation of survivin- $\Delta$ Ex3 is associated with cancer progression in thyroid malignancies (Pannone *et al.*, 2014; Selemetjev *et al.*, 2015). Survivin- $\Delta$ Ex3 was also suggested to be related to tumor aggressiveness, advanced stage, and poor prognosis in cancer (Waligórska-Stachura *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2013). In contrast De Maria *et al.* (2009) found that survivin- $\Delta$ Ex3 levels decreased in advanced stage and in cases with metastases in oral squamous cell carcinoma, and the authors speculate that the expression levels of survivin variants may show tissue specificity. In our study, though we did not observe any difference in survivin- $\Delta$ Ex3 expression between standard- and high-risk groups, we found that survivin- $\Delta$ Ex3/WT ratio was significantly higher in standard- than in high-risk group. To our knowledge, there are very limited studies in the literature investigating survivin- $\Delta$ Ex3/WT, and it was found that survivin- $\Delta$ Ex3/WT was higher in malignant brain tumor samples (Yamada *et al.*, 2003) and cervical carcinomas (Futakuchi *et al.*, 2007). Survivin- $\Delta$ Ex3/WT was also found to be related to the grade of tumor in breast cancer (Pavlidou *et al.*, 2014) and to poor prognosis in colorectal adenocarcinomas (Pavlidou *et al.*, 2011). In contrast, Mahotka *et al.* (2002) found that the ratio of survivin- $\Delta$ Ex3/WT was not related to the tumor stages in renal cell carcinomas.

Survivin has two nuclear export signals (NESs): one in the C terminal coiled coil domain and the other in the linker region between BIR domain and C terminus. Central NES domain overlaps with the dimerization region, and therefore homodimerization prevents the nuclear export of the protein (Engelsma *et al.*, 2007). Therefore, since antiapoptotic function of survivin-wt is mainly due to its cytoplasmic lo-

cation, homodimerization may decrease its antiapoptotic function. It has been shown that survivin-wt can also heterodimerize with its splice variants, and therefore coexpression of survivin-wt together with its variants may change subcellular localization of survivin-wt (Pavlidou *et al.*, 2014). Survivin- $\Delta$ Ex3 has nuclear localization signal, and survivin- $\Delta$ Ex3/WT heterodimer may lead to nuclear localization of survivin-wt. Our findings that the ratio of survivin- $\Delta$ Ex3/WT expression was found to be lower in high-risk group than in standard-risk group may be associated with a decrease in heterodimer formation leading to nuclear export of survivin-wt and more aggressive behavior.

There are many studies in the literature attempting to study the inhibition of survivin expression using oligonucleotides or compounds such as YM155, LY2181308, and SPC3242, and they focused on the inhibition of all survivin variants (Santarelli *et al.*, 2018; Shojai *et al.*, 2018). However, we suggest that the retention of proapoptotic variants and the repression of only antiapoptotic variants would provide a more effective treatment strategy.

In conclusion, the use of variant-specific primer pairs allowed us to determine the precise expression levels of each variant. Thus, in our study, survivin-wt was found to be one of the isoforms with the lowest expression levels, and survivin-3B and 2 $\alpha$  were expressed at the highest levels. Our results suggest that survivin- $\Delta$ Ex3/WT ratio may be considered for risk classification, and survivin-3B may be a more convenient candidate for targeted treatment of childhood ALL.

#### Acknowledgments

This project was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, Project No. 114S535).

#### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

- Adamkov M, Výbohová D, Tupá V, *et al.* (2015) Expression and significance of survivin in colorectal high grade and low grade adenomas. *Acta Histochem* 117:590–594.
- Ahmed MB, Shehata HH, Moussa M, *et al.* (2012) Prognostic significance of survivin and tumor necrosis factor- $\alpha$  in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Biochem* 45:112–116.

- Bongiovanni L, Romanucci M, Malatesta D, *et al.* (2015) Survivin and related proteins in canine mammary tumours: immunohistochemical expression. *Vet Pathol* 52: 269–275.
- Braný D, Dvorská D, Slavík P, *et al.* (2017) Survivin and gynaecological tumours. *Pathol Res Pract* 213:295–300.
- Caldos H, Honsey LE, Altura RA, *et al.* (2005) Survivin 2 $\alpha$ : a novel survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer* 4:11.
- Cui M, Au JL, Wientjes MG, *et al.* (2015) Intravenous siRNA silencing of survivin enhances activity of mitomycin C in human bladder RT4 xenografts. *J Urol* 194:230–237.
- De Maria S, Pannone G, Bufo P, *et al.* (2009) Survivin gene expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 135:107–116.
- Engelsma D, Rodríguez JA, Fish A, *et al.* (2007) Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin. *Traffic* 8: 1495–1502.
- Esh AM, Atfy M, Azizi NA, *et al.* (2011) Prognostic significance of survivin in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus* 27:18–25.
- Futakuchi H, Ueda M, Kanda K, *et al.* (2007) Transcriptional expression of survivin and its splice variants in cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 17:1092–1098.
- Garg H, Suri P, Gupta JC, *et al.* (2016) Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int* 16:49.
- Ge Q, Li Y, Nie Y, *et al.* (2013) Expression of survivin and its four splice variants in colorectal cancer and its clinical significances. *Med Oncol* 30:535.
- Gibbons JA, Kanwar JR, Kanwar RK (2015) Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer. *BMC Cancer* 15:425.
- Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, *et al.* (2002) Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 62:2462–2467.
- He X, Yang K, Wang H, *et al.* (2018) Expression and clinical significance of survivin in ovarian cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 13:e0194463.
- Hunger SP, Loh ML, Whitlock JA, *et al.* (2013) Children's oncology group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 60:957–963.
- Kostić M, Nikolić N, Ilić B, *et al.* (2013) Analysis of polymorphism in the survivin gene promoter as a potential risk factor for head and neck cancers development. *Srp Arh Celok Lek* 141:304–307.
- Li D, Hu C, Li H (2018) Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells. *Biomed Rep* 8:399–406.
- Mahotka C, Kreg T, Kreg A, *et al.* (2002) Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 100:30–36.
- Münscher A, Prochnow S, Gulati A, *et al.* (2018) Survivin expression in head and neck squamous cell carcinomas is frequent and correlates with clinical parameters and treatment outcomes. *Clin Oral Invest* (in press).
- Pannone G, Santoro A, Pasquali D, *et al.* (2014) The role of survivin in thyroid tumors: differences of expression in well-differentiated, non-well-differentiated and anaplastic thyroid cancers. *Thyroid* 24:511–519.
- Pavlidou A, Dalamaga M, Kroupis C, *et al.* (2011) Survivin isoforms and clinicopathological characteristics in colorectal adenocarcinomas using real-time qPCR. *World J Gastroenterol* 28:1614–1621.
- Pavlidou A, Kroupis C, Dimas K, *et al.* (2014) Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol* 10:883–894.
- Pavlidou A, Kroupis C, Goutas N, *et al.* (2014) Validation of a real-time quantitative polymerase chain reaction method for the quantification of 3 survivin transcripts and evaluation in breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 14:122–131.
- Sah NK, Seniya C (2015) Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumour Biol* 36:6623–6631.
- Santa Cruz Guindalini R, Mathias Machado MC, Garicochea B, *et al.* (2013) Monitoring survivin expression in cancer: implications for prognosis and therapy. *Mol Diagn Ther* 17:331–342.
- Santarelli A, Mascitti M, Lo Russo L, *et al.* (2018) Survivin-based treatment strategies for squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 19:971.
- Selemetjev SA, Savin SB, Paunovic IR, *et al.* (2015) Changes in the expression pattern of apoptotic molecules (galectin-3, Bcl-2, Bax, survivin) during progression of thyroid malignancy and their clinical significance. *Wien Klin Wochenschr* 127:337–344.
- Shojaei F, Yazdani-Nafchi F, Banitalebi-Dehkordi M, *et al.* (2018) Trace survivin in cancer. *Eur J Cancer Prev* (in press).
- Span PN, Tjan-Heijnen VC, Heuvel JJ, *et al.* (2006) Do the survivin (BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total survivin in breast cancer? *Clin Chem* 52:1693–1700.
- Stacy L, Cooper MD, Patrick A, *et al.* (2015) Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 62:61–73.
- Theodoropoulos GE, Michalopoulos NV, Panoussopoulos SG, *et al.* (2010) Effects of caspase-9 and survivin gene polymorphisms in pancreatic cancer risk and tumor characteristics. *Pancreas* 39:976–980.
- Troeger A, Siepermann M, Escherich G, *et al.* (2007) Survivin and its prognostic significance in pediatric acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 92:1043–1050.
- Tröger A, Siepermann M, Mahotka C, *et al.* (2007) Role of survivin splice variants in pediatric acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Klinpadiatr* 219:127–133.
- Végran F, Mary R, Gibeaud A, *et al.* (2013) Survivin 3B potentiates immune escape in cancer but also inhibits the toxicity of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 73:5391–5401.
- Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Waško R, *et al.* (2012) Survivin-prognostic tumor biomarker in human neoplasms. *Ginekol Pol* 83:537–540.
- Yamada Y, Kuroiwa T, Nakagawa T, *et al.* (2003) Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg* 99:738–745.

Address correspondence to:  
Efsun Eren-Keleş, MS  
Central Laboratory  
Biotechnology Institute  
Ankara University  
Tandoğan Campus  
Besevler  
Ankara 06110  
Turkey

E-mail: eerenkeles@gmail.com