

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRK POPULASYONUNDA DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ NON-HODGKİN
LENFOMA TEDAVİSİNDE MOLEKÜLER GEN PROFİLLEMESİ**

Melike ÖZTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi

Doç.Dr. Hilal ÖZDAĞ

ANKARA

2011

Türk Populasyonunda Diffüz Büyük B Hücreli Non-Hodgkin Lenfoma Tedavisinde Moleküler Gen Profillemesi

ÖZET

Çağımızın hastalığı kanser, gün geçtikçe artan insidansı ile önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kanser alt tiplerindeki heterojenlik, tanı ve tedavi sürecini daha da zorlaştırmaktadır. Heterojen kanser türlerinden biri olan Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DLBCL), Non-Hodgkin lenfomanın en sık rastlanan alt tipidir. Uluslararası Prognostik İndeks, Ann Arbor tümör evreleme sistemi gibi kriterler bu hastalığın tanı ve tedavi süreci için yetersiz kalmaktadır. Bu amaç doğrultusunda yapılmış olan gen ifade profili çalışmaları ile bu kriterlerden bağımsız olarak bu amaca yönelik moleküler bir imza belirlenmeye çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında, Lossos *et al.*'ın (2004) yapmış olduğu meta analiz sonuçları doğrultusunda, DLBCL hastalarının sağkalım tahmininde ifade profillerinin kullanılacak 6 genin (*LMO2*, *BCL6*, *FNI*, *CCND2*, *SCYA3* ve *BCL2*), Türk toplumunda moleküler imza olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Yapılan analiz sonucunda bu yöntemin Türk populasyonu için uygun olmayan bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DLBCL, kantitatif eş zamanlı PCR, biyobelirteç, gen ifade profillemesi

Molecular Gene Profiling for the Treatment of Diffuse Large B Cell Lymphoma in Turkish Population

ABSTRACT

Cancer, disease of the era, is an important public health problem with increasing incidence. The heterogeneity of cancer makes its diagnosis and treatment even more challenging. Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is the most prevalent subtype of Non-Hodgkin Lymphoma. The criterias such as International Prognostic Index and Ann Arbor Tumor Staging System are known to be insufficient in diagnosis and treatment of this disease. For this purpose, a molecular signature independent of the above mentioned criterias has been determined by Lossos *et al.* (2004) through meta-analysis of several microarray studies. The analysis identified molecular signature, comprising six genes (*LMO2*, *BCL6*, *FNI*, *CCND2*, *SCYA3* and *BCL2*), that can be used for survival prediction. In this study, we have conducted an analysis in order to determine whether the gene expression profile of these six genes can be used as a marker in Turkish DLBCL cases for the prognosis of this disease.

Key words: DLBCL, qRT-PCR, biomarker, gene expression profiling

TEŞEKKÜR

Kendisini tanıdığım günden bu yana, gerek akademik gerekse sosyal, birlikte olduğumuz her ortamda üstün bilgisini, deneyimini, öngörüsünü benden esirgemeyen, benim için her anlamıyla eğitici ve öğretici olan, zihnimdeki “Danışman” ifadesinin, tüm yönleriyle tam da karşılığı, çok sevdiğim, saygıdeğer danışmanım, Sayın Doç.Dr. Hilal ÖZDAĞ’a,

Tez çalışmamdaki hasta örnek ve bilgilerinin sağlanmasındaki değerli ve özverili katkılarından dolayı Sayın Prof.Dr. Işınsu KUZU’ya, Sayın Prof.Dr. Muhit ÖZCAN’a, ve Sayın Doç.Dr. Pervin TOPÇUOĞLU’na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca sağladıkları maddi destek sebebiyle TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’na,

Proje kapsamındaki ön çalışmaları yapan ve yüksek lisansa başladığım dönemden bu yana her türlü tecrübe ve bilgisini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Nevin BELDER’e,

Son 2,5 yıldır, bana sevgi ve bilgi dolu kucağını açan, her üyesi birbirinden kıymetli GENOMBİLİM Ailesine,

Beni koşulsuz seven, hayatımın her anında varlığını ve desteğini hissettiren, eğitim hayatımın bu aşamaya gelmesinin ana mimarı olan aileme, canım annem Zeliha Pervin ÖZBİLGİN ve sevgili babam Hulusi ÖZBİLGİN’e, ufkumu her daim aydınlatan canım ablam Manolya CANİK ve sevgili abim İdris CANİK’e,

Son olarak, iş çıkışlarında yorgun argın laboratuvara gelip uzadıkça uzayan deneylerimi benimle beraber akşamlar boyu bekleyen, yüksek lisansım boyunca gerek entelektüel birikimini, gerekse sabrını, sevgisini, ilgisini benden hiç esirgemeyen, her koşulda yanımda olan, saygıdeğer meslektaşım, sevgili eşim, hayat arkadaşım Ahmet Raşit ÖZTÜRK’e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Bu tez, sevgili eşime adanmıştır.

Bu tez çalışması, Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu tarafından E1.50.20 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanserin Moleküler Tarihçesi	4
2.1.2. Kanser İstatistikleri	5
2.1.3. Lenf Kanseri	6
2.1.3.1. Non-Hodgkin Lenfoma	9
2.1.3.1.1. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma	10
2.2. DLBCL Tanı ve Tedavi Yöntemleri	13
2.2.1. DLBCL’de R-CHOP Tedavisi	16
2.2.1.1. Siklofosfamid (Cyclophosphamide)	16
2.2.1.2. Hidroksidaunorubisin (Hydroxydaunorubicin)	16
2.2.1.3. Onkovin (Oncovin)	17
2.2.1.4. Prednizolon (Prednisolone)	17
2.2.1.5. Rituksimab (Rituximab)	17
2.2.1.6. R-CHOP Tedavi Protokolü ve Sonuçları	18
2.3. DLBCL’de Yapılan Moleküler Gen Profillemesi Çalışmaları	19
2.3.1. Biyobelirteç Nedir?	19
2.3.2. Gen İfadesi Profillemesi Çalışmaları	20
2.3.3. DLBCL’de GEP Çalışmaları	20
2.3.4. Lossos’un (Lossos <i>et al.</i> 2004) Yaptığı Meta Analiz ve Sonuçları	22
2.3.5. Lossos’un (Lossos <i>et al.</i> 2004) Sağkalım Tahmininde Kullandığı Genler ve Özellikleri	25
2.3.5.1. <i>LMO2</i>	25
2.3.5.2. <i>BCL6</i>	25
2.3.5.3. <i>FNI</i>	26

2.3.5.4. <i>CCND2</i>	26
2.3.5.5. <i>SCYA3</i>	26
2.3.5.6. <i>BLC2</i>	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1. Materyal	28
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Parafine Gömülü Dokudan RNA İzolasyonu	28
3.2.2. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi	30
3.2.3. RNA Konsantrasyonlarının Ayarlanması	30
3.2.4. cDNA Sentezi	30
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR)	32
3.2.5.1. Primer Çiftlerinin Tasarlanması	32
3.2.5.2. Primer Optimizasyonu	33
3.2.5.3. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	35
3.2.5.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi	35
3.2.5.3.1.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	35
3.2.5.3.1.2. Agaroz Jelin Hazırlanması	36
3.2.5.3.1.3. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Görüntülenmesi	36
3.2.5.4. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR)	36
3.2.5.4.1. Hedef Genlerin Klonlanması	37
3.2.5.4.2. Beyaz Kolonilerin Seçimi, Transforme Edilmiş Hedef DNA'nın Kontrolü	39
3.2.5.4.3. qRT-PCR Kurulumu	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1. RNA İzolasyonu Sonuçları	44
4.2. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları	45
4.3. qRT-PCR Analiz Sonuçları	46
4.3.1. Amplifikasyon Eğrileri ve Ortalama Cp Değerleri	46
4.3.2. Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi ve Sonuçları	51
4.3.3. Gen İfade Değişikliği Oranlarının Hesaplanması ve Sonuçları	55
4.4. Klonlanan Hedef Genler ve Analizlerde Kullanılmamalarının Sebepleri	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	59
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Reed-Stenberg hücresi

Şekil 2.2. Bir DLBCL vakasında mediastinal tutulum

Şekil 2.3. Uzun süreli sağkalım için beklenen gen ifade değişimleri

Şekil 2.4. Kısa süreli sağkalım için beklenen gen ifade değişimleri

Şekil 4.1. *PGK1* amplifikasyon eğrisi grafiği

Şekil 4.2. *LMO2* amplifikasyon eğrisi grafiği

Şekil 4.3. *BCL6* amplifikasyon eğrisi grafiği

Şekil 4.4. *FNI* amplifikasyon eğrisi grafiği

Şekil 4.5. *CCND2* amplifikasyon eğrisi grafiği

Şekil 4.6. *SCYA3* amplifikasyon eğrisi grafiği

Şekil 4.7. *BCL2* amplifikasyon eğrisi grafiği

Şekil 4.8. Tipik bir erime eğrisi grafiği

Şekil 4.9. *PGK1* erime eğrisi grafiği

Şekil 4.10. *LMO2* erime eğrisi grafiği

Şekil 4.11. *BCL6* erime eğrisi grafiği

Şekil 4.12. *FNI* erime eğrisi grafiği

Şekil 4.13. *CCND2* erime eğrisi grafiği

Şekil 4.14. *SCYA3* erime eğrisi grafiği

Şekil 4.15. *BCL2* erime eğrisi grafiği

Şekil 4.16. *CCND2* klonlarına ait gel görüntüsü

Şekil 4.17. *BCL6* klonlarına ait gel görüntüsü

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma arasındaki farklar

Çizelge 2.2. NHL sınıflandırma sistemlerinde DLBCL

Çizelge 3.1. cDNA sentezi için gerekli reaktif miktarları

Çizelge 3.2. cDNA sentezi için termal döngü koşulları

Çizelge 3.3. qRT-PCR’da kullanılan primerler

Çizelge 3.4. PCR protokolü

Çizelge 3.5. PCR optimizasyonu termal döngü koşulları

Çizelge 3.6. Klonlama için kullanılan primerlere ait diziler ve ürün boyları

Çizelge 3.7. Koloni kontrol PCR’ı reaksiyon koşulları

Çizelge 3.8. qRT-PCR reaksiyon koşulları

Çizelge 3.9. qRT-PCR termal döngü koşulları

Çizelge 3.10. qRT-PCR’da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklar

Çizelge 5.1. Hastaların sağkalım bilgileri ve sağkalım tahmin sonuçları

SİMGELER DİZİNİ

ACB	Activated B Cell, Aktive Edilmiş B Hücresi
ACS	American Cancer Society, Amerikan Kanser Derneği
<i>BCL2</i>	B-cell lymphoma 2
<i>BCL6</i>	B-cell lymphoma 6
bç	Baz çifti
BL	Burkitt Lenfoma
<i>CCND2</i>	Cyclin D2
CD	Cluster of Differentiation, Farklılaşma Kümeleri
cDNA	Complementary DNA, Komplementer DNA
CGH	Comperative Genomic Hybridization, Komperatif Genomik Hibridizasyon
CHOP	Siklofosamid, Hidroksidaunorubisin, Onkovin, Prednizolon
CpG	Cytosine-phosphate-Guanin, Sitozin-fosfat-Guanin
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
DLBCL	Difüz Büyük B Hücreli Lenfoma
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	Etidyum bromür
F Primer	Forward Primer
FDG-PET	Florodeoksiglukoz ile Pozitron Emisyon Tomografisi
FFPE	Formalin Fixed Parafin Embedded, Formalinle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization, Floresan In Situ Hibridizasyon
FL	Foliküler Lenfoma
<i>FNI</i>	Fibronectin 1
GCB	Germinal Center B Cell, Germinal Merkezli B Hücresi
GEP	Gen Expression Profiling, Gen İfade Profillemesi
HIC1	Hypermethylated in Cancer 1
HKII	Tip-2 Hekzokinaz

HL	Hodgkin Lenfoma
HRS	Hodgkin ve Reed-Setnberg hücresi
IAEA	International Atomic Energy Agency, Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu
IgV	Immunoglobulin Variable Region, Immünglobulin Değişken Bölgesi
IPI	International Prognostic Index, Uluslararası Prognostik İndeks
<i>LMO2</i>	LIM domain only 2
MRI	Magnetic Resonance Imaging, Manyetik Rezonans Görüntülemesi
mRNA	Messenger RNA, Mesajcı RNA
MYC	Myelocytomatosis
NHL	Non-Hodgkin Lenfoma
NK	Naturel Killer, Doğal Öldürücü
PCR	Polimerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pDNA	Plazmit DNA'sı
<i>PGK1</i>	Fosfogliserat kinaz 1
PMBCL	Pre-mediastinal B Cell Lymphoma, Öncül Mediastinal B Hücreli Lenfoması
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR, Kantitatif Eş Zamanlı PCR
R Primer	Revers Primer
R-CHOP	Rituximab-CHOP
REAL	Revised European-American Lymphoma Classification, Yeniden Düzenlenmiş Avrupa-Amerikan Lenfoma Sınıflandırması
rpm	Rotation per minute
RT	Reverse Transcriptase, Ters Transkriptaz
S.O.C	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression, Gen ifadenmesinin Seri Analizi
<i>SCYA3</i>	CCL3, chemokine C-C motif ligand-3
SHM	Somatik hipermutasyon
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Tekli Nükleotid Değişimleri
TBE	Tris-HCl, Borik asit, EDTA
TdT	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
WHO	World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle aynı zamanda önemli bir halk sağlığı sorunudur. Tanı olanaklarının gelişmesi ve sağlık kuruluşlarından yararlanma olanaklarının artması ile her yıl daha çok kanser vakası teşhis edilmektedir. Tanısı konulan bu kanser tiplerinden biri de, lenfomalar yani immun sistem hücrelerinden kökenlenen kanserlerdir.

Lenf kanserleri, Hodgkin Lenfoma (HL) ve Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) olmak üzere iki temel gruba ayrılmıştır. HL, toplam lenfoma hastalarının yaklaşık %10'unda görülürken, %90'ında NHL görülmektedir. Bu istatistiksel bilgi NHL tanı ve tedavisine duyulan gereksinimin önemini ortaya koymaktadır.

NHL'nin birçok alt türü olmakla beraber en sık görülen NHL tipleri, Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma (Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL), Foliküler Lenfoma (FL) ve Mantle Hücreli Lenfoma'dır. DLBCL, %30 görülme sıklığıyla toplumda en sık rastlanan NHL alt tipidir.

DLBCL, heterojen bir alt grubu temsil etmektedir. Bu heterojenite, tanı ve tedavi süreçlerini zorlaştırmakta, farklı terapötik yaklaşım gereksinimlerini de beraberinde getirmektedir. CHOP, (siklofosfamid, hidroksideaurubisin, onkovin, prednizolon) uzun bir süredir kemoterapik bir ilaç kombinasyonu olarak bu hastalığın tedavisinin başlıca dayanağı olmuştur ancak tüm hastalar için yeterli ve istenilen sonuç bu kemoterapik tedaviyle de elde edilememektedir. CHOP tedavisi, Rituksimab (anti CD20 monoklonal antikoru) ilavesiyle daha verimli sonuçlar vermektedir. Coiffier *et al.*'ın (2002) çalışmasında, CHOP tedavisine Rituksimab ilavesinin (R-CHOP) yeni DLBCL tanısı konmuş ve sekiz kür bu tedaviyi almış hastalar üzerinde tam yanıt oranını arttırdığı ve tedavi başarısızlığı oranını düşürdüğü belirtilmiştir. Ancak hastalığın heterojen yapısı sebebiyle, DLBCL tanı ve tedavisine yönelik bilimsel çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir.

Kanser ve benzeri multigenik, multifaktoriyel hastalıkların araştırılmasında gelişen moleküler teknolojiler yeni ufuklar açmaktadır. Bu yeni, yüksek işlem hacimli teknolojiler, yüksek heterojenite arz eden örneklerin genom, transkriptom, proteom veya metabolom bilgisinin tümünü alarak, geniş örnek grupları arasında, istatistik ve informatik araçlar kullanarak istikrarlı bir şekilde tekrar eden moleküler imzayı ve bu imzayı oluşturan moleküllerin teşhis, prognoz ve tedavideki olası etkilerini değerlendirebilmeyi hedeflemektedir. İşte bu kapsamda hastalığın karmaşık yapısı, klasik sınıflandırma yöntemleriyle ayırımın gerçekleştirilememesi araştırmacıları gen ifade profilleri (Gene Expression Profiling, GEP) çalışmalarıyla morfolojik sınıflandırmanın ötesine geçmeye ve yeni prognostik belirteçler (biyobelirteçler) üzerinde çalışmaya itmiştir. Gen ifade profillemesi çalışmaları için sıklıkla başvurulan bir diğer teknoloji ise mikrodizin teknolojisi. Bu teknoloji sayesinde on binlerce gene ait ifade değerleri aynı anda tespit edilebilmektedir. İfade profillemesi çalışmalarında kullanılan bir diğer yöntem ise Kantitatif Eş Zamanlı PCR'dır (Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR). qRT-PCR, floresan boyalar veya floresan işaretli kısa DNA parçaları (oligo) kullanılarak DNA'nın mutlak veya bağıl miktar tayininin gerçek zamanlı yapılabildiği bir yöntemdir ve tek bir gen düzeyinde ifade profili tespitine olanak vermektedir.

Bu Tez Çalışmasının Amacı ve Mantıksal Temelleri

DLBCL ile ilgili olarak literatürde sıklıkla atıf yapılan mikrodizin çalışmaları yapılmıştır ve bunların başında Alizadeh *et al.* (2000), Rosenwald *et al.* (2002) ve Shipp *et al.*'in (2002) yaptığı mikrodizin çalışmaları gelmektedir. Lossos *et al.*, 2004 yılında bu üç çalışmaya ait mikrodizin verilerini temel alan bir meta analiz yapmışlardır vesağkalım skorunu belirlemeye yönelik olarak altı genin (*LMO2*, *BCL6*, *FN1*, *CCND2*, *SCYA3* ve *BCL2*) ifade profillerine bakmanın yeterli olacağını bildirmişlerdir. Bu skorun hesaplanması, hastalarda herhangi başka bir indekse, ölçüte bağılı kalınmaksızın sağkalım tahminine olanak vermektedir. Böylece düşük, orta ve yüksek seviyede ölüm riskine sahip gruplar biçiminde sınıflandırılabilir DLBCL hastalarına farklı tedavi biçimleri uygulanabilecektir. Çünkü DLBCL heterojen yapısı sebebiyle risk sınıfına göre ayarlanmış bir tedavi süreci gerektirmektedir.

Ancak yapılan çalışmalar batı toplumlarını kapsadığından (dolayısıyla örnekler bu topluma ait populyasyondan örnekler içermektedir), etnik farklılığın doğuracağı sonuçların bertaraf edilebilmesi için belirlenen bu aday biyobelirteç genlerin diğer etnik toplumlarda da uygulanabilirliğinin gerekliliği öngörülmüştür. Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu (International Atomic Energy Agency, IAEA) tarafından desteklenen, 11 ülkenin (Türkiye, Fransa, İtalya, İngiltere, Brezilya, Macaristan, Hindistan, Filipinler, Kore, Tayland ve şili) işbirliği ile gerçekleşen E1.50.20 kodlu, “Application of FDG-PET and Molecular Gene Profiling for Risk Stratification of Diffuse Large B-cell Non-Hodgkin’s Lymphoma in Different Ethnic Populations” isimli proje kapsamında gerçekleştirilmiş bu yüksek lisans tez çalışmasında, Lossos *et al.*’ın (2004) yapmış olduğu bu meta-analizin ardından elde edilmiş ve sağkalım skorunun tahminine yönelik, ifade değerlerinden yararlanılan bu altı farklı genin ifade profilleri Türk DLBCL hastalarından elde edilen örneklerde, qRT-PCR yöntemiyle tayin edilmiş ve batı toplumunda sağkalım skoru hesaplanmasında biyobelirteç olarak kullanılabilen bu altı genin, Türk toplumu için de kullanılabilme durumunun tespiti amalanılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kanser

Sürekli değişen günümüz dünyası olumlu ve olumsuz birçok gelişmeyi de beraberinde getirmektedir. Bu olumsuz gelişmelerin başında insidansları gün geçtikçe artan çeşitli sağlık sorunları gelmektedir. Bu sağlık sorunlarından en önemlilerinden biri kanserdir. Enfeksiyon hastalıklarının kontrol altına alınması; diğer hastalıklara karşı etkin tedavi yöntemlerinin kullanıma girmesi ve yaşam standardının yükselmesi ile ortalama yaşam süresinin uzaması, dolayısı ile yaşlı nüfusun artması, gelişen teknoloji ile çevresel karsinojenlere maruziyetin artışı kanser sıklığını gün geçtikçe arttırmaktadır.

2.1.1. Kanserin Moleküler Tarihçesi

Gelişmiş ökaryotların en belirgin özelliklerinden başında hücre büyümesi ve bölünmesinin yoğun bir biçimde düzenleniyor olması gelmektedir. Kanseri hücreleri, büyümelerinin kontrol edilemiyor olması nedeniyle bu duruma istisna oluşturmaktadır. Sınırsız çoğalmaları, apoptozisin görülmemesi, telomerazın sınırsız replikasyon özelliğine sahip olması, yoğunluğa bağlı inhibisyonun etkilenmemeleri, büyüme faktörlerine gereksinimlerinin normal hücreler oranla daha az olması, hücre-hücre, hücre-matriks ilişkilerinin düzensiz olması, anjiyogenez (damar oluşumu) teşvik edici büyüme faktörleri salgılamaları, hücre farklılaşma sürecini tamamlayamamaları gibi özellikleriyle normal hücrelere üstünlük sağlamaktadırlar.

Kanser oluşumunun, çok basamaklı bir süreç olduğu, bağımsız ve birbirini takip eden değişimler sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. İşte bu sebepten ötürü, pek çok kanser türü ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Kanseri görülme sıklığının yaşla birlikte artması birçok kanser türünün yıllar boyunca biriken çok sayıda anomalinin sonucu olduğunu gösterir niteliktedir.

Kanser hücresi oluşumuna sebep olabilecek iki temel mekanizmadan söz edilebilir; bunlardan ilki somatik mutasyonların birikmesi, diğeri ise genetik kararsızlığın ortaya çıkmasıdır. Bu mekanizmalardan mutasyonlara bakacak olursak, kanser hücreleri, normal hücrelere kıyasla çok daha yüksek oranda mutasyona sahiplerdir ve kanser ilerledikçe bu mutasyonların sayısı artmakta, birikmektedir. Bunun nedeni, DNA tamir mekanizmasında görev alan genlerin mutasyonlar sonucu etkisiz hale gelmesi ve işlevlerini yerine getirememesidir. Genetik kararsızlık ise genomda gerçekleşen küçük duplikasyon ve delesyonlar, kromozomlar arası translokasyonlar veya tüm kromozomu etkileyen değişikliklerin sonucu olarak gelişebilir.

Hücresel düzeyde kanserin gelişimi mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonunda çoğalma, canlı kalma, invazyon ve metastaz yetenekleri artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar. Tümör oluşumu, tek bir hücrede olan, hücre çoğalmasına neden olacak bir mutasyonla başlamaktadır. Hücre çoğalmasına paralel olarak tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür ve bu topluluktaki diğer hücrelerde de mutasyonlar gelişir. Bazı mutasyonlar hücreye daha hızlı çoğalma gibi avantajlar kazandırır ve tümör klonu içerisinde baskın hale geçerler. Bu hücrelerin bazılarının da hızlı çoğalma, invazyon, metastaz gibi özellikleri kazanmasıyla avantajlı yeni bir hücre klonu ortaya çıktığından bu işleme klonal seçim adı verilir. Klonal seçim tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler bu nedenle giderek daha hızlı çoğalarak malin özellik kazanırlar. Hızla çoğalan malin özellikli bu hücreler diğer hücre ve dokulara zarar verip, kan ve lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine dağılabilirler yani metastaz yapabilirler.

2.1.2. Kanser İstatistikleri

Dünyada kanser hastalıkları ile ilgili sayım yapma ve veri toplama isteği 1728 yılında Londra'da genel nüfus sayım idaresince yapılan bir çalışma ile başlamış ve bu tarihten itibaren çeşitli ülkelerde çok sayıda çalışma ile devam etmiştir.

2008 Yılı Dünya Kanser Kongresi'nde sunulan veriler, hastalığın evrensel olarak büyük boyutlara ulaştığını ortaya koymaktadır. Bu verilere göre dünyada yaklaşık 11 milyon

insan kansere yakalanmaktadır. Bu veriler kanserden ölümlerin %80'inin gelişmemiş ve az gelişmiş ülkelerde meydana geldiğini ve 2030 yılında yaklaşık 12 milyon insanın kanserden öleceğini öngörmektedir (<http://www.tuba.gov.tr/index.php?id=443>). Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society, ACS) 2009 verilerinde Amerika'da kanser vakalarının yaklaşık 1,5 milyon civarında olduğu, bunların %30'unun akciğer ve bronş, %15'inin göğüs, %10'unun prostat ve yaklaşık %5'inin de lenf kanseri olduğu belirtilmiştir (Anonim, 2009).

Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir (<http://turkkanser.org.tr/news.php?id=61>). Türkiye'deki kanser verileri Sağlık Bakanlığı'na bağlı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı'nın 2004 yılı verilerine dayanmaktadır. Kanser, Sağlık Bakanlığı'na bildirim zorunlu bir hastalık olmasına rağmen ülkemizde gerçek kanser insidansı bilinmemektedir. Gelişmekte olan ülkelerde kanser istatistikleri kısıtlı kaynakların ekonomik kullanımı ve kanser kontrol stratejilerinin planlanması açısından önemlidir. Ayrıca kanser istatistikleri, belirli kanser türlerinin dağılımını, hastalığa yakalanan bireylerin sosyodemografik (yaş, cinsiyet, etnik grup, din, meslek gibi) özelliklerini, bölgeler arası farklılıkları ve zamanla değişimlerini ortaya koyarak kansere yol açan risk faktörlerinin belirlenmesinde ve ileride kanser gelişiminin engellenmesinde kullanılmaktadır.

En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanmaktadır (<http://www.tuba.gov.tr/index.php?id=443>). Lenf kanseri, sayılan bu onkolojik hastalıklar içinde yaşamın uzatılması, daha kaliteli yaşam sağlanması ve hasta sağkalımı açısından daha fazla başarı elde edilmiş bir kanser çeşididir.

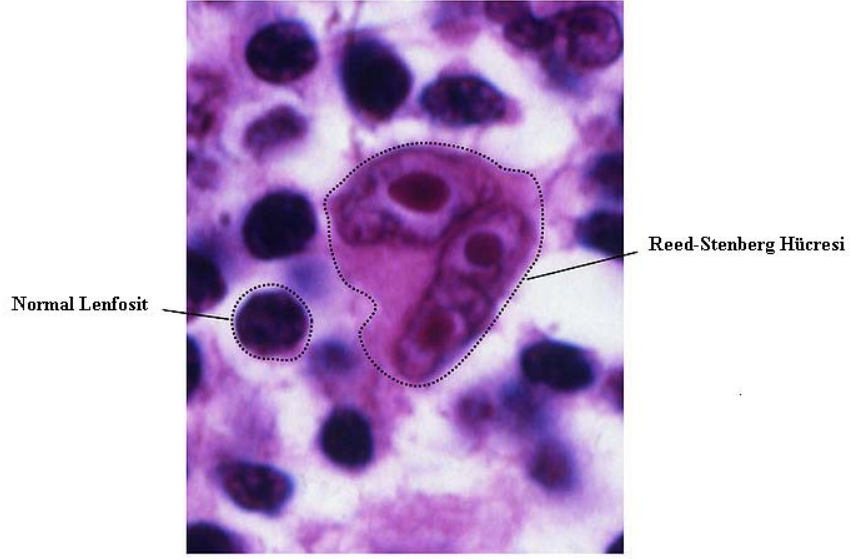
2.1.3. Lenf Kanseri

Lenfoma (lenf kanseri), immün sistem hücreleri olan lenfositlerde başlayan ve solid tümörler halinde veya lösemik yayılım yapabilen bir kanser çeşididir. Bu malignan

hücreler genellikle lenf nodlarından köken almaktadırlar. Yine lenfositlerden köken alan ancak vücutta dolaşan, kanı ve kemik iliğini tutan ve de genellikle solid tümörler halinde görülmeyen lenfoid lösemiler ile büyük benzerlik göstermektedir (Parham 2005).

Günümüzde bilinen birçok alt tipi olan lenfoma ilk kez 1832 yılında Thomas Hodgkin tarafından tanımlanmış ve tanımladığı bu tip “Hodgkin lenfoma” adını almıştır (Hogkin, 1832). Hodgkin hastalığının diğer malignant ve malignant olmayan formlardan ayrılmasının ardından birçok lenfoma sınıflandırması hem morfolojik hem de moleküler parametreler doğrultusunda geliştirilmiştir (Reed 1902, Rosenberg 1994). 1982’de Çalışma Düzenlemesinin (Working Formulation) yaptığı sınıflandırma çok popüler olmuştur. Bu sınıflandırma 16 farklı hastalık alt tipine ayrılan Non-Hodgkin lenfoma’yı (NHL) öne sürmüş ve bunun ardından malignant lenfoid neoplasmlar Hodgkin Lenfoma (HL) ve Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. 1994’de Yeniden Düzenlenmiş Avrupa-Amerika Lenfoma Sınıflandırması (Revised European-American Lymphoma classification, REAL) farklı klinik, patolojik durumları kategorize etmeyi amaçlamıştır (Harris *et al.* 1994). Buna rağmen bu sınıflandırma sistemi de birden fazla hastalık özelliği içermesi muhtemel farklı morfolojik alt tipleri birlikte sınıflandırmıştır. Sonrasında 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından (World Health Organization, WHO) Hematopoetik ve Lenfoid Doku Tümörleri Sınıflandırması yapılmış, bu sınıflama 2008 yılında tekrar düzenlenmiş ve lenfoma sınıflandırmasında altın standart olarak kabul edilmiştir (Jaffe *et al.* 2001). Anılan sınıflandırma bireysel klinikopatolojik durumları, bunu bütünleyici olarak da morfolojik, immünofenotipik, genetik, hücre kökeni, klinik bulgular ve moleküler genetik çalışmaları kapsamaktadır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Lymphoma>).

Lenfoid hücrelerden gelişen kanserler olan lenfomaların iki ana grubundan biri olan Hodgkin lenfoma (HL), bilinen en eski lenfoma türüdür. Bu lenfoma tipini diğer tüm lenfomalardan ayıran morfolojik özellik Hodgkin ve Reed-Stenberg (HRS) hücresi adı verilen geniş, tek çekirdekli veya çok çekirdekli tümör hücresinin bulunmasıdır (Şekil 2.1.). Bu hastalık tipi ergenlerde ve gençlerde yüksek insidans oranlarıyla görülmektedir (Anonim, 2009). Non-Hodgkin Lenfoma ise (NHL) farklı davranış paterni ve tedaviye cevabı ile lenfoproliferatif hastalıkların heterojen bir grubudur.



Şekil 2.1. Reed-Stenberg hücresi (<http://visuals.nci.nih.gov/details.cfm?imageid=7172>)

HL ve NHL arasındaki farklar Çizelge 2.1’de gösterilmektedir:

Çizelge 2.1. Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma arasındaki farklar

Hodgkin Lenfoma	Non-Hodgkin Lenfoma
Reed-Stenberg adlı, hastalığa özgü bir hücre ile karakterizedir.	Hastalık, köken aldığı neoplastik lenfoid hücrenin olgunluk düzeyin göre farklı morfolojide olabilir.
Genellikle tek bir odaktan başlar, zaman içinde görülen yayılma genellikle yavaştır.	Birçok periferel odakta aynı anda bulunabilir.
Düzenli bir biçimde yayılır.	Düzensiz yayılım gösterir.
Ekstranodal yayılıma nadiren rastlanır.	Ekstranodal yayılım daha sık görülebilir.
Hastalığın tedavi başarısı genellikle yüksektir.	HL’ye kıyasla hücre tipine ve agresif özelliğine göre tedavi başarısı değişkendir.

Hem HL hem de NHL, lenfosit progenitör hücre DNA’sında oluşan hasar yüzünden ortaya çıkmaktadır. DNA’daki bu hasar sonrasında hücrede malignant değişim gerçekleşmektedir.

Bu değişim lenfositin kontrolsüz çoğalmasına veya ölüm yollarının engellenmesine yol açacak neoplastik veya tümoral hücrelerin sayısının artışına neden olur.

2.1.3.1. Non-Hodgkin Lenfoma

NHL, B ve T hücrelerinin veya öncü hücrelerinin lenf nodu ve doku infiltrasyonuna yol açan neoplastik proliferasyonudur. Tek bir hastalıktan ziyade bir grup hastalıktan oluşmaktadır. NHL'nin sınıflandırılması için, temel aldıkları parametreler birbirinden farklı birçok sistem uygulanmıştır. Örneğin en genel olarak büyüme hızına göre yavaş seyirli (indolent) ve hızlı seyirli (agresif) lenfoma olarak ikiye ayrılabilir. Yavaş seyirli lenfomalar; yavaş ilerleyen, yaşam süresi uzun olan lenfoma tipidir. Tedavi ile hastalığın doğal seyri pek değişmediğinden genellikle tedavisiz izlenir. Ancak hızlı seyirli lenfomaya dönüştüğünde veya lenf nodlarındaki büyümeye bağlı şikayetler oluştuğunda tedaviye başlanır. Agresif lenfomalar ise hızlı seyrederek ve tedavi edilmediğinde ölümle sonuçlanır. Kemoterapiye duyarlı olduklarından hemen tedavi edilmesi gerekmektedir.

ACS 2009 verilerine göre, Amerika'da geçtiğimiz yıl 74,490 lenfoma hastasından 8,510 hastaya (~%10) HL teşhisi konulmuşken 65,980'ine (~%90) NHL teşhisi konulmuştur. Yine yapılan istatistiksel analiz sonucunda NHL'nin Amerika'da en sık görülen 7. kanser çeşidi olduğu saptanmış, NHL'nin yaşla orantılı artışının 1975 yılından 2006 yılına kadar %76'dan fazla artış gösterdiği görülmüştür (Anonim 2009).

Literatürde NHL sınıflandırılmasına kronolojik olarak bakıldığında, Rappoport'un (1966) sadece morfolojiyi, Kiel/Lukes&Collins'in (1974) immunfenotipik özellikleri, Working Formulation (1982)'nin hücre orijininden ziyade yaşam oranlarını, REAL'in (1994) morfolojik, immunofenotipik, genetik ve klinik özellikleri temel alan sınıflandırmaları görülmektedir. Son olarak da günümüzde, Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma (Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL) ile Burkitt Lenfoma (BL) ya da DLBCL ile HL arasında kalan nadir gözlenen ve sınıflandırılmayan yeni lenfoma alt tipleri eklenerek güncellenen Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırılması altın standart olarak kabul edilmektedir (Harris *et al.* 1994, Jaffe *et al.* 2001, Trumper *et al.* 2004, Anonim 1982, Gatter 2001).

Lenfomalar köken aldığı hücre serisine göre çeşitlere ayrılmaktadır. Olguların %80-85'i B hücre orijinli, %15'i kadarı T hücre orijinliyken, nadir olarak doğal öldürücü (Naturel Killer, NK) hücre orijinli olgulara rastlanmaktadır. NHL'ler B ve T lenfositlerin farklılaşma aşamasının herhangi bir basamağındaki lenfositlerden gelişebilirler. Hangi hücreden köken aldığı tümör hücrelerinin fenotipik ve moleküler özelliklerine göre saptanmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan ve o hücre tipinin tanınmasını sağlayan, özgün antijenlerin (yüzey belirteci) varlığıyla hangi hücreden kökenlendiği anlaşılabilir. Örneğin CD2 (cluster of differentiation, CD2), CD3, CD4, CD7, CD8 T hücrelerinin, CD10, CD19, CD20 B hücrelerinin, CD16, CD56 ise NK hücrelerinin tespitinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra olgunlaşmamış T ve B hücreleri (lenfoblastlar) terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) pozitifdir (TdT, olgunlaşmamış öncül T ve B hücreleri ile akut lenfoblastik lösemi hücreleri tarafından üretilen bir çeşit DNA polimerazdır), bu özellik myeloblast ve olgun lenfosit ayırımında kullanılmaktadır (Herrick and Dogan 2010).

NHL'nin birçok alt türü olmakla beraber en sık görülen NHL tipleri aşağıda sıralanmıştır:

- 1-DLBCL: Tüm NHL'nin %30'nu oluşturur. Hızlı seyirli bir lenfoma türüdür.
- 2-Foliküler lenfoma (FL): Tüm NHL'nin %20'sini oluşturur. Yavaş seyirli bir lenfoma türüdür.
- 3-Mantle hücreli lenfoma: tüm NHL'nin %6'sını oluşturur. Hızlı seyirli bir lenfoma türüdür (<http://hematolojika.com/Content4.asp?M1=1&M2=8&M3=4&M4=14>).

2.1.3.1.1. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DLBCL), Non-Hodgkin lenfomanın yetişkinlerde gözlenen agresif bir formudur ve görülen lenfoid neoplazmların yaklaşık olarak %30-40'ını kapsamaktadır (Anonim 1997).

Bugüne kadar yapılan farklı NHL sınıflandırmalarında, DLBCL da farklı gruplar altında yer almış ve farklı isimlerle anılmıştır. DLBCL tanımlamalarına ait bilgiler Çizelge 2.2.'de mevcuttur (Abramson and Shipp 2005).

Çizelge 2.2. NHL sınıflandırma sistemlerinde DLBCL

Rappoport (1966)	Diffüz Histositik Lenfoma
Kiel (1974)	Sentroblastik Lenfoma B-İmmunoblastik Lenfoma B-Büyük Hücre Anaplastik Lenfoma
Lukes-Collins (1974)	Büyük Ayrık Foliküler Merkez Hücre Lenfoması Büyük Ayrık Olmayan Foliküler Merkez Hücre Lenfoması B-İmmunoblastik Lenfoma
Çalışma Düzenlemesi (1982)	Diffüz Karışık Büyük ve Küçük Hücre Lenfoması (Grup F) Diffüz Büyük Hücre Lenfoması (Grup G) Büyük Hücre İmmunoblastik Lenfoma (Grup H)
REAL (1994) & WHO (2001)	Diffüz Büyük B-Hücre Lenfoması

Bu lenfoma türüne malignant B lenfositleri diffüz şekilde lenf nodlarının ve ektranodal bölgelerin yapısını bozması sebebiyle DLBCL denilmesi uygun görülmüştür (Abramson and Shipp 2005).

Klinik ve morfolojik göstergeler DLBCL'in heterojen olduğunu, farklı terapötik yaklaşımlar gerektiren farklı alt tiplerden oluştuğunu göstermektedir. DLBCL'in heterojen yapısından yola çıkılarak yapılan gen ifade profillemesi çalışmalarıyla 1) Germinal merkezli B hücre lenfoması (GCB), 2) Aktive edilmiş B hücre lenfoması (ABC) olmak üzere iki ana gruba ayrıldığı görülmüş ve yapılan başka bir çalışmada ise immunohistokimyasal teknikler kullanılarak bu alt tiplerin varlığı doğrulanmıştır (Hans *et al.* 2004).

DLBCL’de en sıklıkla karşılaşılan genetik değişiklik 3q27 kromozomal bandında bulunan *BCL6* (B-cell lymphoma 6) geninin farklı translokasyon partnerleri ile yeniden düzenlenmesi şeklinde görülmekte, promotörün yer değiştirilmesi ve yetersiz *BCL6* ifadenmesi gibi sonuçlara yol açmakta ve vakaların ~%40’ında görülmektedir (Lossos 2005). *BCL6*, *CDKN1B/p27*, *CCND2/cyclin D2* ve *TP53* gibi hücre döngüsü kontrolü ve genomik kararlılıkla ilgili genlerle ilişkilidir (Phan *et al.* 2004, Shaffer *et al.* 2000).

BCL2 genindeki kromozomal bant 18q21’den 14q32’deki Ig lokusuna olan ayrıcı nitelikteki FL translokasyonunun DLBCL’deki oranının ~%20 olduğu ve 8q24’deki MYC gen lokusunu içeren tipik bir BL translokasyonu olan t(8;14)’ün ise ~%6 oranında görüldüğü belirtilmiştir (Lossos 2005).

DLBCL örneklerinin geniş serilerinde çeşitli Komperatif Genomik Hibridizasyon (Comparative Genomic Hybridization, CGH) çalışmaları yapılmıştır. Bunlardan Bea *et al.*’ın yaptığı bir çalışmada kromozom 6q’da iki parçanın kaybolduğu (6q21-q22 ve 6q16), 18q, 3q ve 6p’ye parça eklendiği, 2p’ye ise hem parça eklendiği hem de amplifikasyonların olduğu belirtilmiştir (Bea *et al.* 2005).

DLBCL’i simgeleyecek belirli bir genetik sapma bulunmamaktadır ancak çoğu lenfoma türü immunoglobulin gen lokuslarını içeren resiprokal kromozomal translokasyonları ile karakterizedir ve bu tipik değişimlerin belirlenmesi önemli bir tanı bilgisi sağlamaktadır. İncelenen tümörlerin çoğunda immunoglobulin ağır ve hafif zincir genlerinde yeniden düzenlenmelerin olduğu ve aynı zamanda değişken bölgelerinde (IgV) somatik hipermutasyonlara (SHM) sahip oldukları görülmüştür. SHM’ler antikor çeşitliliğine ve antijen afinitesinde artışı sebep olmaktadır ancak aynı zamanda kromozomal translokasyonların ve mutagenizin oluşmasına da sebep olabilirler. Çalışmalar sonucunda yapısal değişimlerden (dengeli ve dengesiz translokasyonlar), sayısal değişimlere (ör: anöploidi) ve nokta mutasyonlarına uzanan geniş bir spektruma yayılan genetik anomaliler bildirilmiştir. Bu anomalilerin çoğu konvansiyonel sitogenetik veya FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) teknikleri ile tanımlanmıştır (Abramson and Shipp 2005, Hunt and Reichard 2008, Klein *et al.* 1998).

Karsinogenezde, kromozomal dengesizliklerin varlığına ek olarak, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu gibi epigenetik değişimlerin de önemli rol oynadığı düşünce gün geçtikçe güçlenmektedir. Malignant lenfomalarda bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur ve yayınlanan çoğu raporda sitozin-fosfat-guanin (CpG) adaları hipermetilasyonu yoluyla olası tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel susturulması konusuna odaklanılmıştır. Yapılan bir çalışmada, hypermethylated in cancer 1 (HIC1) geninin delesyonla inaktivasyonu ve promotör hipermetilasyonu DLBCL’de bir klinik bulguyla ilişkilendirilmiştir (Stocklein *et al.* 2008). DNA hipermetilasyon seviyeleri 500’den fazla olan CpG adalarını araştıran başka bir çalışmada CpG adalarının hipermetilasyonu ile transkripsiyonel düzenlenmesi gerçekleştiği düşünülen, olası hedef genler ortaya konmuştur (Pike *et al.* 2008).

2.2. DLBCL Tanı ve Tedavi Yöntemleri

DLBCL, heterojen alt tiplere sahip bir hastalık grubu olduğu için tanı ve tedavisi kolaylıkla yapılamamaktadır. Bu amaçla çeşitli prognostik modeller kullanılmaktadır. Uluslararası Prognostik İndeks (International Prognostic Index, IPI) hasta yaşını, tümörün aşamasını, serum laktat dehidrogenaz konsantrasyonunu, performans durumunu ve extranodal hastalık bölgelerinin sayısını temel alan ve bu amaçla kullanılan prognostik bir modeldir (Lossos *et al.* 2004). Ann Arbor evreleme sistemi hastalığın evrelerini belirlemek amacıyla kullanılan bir başka modeldir. Ann Arbor evreleme sistemine göre; Evre I: tek bir lenf nodu bölgesinde hastalık durumunu, Evre II: ya göğüs ya da karın bölgesindeki lenf bezlerindeki hastalık durumunu, Evre III: hem göğüs hem de karın bölgesindeki lenf bezlerindeki hastalık durumunu ve Evre IV: karaciğer, kemik iliği veya akciğer gibi lenf bezleri dışındaki organlara hastalığın yayıldığı durumu ifade etmektedir. Evre I-II erken evre, evre III-IV ileri evre olarak sınıflandırılabilir. Ancak bu ve benzeri prognostik modeller, belirteçler DLBCL tanısında ve alt tiplerin belirlenmesinde yeterli olmamaktadır (Anonim 1993, <http://hematolojika.com/Content4.asp?M1=1&M2=8&M3=4&M4=14>).

Hastalığın karmaşık yapısı, klasik sınıflandırma yöntemleriyle ayırımın gerçekleştirilememesi araştırmacıları gen ifade profilleri (Gene Expression Profiling, GEP) çalışmalarıyla morfolojik sınıflandırmanın ötesine geçmeye ve yeni prognostik belirteçler üzerinde çalışmaya itmiştir. Yapılan bu çalışmaların önemi, GEP çalışmaları sonucu

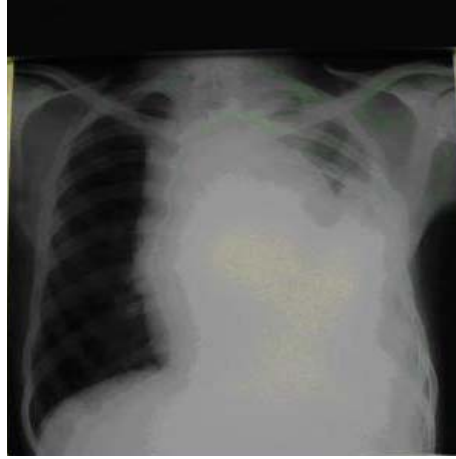
belirlenen genlere ait moleküler imzaların tanı ve tedaviye yönelik olarak tahmin mekanizması oluşturulmasında kullanılabilirliği.

Son yıllarda bu hastalığın tanısına yönelik olarak FDG-PET (Florodeoksiglukoz ile Pozitron Emisyon Tomografisi) görüntüleme yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tomografi biçimi, uygulama esnasında bir glukoz analogu olan, flourine-18 ile etiketlenmiş florodeoksiglukozun (FDG) glukoz metabolizması içerisinde kullanılması ve bunun görüntülenmesi esasına dayanmaktadır. Bu süreçte hastaya FDG verilmekte ve bu şekerin hedeflenen organlarda birikmesi beklenmektedir. Ardından görüntüleme aşamasına geçilmekte ve her bir organda bu şekerin miktarı PET ile tayin edilmektedir. Bu yöntem ile glukoz tüketimi yüksek olan organlar tespit edilebilmekte, kanserin belirgin metabolik özelliklerinden olan yüksek glukoz tüketimi baz alınarak özellikle HL, NHL ve akciğer kanserinin teşhis ve tedavi sürecinde bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. Hatta PET kullanılarak yapılan onkolojik taramaların %90'ından fazlasında FDG molekülü kullanılmaktadır. Literatürde bu görüntüleme yönteminin Non-Hodgkin lenfomalarda hem tanıda hem de tedavi aşamasında tümörün hangi fazda olduğunun belirlenmesinde etkin ve yaygın kullanımının gerekliliği üzerinde durulmaktadır (Spaepen *et al.* 2002, Kostakoglu *et al.* 2002, Mikhaeel *et al.*2005, Haioun *et al.* 2005, Kostakoglu *et al.* 2006).

Glukoz metabolizması ve kanser arasındaki ilişkiye bakılacak olursa, yüksek malignansiye sahip, az farklılaşmış tümörlerin fenotipik göstergelerinden birinin, bu tümörlerin normal hücrelerden çok daha yüksek bir oranda glukozu kullanma eğilimleri olduğuna bunun da tip 2 hekzokinaz (HKII) geninin yüksek miktarda sentezlenmesine bağlı bir süreç olduğu görülmektedir. HKII geninin tümör hücrelerinde yüksek oranlarda ifade edilmesinin sebebi olarak, metilasyon ve demetilasyon olaylarının HKII gen ifade seviyesinin düzenlenmesinde etkin bir rol oynamasının olduğu düşünülmektedir. Bu anormal metabolik değişiklik, oksijen seviyesi düştüğünde bile sabit bir enerji arzının korunmasıyla and biyosentez prekürsörlerinin miktarlarının yüksek tutulmasının sağlanmasıyla kanser hücrelerinin çoğalması amacına hizmet eder. Dolayısıyla, yüksek oranda glikolitik tümör fenotipine sebep olan (glukozu çok kullanan) değişme süreci, normal hücreye oranla tümör hücresine metabolik bir avantaj kazandırır (Goel *et al.* 2003).

DLBCL, hastada özgün bir şikayete neden olmamakla beraber farklı tipte şikayetlere neden olabilmektedir. Bunlardan bazıları halsizlik, çabuk yorulma, kilo kaybı, terleme, yüksek

ateş, boyun, koltuk altı veya kasıklardaki lenf bezlerinde büyüme ile ciltte iyileşmeyen yaralar ve mediastinal (göğüs boşluğu) tutulum (Şekil 2.2) olarak sıralanabilir. Bazı hastalarda ani gelişen nefes almada zorluk, yüzde, boyunda şişlik ve aşırı tansiyon düşüklüğünden oluşan acil bir tablo (Vena Cava Superior Sendromu) gelişebilir.



Şekil 2.2. Bir DLBCL vakasında mediastinal tutulum

(<http://hematolojika.com/Content4.asp?M1=1&M2=8&M3=4&M4=14>)

Şikayetleri NHL ile uyumlu olan hastalarda; kan sayımı, eritrosit sedimentasyon hızı ve rutin biyokimyasal testler yapılır. Tanı için öncelikli şart alınan dokunun (sıklıkla lenf bezi) patolojik incelenmesidir. Hastalığın yaygınlığının tespiti için akciğer ve karın bölgesinin tetkiki gerekmektedir. Bu amaçla akciğer grafisi, ultrason, bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntülemesi (Magnetic Resonance Imaging, MRI) kullanılır. Kemik iliği biyopsisi yapılarak kemik iliğinde hastalığın olup olmadığı anlaşılabilir. Örneklerden yapılacak genetik çalışmalarla bu hastalıkta sık görülen kromozom anomalileri tespit edilebilir

(<http://hematolojika.com/Content4.asp?M1=1&M2=8&M3=4&M4=14>).

2.2.1. DLBCL'de R-CHOP tedavisi

DLBCL tedavisinde, Non-Hodgkin lenfomalarda artık klasikleşen CHOP (siklofosfamid, hidroksidaunorubisin, onkovin, prednizolon) adı verilen ve bazen bir monoklonal antikor olan “Rituksimab” (anti-CD20 monoklonal antikor) ile birleştirilerek kullanılan (eğer

lenfoma B hücre kökenli ise tedavi bu biçimiyle uygulanmaktadır) kemoterapi biçimi uygulanmaktadır. Her biri birer kemoterapik ajan olan bu ilaçların özellikleri ve etki mekanizmaları aşağıda belirtilmiştir:

2.2.1.1. Siklofosfamid (Cyclophosphamide)

Siklofosfamid, DNA'ya bağlanan ve çapraz bağlantılara (cross-links) sebep olarak DNA'ya hasar veren alkilleyici bir ajandır. Bazı otoimmün hastalıkların ve birçok kanser tipinin tedavisinde kullanılmaktadır. Aktif formuna karaciğerde dönüşerek kemoterapik özellik kazanır. Hücre büyümesini yavaşlatarak veya durdurarak etkisini gösterir. Bu ilacın önemli bir diğer özelliği, bu molekülün aldehit dehidrogenaz (ALDH) seviyesinin düşük olduğu hücrelerde etkisini göstermesidir. Bu nedenle, ALDH seviyesinin yüksek olduğu kemik iliği kök hücreleri, karaciğer ve intestinal epitelyumda siklofosfamid çok düşük bir etkiye sahiptir. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclophosphamide>)

2.2.1.2. Hidroksidaunorubisin (Hydroxydaunorubicin)

Antrasiklin antibiyotiği olan ve doksorubisin olarak da bilinen ilaç, tüm antrasiklinler gibi, DNA çift sarmalının arasına girmek suretiyle makromolekül sentezini engelleyerek etkisini göstermektedir. Bu süreç, DNA'daki aşırı kıvrımların (super coil) gerginliğini azaltan topoizomeraz II'nin ilerlemesini engeller; DNA zincirinin topoizomeraz tarafından kırılmasını takiben gerginlik azaldıktan sonra tekrar yapıştırılmasına engel olur ve replikasyonu durdurur. HL ve bazı lösemi türlerini tedavi etmekte kullanılan ilaç, birçok yumuşak doku sarkomaları ve karsinomlarının tedavisinde de kullanılmaktadır. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxydaunorubicin>).

2.2.1.3. Onkovin (Oncovin)

Bir mitotik inhibitör olan Onkovin (vinkristin olarak da bilinmektedir), tübülün proteinine bağlanarak hücrelerin duplikasyonuna engel olur ve bu özelliği nedeniyle kanser

kemoterapisinde kullanılmaktadır. Onkovinin tübülün dimerlerine bağlanmasıyla mikrotübüller parçalanmaya başlar ve bu da mitozun metafaz safhasında durmasına neden olur. Bu nedenle, kanseri de içeren tüm hızlı çoğalan hücre türleri de bu ilaçtan etkilenirken, bu etki kemik iliğini ve intestinal epitelyumu da kapsar. Ana kullanım alanı, CHOP reçetesinin bir parçası olarak NHL'nin tedavisidir.

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Oncovin>)

2.2.1.4. Prednizolon (Prednisolone)

Sentetik bir glukokortikosteroid olan prednizolon, immunsupresif bir ilaç olarak etki etmektedir. Bazı otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanıldığı gibi anti-tümör ilacı olarak kullanılmaktadır. Akut lenfoblastik lösemi (ALL), NHL, HL ve multiple miyeloma ve diğer hormona duyarlı tümörlerde, başka antikanser ilaçlarıyla birlikte kullanılarak kanser tedavisinde önemli bir role sahiptir.

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Prednisone>)

2.2.1.5. Rituksimab (Rituximab)

Ritüksimab, B hücrelerinin yüzeylerinde yer alan CD20 proteininin kimerik monoklonal antikordur; dolayısıyla çok sayıda, aşırı aktif veya fonksiyonunu yerine getiremeyen B hücreleriyle karakterize olan hastalıklarda bu hücrelerinin yok edilmesi amacıyla kullanılan bir ilaçtır. Başta DLBCL olmak üzere lenfoma ve lösemi tedavisinde, transplant reddi ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisi gibi durumlarda kullanılmaktadır.

Ritüksimab antikoru, CD20 proteininin 170.-173. ve 182.-185. aminoasitlerine bağlanarak 167. ve 183. aminoasitler arasında bir disülfid bağının oluşmasını neden olarak etkisini gerçekleştirir (Binderet *al.* 2006). CD20 proteinin, öncül B hücrelerinden farklılaşmış B “hücrelerine yayılan spektrumdaki B hücrelerinin yüzeyinde yer alır, ancak son aşama farklılaşmanın oluşturduğu plazma hücrelerinde bu proteine rastlanmaz. Bu proteinin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, kalsiyum akışının plazma zarları arasındaki alışverişi ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu koruyarak B hücrelerinin aktivasyonuna sebep

olduğu düşünölmektedir. CD20 gibi Rituksimab'ın etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre döngüsü üzerinde genel bir düzenleyici rolünün olduğu, B hücresi reseptörlerinin ifadelerinde azalmaya neden olduğu ve CD20+ hücrelerinin apoptozunu indüklediği düşünölmektedir. Sonuç olarak, kanserli olanları da dahil olmak üzere, varolan B hücreleri yok olmakta ve yerlerine lenfoit kök hücrelerden sağlıklı bir B hücresi popölasyonu gelmektedir (Shaw *et al.* 2003).

2.2.1.6. R-CHOP Tedavi Protokolü ve Sonuçları

Bu kemoterapi tedavisi genellikle 3 haftada bir (her 21 günde bir) uygulanmaktadır. Kemoterapik ilaçların (siklofosfamid, hidroksideaunorubisin ve onkovin) enjeksiyonunun ardından 5 gün süreyle steroid (prednizolon) tabletler alınmaktadır. Literatüre bakıldığında bazı çalışmalarda R-CHOP tedavisinin sağkalım süresini arttırdığı belirtilmiştir (Hunt *et al.* 2008, Feugier *et al.* 2005, Pfreundschuh *et al.* 2006, Habermann *et al.* 2006, Coiffier *et al.* 2002). Kardiyovasküler hastalık öyküsü olan kişiler için doksorubisin (kardiyotoksik olduğu için) bu kürden çıkartılır ve kür COP olarak uygulanır. Bu tedavi sürecinin beyaz kan hücrelerinin sayısında azalma (dolayısıyla enfeksiyonlara karşı koyma yeteneğinin azalması, sıklıkla hastalanma, kaslarda ağrı vb.), kırmızı kan hücrelerinin sayısında azalma (kan transferi gereksinimi), yorgunluk, bitkinlik, saç kaybı, iştahta azalma, ağız yaraları, ciltte koyulaşma veya aşırı hassasiyet, hazımsızlık, doğurganlığın kaybedilmesi ve çevresel sinir sistemi hastalıklarına sebep olması gibi birçok yan etkisinin de olduğu bilinmektedir.

Bu tedavi yöntemi, hem birey hem de ülke ekonomisine ciddi bir yük getirmektedir. Romse *et al.*'ın (2008) yayınında R-CHOP tedavisinin genellikle 6 kür uygulanıldığı ve her bir kürün maliyetinin 1.829 € (~3.700 TL) olduğu bildirilmiştir. Bazı kaynaklarda, standart CHOP tedavisine Rituksimab ilavesinin toplam maliyeti yaklaşık 12 kat arttırdığı, yılda 8 kür uygulanması durumunda bu kombine tedavinin yaklaşık 33.000 TL civarında bir maliyeti sahip olacağı belirtilmiştir. Örneğın, MABTHERA® ROCHE ticari ismiyle piyasada bulunan, etkin maddesi Rituximab olan bu ilacın birim fiyatı 1241.49 TL'dir.

DLBCL, kemoterapiye yanıt veren insan malignanslarından biri olsa da hastaların çoğu (~%60), hastalığın heterojen yapısı sebebiyle, kullanılan bu geleneksel kemoterapi yöntemine (CHOP) yanıt vermemektedir (Coiffier 2001).

Hastalığın yavaş veya hızlı seyirli olmasına göre tedavi seçenekleri değişmektedir. Yavaş seyirli lenfomada erken evrede radyoterapi (ışın tedavisi) veya kemoterapi verilirken, ileri evrede hastanın hiç bir şikayeti yok ise tedavi verilmez. Çünkü bu tip hastalar uzun süre yaşarlar ve hastaların yaşam süresi tedaviye bağımlı değildir. Non-Hodgkin lenfomada uygun hastalarda otolog kök hücre nakli yapılır. Allojenik kök hücre nakli nadiren uygulanır. Kemoterapi sonrası tekrarlayan veya başlangıçtaki tedaviye yanıt vermeyen 60-65 yaş altı hastalarda otolog kök hücre nakli yapılması öngörülmektedir (<http://hematolojika.com/Content4.asp?M1=1&M2=8&M3=4&M4=14>).

Sonuç olarak, etkin bir tanı ve tedavi sürecinin gerçekleştirilebilmesi, tedaviye yanıt için bağımsız bir tahmin mekanizması oluşturulabilmesi için tüm bu parametrelerin birlikte ve doğru bir biçimde kullanılması gerekmektedir.

2.3. DLBCL’de Yapılan Moleküler Gen Profillemesi Çalışmaları

2.3.1. Biyobelirteç nedir?

Biyobelirteçin genel tanımına bakacak olursak, bir biyobelirteç belirli bir hastalığın klinik belirtileri ve sonuçları ile doğrudan bağlantılı bir biyolojik sürecin varlığının veya sonucunun bir göstergesidir. Daha özel olarak, biyobelirteç, bir hastalık riski veya seyriyle bağlantılı bir gen, transkript, protein veya biyomolekülün durum veya miktarındaki değişikliklerin belirteçidir. Biyobelirteç keşfine yönelik çalışmalar başlıca Northern Blot, gen ifadenmesi, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression, gen ifadenmesinin seri analizi), mikrodizin (mikroarray), proteomik ve metabolomik analiz teknolojileriyle gerçekleştirilmektedir. Hastalıkla ilgili yapılan bu moleküler çalışmaların sonuçları, hastalığın alt birimlerinin tanımlanması, hastaya güvenli bir biçimde tanı konulması ve tedavi sürecinin yönlendirilmesi gibi süreçlerde etkin bir rol oynamaktadır.

2.3.2. Gen İfadesi Profillemesi Çalışmaları

Gen ifadesi, genin fonksiyonel ürününe dönüşüm sürecine verilen genel bir tanımlamadır. Gen ifadesi profili (GEP) terimiye, hücresele fonksiyonların büyük resmini oluşturabilmek için binlerce genin aktivitesine (gen ifadesine) aynı anda bakmak anlamında kullanılmaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan teknolojilerin başında mikrodizin gelmektedir.

Mikrodizin teknolojisi çalışmalarında, amaç doğrultusunda cDNA (komplementer DNA) ve oligonükleotit olmak üzere iki tip mikrodizin platformu kullanılabilir. Yapılan deneylerin ardından, mikrodizin deneylerine ait sonuçlar yönlendirilmiş ve yönlendirilmemiş olmak üzere başlıca iki tür yaklaşımla analiz edilmektedir. Yönlendirilmemiş (unsupervised) yaklaşımda veriyi analiz ederken klinik parametreler, sağkalım süresi gibi dış parametreleri kullanmayan metotlar kullanılır (Alizadeh *et al.* 1999, Alizadeh *et al.* 2000). Yönlendirilmiş (supervised) yaklaşımda ise bunun tam tersi bir yaklaşım söz konusudur ve burada amaç ifadesi iç parametrelerle uyum gösteren genlerin tespitidir (Rosenwald *et al.* 2002).

2.3.3. DLBCL'de GEP Çalışmaları

Standart patolojik teknikler her bir hasta için güvenilir bir biçimde kemoterapi hassasiyetini veya sonuçlarını belirleyememektedir. Bu sebepten dolayı mikrodizin deney sonuçları kullanılarak yapılan global gen ifade analizleri DLBCL sınıflandırmasını, tanı ve tedavisini güçlendirmektedir. Gen ifade profillemesi çalışmalarının patogenezi ve klinik davranışta homojen bir yapı gösteren tümörlerin daha iyi bir biçimde sınıflandırılmasına olanak verebileceği düşünülmüştür.

Bu hipotezi test etmek amacıyla birçok merkezde ortak yürütülmüş olan bir çalışma başlatılmıştır (Shipp *et al.* 2002). Bu çalışmada özellikle lenfoid hücrelerle veya kanser biyolojisiyle ilişkisi olduğu gösterilmiş genler seçilerek oluşturulmuş, "Lymphochip" adında özel bir cDNA mikrodizini kullanılmıştır (Wright *et al.* 2003). Anthrasiklin temelli kemoterapi uygulanmış hastalardan alınmış 42 tümör örneğiyle yapılmış bu çalışmada,

yönlendirilmemiş hiyerarşik sınıflandırma yaklaşımıyla DLBCL iki farklı gruba ayrılmıştır. İfade modelleri GCB ve ABC karakteristikleri göstermektedir. GCB grubunun daha iyi sağkalım gösterdiği tespit edilmiştir (Eisen *et al.* 1998).

Lenfoma/Lösemi Moleküler Profillemesi Projesi Grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise anthrasiklin temelli kemoterapi görmüş DLBCL hastalarından alınmış 240 tümör örneği analiz edilmiştir. cDNA Lymphochip ve yönlendirilmemiş sınıflandırma metodolojileri gibi benzer metodolojiler kullanılmış ve belirlenmiş olan bu alt grupların varlığı doğrulanmıştır. Buna ek olarak, adına “Tip 3” denilen farklı bir grup tanımlanmıştır. DLBCL’de sıklıkla görülen *bcl-2* translokasyonunun *vec-rel* amplifikasyonunun sadece GC-DLBCL alt grubunda görüldüğü belirlenmiştir. Bu çalışmada kemoterapinin ardından sağkalımı tahmin etmek için 17 genin ifadesine dayanan bir model oluşturulmuş ve birbirinden bağımsız hasta toplulukları yardımıyla geçerliliği onaylanmıştır (Butte 2002).

Rosenwald *et al.*’ın (2002) gerçekleştirdiği çalışmaya ek olarak Shipp *et al.* (2002), 6817 genden oluşan Affymetrix oligonükleotid dizini kullanarak CHOP temelli kemoterapi uygulanmış 58 DLBCL hasta örneğinin gen ifadelerini araştırmışlar ve hastalık sonucunun tahminine yönelik bir model geliştirmeyi hedeflemişlerdir. IPI’den bağımsız olarak olarak 13 gen ile oluşturulan bu setin sağkalım tahmininde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Bea *et al.*’ın (2005) yaptığı çalışmada CGH tekniği kullanılmış ve herhangi bir tedavi görmemiş 224 DLBCL hastasının genetik değişimleri araştırılmıştır.

Hem oligonükleotid hem de Lymphochip DLBCL çalışmalarıyla oluşturulmaya çalışılan tahmin modellerine alternatif olarak Wright *et al.* (2003) farklı mikrodizin platformları aracılığıyla oluşturulan deney sonuçlarının yorumlanmasına olanak veren, yeni istatistiksel bir metot öne sürmüşlerdir. Bu metodu kullanarak Shipp *et al.* (2002) ile Rosenwald *et al.*’ın (2002) yayınlarından farklı olarak 14 geni kapsayan yeni bir tahmin modeli ortaya koymuşlardır.

Teknik olarak basit, rutin klinik uygulamada kullanıma uygun bir model bulma amacıyla yola çıkan Lossos *et al.* (2004), DLBCL’de sağkalımla ilgili olabilecek 36 genlik bir

panelin ifade düzeylerini değerlendirmiştir. Yapılan tek değişkenli mikrodizin veri analizi sonucu tahmin gücü en yüksek 6 gen belirlenmiş ve çok değişkenli bir analizde her birinin göreceli katkısını temel alan bir model geliştirilmiştir.

(Yapılan moleküler profillemeye çalışmalarından örneğin; Alizadeh *et al.*'in(2000) yapmış olduğu yayında yönlendirilmemiş yaklaşım kullanılmışken, Rosenwald'e (2002) ile Shipp'e (2002) ait yayınlarda ise yönlendirilmiş yaklaşımın kullanıldığı görülmektedir).

2.3.4. Lossos'un (Lossos *et al.* 2004) Yaptığı Meta Analiz ve Sonuçları

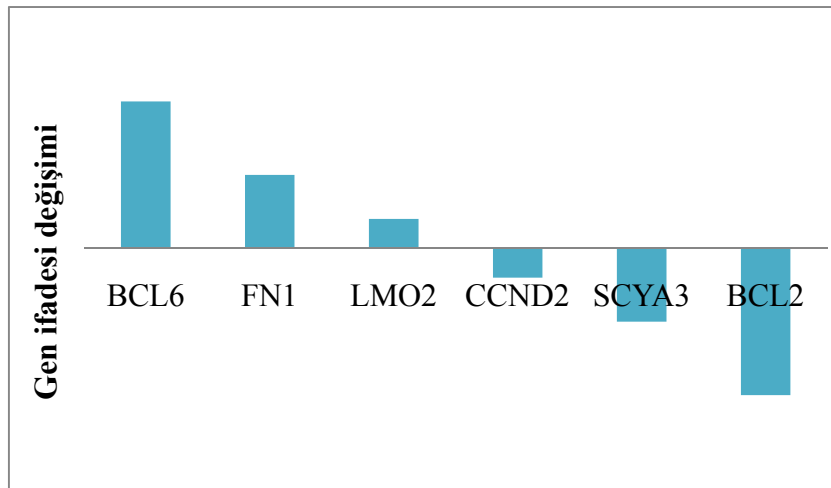
Lossos *et al.*, önceki yıllarda yapılan moleküler profillemeye çalışmalarını (Alizadeh *et al.* 2000, Rosenwald *et al.* 2002, Shipp *et al.* 2002) yeniden yorumlayarak 2004 yılında bir meta analiz yapmışlardır. Her üç çalışmanın sonucunda elde edilen, tahmin için kullanılması uygun gen panelleri içinde birbiriyle örtüşen çok az sayıda gen olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun teknik farklardan, kullanılan mikrodizinlerin kompozisyonlarından ve tahmin modeli oluşturmak için kullanılan farklı algoritmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak her tahmin modelinin her türlü durumda çalıştığı gösterilebilmesi için sadece o hastalığın kökenlendiği hasta grubunda değil de bağımsız bir hasta grubuyla da doğrulanması gerekmektedir (Ambroise ve McLachlan 2002, Simon *et al.* 2003). İşte bu ve benzeri sebeplerden ötürü hangi modelin DLBCL'in moleküler, histopatolojik ve klinik heterojenitesini tam olarak tanımlayabileceği henüz açıklık kazanamamıştır.

Mikrodizin deneylerinin klinik laboratuvarlarda henüz yaygın bir biçimde yapılmadığı göz önünde bulundurulduğunda, bu durum gen ifadesi tespiti için klinikte uygulanabilecek daha pratik yöntemlere ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir. Bu amaç doğrultusunda ekip, 66 DLBCL hastasında (Bu hastalar REAL sınıflandırma sistemine göre DLBCL tanısı konmuş (Harris *et al.* 1994), hepsi CHOP veya R-CHOP tedavisi almış, Ann Arbor lenfoma evrelendirme sistemine göre tümörü evrelendirilmiş hastalardır.) kantitatif eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) yöntemiyle, seçmiş oldukları 36 genin ifadesini belirlemişlerdir. Bunun ardından tek değişkenli mikrodizin veri analizi yapılmış, 36 genlik bu panelden

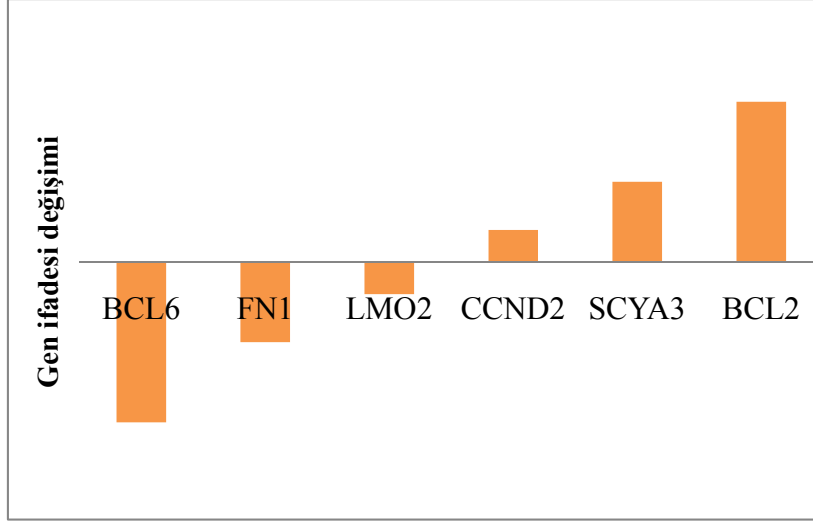
sağkalım tahminine yönelik 6 gen (*LMO2*, *BCL6*, *FN1*, *CCND2*, *SCYA3*, *BCL2*) belirlenmiş ve tahmine yönelik bir model (mortalite tahmin skoru) oluşturulmuştur:

$$\text{Mortalite Tahmin Skoru} = (-0.0273 \times LMO2) + (-0.2103 \times BCL6) + (-0.1878 \times FN1) + (0.0346 \times CCND2) + (0.1888 \times SCYA3) + (0.5527 \times BCL2)$$

Mortalite tahmin skoru formülünde gen isimlerinin olduğu yerlere her hasta için ilgili gendeki değişim miktarının log2 tabanındaki karşılığının yazılması gerekmektedir. Çıkan değer 0,063'den küçük ise hasta düşük ölüm riski grubuna, 0,063'den büyük 0,093'den küçük ise orta ölüm riski grubuna ve 0,093'den büyük ise yüksek ölüm riski grubuna dahil edilmektedir. Şekil 2.3. ve Şekil 2.4.'de uzun ve kısa süreli sağkalım için ifadesinde artış veya azalış beklenen genler belirtilmiştir:



Şekil 2.3. Uzun süreli sağkalım için beklenen gen ifade değişimleri



Şekil 2.4. Kısa süreli sağkalım için beklenen gen ifade değişimleri

Bu genlerden *LMO2*, *BCL6* ve *FN1* uzun süren sağkalım ile, *CCND2*, *SCYA3* ve *BCL2* ise kısa süreli sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Uzun süren sağkalım ile ilişkilendirilmiş *LMO2*, *BCL6* ve *FN1* genlerinin ifadelerindeki artış ve kısa süreli sağkalımla ilişkilendirilmiş *CCND2*, *SCYA3* ve *BCL2* genlerinin ifadelerindeki azalış, hastanın daha uzun yaşayacağı sonucuna götürmektedir.

Bu model, gen ifadesini ölçen metottan (örn: qRT-PCR, cDNA mikrodizinleri, oligonükleotit mikrodizinleri) bağımsız olarak tahmin değerinin olup olmadığının tespiti için, Shipp *et al.* (2002) ve Rosenwald *et al.*'a (2002) ait mikrodizin verilerine uygulanarak kontrol edilmiştir. Bu altı genin ifade düzeyleri qRT-PCR ile tespit edilmiş ve bu genlerin aktivasyon düzeylerinin IPI'dan bağımsız olarak klinik sonuçlarla korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Butte 2002, Ramaswamy ve Golub 2001).

Çalışmada kullanılan qRT-PCR, başlangıç miktarına göre oluşan son PCR ürününün özgün, hassas ve diğer metotlara göre daha kolay tespit edilebildiği ve gen ifadelenme oranlarının niceliksel olarak tayininin yapıldığı bir tekniktir. Bu yöntemde; her bir PCR döngüsünde oluşan flouresan ışınımı aracılığı ile son ürün miktarı eş zamanlı olarak tespit edilebilir (http://genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=2&tablo=tbl_yontemler).

qRT-PCR'da gen ifadelenme oranlarının ölçümü, göreceli ölçüm (relative quantification) ve mutlak ölçüm (absolute quantification) olmak üzere iki yöntemle yapılabilmektedir.

Mutlak ölçüm için başlangıçtaki DNA miktarının bilinmesi gerekmektedir. Böylelikle reaksiyon sonunda ortamdaki nükleik asit miktarının ne orvea arttığı net bir biçimde belirlenebilmektedir. Başlangıç DNA miktarının belirlenmesi, bu genlere ait kopya sayılarının bilinmesiyle mümkün olacağından, ifade profillerine bakılacak olan bu genlerin her biri, belirlenen uygun bir vektöre klonlanmalıdır.

2.3.5. Lossos'un (Lossos *et al.* 2004) Sağkalım Tahmininde Kullandığı Genler ve Özellikleri

Sağkalım tahminine yönelik oluşturulmuş mortalite tahmin skoru denkleminde ifade düzeyleri kullanılan altı gen *LMO2*, *BCL6*, *FNI*, *CCND2*, *SCYA3* ve *BCL2*'dir. Her bir genin işlevi ve lenfomayla ilişkisi açıklanmıştır:

2.3.5.1. *LMO2*

LMO2 (LIM domain only 2), eritropoezis ve anjiyogenezde önemli rol oynamaktadır (Waren *et al.* 1994, Yamada *et al.* 2000). *LMO2* geninin transkripsiyon başlama noktası, çocukluk T hücre akut lenfoblastik lösemisine spesifik translokasyonların olduğu 11p13 T hücre translokasyon kümesi bölgesinin yaklaşık olarak 25 kb aşağı bölgesinde (downstream) lokalizedir (Boehm *et al.* 1991). *LMO2* proteini hematopoetik gelişimde merkezi ve hayati bir rolü vardır ve yüksek oranda korunmuştur. Normal T lenfositlerinde ifade edilmez (Royer *et al.* 1991) ancak germinal merkez lenfositlerinde yüksek oranda ifadelenir (Alizadeh *et al.* 2000). *LMO2*'nin T hücreli lösemiye sebep olma kabiliyeti ve DLBCL'deki uzatılmış sağkalımla korelasyonu arasındaki ilişki henüz belirsizdir.

2.3.5.2. *BCL6*

BCL6 (B-cell lymphoma 6) geni transkripsiyonel bir repressörü kodlar (Chang *et al.* 1996, Kerckaert *et al.* 1993, Seyfert *et al.* 1996), normal B hücrelerinde ve CD4+ hücrelerde ifadelenir ve germinal merkez oluşumunda, T hücre bağımlı immün cevabı kontrol eder

(Cattoretti et al. 1995, Dent et al. 1998, Ye et al. 1997). Germinal merkezden köken alan Non-Hodgkin lenfomalarında ifadelenir Bu genin DLBCL’de sıklıkla translokasyona ve hipermutasyona uğradığı görülmüştür (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=604>). BCL6 ifadesinin hayatta kalımın tahmininde kullanıldığı bildirilmiştir (Lossos et al. 2001).

2.3.5.3. *FNI*

FNI (Fibronectin 1), hücre iskeleti organizasyonunu düzenleyen hücre adezyon reseptörlerinin integrin protein ailesi için ligand ve hücre dışı bir glikoproteindir. Hepatositler, stromal fibroblastlar ve bazı tümör hücreleri tarafından *FNI* hücre adezyonu ve embriyogenez, yara iyileşmesi, kan koagülasyonu metastaz ve migrasyon işlevlerinde görevlidir (Mosher 2001). *FNI*’in değişen ifadesi, yıkımı ve organizasyonu kanser ve fibrozisi içeren çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmiştir. *FNI*, DLBCL’de lenf nodunda ifadelenen genlerden biridir (Williams *et al.* 2008).

2.3.5.4. *CCND2*

CCND2 (Cyclin D2), üyeleri hücre döngüsü boyunca mevcut olan ve miktarlarındaki dikkat çekici dönemsellik tarafından karakterize edilen siklin ailesine ait bir proteini kodlar. *CCND2*, hücre döngüsünün G1 fazından S fazına ilerleyişini kontrol eder (Sherr 1995). *CCND2*’nin artmış ifadelenmesi kronik lenfositik lösemi ve mantle hücreli lenfomada görülmektedir (Delmer *et al.* 1995).

2.3.5.5. *SCYA3*

SCYA3 (*CCL3*, chemokine C-C motif ligand-3), inflamasyon bölgelerine çeşitli hücreleri görevlendiren bir CC kemokinidir. Kemokinler immunoregülasyon ve inflamator işlevlerinde yer alan salgılanmış bir protein ailesidir. Kemokinler özellikle lenfositleri

enfeksiyon ve hasar bölgelerine çeker. Bu genin B hücreli lenfomada fonksiyonu bilinmemektedir ancak yüksek oranda DLBCL'nin ABC alt tipinde ifadenmektedir. *CCND2* ve *SCYA3* genlerinin promotör bölgeleri *BCL6*'ya yüksek afiniteyle bağlanabilecek bölgeler içerir ve bu iki genin ifadesi *BCL6* tarafından baskılanır. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6349>)

2.3.5.6. *BCL2*

BCL2 (B-cell lymphoma 2) geni, lenfositler gibi bazı hücrelerin apoptotik ölümünü engelleyen integral bir dış mitokondriyal membran proteinini kodlar. *BCL2* proteini normal germinal merkez B hücrelerinde düşük seviyede bulunur ancak t(14;18) translokasyonu (*BCL2*'nin Ig ağır zincir lokusuna translokasyonu) olan bazı NHL'lerde (örnek, foliküler lenfoma) bu genin ifadesinin artmış olduğu görülmektedir (Alizadeh *et al.* 2000, Kramer *et al.* 1998) Bu translokasyonun *BCL2*'nin sürekli belirli bir oranda ifadenmesine sebep olduğu ve bunun da foliküler lenfomaya sebep olduğu düşünülmektedir. *BCL-2* ve *MYC* genlerinin ifadelerindeki eş zamanlı artışın lenfomayı da içeren agresif B hücresi malignansilerine sebep olduğu düşünülmektedir (Otake *et al.* 2007). *BCL2* apoptozisi önlemektedir ve bu proteinin artmış miktarı (immunohistokimyasal olarak tespit edilmiş) DLBCL hastalarında zayıf prognoz için bağımsız bir marker olarak işlev görmektedir (Gascoyne *et al.* 1997, Kramer *et al.* 1996, Hermine *et al.* 1996, Hill *et al.* 1996).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (Formalin Fixed Parafin Embedded, FFPE) DLBCL doku örnekleri kullanılmıştır. Her hasta örneğinden 5µm x 6 parafin kesit (Shandon Finesse 325 Manuel Mikrotom, Thermo, Katalog No: A77500016) alınmıştır. Bazı hastalara ait parafin doku örneklerinin bulunamaması sebebiyle çalışmada bu hastalara ait sitolojik yaymalardan yararlanılmıştır.

Çalışma için, Ankara Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'nun izni ve onayı alınmıştır.

3.1.Yöntem

Uluslar arası Atom Enerjisi (IAEA) kurumunun desteklediği, E1.50.20 kodlu, 11 ülkenin işbirliği ile gerçekleşen bu projede kullanılan tüm yöntemlere, reaktif ve malzemelere, taraf ülkelerin gerçekleştirdiği toplantılarda ortak olarak karar andrılmış ve bu kararlara uygun olarak kullanılmıştır.

3.2.1. Parafine Gömülü Dokudan RNA İzolasyonu

FFPE örneklerden, hem manual yöntem hem de kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş. Bu amaçla Qiagen RNeasy FFPE Kit (50) (Katalog No: 74404) kullanılmıştır. Ancak gerçekleştirilmiş olan optimizasyon çalışmalarında en iyi sonucun kit protokolüne ilave edilen ek aşamalarla elde edildiği tespit edilmiş ve çalışma boyunca tüm RNA izolasyonları aşağıdaki, yeniden düzenlenmiş protokol esas alınarak gerçekleştirilmiştir:

- 1) Total RNA izolasyonu için 5 µm'lik FFPE kesitler RNaz'dan arındırılmış 2.0ml'lik tüpe alınır, 1.5 ml ksilen eklenir. Kısa bir süre vortekslenir (IKA, MS2 Minishaker).

- 2) 37°C'de, 20 dk inkübasyon (BINDER inkübatör, Katalog No: BD115) gerçekleştirilir.
- 3) İnkübasyonun ardından 8.000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilir (Thermo, Microlite RF, No:220/240). Çökme gerçekleşene kadar bu işleme devam edilir.
- 4) İlk üç basamak tekrar edilir.
- 5) 1.5 ml %100 EtOH (Merck K37727427) eklenir ve kısa bir vortekslenir.
- 6) Bu işlemin ardından, 37°C, 30 dk inkübe edilir.
- 7) Gerçekleştirilen spinin ardından alkol uzaklaştırılır, 5. ve 6. adım tekrarlanır.
- 8) Alkol uzaklaştırılır ve pelletin oda ısısında 5-10 dk kuruması beklenir.
- 9) Kuruyan pellete 240 µl PKD tamponu (Qiagen Mat.No: 1034963) ve 10 µl Proteinaz K (Qiagen Mat.No: 1014023) eklenir, iyice vortekslenir.
- 10) 55°C'de 15 dk, ardından 80°C'de 15 dk ısı bloğunda (Techne, FDB02DD) bekletilir.
- 11) 500 µl RBC tamponu (Qiagen Mat.No: 1034958) eklenir.
- 12) Lizat iyice karıştırılır ve gDNA eliminatör spin kolona aktarılır. 30 sn, 13.000 rpm'de santrifüj edilir.
- 13) Kolon atılır, protokole alttaki sıvı ile devam edilir.
- 14) 1200 µl %100 EtOH eklenir ve iyice pipetaj yapılır. Santrifüj edilmez.
- 15) 700 µl örnek, +4°C'deki RNeasy Minelute spin kolona eklenir.15 sn, 13.000 rpm'de santrifüj edilir. Alttaki sıvı atık kabına boşaltılır ve kolon aynı toplama tüpüne konulur.
- 16) Bir üstteki adım, kalan örnek bitene kadar tekrarlanır. İşleme aynı toplama tüpü ile devam edilir.
- 17) 500 µl RPE tamponu (Qiagen Mat.No: 1017974) kolona eklenir. 15 sn, 13.000 rpm'de santrifüj edilir (membran yıkanır). Sıvı atık kabına boşaltılır. Aynı toplama tüpü ile devam edilir.
- 18) 500 µl RPE tamponu (yıkama tamponu) kolona eklenir. 2 dk, 13.000 rpm'de santrifüj edilir.
- 19) Kolon yeni 2 ml'lik toplama tüpüne konulur. Kolonun kapağı açılır. En yüksek hızda 5 dk santrifüj edilir (membran kuruyana kadar devam edilir).
- 20) Kolon 1.5 ml'lik tüpe konulur. 14-30 µl (20 µl) RNaz'dan arındırılmış dH₂O (Qiagen Mat.No: 1017979), doğrudan kolona eklenir ve en yüksek hızda 1 dk santrifüj edilir.

3.2.2. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi

Elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. RNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınmaktadır. 260 nm DNA'nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyunu ifade etmektedir. A260/A280 oranının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Fenol, protein veya benzeri diğer safsızlıkların olması durumunda bu oranlar belirtilen aralığın dışında çıkmaktadır.

3.2.3. RNA Konsantrasyonlarının Ayarlanması

Nanodrop aracılığıyla konsantrasyonları belirlenen RNA örnekleri, cDNA sentezinde kullanılmak üzere son hacimde 1 µg RNA olacak şekilde tüplere bölünmüş ve -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.4. cDNA Sentezi

İzolasyon sonrası elde edilen RNA molekülü tek zincirli yapısı sebebiyle kırılındır, kolay degrade olabilir. Sonraki aşamalarda yapılacak işlemler içinse dayanıklı, sağlam bir moleküle ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaç doğrultusunda yapılan işlem bu RNA molekülünden, ters transkriptaz (Reverse Transcriptase, RT) enzimiyle DNA kopyasının sentezi işlemi yani komplementer DNA (complementary DNA, cDNA) sentezidir. cDNA sentezinde aşağıda protokolü verilmiş olan Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Katalog No: 4368813) kullanılmıştır:

- 1) Kit reaktiflerinin buz üzerinde erimesi sağlanır.
- 2) Çizelge 3.1.'de miktarları verilen reaktifler karıştırılır.

Çizelge 3.1. cDNA sentezi için gerekli reaktif miktarları

10xRT tamponu	2 µl
dNTP karışımı	0,8 µl
Randomize primerler	2 µl
Transkriptaz	1 µl
Nükleazdan arındırılmış dH₂O	4,2 µl
Toplam Hacim	10 µl

- 3) Hazırlanan karışım buz üzerinde tutulur ve nazikçe karıştırılır.
- 4) Karışım her tüpte 10 µl olacak biçimde dağıtılır.
- 5) 10 µl RNA örnekleri karışıma eklenir, pipetaj ve sonrasında spin yapılır.
(Başlangıç RNA miktarının 1 µg olması gerekmektedir. Örnek konsantrasyonuna uygun RNA eklendikten sonra 10 µl'ye dH₂O ile tamamlanır.)
- 6) Örnekler termal döngü cihazına (MJ Research, Tetrad 2) yerleştirilir. Tablo 3.2.'de belirtilen program uygulanır.

Çizelge 3.2. cDNA sentezi için termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre
25	10 dk
37	120 dk
85	5 sn
10	∞

- 7) Elde edilen cDNA, -20°C'de saklanır.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR)

PCR, yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak, bir termal döngü cihazı yardımıyla DNA'nın in vitro olarak çoğaltılması işlemidir. Bu yöntem günümüzde moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır.

3.2.5.1. Primer Çiftlerinin Tasarlanması

Yürütülen proje, dokuz ülkede eş zamanlı olarak yürütüldüğü için ifade profiline bakılacak altı gene (*LMO2*, *BCL6*, *FNI*, *BCL2*, *CCND2* ve *SCYA3*) özgün primerlerin tasarlanması ortak bir komisyon tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu primerler esas olarak qRT-PCR işlemlerinde kullanılacağı için primer tasarımında dikkat edilen en önemli husus ileri ve ters primerlerinin genin farklı ekzonlarında olacak biçimde tasarlanmış olmasıdır. Bu sayede, mRNA senteziyle intronlarından arınmış olan genin amplifikasyonu esnasında ortamda DNA kontaminasyonunun olup olmadığı kontrol edilebilmektedir. Çizelge 3.3.'de qRT-PCR'da kullanılan primerlere ait diziler mevcuttur:

Çizelge 3.3. qRT-PCR’da kullanılan primerler

Gen	Primer Dizisi	Ürün Boyu
<i>BCL2</i>	F: ACCTGCACACCTGGATCCA	95 bç
	R: ACAGCCAGGAGAAATCAAACAGA	
<i>BCL6</i>	F: GCGAATCCACACAGGAGAGAA	62 bç
	R: TTGTGACGGAAATGCAGGTTAC	
<i>CCND2</i>	F: CCCTACATGCGCAGAATGGT	71 bç
	R: GACCTCTTCTTCGCACTTCTGTTC	
<i>FNI</i>	F: CTATGGCCGTGGCATTGG	111 bç
	R: GTGGGAGTTGGGCTGACT	
<i>LMO2</i>	F: CAAACTGGGCCGGAAGCT	67 bç
	R: ATGCGCAGAGACCGTCTTG	
<i>SCYA3</i>	F: ATGGCTCTCTGCAACCAGTTCT	52 bç
	R: GCGGTCGGCGTGTC	
<i>PGK1</i>	F: GGGAAAAGATGCTTCTGGGAA	72 bç
	R: TTGGAAAGTGAAGCTCGGAAA	

3.2.5.2. Primer Optimizasyonu

Primer çiftlerinin en etkin çalıştıkları bağlanma sıcaklıklarını bulmak için primerler 50°C-65°C sıcaklık aralığında denenmiştir. Bu reaksiyonlarda hasta örneklerine ait cDNA’lar kullanılmıştır. Çizelge 3.4.’de miktarları belirtilen reaktifler ve Çizelge 3.5.’deki termal döngü koşulları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR protokolü

Reaktif	Miktar (µl)
10X Taq tamponu (Fermentas)	2,5
MgCl ₂ (Fermentas, 25 mM)	1,5
dNTP (Fermentas, 10 mM)	0,5
F Primer (10 pmol/µl)	0,5
R Primer (10 pmol/µl)	0,5
Taq DNA polimeraz (5u/µl)	0,2
dH ₂ O	17,3
cDNA	2,0
Toplam Hacim	25

Çizelge 3.5. PCR optimizasyonu termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95	5 dk	1
95	30 sn	
Değişken*	30 sn	45
72	30 sn	
72	5 dk	1
10	∞	1

(*50°C, 55°C,58°C,60°C,62°C ve 65°C)

dNTP Karışımı Hazırlanması

dATP (Fermentas R0145), dGTP (Fermentas R0165), dCTP (Fermentas R0155) ve dTTP(Fermentas R0175) stoklarının (100mM) her birinden 100 µl alınarak 600 µl dH₂O ile son hacim 1000 µl olacak şekilde tamamlanmış ve 10 mM, 1000 µl dNTP karışımı elde edilmiştir.

3.2.5.3. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

3.2.5.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

3.2.5.3.1.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

1) 5x TBE (Tris-HCl, Borik asit, EDTA)

54 gr Trisma Base (Amresco, 0826), 27,5 gr Borik asit (Amresco, 0588) ve 20 ml 0,5 M EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (Sigma E5134) 1000ml'ye dH₂O ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

2) Ethidium Bromide, EtBr (10 mg/ml)

EtBr (Scharlau ET0109), son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde sulandırılarak hazırlanmıştır.

3) DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, SM0321)

100 µl DNA ladder, 166 µl 6x Loading Dye (yükleme boyası) (Fermentas 0611) ve 734 µl dH₂O ilavesi sonrasında vortekslenmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Agaroz jel

elektroforezinde bilinmeyen ürünlerin boyutunun tahmini için referans olarak kullanılmıştır.

4) %2'lik Agaroz Jel

3.2.5.3.1.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

Jel hazırlığı için öncelikle 2 gr/100 ml (olacak şekilde hassas terazide (Shimadzu BX320H) agaroz (Peqlab, peqGOLD Universal Agarose) tartılır. Ana stokta 5X olarak hazırlanmış, dH₂O ilavesiyle 1X olacak biçimde seyreltilmiş olan TBE, 2 gr agarozla son hacim 100 ml olacak biçimde ilave edilir. Hazırlanan bu karışımın mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) çözünmesi sağlanır. Çözelti hazırlandıktan sonra bir süre soğuması beklenir, ardından çeker ocak altında içine 5 µl EtBr eklenir. İyiye karıştırılmasının ardından çözelti, donması için jel tablasına dökülerek 25-30 dk bekletilir.

3.2.5.3.1.3. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Görüntülenmesi

Kullanıma hazır hale gelmiş olan %2'lik jel, içinde 1x TBE bulunan agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilir. PCR ürünleri, 5 µl PCR ürünü, 5 µlyüklemeye boyası ile karıştırılarak mikropipet (FINNPIPETTE, 3-30 µl) yardımıyla jele yüklenir ve jel 120 voltta ~30 dk yürütülür. Ardından jel görüntüleme sisteminde (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak UV altında görüntülenir.

3.2.5.4. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR)

Genlere özgü tasarlanmış primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının tespitinin ardından sıra nükleik asit miktarı belirlenmesi aşamasına gelmiştir. İfade oranlarındaki değişimin kopya sayısı düzeyinde hesaplanabilmesi için mutlak ölçüm yapılmalı bunun için de başlangıçtaki DNA miktarının bilinmesi gerekmektedir. Başlangıç DNA miktarının

belirlenmesi, standart eğri oluşturulabilmesi için ifade profillerine bakılacak olan bu genlerin her biri, belirlenen uygun bir vektöre klonlanmışlardır.

3.2.5.4.1. Hedef Genlerin Klonlanması

Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması işlemine “gen klonlaması” adı verilmektedir. Hedef genlerin klonlanmalarıyla ilgili çalışmalar proje ortaklarından Paris’de INSERM, Saint-Louis Hastanesi, Hematoloji Enstitüsü’nde, Dr. Rose Ann Padua’nın laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, klonlama çalışmaları için özgün olarak tasarlanmış primerlerin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve her primer çifti için optimum bağlanma sıcaklığı tespit edilmiştir. Çizelge 3.6.’da bu primerlere ait dizi bilgisi ve ürün boyları mevcuttur:

Çizelge 3.6. Klonlama için kullanılan primerlere ait diziler ve ürün boyları

Gen	Primer Dizisi	Ürün Boyu
<i>BCL2</i>	F: CGGTGGGGTCATGTGTGTGGA	280 bç
	R: GGGGCAGGCATGTTGACTTCACT	
<i>BCL6</i>	F: GCCCTACAAATGCGAAACCTGC	362 bç
	R: TGAGAAGGGGCTGGAGACGAAA	
<i>CCND2</i>	F: CCTTCCGCAGTGCTCCTACTTCAA	271 bç
	R: GGTGTAAATGCACAGCTTCTCCGC	
<i>FNI</i>	F: GCTTCGGTCAGGGTCGGGG	285 bç
	R: TGGAAATGTGAGATGGCTGTGGTG	
<i>LMO2</i>	F: CCCCCATCCCTGCTGACA	273 bç
	R: TGACAATGCGGGTGAAAGACAAAGT	
<i>SCYA3</i>	F: GCCCACATTCCGTCACCTGCT	309 bç
	R: CCTCAGGCACTCAGCTCCAGGT	

Primerlerin optimize edilmesinin ardından elde edilen taze PCR ürünleriyle klonlama reaksiyonlarına geçilmiştir. Bu amaç doğrultusunda klonlamanın yapılacağı hücre tipi olarak One Shot TOP10 Chemically E. coli (Katalog No: 44-0301) hücreleri kullanılmıştır. Hedef genlerin klonlanması, aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir:

- 1) Klonlama reaksiyonu karışımı :

Taze PCR ürünü	→ 4 µl
Tuz solüsyonu	→ 1 µl
TOPO vektör	→ 1 µl

- 2) Elde edilen klonlama reaksiyonu karışımı nazikçe karıştırılır ve 30 dk oda ısısında bekletilir.
- 3) Reaksiyon karışımından kompetan (geçirgenleştirilmiş) E.coli hücrelerine 2 µl eklenir ve nazikçe karıştırılır.
- 4) Hücreler sarsmadan 42°C'de 30 sn ani ısı şokuna maruz bırakılır.
- 5) Tüpler ısı şokunun ardından hemen buz üzerine alınır.
- 6) Bu karışımın üzerine 250 µl S.O.C (super optimal broth with catabolite repression) medium (besince zengin bakteri büyüme besiyeri) eklenir.
- 7) Tüpün kapağı sıkıca kapatılır ve yatay olarak 37°C'de, 200 rpm'de 1 saat çalkalanır.
- 8) Bu inkübasyonun ardından karışım X-gal eklenmiş seçici besiyerine (LB (Luria-Bertani) ampisilin, Invitrogen Immedia AmpAgar, Katalog No: Q601-20) 20 µl ve 100 µl olmak üzere iki farklı konsantrasyonda yayılarak transforme edilir.

3.2.5.4.2. Beyaz Kolonilerin Seçimi, Transforme Edilmiş Hedef DNA'nın Kontrolü

Elde edilen beyaz kolonilerden 10-12 tanesi başka bir petriye büyütülmek üzere alınmıştır. İstenilen DNA parçasının (hedef genlere ait DNA dizileri) vektöre eklenip eklenmediğinin kontrolü için, bu kolonilerin her biri için aşağıda verilen koşullarda PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir:

Çizelge 3.7. Koloni kontrol PCR'ı reaksiyon koşulları

Ready Mix*	5 µl
dH₂O	4 µl
Primer F	0.5 µl
Primer R	0.5 µl
Toplam	10 µl

*Ready Mix (Sigma RedTaq Reaction Mix, Katalog No: R2523)

Oluşan PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve istenilen hedef ürün boyutunda ürün oluşumuna bakılmış (Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.), doğru yerde bant verdiği düşünülen koloniler 5 ml LB besiyeri ve 5 µl ampisilin varlığında, gece boyu 200 rpm'de çalkalanarak büyütülmüş ve bu kültürlerden aşağıdaki protokol doğrultusunda plazmit DNA (pDNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Plasmid DNA İzolasyonu Protokolü (QIAprep Spin Miniprep Kit, Katalog No: 27106)

Hazırlanan ve gece boyu inkübasyonu gerçekleştirilen kültür, santrifüj edilir, süpernatant atılır ve hücre pelleti oluşması sağlanır.

- 1) Pellet haline gelmiş bakteriyel hücreler 250 µl P1 tamponu ile süspanse edilir ve mikrosantrifüj tüpüne alınır.
- 2) 250 µl P2 tamponu eklenir ve tüp 4-5 defa ters yüz edilerek karıştırılır.
- 3) 350 µl N3 tamponu eklenir ve hızlı ve seri bir biçimde 4-5 defa ters yüz edilerek karıştırılır.
- 4) 10 dk, 13.000 rpm'de santrifüj edilir.
- 5) 4. basamakta oluşan süpernatant QIAprep spin kolona aktarılır.
- 6) 30-60 sn santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- 7) QIAprep spin kolona 750 µl PE tamponu eklenerek yıkanır ve 30-60 sn santrifüj edilir.
- 8) Süpernatant atılır ve 1 dk'lık ek bir santrifüj daha yapılır.
- 9) QIAprep kolon 1.5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
- 10) DNA'yı kolondan ayırmak için, kolon içindeki membranın tam ortasına 50 µl EB tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) veya dH₂O eklenir ve 1 dk maksimum hızda santrifüj edilir.

İzolasyon sonrasında elde edilen DNA'lar spektrofotometre aracılığıyla ölçülmüş, Padua Lab'ın ortak olarak çalıştığı dizileme merkezinin istediği oranlarda hazırlanarak (600ng/µl, toplam hacim 15 µl) gönderilmiş ve gelen dizi analizi sonuçları, *BCL6* ve *CCND2* genlerinin başarıyla klonlandığını göstermiştir.

Bu doğrulamanın ardından, hedef DNA parçasını taşıyan kolonilerden plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve qRT-PCR deneylerinde bu plazmidleri kullanıp dilüsyon yaparak standart eğri (standard curve) oluşturabilmeleri için bu proje kapsamında ortak olarak çalışan 8 ülkeye gönderilmiştir.

BCL6 ve *CCND2* genlerinin klonlandığı plazmit DNA'ları (pDNA) kullanılarak 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} oranlarında seri dilüsyonlar hazırlanmış, bu pDNA'lar kullanılarak qRT-PCR kurulmuş ve elde edilen amplifikasyon değerleriyle bir standart eğri oluşturulmuştur. Oluşturulan bu standart eğrinin eğimi, amplifikasyonun verimini vermekte ve bu değer kullanılarak hedef genlerin ifade oranlarındaki değişimler hesaplanabilmektedir.

3.2.5.4.3. qRT-PCR Kurulumu

DLBCL hasta örnekleri cDNA'ları ile aşağıdaki protokole uygun olarak, Power SYBR® Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems, Katalog No: 4367659) protokolü kullanılarak qRT-PCR deneyleri yapılmıştır:

- 1) Deneyde kullanılacak reaktiflerin buz üzerinde çözünmesi beklenir.
- 2) Çizelge 3.8. doğrultusunda reaksiyon karışımı hazırlanır.

Çizelge 3.8. qRT-PCR reaksiyon koşulları

POWER SYBR Green Master Mix	5 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
dH₂O	2 µl
Toplam	8 µl

- 3) Hazırlanan reaksiyon karışım (örnek sayısı x birim reaksiyon karışımı) qRT-PCR plakasındaki (LightCycler®480 Multiwell Plate 384, white, Katalog No: 04729749001) her bir kuyucukta 8 µl olacak biçimde dağıtılır.
- 4) Kuyulardaki reaksiyon karışımlarının her birine 2 µl örnek cDNA'sı eklenir ve böylelikle son hacim 10 µl'ye tamamlanır.
- 5) Reaksiyon kurulumunun ardından plaka, şeffaf, yapışkan bir örtücü (LightCycler®480 Sealing Foil, Katalog No: 04729757001) yardımıyla plakanın üzeri kapatılır.
- 6) Plaka, LightCycler®480 Real-Time PCR System cihazına yerleştirilir.
- 7) Cihaz Çizelge 3.9.'da belirtilen termal döngü koşullarına uygun biçimde ayarlanmıştır:

Çizelge 3.9. qRT-PCR termal döngü koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	10 dk	1
	95	15 sn	
Amplifikasyon	Değişken*	30 sn	45
	72	30 sn	
Erime Eğrisi	95	10 sn	1
	65	1 dk	
	95	∞	
Soğuma	40	1 dk	1

*Amplifikasyon basamağındaki değişken sıcaklık her primer çiftine göre farklılık göstermektedir.

- 8) Deney protokolünün sonlanması ardından sonuçlar cihazın yazılımında bulunan programlar doğrultusunda analiz edilir.

Çizelge 3.3.'de dizi bilgileri verilmiş olan bu primerlerin, yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.10.'da mevcuttur:

Çizelge 3.10. qRT-PCR'da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları

Gen	Optimum Sıcaklık (°C)
<i>BCL6</i>	58
<i>CCND2</i>	58
<i>FNI</i>	55
<i>LMO2</i>	55
<i>SCYA3</i>	55
<i>PGK1</i>	55
<i>BCL2</i>	62

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. RNA İzolasyonu Sonuçları

Çalışmada kullanılmış olan hastalara ait tüm tümör doku örnekleri, parafine gömülü ve 5µm'lik kesitler biçiminde, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD'dan temin edilmiştir. Tüm örneklerden parafine gömülü dokudan RNA izolasyonu protokolü kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir. Bu RNA'ların A260/A280 değerlerine sonraki aşamalarda yapılacak nicel ölçümler sebebiyle özellikle dikkat edilmiş, izole edilen RNA örneklerinde herhangi bir safsızlığın olmamasına özen gösterilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için yapılmış olan Nanodrop ölçümleri Çizelge 4.1.'de mevcuttur:

Çizelge 4.1. Örneklerle ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Hasta No	ng/µl	A260/A280
1	1953.76	1.98
2	1453.13	2.07
3	1532.27	2.09
4	1029.54	2.08
5	395.43	2.12
6	1590.10	2.05
7	509.36	2.15
8	175.12	1.94
9	699.02	2.01
10	225.70	1.94
11	122.31	2.02
12	3307.04	1.97
NLN*	371.31	2.07

*Normal lenf nodu örneklerinden havuz oluşturularak elde edilmiş RNA örneği

4.2. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları

Çalışmanın nihai hedefi örneklerdeki hedef gen ifade değişikliklerinin tespiti olduğu için, başlangıçtaki transkript sayısının eşit olması büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerin her biri, başlangıç RNA miktarı 1 µg olacak biçimde ayarlanmıştır ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten izolasyon sonucu elde edilen RNA ana stoğundan cDNA sentezi için ne kadar alınması gerektiği Çizelge 4.2.'de mevcuttur.

Çizelge 4.2. 1 µg RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Hasta No	Stok RNA konsantrasyonu (ng/µl)	Alınması gereken RNA miktarı (µl)
1	1953.76	0.51
2	1453.13	0.69
3	1532.27	0.65
4	1029.54	0.97
5	395.43	2.53
6	1590.10	0.63
7	509.36	1.96
8	175.12	5.71
9	699.02	1.43
10	225.70	4.43
11	122.31	8.18
12	3307.04	0.30
NLN*		

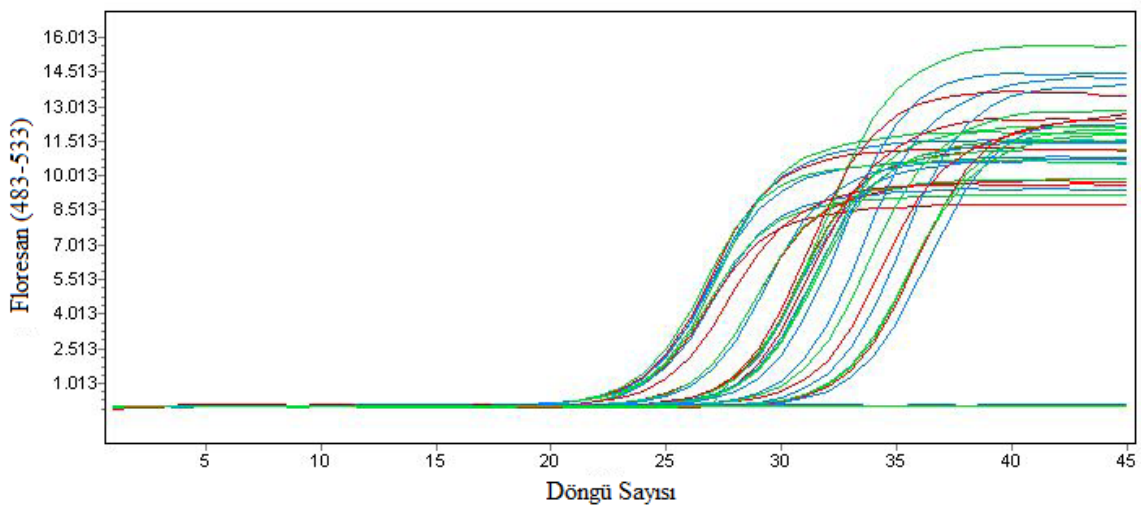
*Normal lenf nodu örneklerinden havuz oluşturularak elde edilmiş RNA örneği

4.3. qRT-PCR Analiz Sonuçları

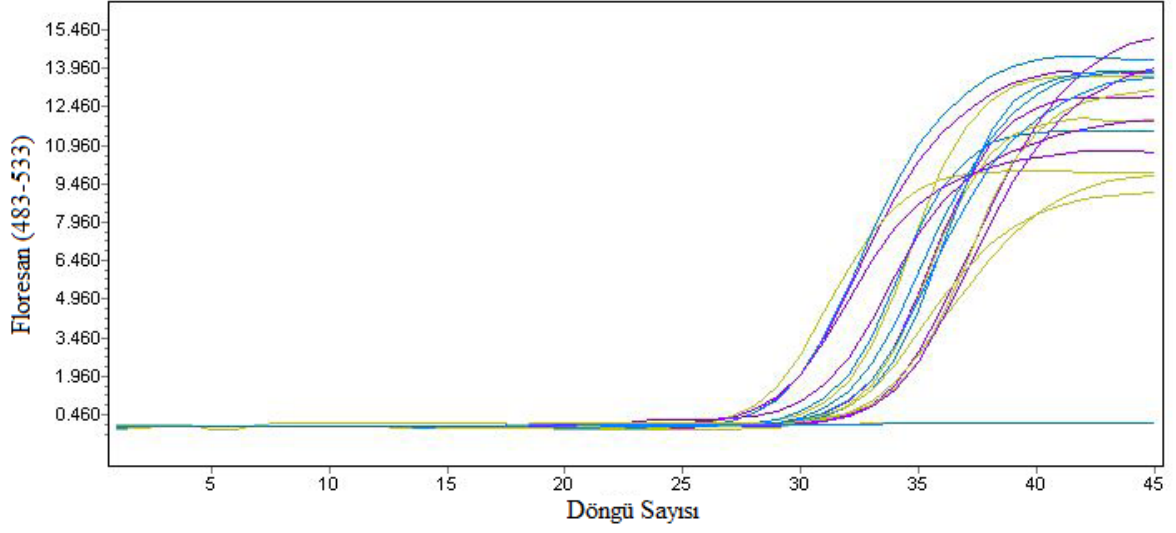
Her bir hedef gen için (*LMO2*, *BCL6*, *FNI*, *CCND2*, *SCYA3* ve *BCL2*) tasarlanmış primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının saptanması amacıyla yapılan optimizasyon PCR'larının ardından elde edilen örnek cDNA'ları ile qRT-PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Amplifikasyon Eğrileri ve Ortalama Cp Değerleri

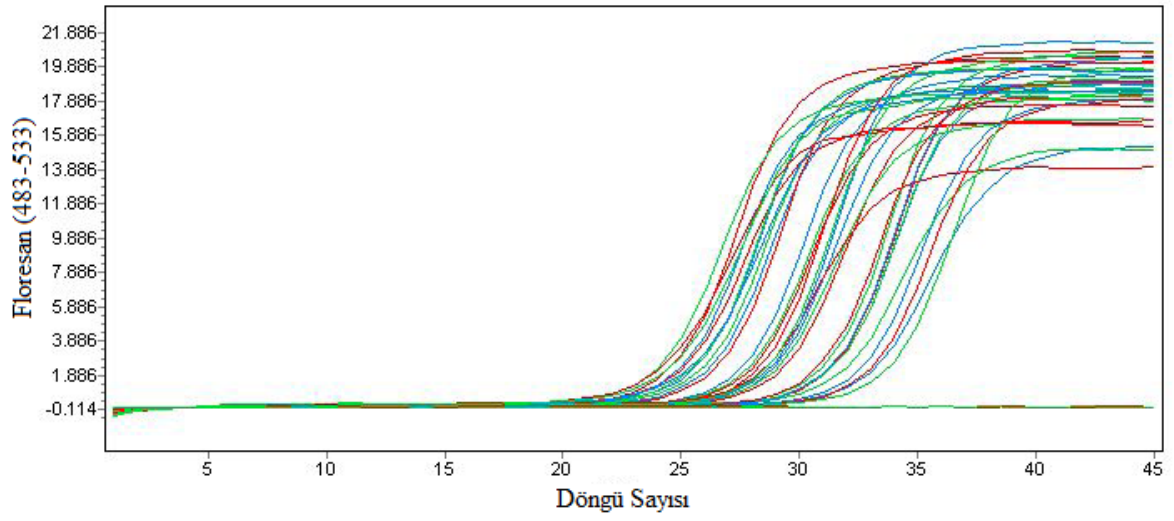
Gerçekleştirilmiş olan her qRT-PCR deneyinin sonunda, hedef gene özgü primerlerin örnek cDNA'sı üzerinde uygun bölgelere bağlanması ve bu transkriptin logaritmik olarak artışını gösteren amplifikasyon eğrisi grafikleri oluşmaktadır. Oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green I daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır. Bu floresan ışımaların eşik değerini geçtiği döngü sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir. Şekil 4.1.'de *PGKI*'e, Şekil 4.2.'de *LMO2*'ya, Şekil 4.3.'de *BCL6*'ya, Şekil 4.4.'de *FNI*'e, Şekil 4.5.'de *CCND2*'ye, Şekil 4.6.'da *SCYA3*'e ve Şekil 4.7.'de *BCL2*'ye ait amplifikasyon eğrisi grafikleri görülmektedir:



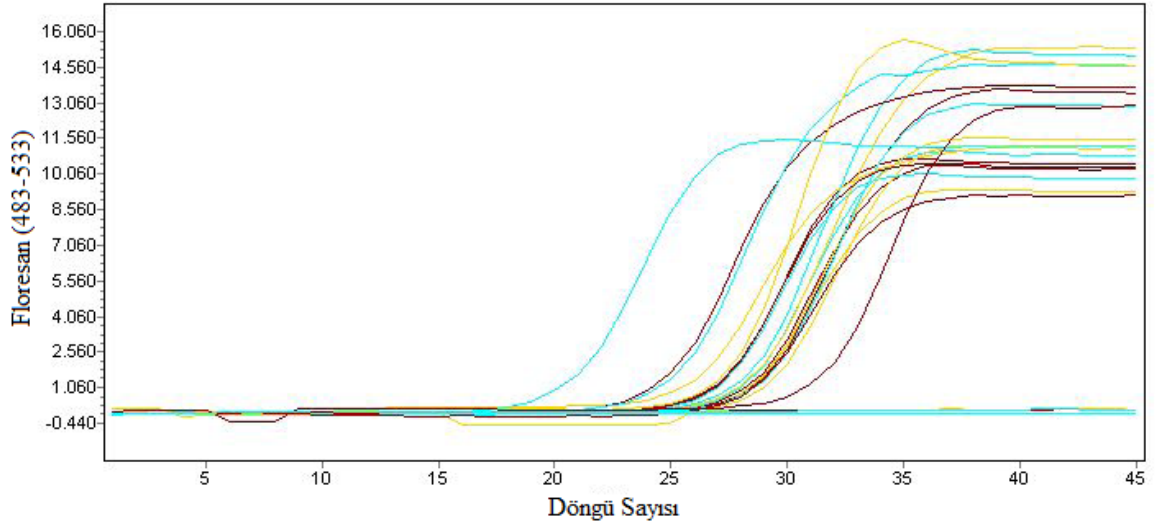
Şekil 4.1. *PGKI* amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)



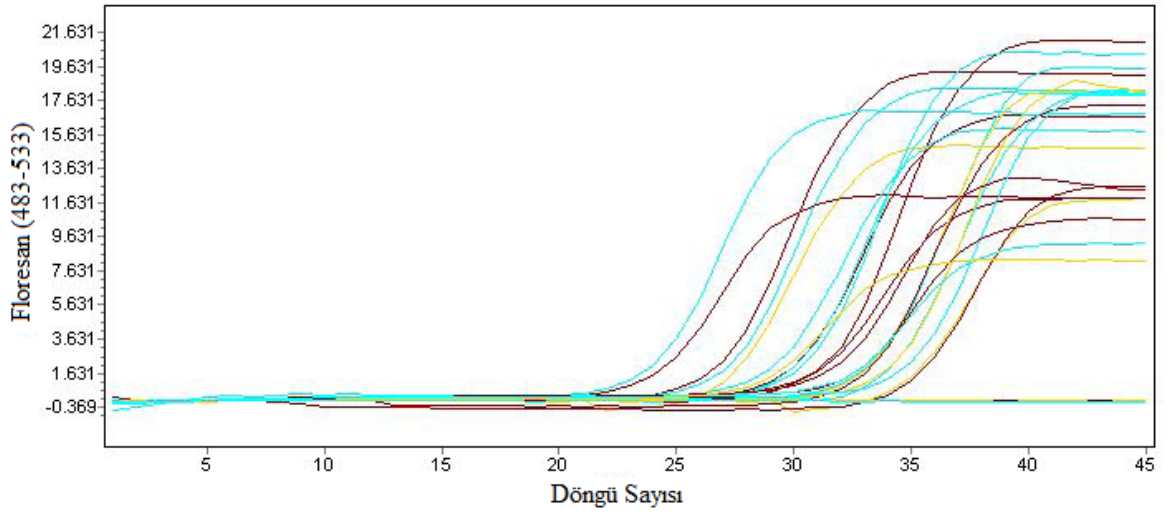
Şekil 4.2. *LMO2* geninin amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)



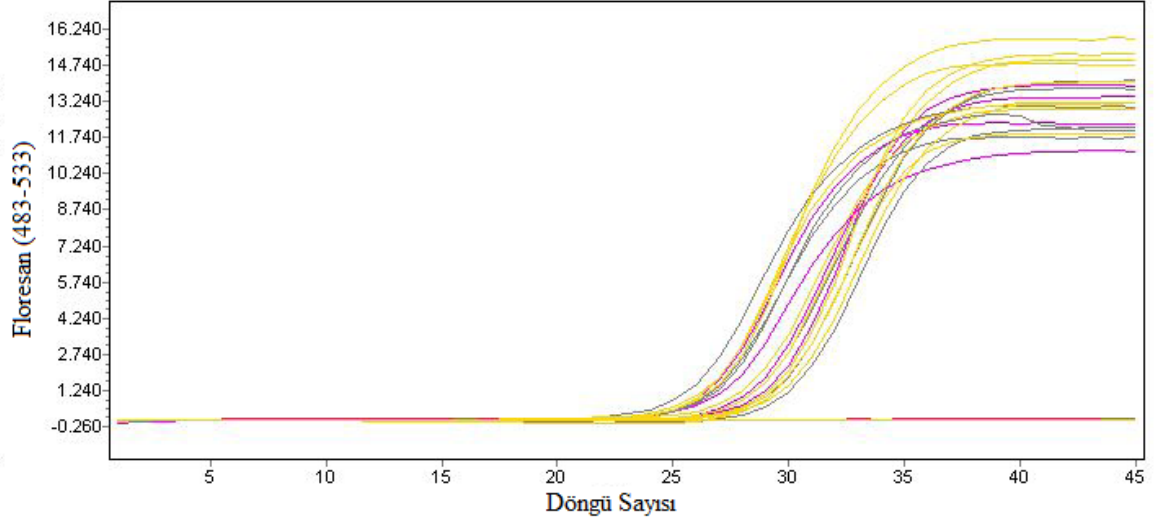
Şekil 4.3. *BCL6* amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 58°C)



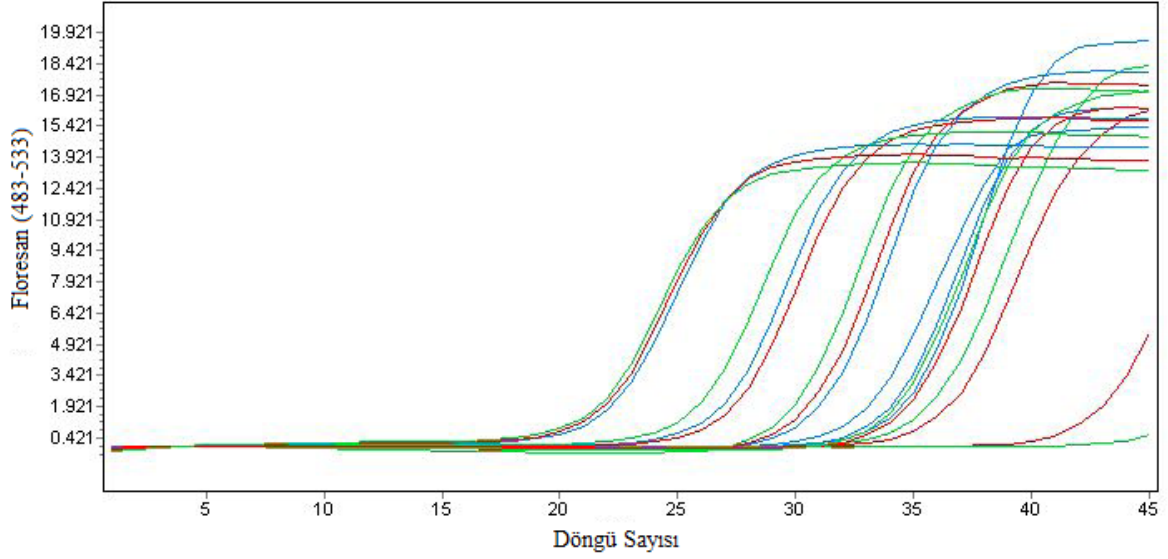
Şekil 4.4. *FNI* amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)



Şekil 4.5. *CCND2* amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 58°C)



Şekil 4.6. *SCYA3* amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)



Şekil 4.7. *BCL2* amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)

Her bir hedef gen için, 12 örnekve kontrol doku örneği olarak 6 farklı normal lenf nodu örnek RNA'sı karıştırılarak havuz elde edilmiş normal lenf nodu (NLN) örneği, olası teknik hataları bertaraf etmek için üçlü (her örnek için 3 ayrı reaksiyon) olarak çalışılmıştır.

qRT-PCR reaksiyonları sonuçlarının analiz edilmesiyle her örnek için üç adet Cp değeri oluşmuştur. Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplandığı analizlerde, bu üç Cp değerinin ortalaması kullanılmıştır. Çizelge 4.3.'de her bir hedef gen ve her bir örnek için hesaplanmış ortalama Cp değerleri mevcuttur:

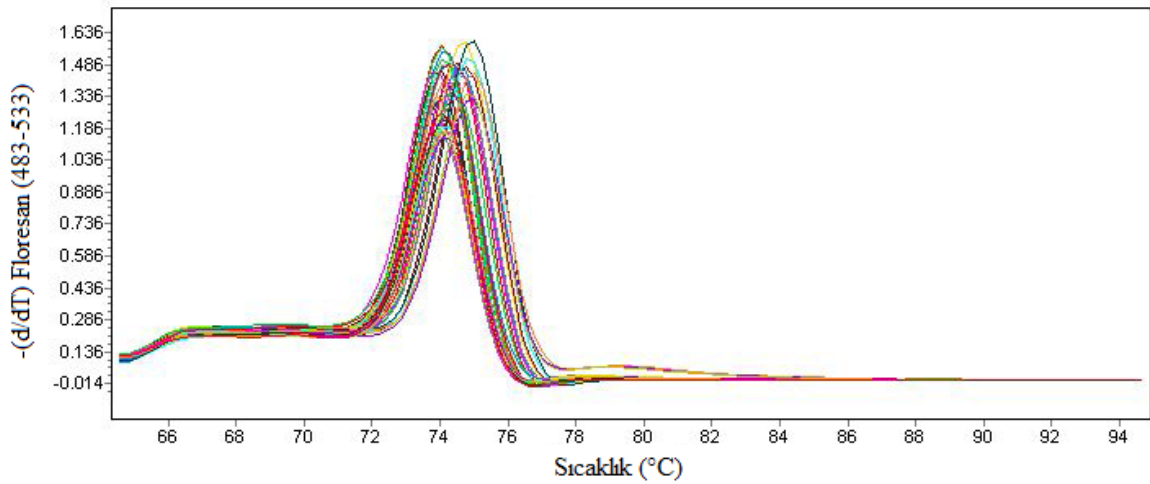
Çizelge 4.3. Örneklerin ortalama Cp değerleri

Hasta No	Ortalama Cp Değerleri						
	PGK1	LMO2	BCL6	FN1	CCND2	SCYA3	BCL2
1	27.69	30.82	30.90	27.92	31.58	29.19	
2	23.65	27.26	26.73	27.40	29.09	26.41	30.02
3	25.87	25.73	29.74	28.60	32.80	28.57	33.92
4	23.60	24.94	23.78	27.77	28.24	30.91	26.23
5	24.12	24.05	23.61	25.04	28.85	26.24	21.42
6	28.81	28.55	33.90	28.01	32.22	29.45	30.46
7	28.13	31.18	30.16	30.44	30.48	29.71	32.64
8	36.64	31.83	27.37	27.21	31.03	29.11	32.27
9	32.44	33.10	33.16	29.31	33.36	34.08	
10	32.29	24.39	33.37	20.79	24.42	25.24	28.86
11	28.47	28.21	31.90	27.37	33.46	26.80	29.87
12	30.52	30.62	28.18	30.61	32.69	29.51	29.29
NLN*	25.12	26.82	25.49	25.17	26.74	25.92	27.66

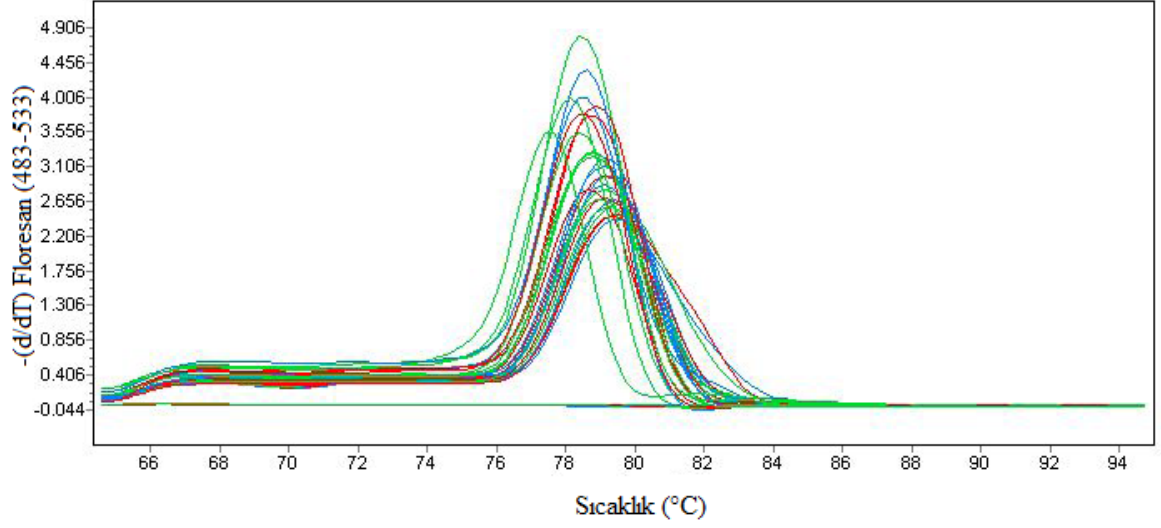
*Normal lenf nodu örneklerinden havuz oluşturularak elde edilmiş RNA örneği

4.3.2. Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi ve Sonuçları

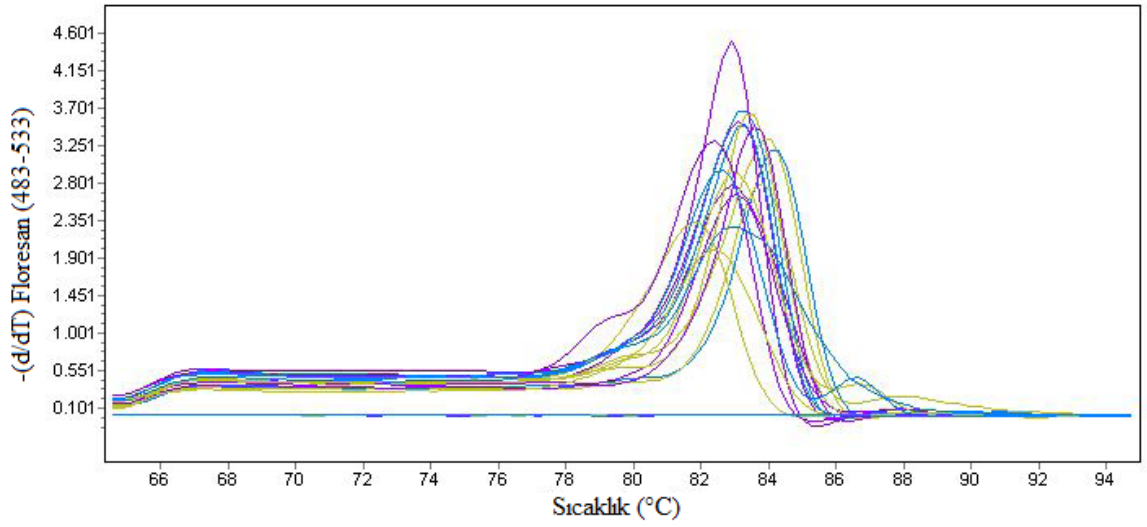
qRT-PCR reaksiyonlarında kullanılan SYBR Green I, DNA çift sarmalına bağlandığı için erime eğrisi analizi qRT-PCR'in özgünlüğü için büyük önem taşımaktadır. Tipik bir erime eğrisi grafiğinde, her örnek için sadece bir tane peak görülmesi beklenmektedir. Ekstra peakler özgün olmayan PCR ürünlerinin veya primer dimerin habercisidir. Her qRT-PCR reaksiyonunun ardından, reaksiyonun özgünlüğünü değerlendirebilmek açısından erime eğrisi analizi yapılmıştır. Şekil 4.8.'de, tipik, olması beklenen bir erime eğrisi grafiği, Şekil 4.9.'de *PGKI*'e, Şekil 4.10.'da *LMO2*'ya, Şekil 4.11.'de *BCL6*'ya, Şekil 4.12.'de *FNI*'e, Şekil 4.13.'de *CCND2*'ye, Şekil 4.14.'de *SCYA3*'e ve Şekil 4.15.'de de *BCL2*'ye ait erime eğrisi grafikleri görülmektedir:



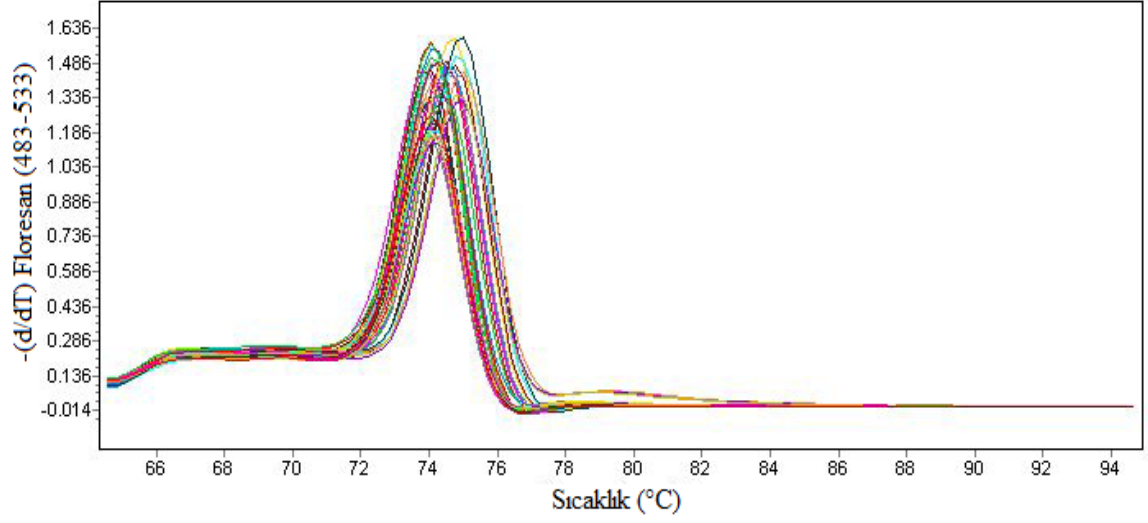
Şekil 4.8. Tipik bir erime eğrisi grafiği



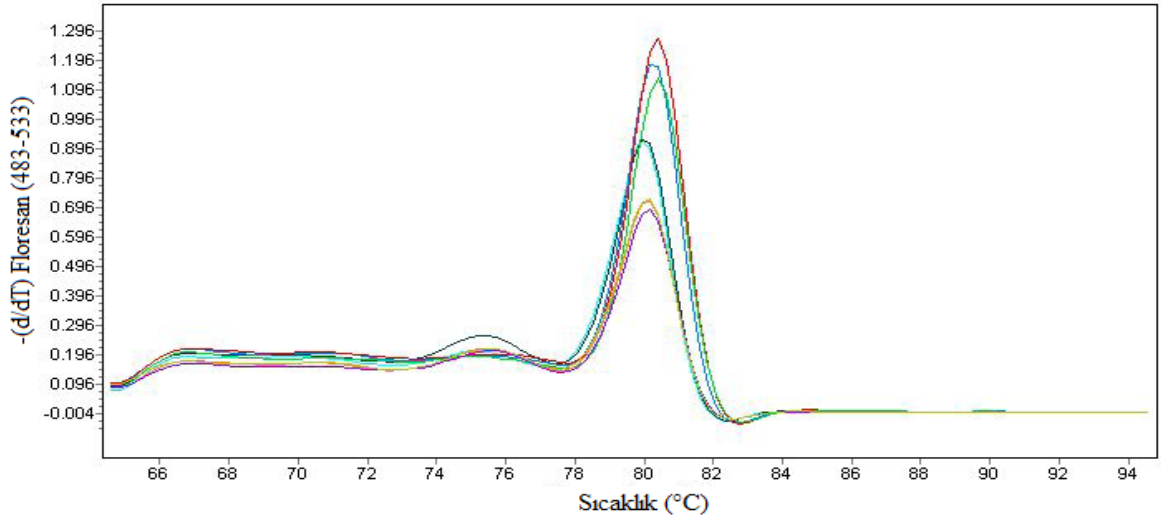
Şekil 4.9. *PGK1* erime eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)



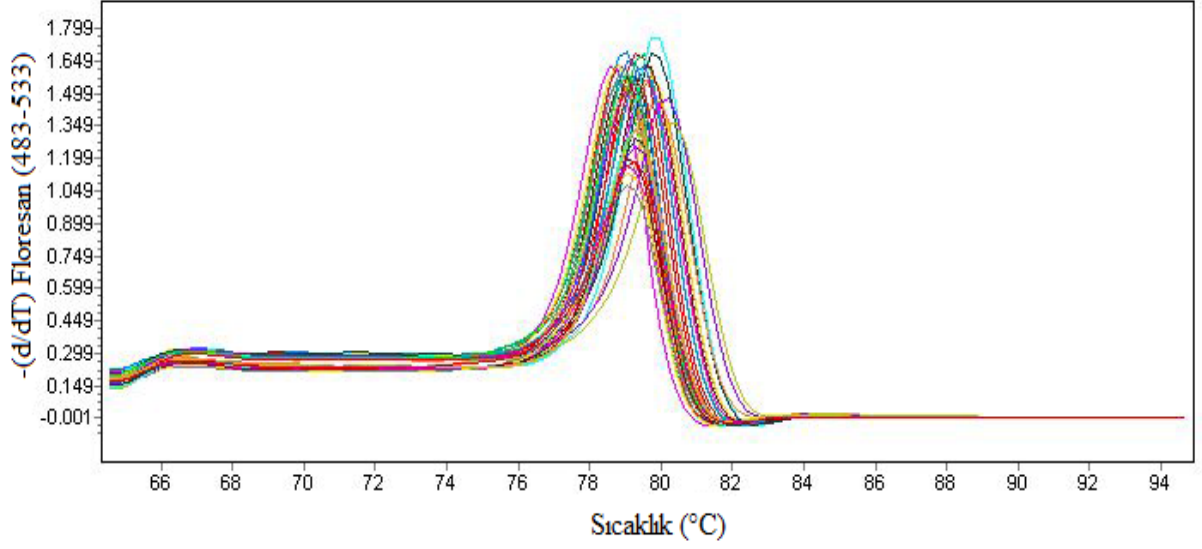
Şekil 4.10. *LMO2* erime eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)



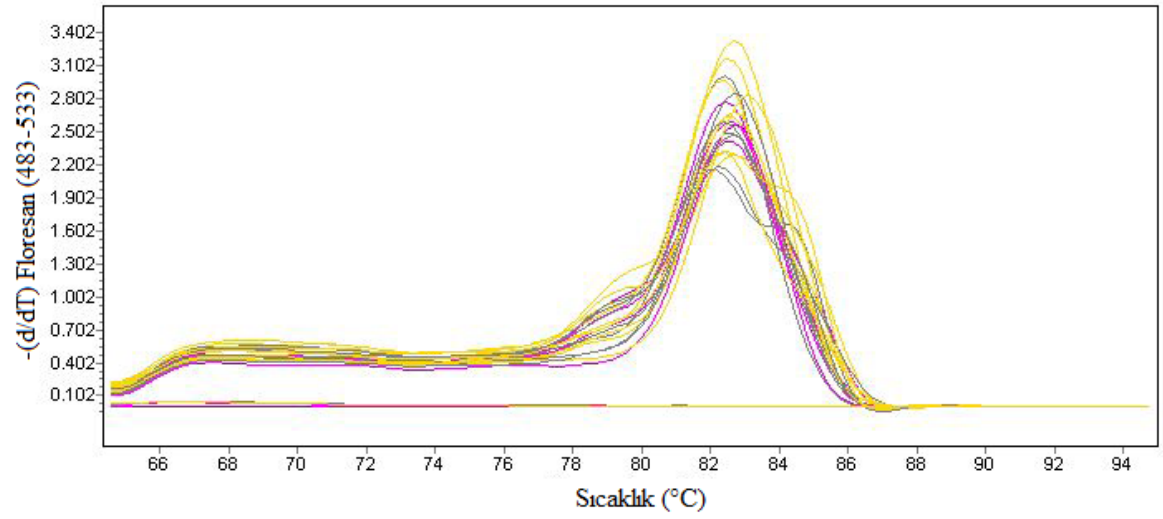
Şekil 4.11. *BCL6* erime eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 58°C)



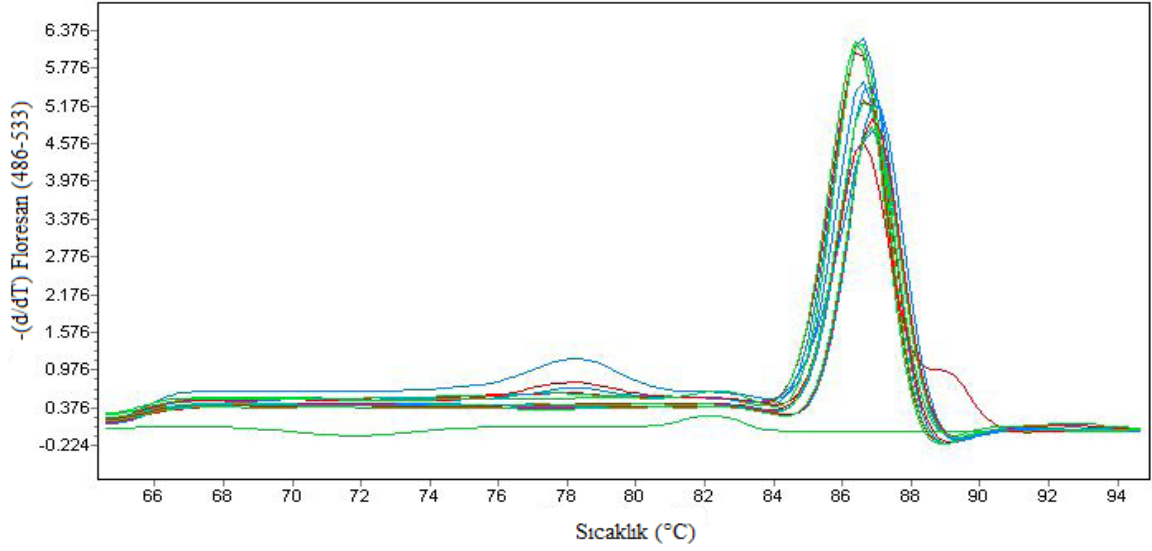
Şekil 4.12. *FNI* erime eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)



Şekil 4.13. *CCND2* erime eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 58°C)



Şekil 4.14. *SCYA3* erime eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)



Şekil 4.15. *BCL2* geninin erime eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 55°C)

4.3.3. Gen İfade Değişikliği Oranlarının Hesaplanması ve Sonuçları

Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır. Bu formül amplifikasyon etkinliği değeri olan E değerini 2 olarak reaksiyon etkinliğinin %100 olduğunu kabul eder. Formülün açık hali aşağıdaki gibidir:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(\Delta Ct_{Hedef Gen (Kontrol-Örnek)}) - (\Delta Ct_{Housekeeping (Kontrol-Örnek)})]}$$

Bu formül doğrultusunda hesaplanan gen ifadesi değişim oranları, daha sonra log2 tabanına çevrilmiştir. Bunun yapılmasının sebebi, bu değişimlerinin ifade ediliş biçimlerini kolaylaştırmaktır. Her bir hedef gen için örneklere ait gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanındaki karşılıkları Çizelge 4.4.'de mevcuttur.

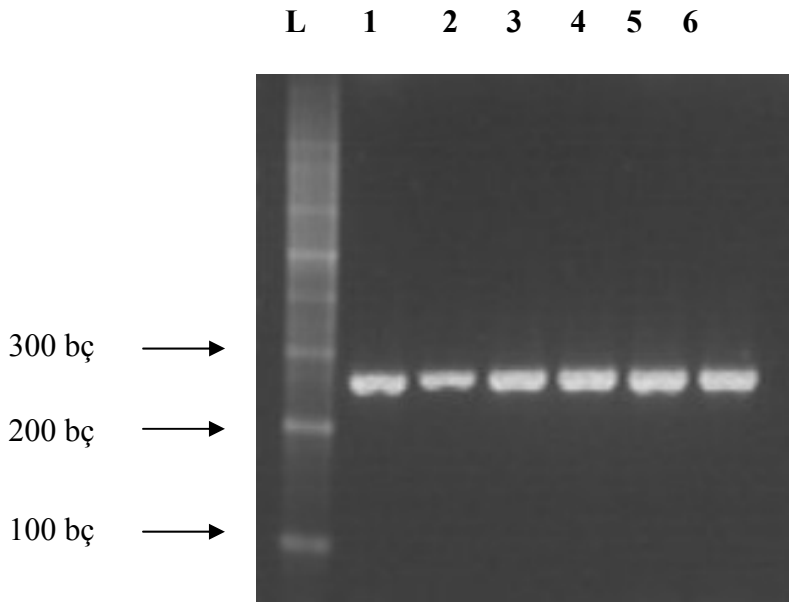
Çizelge 4.4. Örneklerin gen ifade değışikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları

Hasta No	LMO2	BCL6	FN1	CCND2	SCYA3	BCL2
1	-2.26	-1.51	-0.18	-2.84	-0.69	
2	-3.81	-1.57	-3.70	-2.71	-1.95	-3.82
3	-5.31	1.84	-2.69	-3.50	-1.90	-5.51
4	-3.01	0.37	-4.12	0.19	-6.50	-0.09
5	-3.10	1.78	-0.87	0.88	-1.31	5.24
6	-1.78	1.96	0.86	-4.72	0.17	0.89
7	-0.73	-1.35	-2.27	-1.66	-0.78	-1.97
8	7.23	6.51	9.47	9.63	8.33	6.91
9	0.70	1.04	3.18	-0.36	-0.83	
10	9.50	9.61	11.56	-0.71	7.86	5.98
11	-3.37	1.96	1.15	-3.06	2.47	1.14
12	-0.55	1.60	-0.04	2.71	1.81	3.78

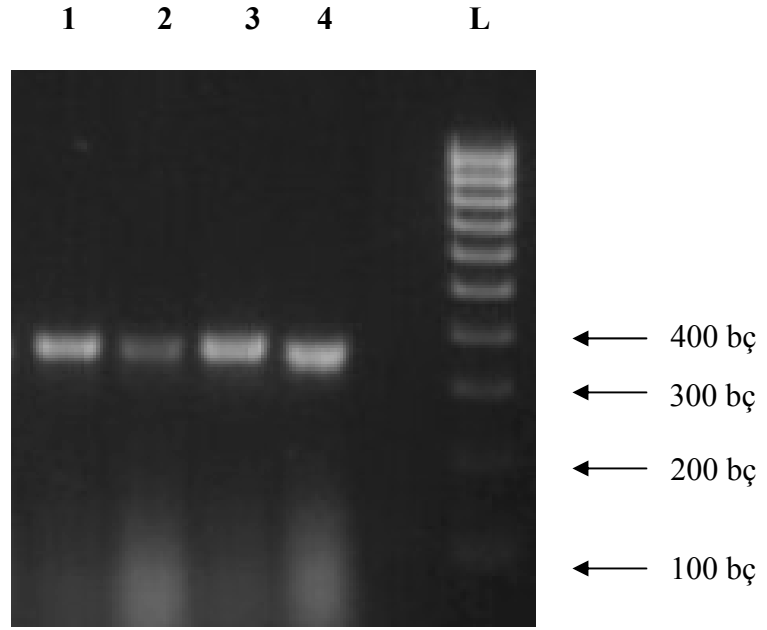
Gen ifade değışikliğioranlarının log2 tabanına göre karşılığı olan değerlerin negatif olması, ilgili örnekte hedef gen ifadesinin azaldığını; değerin pozitif olması ise, hedef gen ifadesinin artmış olduğunu göstermektedir.

4.4. Klonlanan Hedef Genler ve Analizlerde Kullanılmamalarının Sebepleri

Uluslararası bir proje kapsamında yürütülen bu tez çalışmasında, analiz sonuçlarının laboratuvarlar arasında daha nicel olarak aktarılabilmesini sağlamak için ifade profillemesinin bağıl değil mutlak ölçüm ile yapılması gerektiğine karar verilmiş ve bu amaçla hedef gen amplifikasyon ürünlerinin plazmidlere klonlanması bu çalışmanın aşamalarından biri olarak belirlenmişti. Yine bu kapsamda iki genin (*BCL6* ve *CCND2*) klonlama çalışmaları bu tezin dahilinde Paris’de INSERM, Saint-Louis Hastanesi, Hematoloji Enstitüsü’nde, Dr. Rose Ann Padua’nın laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16.’da *CCND2* klonlarına ve Şekil 4.17.’de ise *BCL6* klonlarına ait gel görüntüleri mevcuttur:



Şekil 4.16. *CCND2* klonlarına ait gel görüntüsü (Beklenen ürün boyu 271 bç; L, 100 bç DNA ladder; 1, 2, 3, 4, 5, 6 numaralı kuyular, koloni örnekleri)



Şekil 4.17. BCL6 klonlarına ait gel görüntüsü (Beklenen ürün boyu 362 bç; L, 100 bç DNA ladder; 1, 2, 3, 4 numaralı kuyular, koloni örnekleri)

Ancak çalışma kapsamındaki diğer genlerin klonlanmaları henüz tamamlanamadığı için bu tez çalışmasında analizler bağlı ölçüm değerlendirmeleri temel alınarak gerçekleştirilmiştir.

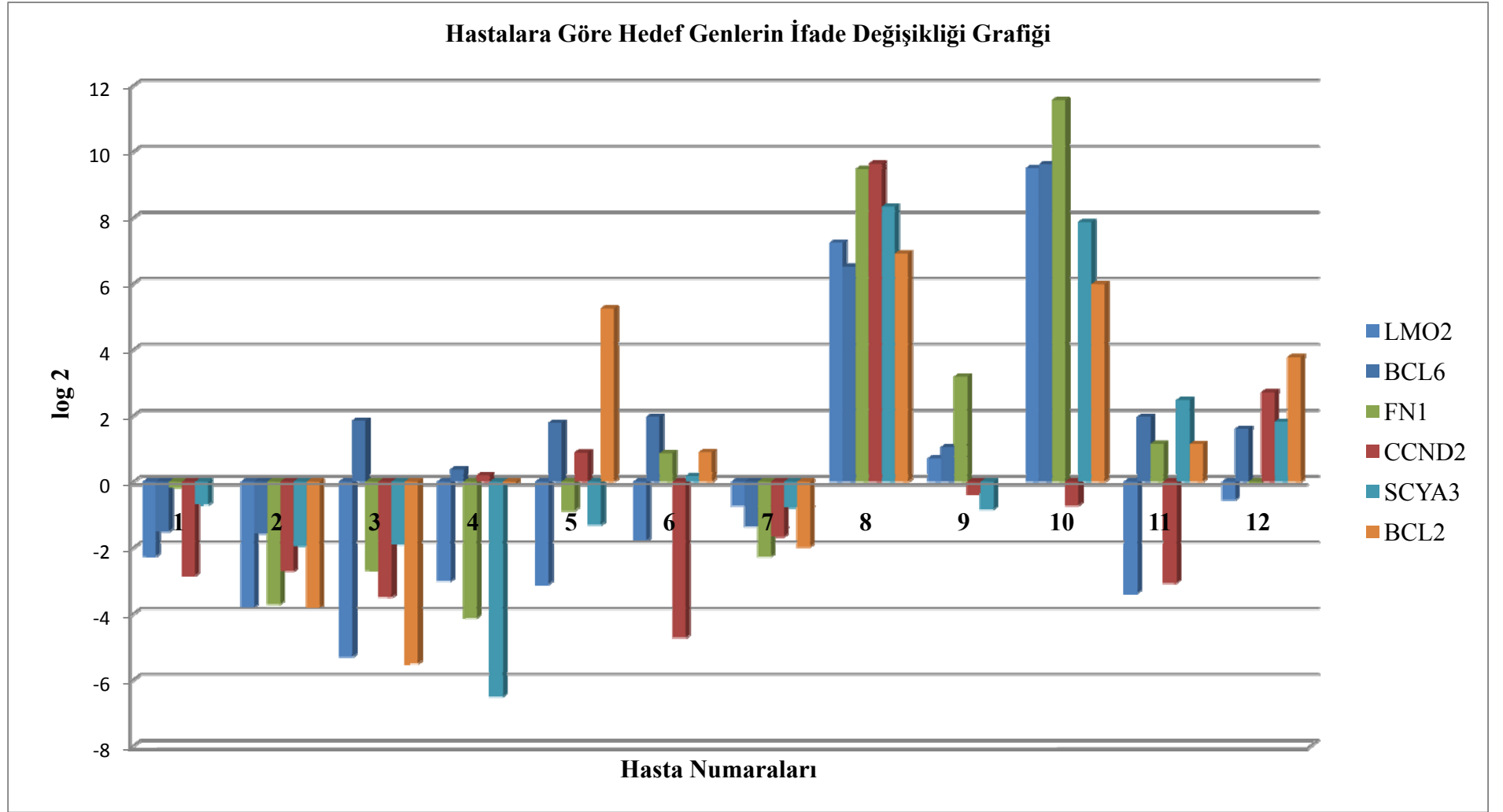
5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hemen tüm kanser tiplerinde olduğu gibi heterojen bir yapıya sahip olan DLBCL hastalığında da teşhis ve tedavide yönlendirici moleküler belirteçlere büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Bu hastalık ile ilgili olarak yürütülmesi yüksek işlem hacimli gen ifade profillemesi çalışmaları (Alizadeh *et al.* 2000, Rosenwald *et al.* 2002, Shipp *et al.* 2002) ve bu çalışmaların üzerinden gerçekleştirilmiş olan metaanalizler (Lossos *et al.* 2004) DLBCL'in tedavisinin yönlendirilmesinde etkin olabilecek, IPI'dan ve Ann Arbor tümör evrelendirme sisteminin gibi kriterlerden bağımsız olarak kullanılabilir yeni moleküler belirteçlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu moleküler belirteçlerin bütün laboratuvarlarca standardize olarak kullanılabilir bir teknikte, başka kriterlere bağımlı kalmaksızın mortalite tahmin skorunu belirleyebilmesi, DLBCL tedavisinde doğru hastaya doğru ilacın verilmesi yolunda önemli bir adımdır.

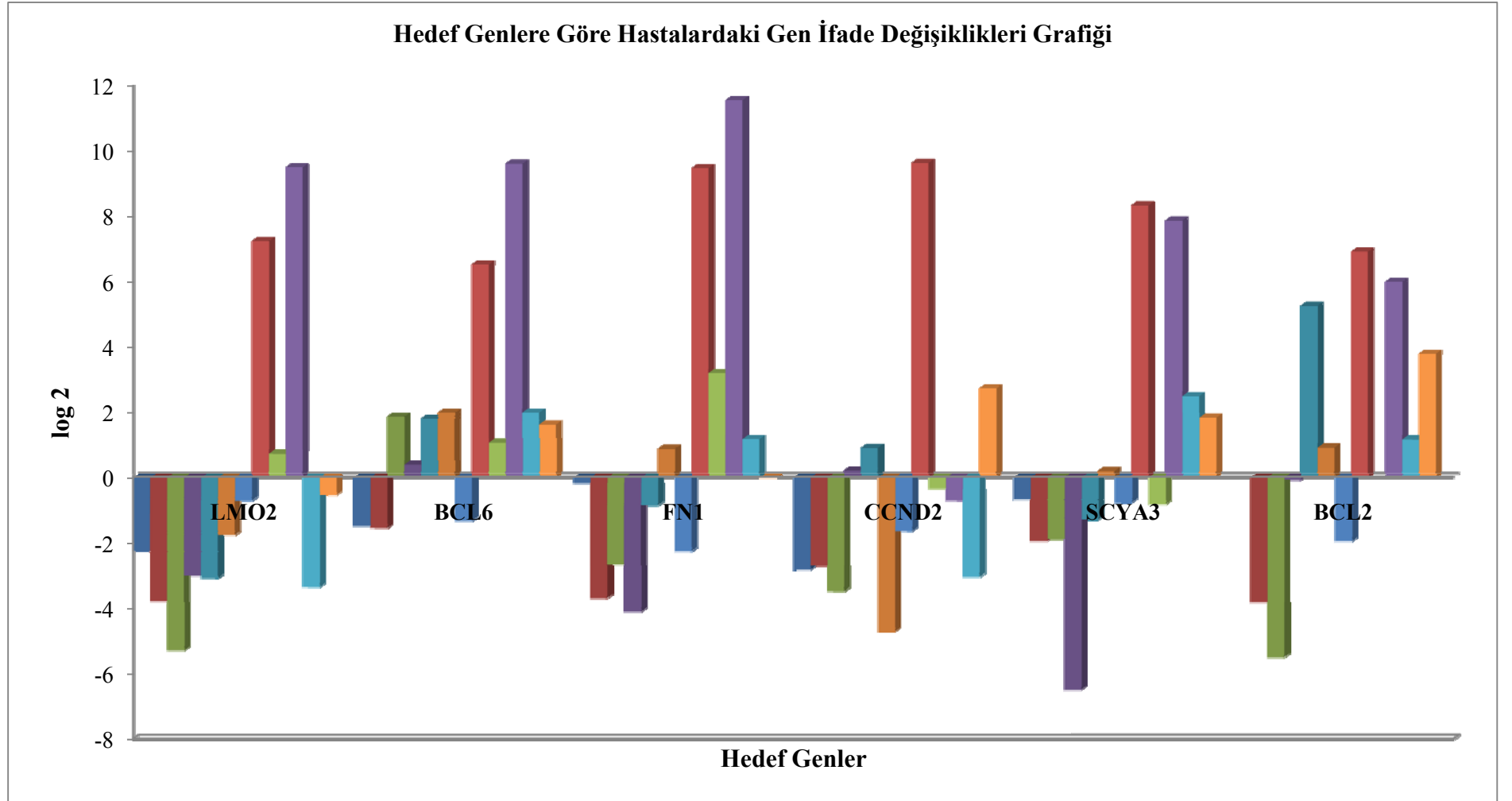
Bilimin önde gelen merkezlerinin çoğunlukla Avrupa ve Amerika'da bulunması özellikle Batı popülasyonlarından gelen bilginin daha yoğun olmasına neden olmaktadır. Genom/transkriptom boyu analizlerden elde edilen verilerin dünya popülasyonlarına global olarak uygulanabilirliğinin doğrulanması işte bu nedenle önemli ve gereklidir (Patel *et al.* 2010, Magi-Galluzzi *et al.* 2010, Rose *et al.* 2010).

Sunulan bu tez çalışmasında Lossos *et al.*'ın (2004), Alizadeh *et al.* (2000), Shipp *et al.* (2002) ve Rosenwald *et al.*'ın (2002) araştırma sonuçları üzerine yaptıkları meta analiz DLBCL hastalarının sağkalım sürelerini öngörebilecek bir moleküler imzayı ortaya çıkarmıştır. Bu moleküler imzanın dünyadaki diğer popülasyonlar için geçerli olup olmadığının gösterilmesini amaçlayan uluslararası bir projenin kapsamında incelenen 12 Türk DLBCL hastasının verileri bu yöntemin Türk popülasyonu için uygun olmadığını göstermektedir.

Türk DLBCL hasta örneklerinde yapılan analizler sonucunda her bir hasta için hedef genlerin ifade değişiklikleri ve hedef genlere göre her bir hastanın gen ifade değişiklikleri sırasıyla Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.'de grafik biçiminde gösterilmektedir:



Şekil 5.1. Hastalara Göre Hedef Genlerin İfade Değişikliği Grafiği



Şekil 5.2. Hedef Genlere Göre Hastalardaki Gen İfade Değişiklikleri Grafiği

Türk DLBCL hastaları örneklerinden 1, 2 ve 7 numaralı hastaların gen ifade değişikliklerine bakıldığında (Şekil 5.1.) benzer bir eğilim gösterdikleri belirlenmiş ve bu hastalarda tüm hedef gen ifadelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu üç hastanın ifade profillerinin aksine, 8 numaralı hastada ise tüm hedef gen ifadelerinde artış görülmüştür. Ayrıca, 6 ve 11 numaralı hastaların ise ifade profillerinin benzer olduğu belirlenmiştir.

Bu hastalar için hesaplanan mortalite skorlarına göre, hastaların %50'si, kısa sağkalım grubuna, yaklaşık %50 kadarı da uzun sağkalım grubuna dahil edilebilmektedir (Çizelge 5.1.). Hastaların tedavi sonrası sağkalım durumlarına bakıldığında ise oniki hastadan yedisinin (1, 3, 4, 5, 6, 7, 11 numaralı hastalar) hayatta kalımı doğru biçimde tahmin edilmişken beşi (2, 8, 9, 10, 12) için bu tahminin doğru olmadığı görülmüş, bu da tahmin başarısının yaklaşık %60 civarında olduğunu göstermiştir. Bu sonuçtan yola çıkılarak, mortalite skoru hesaplayarak sağ kalım tahmini yapan bu yöntemin Türk DLBCL hastaları için uygun bir yöntem olmadığı sonucuna varılmaktadır.

Çizelge 5.1.'deki 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12 numaralı hastaların tanısından bu zamana Lossos *et al.*'ın (2004) çalışmasında eşik değer olarak belirtilen 5 yıllık süre geçmemiş olduğu için yapılmış olan bu tahminlerin hangi ölçüde tutarlılık göstereceğini ancak zaman gösterecektir. Bu itibarla yalnızca 1, 5 ve 11 numaralı hastaların sağ kalım tahminleri doğru biçimde gerçekleştirilmiştir ve bu tahmin IPI skorlarıyla da korelasyon göstermektedir.

Çizelge 5.2. Hastaların sağkalım bilgileri ve sağkalım tahmin sonuçları

Hasta No	Tanı Tarihi	Ölüm Tarihi	IPI skoru	Sağkalım Tahmini	Sağkalım
1	28-09-2007	20-10-2007	3	Kısa	Ölü
2	28-08-2008	21-12-2009	3	Uzun	Ölü
5	26-06-2008	08-08-2008	3	Kısa	Ölü
9	13-04-2007	2007	3	Uzun	Ölü
11	13-09-2009	2009	3	Kısa	Ölü
3	18-01-2008		3	Uzun	Sağ
4	15-10-2009		3	Uzun	Sağ
6	18-12-2009		2	Uzun	Sağ
7	14-01-2009		0	Uzun	Sağ
8	06-01-2010		1	Kısa	Sağ
10	15-01-2009		2	Kısa	Sağ
12	19-01-2010		3	Kısa	Sağ

Çizelgedeki sarı renk sağkalım tahmininin %100 doğru yapılmış olduğu hastaları, yeşil renk ise henüz net sağkalım tahmini yapılamayacak hastaları göstermektedir. IPI, sağkalım tahmininde sıklıkla kullanılan prognostik bir modeldir. IPI değerlerinde 0-1:düşük ölüm riskini, 2: düşük-orta ölüm riskini, 3: orta-yüksek ölüm riskini, 4<: yüksek ölüm riskini ifade etmektedir.

Yapılması Planlananlar ve Temel Çıkarımlar

Bu çalışma, IAEA tarafından desteklenen bir proje kapsamında halen sürmektedir ve analizler mutlak ölçüm yapılacak şekilde tekrarlanmaktadır. Uluslararası kapsamlı bu çalışmada teknik yetersizlikler sebebi ile gen ifade profillemesi çalışmalarını yapamayacağını belirten işbirlikçi ülkelerden Kore'ye ait örnekler halihazırda analize alınmak üzere beklemektedir. 2011 sonunda bitecek olan projenin son aşamasında elde etmiş olduğumuz bulgular, Fransa, Brezilya, Macaristan, Hindistan, Filipinler, Kore, Tayland ve Şili'den gelen veriler entegre edilerek değerlendirilecektir.

Lossos *et al.*'ın (2004) çalışmasında, 5 yıl ve üstündeki sağkalım süresi uzun, 5 yıldan az olan süreler ise kısa sağkalım süresi olarak kabul edilmiştir. Çalışmada yer alan bazı hastaların, tanısından bu zamana belirtilen 5 yıllık süre geçmemiş olduğu için yapılmış olan tahminlerin hangi ölçüde tutarlılık göstereceği bilinmemektedir.

Yapılan hesaplamalarda, Türk DLBCL hastaları örneğinde, sağkalım tahmininde mortalite skorunun başarı oranı %60 olarak belirlenmiştir. Ancak, gerek hasta sayısının istenilenden az oluşu, gerekse hastaların çoğunun tanı aldıkları tarihten bu yana 5 yıllık eşik sürenin geçmemiş olması sebebiyle hesaplanmış olan bu sağkalım tahminleri sağlam bir temele dayandırılmamaktadır. Bu doğrultuda, tanı zamanından bu yana geçen süre göz önüne alınarak örnek sayının çoğaltılmasıyla toplumsal düzeyde daha güvenilir sonuçlar elde edilebilecektir. Ayrıca bu başarı oranı, tıpkı SNP (Single Nucleotide Polymorphism, Tekli Nükleotid Değişimleri) çalışmaları gibi gen ifade profili çalışmalarının da toplumsal ölçekte yapılması gerektiğinin altını önemle çizmektedir.

KAYNAKLAR

- A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. 1997. *Blood*, 89(11);3909-3918.
- A predictiand model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. 1993. The International NHL Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*, 329(14); 987-994.
- Abramson, JS., Shipp, MA. 2005. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood*, 106(4);1164-1174.
- Alizadeh, A., Eisen, M., Davis, R., Ma, C., Sabet, H., Tran, T., Powell, JI., Yang, L., Marti, GE., Moore, DT., Hudson, JR., Chan, WC., Greiner, T., Weisenburger, D., Armitage, JO., Lossos, I., Levy, R., Botstein, D., Brown, PO., Staudt, LM. 1999. The Lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genome-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 64;71-78.
- Alizadeh, AA., Eisen, MB., Davis, RE., Ma, C., Lossos, IS., Rosenwald, A., Boldrick, JC., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, JI., Yang, L., Marti, GE., Moore, T., Hudson, J Jr., Lu, L., Lewis, DB., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, WC., Greiner, TC., Weisenburger, DD., Armitage, JO., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, MR., Byrd, JC., Botstein, D., Brown, PO., Staudt, LM. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(6769);503-511.
- Ambrose, C., McLachlan, GJ. 2002. Selection bias in gene extraction on the basis of microarray gene-expression data. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(10);6562-6566.
- Bea, S., Zettl, A., Wright, G., Salaverria, I., Jehn, P., Moreno, V., Burek, C., Ott, G., Puig, X., Yang, L., Lopez-Guillermo, A., Chan, WC., Greiner, TC., Weisenburger, DD., Armitage, JO., Gascoyne, RD., Connors, JM., Grogan, TM, Braziel, R., Fisher, RI., Smeland, EB., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Simon, R., Powell, J., Wilson, WH., Jaffe, ES., Montserrat, E., Muller-Hermelink, HK., Staudt, LM., Campo, E., Rosenwald, A. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. 2005. Diffuse

- large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene expression-based survival prediction. *Blood*, 106(9);3183–3190.
- Binder, M., Otto, F., Mertelsmann, R., Veelken, H., Trepel, M. 2006. The epitope recognized by rituximab. *Blood*, 108(6);1975-1978.
- Boehm, T., Foroni, L., Kaneko, Y., Perutz, MF., Rabbitts, TH. 1991. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:4367-4371.
- Butte, A. 2002. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*, 1(12);951-960.
- Cattoretti, G., Chang, CC., Cechova, K., Zhang, J., Ye, BH., Falini, B., Louie, DC., Offit, K., Chaganti, RS., Dalla-Favera, R. 1995. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*, 86;45-53.
- Chang, CC., Ye, BH., Chaganti, RS., Dalla-Favera, R. 1996. BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93;6947-6952.
- Coiffier, B. 2001. Diffuse large cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*,13(5);325-334.
- Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P., Gisselbrecht, C. 2002. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346(4);235–242.
- Delmer, A., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Tang, R., Ramond, S., Faussat, AM., Marie, JP., Zittoun, R. 1995. Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood*, 85:2870-2876.
- Dent, AL., Hu-Li, J., Paul, WE., Staudt, LM. 1998. T helper type 2 inflammatory disease in the absence of interleukin 4 and transcription factor STAT6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95;13823-13828.
- Eisen, MB., Spellman, PTG., Brown, PO., Botstein, D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(2):14863-14868.

- Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Fermé, C., Christian, B., Lepage, E., Tilly, H., Morschhauser, F., Gaulard, P., Salles, G., Bosly, A., Gisselbrecht, C., Reyes, F., Coiffier, B. 2005. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*, 23(18);4117–4126.
- Gascoyne, RD., Adomat, SA., Krajewski, S., Krajewska, M., Horsman, DE., Tolcher, AW., O'Reilly, SE., Hoskins, P., Coldman, AJ., Reed, JC., Connors, JM. 1997. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90;244-251.
- Gatter, KC., Warnke, RA. 2001. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe, ES., Harris, NL., Stein, H., Vardiman, JW., eds. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 171-174.
- Goel, A., Mathupala, SP., Pedersen, PL. 2003. Glucose metabolism in cancer. Evidence that demethylation events play a role in activating type II hexokinase gene expression. *J Biol Chem*, 278(17);15333-15340.
- Habermann, TM., Weller, EA., Morrison, VA., Gascoyne, RD., Cassileth, PA., Cohn, JB., Dakhil, SR., Woda, B., Fisher, RI., Peterson, BA., Horning, SJ. 2006. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 24(19);3121–3127.
- Haioun, C., Itti, E., Rahmouni, A., Brice, P., Rain, JD., Belhadj, K., Gaulard, P., Garderet, L., Lepage, E., Reyes, F., Meignan, M. 2005. 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome. *Blood*, 106(4);1376-1381.
- Hans, CP., Weisenburger, DD., Greiner, TC., Gascoyne, RD., Delabie, J., Ott, G., Müller-Hermelink, HK., Campo, E., Braziel, RM., Jaffe, ES., Pan, Z., Farinha, P., Smith, LM., Falini, B., Banham, AH., Rosenwald, A., Staudt, LM., Connors, JM., Armitage, JO., Chan, WC. 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1);275-282.

- Harris, NL., Jaffe, ES., Stein, H., Banks, PM., Chan, JK., Cleary, ML., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, KC. 1994. A revised European±American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84(5);1361-1392.
- Hermine, O., Haioun, C., Lepage, E., d'Agay, MF., Briere, J., Lavignac, C., Fillet, G., Salles, G., Marolleau, JP., Diebold, J., Reyas, F., Gaulard, P. 1996. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 87;265-272.
- Herrick, J., Dogan, A. 2010. Lymphoma. In: Erber, WN. *Diagnostic Techniques in Hematological Malignancies*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 224-229.
- Hill, ME., MacLennan, KA., Cunningham, DC., Vaughan Hudson, B., Burke, M., Clarke, P., Di Stefano, F., Anderson, L., Vaughan Hudson, G., Mason, D., Selby, P., Linch, DC. 1996. Prognostic significance of Bcl-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood*, 88;1046-1051.
- Hodgkin, T. 1832. On some morbid appearances of the absorbant glands and spleen. *Med-Chir Trans*, 17;68±114.
- Hunt, KE., Reichard, KK. 2008. Diffuse large B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*, 132(1);118-24.
- Jaffe, ES., Harris, NL., Stein, H. and Vardiman JW, editors. *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissue*. Lyon: IARC Press, 2001
- Kerckaert, JP., Dewindt, C., Tilly, H., Quief, S., Lecocq, G., Bastard, C. 1993. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat Genet*, 5;66-70.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., Küppers, R. 1998. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev*, 162;261-280.

- Kostakoglu, L., Coleman, M., Leonard, JP., Kuji, I., Zoe, H., Goldsmith, SJ. 2002. PET predicts prognosis after 1 cycle of chemotherapy in aggressive lymphoma and non Hodgkin's disease. *J Nucl Med*, 43(8);1018-1027.
- Kostakoglu, L., Goldsmith, SJ., Leonard, JP., Christos, P., Furman, RR., Atasever, T., Chandramouly, A., Verma, S., Kothari, P., Coleman, M. 2006. FDG-PET after 1 cycle of therapy predicts outcome in diffuse large cell lymphoma and classic Hodgkin disease. *Cancer*, 107(11);2678-2687.
- Kramer, MH., Hermans, J., Wijburg, E., Philippo, K., Geelen, E., van Krieken, JH., de Jong, D., Maartense, E., Schuurin, E., Kluin, PM. 1998. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 92;3152-3162.
- Lossos, IS. 2005. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 23(26);6351-6357.
- Lossos, IS., Czerwinski, DK., Alizadeh, AA., Wechser, MA., Tibshirani, R., Botstein, D., Levy, R. 2004. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*, 350(18);1828-1837.
- Magi-Galluzzi, C., Tsusuki, T., Elson, P., Simmerman, K., Lafargue, C., Esgueva, R., Klein, E., Rubin, MA., Zhou, M. 2010. TMPRSS2-ERG gene fusion prevalence and class are significantly different in prostate cancer of caucasian, african-american and japanese patients. *Prostate*, [Epub ahead of print]
- Mikhaeel, NG., Hutchings, M., Fields, PA., O'Doherty, MJ., Timothy, AR. 2005. FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression free and overall survival in high grade non Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol*, 16(9);1514-1523.
- Mosher, DF. 2001. A role for fibronectin in self-repair after ischemic injury. *Nat Med*, 7;290-292.
- National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. 1982. *Cancer*, 49(10);2112-2135.
- Otake, Y., Soundararajan, S., Sengupta, TK., Kio, EA., Smith, JC., Pineda-Roman, M., Stuart, RK., Spicer, EK., Fernandes, DJ. 2007. Overexpression of nucleolin in

chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood*, 109(7);3069–3067.

Parham, Peter (2005). *The immune system*. New York: Garland Science. p.414. ISBN 0-8153-4093-1.

Patel, TA., Colon-Otero, G., Bueno Hume, C., Copland, JA 3rd., Perez, EA. 2010. Breast cancer in Latinas: gene expression, differential response to treatments, and differential toxicities in Latinas compared with other population groups. *Oncologist*, 15(5):466-475.

Pfreundschuh, M., Trumper, L., Osterborg, A., Pettengell, R., Trneny, M., Imrie, K., Ma, D., Gill, D., Walewski, J., Zinzani, PL., Stahel, R., Kvaloy, S., Shpilberg, O., Jaeger, U., Hansen, M., Lehtinen, T., López-Guillermo, A., Corrado, C., Scheliga, A., Milpied, N., Mendila, M., Rashford, M., Kuhnt, E., Loeffler, M.; MabThera International Trial Group. 2006. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*, 7(5);379–391.

Phan, RT., Dalla-Favera, R. 2004. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, 432(7017);635–639.

Pike, BL., Greiner, TC., Wang, X., Weisenburger, DD., Hsu, YH., Renaud, G., Wolfsberg, TG., Kim, M., Weisenberger, DJ., Siegmund, KD., Ye, W., Groshen, S., Mehrian-Shai, R., Delabie, J., Chan, WC., Laird, PW., Hacia, JG. 2008. DNA methylation profiles in diffuse large B-cell lymphoma and their relationship to gene expression status. *Leukemia*, 22(5);1035–1043.

Ramaswamy, S., Golub, TR. 2001. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol*, 20(7);1932–1941.

Reed, DM. 1902. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep*, 10;133±196.

Rose, AE., Satagopan, JM., Oddoux, C., Zhou, Q., Xu, R., Olshen, AB., Yu, JZ., Dash, A., Jean-Gilles, J., Reuter, V., Gerald, WL., Lee, P., Osman, I. 2010. Copy number and gene expression differences between African American and Caucasian American prostate cancer. *J Transl Med*, 8;70.

- Rosenberg, S. A. 1994. Classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 84(5);1359-1360.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, WC., Connors, JM., Campo, E., Fisher, RI., Gascoyne, RD., Muller-Hermelink, HK., Smeland, EB., Giltnane, JM., Hurt, EM., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, WH., Jaffe, ES., Simon, R., Klausner, RD., Powell, J., Duffey, PL., Longo, DL., Greiner, TC., Weisenburger, DD., Sanger, WG., Dave, BJ., Lynch, JC., Vose, J., Armitage, JO., Montserrat, E., López-Guillermo, A., Grogan, TM., Miller, TP., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T., Staudt, LM.; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. 2002. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346(25);1937–1947.
- Royer-Pokora, B., Loos, U., Ludwig, WD. 1991. TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene*, 6;1887-1893.
- Seyfert, VL., Allman, D., He, Y., Staudt, LM. 1996. Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene*, 12;2331-2342.
- Shaffer, AL., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, EP., Staudt, LM. 2000. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*, 13(2);199–212.
- Shaw, T., Quan, J., Totoritis, MC. 2003. B cell therapy for rheumatoid arthritis: the rituximab (anti-CD20) experience. *Ann Rheum Dis*, 62 Suppl 2:ii55-9.
- Sherr, CJ. 1995. Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians*, 107;181-186.
- Shipp, MA., Ross, KN., Tamayo, P., Weng, AP., Kutok, JL., Aguiar, RC., Gaasenbeek, M., Angelo, M., Reich, M., Pinkus, GS., Ray, TS., Koval, MA., Last, KW., Norton, A., Lister, TA., Mesirov, J., Neuberg, DS., Lander, ES., Aster, JC. Golub, TR. 2002. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*, 8(1);68–74.
- Simon, R., Radmacher, MD., Dobbin, K., McShane, LM. 2003. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst*, 95(1);14-18.

- Spaepen, K., Stroobants, S., Dupont, P., Vandenberghe, P., Thomas, J., de Groot, T., Balzarini, J., De Wolf-Peeters, C., Mortelmans, L., Verhoef, G. 2002. Early restaging PET with 18F-FDG predicts outcome in patients with aggressive non Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*, 13(9);1356-1363.
- Stein, H., Bob, R. 2009. Is Hodgkin lymphoma just another B-cell lymphoma? *Curr Hematol Malig Rep* 4(3);125-128.
- Stocklein, H., Smardova, J., Macak, J., Katzenberger, T., Höller, S., Wessendorf, S., Hutter, G., Dreyling, M., Haralambieva, E., Mäder, U., Müller-Hermelink, HK., Rosenwald, A., Ott, G., Kalla, J. 2008. Detailed mapping of chromosome 17p deletions reveals HIC1 as a novel tumor suppressor gene candidate telomeric to TP53 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene*, 27(18);2613–2625.
- Trumper, L., Brittinger, G., Diehl, V., Harris, NL. Non-Hodgkin's lymphoma: a history of classification and clinical observations. In: Mauch PM, Armitage JO, Coiffier B, Dalla-Favera R, Harris NL, eds. *Non-Hodgkin's Lymphomas*. New York, NY: Lippincott, Williams and Wilkins; 2004:3-19.
- Warren, AJ., Colledge, WH., Carlton, MB., Evans, MJ., Smith, AJ., Rabbitts, TH. 1994. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell*, 78;45-57.
- Williams, CM., Engler, AJ., Slone, RD., Galante, LL., Schwarzbauer, JE. 2008. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer research*, 68(9);3185–3192.
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, EA., Wiestner, A., Staudt, LM. 2003. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(17);9991–9996.
- Yamada, Y., Pannell, R., Forster, A., Rabbitts, TH. 2000. The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97;320-324.
- Ye, BH., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Howe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, RS., Rothman, P., Stall, AM., Pandolfi, PP., Dalla-Favera, R. 1997. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*, 16;161-170.

American Cancer Society. Cancer Facts&Figures 2009. Atlanta: American Cancer Society, 2009, http://www.cancer.org/docroot/STT/STT_0.asp

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lymphoma>

http://genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=2&tablo=tbl_yontemler

<http://hematolojika.com/Content4.asp?M1=1&M2=8&M3=4&M4=14>

http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Dahili_Tip/Radyasyon_Onk/Oguz_Galip_Yildiz2/NO-N-hodgkin%20lenfoma.pdf

http://tip.sdu.edu.tr/akademikyapi/dersnotlar/Patoloji/Sema_Bircan/Hemato_Ders/Non-Hodgkin_Lenfoma.pdf

<http://turkkanser.org.tr/news.php?id=61>

<http://visuals.nci.nih.gov/details.cfm?imageid=7172>

http://www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/498/Non_Hodgkin_Lenfoma_TR.pdf

http://www.leukemia-lymphoma.org/attachments/National/br_1255377088.pdf

<http://www.tuba.gov.tr/index.php?id=443>

Lymphoma facts and statistics are from the LLS booklet Leukemia, Lymphoma, Myeloma Facts 2009-2010, June 2009.

http://www.leukemia-lymphoma.org/all_mat_toc.adp?item_id=522552

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Melike ÖZTÜRK

Doğum Yeri: Adapazarı

Doğum Tarihi: 21/10/1986

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Gaziantep Kolej Vakfı YDA Süper Lise (2002-2004)

Lisans: İstanbul Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
(2004-2008)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Omega Araştırma Organizasyon Eğitim Danışmanlık Ltd. Şti. (11-2010/ 01-2011)