

Kronik Miyeloid Lösemi (KML) hastalarında DNA Metiltransferaz 3A (DNMT3A) kodlayan gende R882H mutasyon varlığının araştırılması

INVESTIGATION OF R882H MUTATION IN THE GENE CODING DNA METHYLTRANSFERASE 3A (DNMT3A) IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (CML) PATIENTS

 Nazlı ŞİRİN¹,  Bengüsu AYDIN¹,  Melek PEHLİVAN²,  Hakkı Ogün SERCAN¹

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İZMİR

²İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İZMİR

ÖZ

Amaç: Kronik Miyeloid Lösemi (KML), hematopoetik kök hücre (HKH) orijinli klonal miyeloproliferatif bir hastalıktır. KML'deki Bcr-Abl kimerik geni ile birlikte diğer ek mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonlar hastalığın blastik faza doğru ilerleyişi için gereklidir. DNA metiltransferazlar (DNMT), epigenetik olarak düzenlenmiş genlerin ifade edilmesinde ve baskılanmasında önemli rol oynayan genom metilasyonu için anahtar proteinlerdir. Hematolojik malignitelerde DNMT3A ve diğer DNA metilasyon düzenleyicilerinde mutasyonlar tanımlanmıştır. R882H mutasyonu DNMT3a'da en sık gözlenen mutasyondur. Bu çalışmanın amacı DNMT3A R882H mutasyonunun KML hastalarındaki görülme oranını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bcr/Abl kimerik gen analizi amacıyla gönderilmiş KML hastalarının kemik iliğlerinden elde edilmiş olan cDNA örneklerinde, DNMT3A R882H mutasyonunu taramak için, Acil restriksiyon enzim kesimi kullanıldı. Kesim sonrası Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- örneklerden random seçilerek DNMT3A için DNA dizi analizi yapıldı. Elde edilen verilerin analizleri istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: 35 Bcr/Abl+ ve 60 Bcr/Abl- örneğin Acil restriksiyon enzim kesimi sonrası bu mutasyonu taşımadıkları gözlemlendi. Bu örneklerden random seçilerek DNA dizi analizi ile değerlendirilen örneklerde de R882H mutasyonunun olmadığı doğrulandı.

Sonuç: Elde edilen sonuçlarımıza göre DNMT3A-R882H mutasyonunun KML hastalarında gözlenmediği, Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- bireyler arasında mutasyon görülme oranı açısından herhangi bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Hematopoetik hücrelerin proliferasyon potansiyelini arttırmakta rol oynadığı bilinen DNMT3A R882H mutasyonunun KML progresyonu açısından etkili olmadığı ortaya konmuştur.

Anahtar Sözcükler: Kronik Myeloid Lösemi, Bcr/Abl, DNMT3A, R882H mutasyonu

Hakkı Ogün SERCAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
İZMİR

 <https://orcid.org/0000-0002-2449-1794>

ABSTRACT

Objective: Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disease of hematopoietic stem cell (HSC) origin. Along with the Bcr-Abl chimeric gene in KML, other additional mutations and epigenetic modifications are necessary for the disease to progress to the blastic phase. DNA methyltransferases (DNMTs) are key proteins for genome methylation, which play an important role in the expression and suppression of epigenetically regulated genes. Mutations in DNMT3A and other DNA methylation regulators have been identified in hematological malignancies. R882H mutation is the most common mutation in DNMT3a. The aim of this study is to investigate the incidence of DNMT3A R882H mutation in CML patients.

Materials and Methods: Acil restriction enzyme cutting was used to screen the DNMT3A R882H mutation in cDNA samples obtained from bone marrow samples of CML patients sent for Bcr/Abl chimeric gene analysis. After restriction enzyme cutting, Bcr/Abl+ and Bcr/Abl- samples were randomly selected and DNA sequence analysis was performed for DNMT3A. Analyzes of the data obtained were evaluated statistically.

Results: It was observed that 35 Bcr/Abl + and 60 Bcr/Abl- samples did not carry this mutation after Acil restriction enzyme cutting. It was confirmed that there was no R882H mutation in the samples evaluated randomly by DNA sequence analysis from these samples.

Conclusion: According to our results, it was founded that DNMT3A-R882H mutation was not observed in CML patients and there was no difference in the rate of mutation among Bcr/Abl + and Bcr/Abl- individuals. It has been demonstrated that the DNMT3A R882H mutation, which is known to play a role in increasing the proliferation potential of hematopoietic cells, is not effective for CML progression.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, Bcr/Abl, DNMT3A, R882H mutation.

Kronik miyeloid lösemi (KML), hematopoetik kök hücre (HKH) orjinli klonal miyeloproliferatif bir hastalıktır. t(9;22)(q34;q11) sonucu Bcr/Abl kimerik geni oluşmakta ve bu gen artmış tirozin kinaz aktivitesine sahip 210 kDA ağırlığında protein ürünü veren bir mRNA kodlamaktadır (1). İn vitro deneysel modeller Bcr/Abl protein kinazın KML'nin patogeneğinde merkezi rol oynadığını göstermiştir (2, 3). Bcr/Abl kimerik geni KML'deki primer genetik kusur olarak kabul edilmiş olsa da, diğer ek mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonlar hastalığın blastik faza doğru ilerleyişi için gereklidir (1).

DNA metilasyonu, transkripsiyonel represyon, genomik imprintlenme ve tekrarlayan elementlerin bastırılması gibi anahtar hücrel işlemlerde yer alan epigenetik bir modifikasyondur. Özellikle tümör baskılayıcı genlerin promotor hipermetilasyonu yoluyla epigenetik olarak susturulması kanserlerde çok sık karşılaştığımız epigenetik faktörlerdendir (4, 5). Epigenetik

olarak düzenlenmiş gen ekspresyonu ve represyonunda önemli rol oynayan anahtar enzimler, DNA metiltransferazlardır (DNMT). Genomik DNA'nın metilasyon deseninin korunması ve sürdürülmesi DNA metiltransferazlar ile düzenlenir. Memelilerde üç gen, DNA metiltransferaz proteinlerini kodlamaktadır: DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B (6). DNMT3A, omurgalılarda yüksek oranda korunan 130 kDa'luk bir proteindir (6). DNMT3A ve DNMT3B proteinleri, metillenmemiş CpG alanlarının de novo metilasyonu yoluyla özellikle embriyogeneşte erken DNA metilasyon desenlerini oluşturmaktan sorumludur.

DNMT3A geni, insan kromozomu 2p23 üzerindeki 23 ekzon tarafından kodlanır (7). Hematolojik malignitelerde, DNMT3A ve diğer DNA metilasyon düzenleyicilerinde mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonların fonksiyonel analizi, hastalık mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına, yeni

biyobelirteçlerin ve / veya ilaç hedeflerinin keşfedilmesine ve tedavi rejimlerinin daha rasyonel tasarımlarına imkân sağlayacak potansiyel oluşturmaktadır (8). DNMT3A'daki somatik mutasyonların çoğunluğu heterozigottur ve proteinin normal fonksiyonunda veya stabilitesinde kilit rol oynayan bu oligomerleşmenin bozulmasına yol açarlar (9). DNMT3A mutasyonları ve lökogenез süreci ile ilişkisi konusunda çalışmalar artmakla beraber, henüz moleküler mekanizmalar, klinik prognostik ve terapötik değer konusunda önemli sorular cevapsız kalmaktadır. Hematopoetik malignitelerde DNMT3A mutasyonlarının çoğu, metiltransferaz domain (MTD)'de R882 kodonunda meydana gelmektedir (10). DNMT3A'nın fonksiyonel formu oligomerize olmuş şekildedir. R882H mutasyonunun bulunduğu MTase domaini oligomerizasyon için önemlidir. Özellikle R882H ile bu oligomerleşme bozulabilmektedir. R882H mutasyonu ile oluşan mutant protein, dominant negatif etki göstererek, DNMT3A için heterozigot yapılanmaya rağmen WT DNMT3A'nın fonksiyonunu baskılamakta ve bu da genomik DNA metilasyon deseninin düzenlenmesi noktasında olumsuz etki etmektedir (9, 11).

Hematolojik maligniteler incelendiğinde, DNMT3A-R882H mutasyonu, hematopoetik hücrelerin proliferasyon potansiyelini ve hücre döngüsü aktivitesini artırmakta, genomik metilasyon desenlerinin modifikasyonlarını uyarmaktadır. DNMT3A mutasyonlarının fonksiyonel rolü ile ilgili ilerlemelere rağmen miyeloid malignitelerin patogenezinin moleküler mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır. DNMT3A R882 mutasyonlarının, KML prognozunu etkileyip etkilemediği belirsizdir. Bu çalışmada, KML ön tanısı ile gönderilmiş moleküler olarak Bcr/Abl+ olduğu bilinen örnekler ile Bcr/Abl- olduğu saptanan örneklerdeki R882H mutasyonunun varlığının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta örnekleri

Çalışmaya dâhil edilen hasta örnekleri klinik olarak KML ön tanısı almış ve kimerik gen analizi için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiş olan hastalardan seçilmiştir. 35 KML Bcr/Abl pozitif ve 60 Bcr/Abl negatif hasta olmak üzere

toplam 95 hasta dâhil edilmiştir. Çalışma için "Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan" 30.01.2019 tarih ve 2019/02-21 numaralı izin alınmıştır.

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Hasta örneklerinden total RNA izolasyonları, RNeasy® Mini kiti (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. Genomik DNA kontaminasyonunu önlemek için, RNA örnekleri üreticinin talimatları doğrultusunda RNaz içermeyen DNaz I (Qiagen) ile muamele edildi. RNA bütünlüğü ve saflığı sırasıyla elektroforez ve OD260/OD280 nm oranı ile doğrulandı. Üreticinin talimatlarına göre 2 µg RNA kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi (SuperScript™ First Strand kiti, Invitrogen).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

DNMT3A (Gene ID:1788) genini içeren bölgeyi çoğaltmak için gerekli primerler dizayn edildi. Reaksiyonlar, her primerden 5 pmol, 4 ul cDNA örneği ve 1x Fermentas Maxima Hot Start PCR Master Mix kullanılarak 20 ul hacimde gerçekleştirildi. Primer dizileri Tablo 1'de verilmektedir. PCR reaksiyonunun ısı profili: 95°C'de 5 dakika ön inkübasyon, ardından 95°C'de 10 saniye, 59°C'de 5 saniye, 72 °C'de 10 saniye olmak üzere 40 amplifikasyon döngüsü ile gerçekleştirildi.

Tablo 1. DNMT3A Geni Primer Dizisi

Primer dizisi (5'-3')
Dnmt3aF: 5'-CCATAAAGCAGGGCAAAGACC-3'
Dnmt3aR 5'-GAGCGAAGAGGTGGCGGATG-3'

Agaroz jel elektroforezi

PCR sonrası elde edilen ürünleri kontrol etmek amacıyla %2'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA) tamponu içerisinde 100 volt'da 45 dakika yürütülen PCR örneklerinin 195 bp uzunluğundaki

bantları DNA Molecular Weight Marker XII (50bp ladder, Roche) kullanılarak değerlendirildi (12).

Restriksiyon enzim kesimi

R882H bölgesine denk gelen ve DNMT3A bölgesini 130 ve 60 bp olmak üzere iki parçaya kesen AcI I (#R0551S, New England Biolabs) kesim enzimi kullanıldı. R882H mutasyonu bulundurmayan DNMT3A dizilerin enzim tarafından kesilerek jelde çift bant vermesi beklenirken mutasyon bulunduran DNMT3A dizilerinin kesilmeden tek bant vermesi beklenmektedir. Üretici firmanın protokolüne uygun gerçekleştirilen ve 15 µl'de kurulan reaksiyon için 10 µl PCR ürünü, 1 µl AcI I enzimi ve 1,5 µl Cut Smart Buffer kullanıldı (13). Restriksiyon enzim kesimi 37°C 20 dakika, 65°C 20 dakika ısı profili kullanılarak gerçekleştirildi. Enzim kesimi sonrası örnekler %2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi.

DNA dizi analizi

Restriksiyon enzim kesim sonrası Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- örneklerden random 10 örnek seçilerek sekans analizi için DNMT3A PCR primerleri ile birlikte Eurofins Genomics (Germany) sekans analizine gönderildi. R882H kodonundaki mutasyonun varlığını doğrulamak için DNMT3A bölgesinin dizileme işlemi Sanger yöntemi (3130XL, Applied Biosystems) ile yapıldı. DNA dizi analizinde kullanılan primer dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

PCR reaksiyonu daha önceki çalışmamızda olduğu gibi 500 ng cDNA, 0,4 pmol primer, 200 M dNTP, 2 ünite Taq polimeraz (Roche) ve 1X reaksiyon tamponu kullanılarak gerçekleştirildi. PCR reaksiyonunun ısı profili: 95°C'de 5 dakika ön inkübasyon, ardından 95°C'de 10 saniye, 59°C'de 10 saniye 72°C'de 10 saniye olmak üzere 40 amplifikasyon döngüsü ile gerçekleştirildi (14).

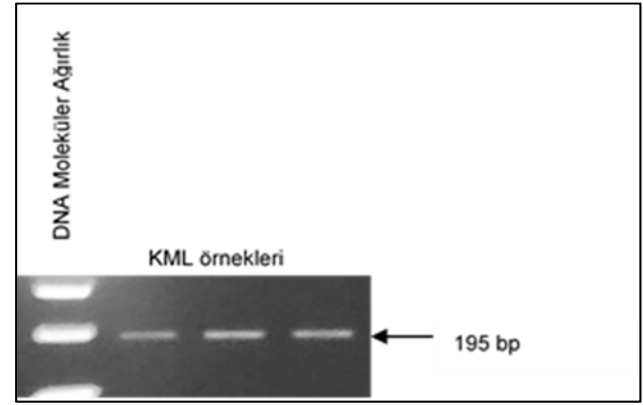
İstatistiksel analiz

Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- KML hastalarında DNMT3A R882H kodonundaki mutasyon görülme sıklığı açısından fark gözlenmediği için, istatistiksel olarak bir değerlendirme yapılmamıştır.

BULGULAR

Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- örneklerde DNMT3A PCR'ının gerçekleştirilmesi

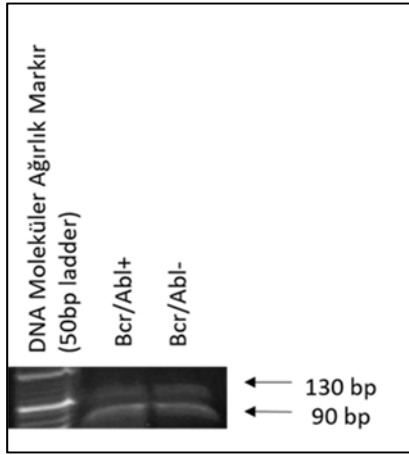
Çalışmaya dâhil edilen 95 hastanın 34'ü (%35,79) kadın, 61'i (%64,21) erkekti. Kadın hastaların yaş ortalamaları 25,15 (±SD:20,49), erkek hastaların yaş ortalamaları 32,19 (±SD:26,53) olarak saptandı. KML ön tanısı ile gelen hasta örneklerinin %36,84'ü Bcr/Abl+, %63,16'sı Bcr/Abl-'ti. Hasta kemik iliği örneklerinden elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak DNMT3A primerleri ile yapılan PCR sonucunda 195 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Şekil1).



Şekil 1. KML örneklerinde DNMT3A primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu.

PCR örneklerinin "AcI" restriksiyon enzim ile kesimi

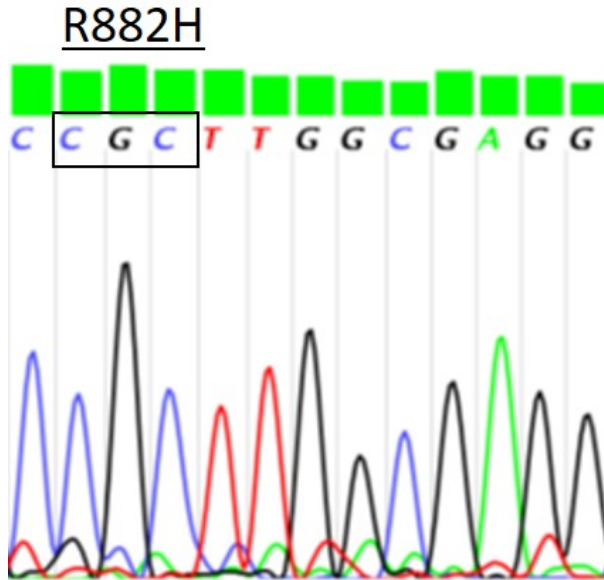
DNMT3A PCR'ı sonrası gerçekleştirilen "AcI" restriksiyon enzim kesimi sonucunda, KML ön tanısı ile gelmiş olan Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- örneklerin R882H mutasyonu taşımadıkları gözlemlendi. Tüm örneklerde AcI restriksiyon enzimi ile muamele sonrasında 90 ve 130 bp olmak üzere çift bant elde edildi.



Şekil 2. Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- örneklerde Acil kullanılarak yapılan restriksiyon enzim kesimi sonucu.

Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- örneklerde R882H mutasyonunun DNA dizi analizi ile değerlendirilmesi

Bcr/Abl+ ve Bcr/abl- örneklerin R882H mutasyonu taşıyıp taşımadıkları random 10 örnek seçilerek Sanger DNA dizi analizi ile de kontrol edildi. Bcr/Abl + ve Bcr/Abl- örneklerin R882H mutasyonunu taşımadıkları gözlemlendi.



Şekil 3. KML örneklerinde R882 mutasyonu için DNA dizi analizi sonucu.

TARTIŞMA

Genom stabilitesinin düzenlenmesinde rol alan DNA metilasyonu birçok hücresel süreçte doğrudan rol oynamaktadır. Son yıllarda, yeni DNA sekanslama tekniklerinin hızlı gelişimi ile DNMT gibi DNA metilasyon düzenleyicileri de dâhil olmak üzere tümör dokularında somatik mutasyonlar içeren genler ortaya konmuştur. Bu genlerden DNMT3A DNA metiltransferazındaki mutasyonlar, Akut miyeloid lösemi (AML) başta olmak üzere, miyelodisplastik sendrom (MDS) ve T-hücresi lenfomaları dahil diğer kanser türlerinde tanımlanmıştır (15).

Erişkin hematolojik malignitelerde DNMT3A mutasyonları sıklıkla lökogenезin erken olayları olarak ortaya çıkmakta ve hücrelere seçim avantajı sağladığı düşünülmektedir (16, 17). DNMT3A mutantlarının DNMT3A üretmeyen HKH popülasyonuna transplante edildiklerinde miyeloid ve lenfoid neoplazmların gelişmesine yol açtığı bildirilmiştir (18, 19). R882H mutasyonunun DNMT3A'nın CpG metilasyon aktivitesini doğrudan azalttığı, anormal DNA metilasyon modellerine neden olabildiği bildirilmiştir (20). R882H mutantlarının polycomb proteinler ile interaksyona girerek hemopoetik ve lösemik kök hücrelerde diferansiyasyonu blokladığı bildirilmiştir (21).

Genellikle heterozigot olan R882H mutasyonunun doğal tip protein üzerinde dominant-negatif bir etki gösterdiği saptanmıştır. Mutant protein, WT DNMT3A ile dimerize olabilir, ancak proteinin esas olarak daha aktif bir formunu içeren tetramerler oluşturamaz (22, 23). Sonuçta ortaya çıkan düşük DNMT3A homotetramerleri, R882 mutasyonları olan hastalarda gözlenen genom çapında hipometilasyon için metiltransferaz aktivitesinde önemli bir azalma ile sonuçlanır (24, 25).

DNMT3A R882H mutasyonunun hematolojik maligniteler üzerindeki etkisi uzun zamandır araştırma konusu olmuştur. Bu mutasyonun hemopoetik hücrelerde gen ekspresyonu ve DNA metilasyonundaki regülasyonu yoluyla kronik miyelomonositik lösemiye neden olduğu bildirilmiştir (26). R882H mutasyonu, AML'de en sık görülen DNMT3A yanlış anlamli mutasyonu temsil etmektedir ve yaşa bağımlı olarak arttığı

bildirilmiştir (27). R882H mutasyonu AML'de oldukça yaygın olmasına rağmen, patojenik mekanizması moleküler düzeyde açıklığa kavuşturulmamıştır (15). DNMT3A mutasyonlarının hematolojik malignitelerdeki önemi bilinmesine rağmen DNMT3A R882H mutasyonunun KML hastalarında varlığına veya KML progresyonuna etkisine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

KML hastalarında DNMT3A mutasyonları ile yapılan çalışmalar incelendiğinde; Schimit ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Bcr/Abl varlığından bağımsız olarak 14 Ph- ve 15 Ph+ KML hastasında, miyeloid hastalıklarda sıklıkla mutasyona uğrayan aralarında DNMT3A'nın da bulunduğu 25 gen incelenmiştir. 1 Ph- hastada C2645G>A mutasyonu ve Ph+ iki hastada ise A741GfsX8 ve Q237X mutasyonları saptanmıştır. Ki ve ark. tarafından 2017 yılında gerçekleştirilen çalışmada ise tirozin kinaz inhibitör tedavisi alan 13 KML hastası ve ikinci bir grupta 100 KML hastası DNMT3A mutasyonları açısından incelenmiştir. 2 hastada DNMT3A'da I705T ve 1122+1G>A mutasyonları saptanmıştır (28,29). Fakat yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda KML'de R882H mutasyonu ile ilgili güncel veriye rastlanmamıştır.

9 ile 22. kromozomların translokasyonu (Bcr/Abl) KML hastalarının neredeyse % 90-95'inde mevcuttur. % 5-8 KML hastasında ise kötü prognoza ilerlemeye neden olan varyant kompleks translokasyonlar bulunmaktadır (30). Bu çalışma ile 95 KML ön tanısı almış Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- olduğunu bildiğimiz bireylerde DNMT3A'nın MTase domaininde sıklıkla karşılaşılan R882H mutasyonu taranmış ve bu hastaların R882H mutasyonunu içermedikleri gözlenmiştir. R882H mutasyonunun Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- hastalar için ayırt edici bir genetik özellik olmadığı ve Bcr-Abl'in pozitif olduğu vakalarda KML gelişimi açısından bu mutasyonun etkili olmadığı ortaya konulmuştur.

DNMT3A mutasyonlarının yapısal ve fonksiyonel sonuçlarının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, bu mutasyonların patolojik etkilerini gösterebilmek açısından önem taşımaktadır (20). Bcr/Abl+ ve Bcr/Abl- KML hastalarında DNMT3A'da gözlenen R882H mutasyonunun

gözlenmemesi bu mutasyonun bazı hematolojik malignitelerin gelişiminde etkili olmadığı ihtimalini ortaya koymaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (2019.KB.SAG.045) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. *Oncologist*. 2000;5(5):405-15.
2. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute. 2009;16: 122-31.
3. Von Bubnoff N, Duyster J. Chronische Myeloische Leukämie - Therapie und Monitoring. *Dtsch Arztebl Int*. 2010; 107: 114-21.
4. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983; 301(5895):89-92.
5. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999;21:163-7.
6. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 1998;19:219-20.
7. Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem*. 2002;277(41):38746-54.
8. Li KK, Luo L-F, Shen Y, Xu J, Chen Z, Chen S-J. DNA Methyltransferases in Hematologic Malignancies. *Semin Hematol*. 2013;50(1):48-60.
9. Ayyanathan K, Lechner MS, Bell P, Maul GG, Schultz DC, Yamada Y, et al. Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable,

- epigenetic gene silencing: A mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* 2003;17(15):1855–69.
10. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KRM, Ozenberger BA, Ellrott K, et al. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project *Nat Genet.* 2013; 45: 1113–20.
 11. Yokochi T, Robertson KD. Preferential methylation of unmethylated DNA by mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *J Biol Chem* 2002;277(14):11735–45.
 12. Drabik A, Bodzoń-Kuśkowska A, Silberring J. Gel Electrophoresis. In: *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads: Second Edition.* Elsevier Inc.; 2016. p. 115–43.
 13. Optimizing Restriction Endonuclease Reactions | NEB [Internet]. New England BioLabs. 2018. Erişim tarihi: 24.11.2020. Erişim adresi: <https://international.neb.com/protocols/2012/12/07/optimizing-restriction-endonuclease-reactions>
 14. Pehlivan M, Caliskan C, Yuçe Z, Sercan HO. Forced expression of Wnt antagonists sFRP1 and WIF1 sensitizes chronic myeloid leukemia cells to tyrosine kinase inhibitors. *Tumour Biol.* 2017;39(5):1010428317701654.
 15. Emperle M, Dukatz M, Kunert S, Holzer K, Rajavelu A, Jurkowska RZ, et al. The DNMT3A R882H mutation does not cause dominant negative effects in purified mixed DNMT3A/R882H complexes. *Sci Rep.* 2018;8(1).
 16. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328–33.
 17. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015 Feb 24 [cited 2020 Nov 17];15(3):152–65.
 18. Mayle A, Yang L, Rodriguez B, Zhou T, Chang E, Curry C V, et al. Hematopoiesis and stem cells: Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. *Blood.* 2015;125(4):629–38.
 19. Celik H, Mallaney C, Kothari A, Ostrander EL, Eultgen E, Martens A, et al. Hematopoiesis and stem cells: Enforced differentiation of Dnmt3a-null bone marrow leads to failure with c-Kit mutations driving leukemic transformation. *Blood.* 2015;125(4):619–28.
 20. Anteneh H, Fang J, Song J. Structural basis for impairment of DNA methylation by the DNMT3A R882H mutation. *Nat Commun.* 2020;11:2294.
 21. Koya J, Kataoka K, Sato T, Bando M, Kato Y, Tsuruta-Kishino T, et al. DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. *Nat Commun.* 2016;7:10924.
 22. Holz-Schietinger C, Matje DM, Reich NO. Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation. *J Biol Chem.* 2012;287(37):30941–51.
 23. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, et al. The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers. *Cancer Cell.* 2014;25(4):442–54.
 24. Meyer SE, Qin T, Muench DE, Masuda K, Venkatasubramanian M, Orr E, et al. DNMT3A haploinsufficiency transforms FLT3ITD myeloproliferative disease into a rapid, spontaneous, and fully penetrant acute myeloid leukemia. *Cancer Discov.* 2016;6(5):501–15.
 25. Yang L, Rodriguez B, Mayle A, Park HJ, Lin X, Luo M, et al. DNMT3A Loss Drives Enhancer Hypomethylation in FLT3-ITD-Associated Leukemias. *Cancer Cell.* 2016;29(6):922–34.
 26. Xu J, Wang YY, Dai YJ, Zhang W, Zhang WN, Xiong SM, et al. DNMT3A Arg882 mutation drives chronic myelomonocytic leukemia through disturbing gene expression/DNA methylation in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2620–5.

27. Elsayed GM, Fahmi AEA, Shafik NF, Elshimy RAA, Abd Elhakeem HK, Attea SA. Study of DNA methyl transferase 3A mutation in acute myeloid leukemic patients. *Egypt J Med Hum Genet.* 2018;19(4):315–9.
28. Kim TH, Tyndel MS, Zhang Z, Ahn J, Choi S, Szardenings M, et al. Exome sequencing reveals DNMT3A and ASXL1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leuk Res.* 2017;59:142–8.
29. Schmidt M, Rinke J, Schäfer V, Schnittger S, Kohlmann A, Obstfelder E, et al. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. *Leukemia.* 2014;28(12):2292–9.
30. Ciftciler R, Saglam EA, Inanc A, Ozcebe O, Haznedaroglu IC. A unique case of complex variant translocation of t(6;9;22)(p22;q34;q11.2), der(19) in a newly diagnosed patient with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet.* 2019;237:78–81.