

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**POLİSİTEMİA VERA ve ESANSİYEL TROMBOSİTOZ  
HASTALARINDA APOPTOTİK YOLAKTA GÖREVLİ GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Gurbet DOĞRU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

MERSİN – 2012

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**POLİSİTEMİA VERA ve ESANSİYEL TROMBOSİTOZ  
HASTALARINDA APOPTOTİK YOLAKTA GÖREVLİ GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Gurbet DOĞRU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP –SBE TBG(GD) 2010-6 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 214

MERSİN – 2012

**Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz Hastalarında Apoptotik Yolakta Görevli Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 07/06/2012



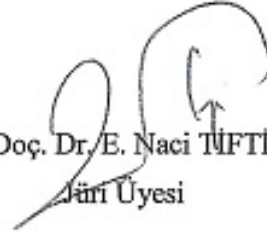
Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

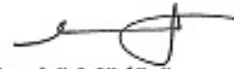
Jüri Üyesi



Doç. Dr. E. Naci NİFTİK

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun...20.06.2012 tarih ve...2012/163 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda özellikle deneysel aşamada karşılaştığım zorluklarda benden akademik desteğini esirgemeyen, Anabilim Dalı Başkanımız, Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Tezimde yer alan hasta ve kontrol gruplarının toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı, ME. Ü. Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalında görev yapmakta olan Doç. Dr. E. Naci TİFTİK ve Dr. Anıl TOMBAK'A, tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. M. Ali SUNGUR'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Ümit KARAKAŞ, Kenan ÇEVİK ve diğer anabilim dallarındaki çalışma arkadaşlarım ile teknik ve idari personele teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, aileme sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>KABUL ve ONAY</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	x
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xi
<b>ÖZET</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİ</b> .....	4
2.1. Hematopoez ve Hematolojik Malignansiler .....	4
2.2. Miyeloproliferatif Malignansiler-Miyeloproliferatif Neoplazm (MPN) .....	4
2.2.1. MPN'nin Sınıflandırılması .....	6
2.2.2. MPN'nin Moleküler Patogenezi .....	9
2.2.3. MPN'lerde Genetik Varyasyonlar .....	10
2.2.4. MPN'lerde Sitogenetik Bulgular .....	10
2.2.5. MPN'lerde Moleküler Genetik Bulgular .....	10
2.2.5.1. Janus Kinaz Sinyal İletimi ve JAK2V617F Mutasyonu .....	10
2.2.5.2. TET2 (Ten-Eleven-Translocation 2) Mutasyonu.....	16
2.2.5.3. ASXL1 (Additional SeX comb Like 1) Mutasyonu .....	18
2.2.5.4. MPL (Myeloproliferative Leukemia Virus) Mutasyonu .....	19
2.2.5.5. LNK (Lymphocyte-specific adapter protein) Mutasyonu .....	20
2.3. Polisitemia Vera .....	22
2.3.1. Epidemiyoloji .....	22
2.3.2. Tarihçe.....	22

2.3.3. Patofizyoloji .....	23
2.4. Esansiyel Trombositoz .....	26
2.4.1. Epidemiyoloji .....	26
2.4.2. Patofizyolojisi.....	26
2.5. Apoptoz.....	27
2.5.1. Apoptozun Biyokimyasal ve Morfolojik Özellikleri .....	29
2.5.2. Apoptozun Morfolojik Özellikleri.....	30
2.5.3. Apoptozun Moleküler Mekanizması.....	31
2.5.3.1. Ekstrinsik Yolak (Reseptör Aracılı Apoptozis .....	32
2.5.3.2. İntrensik Mitokondriyal Yolak .....	34
2.5.4. Apoptozun Moleküler Regülatörleri Olarak BCL-2 Familyası.....	37
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>42</b>
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	42
3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	42
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	43
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler .....	44
3.1.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler .....	44
3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması .....	45
3.3. Real Time PCR Yöntemiyle Moleküler Genetik Analizi.....	45
3.3.1. DNA İzolasyonu .....	45
3.3.1.1. Miller Tuz Çöktürme Yöntemi .....	45
3.3.2. Genotiplerin Belirlenmesi .....	46
3.3.2.1. SNP Özellikleri .....	47
3.3.2.2. Real Time-PCR Reaksiyon Ortamı .....	49
3.3.2.3. Real Time-PCR Reaksiyon Şartları .....	49
3.4. İstatistiksel Analiz .....	50
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>51</b>
4.1. Real Time-PCR Analiziyle İlgili Bulgular .....	51
4.2. PV ve ET Görülme Oranlarının Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı .....	54
4.3. Fas -670 G>A (rs1800682) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu İle Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi .....	55

4.4. FAS -1377 G>A (rs2234767) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu İle Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET ile İlişkisi .....	57
4.5. FASL IVS2 -124 A>G (rs5030772) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu İle Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi .....	58
4.6. BAX -248 G>A (rs464878) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu İle Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi .....	60
4.7. BCL2 -938 C>A (rs2279115) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu İle Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi .....	62
4.8. FAS -670 G>A rs1800682, FAS -1377 G>A rs2234767, FASL IVS2 -124 A>G rs5030772, BAX -248 G>A rs4645878 ve BCL2 -938 C>A rs2279115 polimorfizmlerine ait genotip oranlarının hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı .....	64
<b>5.TARTIŞMA</b> .....	66
<b>6.SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	75
<b>7.KAYNAKLAR</b> .....	76
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	89

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hematopoezin biyolojik şeması .....	5
Şekil 2.2. Miyeloproliferatif hastalıklar ile AML'ye dönüşüm arasındaki ilişki .....	6
Şekil 2.3. Miyeloproliferatif Hastalıkların Sınıflandırılması .....	8
Şekil 2.4. MPN'lerin Moleküler Patogenezi ile ilgili bir Model.....	9
Şekil 2.5. JAK geninin yapısal organizasyonu .....	11
Şekil 2.6. JAK/STAT sinyal iletiminin standart şeması.....	12
Şekil 2.7. STAT molekülünün yapısal organizasyonu.....	13
Şekil 2.8. JAK/STAT aracılı Sinyal iletimi .....	14
Şekil 2.9. JAK1, JAK2, JAK3 genlerinin etkileşime girdikleri Sitokin reseptörleri	15
Şekil 2.10. JAK2V617F Mutasyonunun JAK gen yapısındaki yerleşimi.....	15
Şekil 2.11. Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinde TET gen fonksiyonu .....	16
Şekil 2.12. MPN'lerde görülen TET2 gen mutasyon çeşitleri .....	18
Şekil 2.13. MPN'lerde görülen ASXL1 gen mutasyonları .....	18
Şekil 2.14. MPN'lerde görülen MPL gen mutasyonu.....	19
Şekil 2.15. MPL geninin 10. ekzonunda meydana gelen mutasyonlar .....	20
Şekil 2.16. MPN'lerde mutasyonların hedef aldığı mekanizma ve yollar.....	21
Şekil 2.17. Polisitemia Vera hastalık tarihinde dönüm noktası sayılan gelişmeler	23
Şekil 2.18. Eritropoez mekanizması ve eritrosit oluşumu .....	24
Şekil 2.19. Hücre ölümünün sınıflandırılması.....	28
Şekil 2.20. <i>C.Elegans</i> modelinde Hücre ölüm mekanizmasının temel komponentleri .....	29
Şekil 2.21. Apoptozun Morfolojik ve Biyokimyasal oluşum fazları .....	30
Şekil 2.22. Apoptotik hücrede görülen morfolojik değişiklikler .....	31
Şekil 2.23. Apoptotik hücre ölüm çeşitlerinin şematik gösterimi.....	32
Şekil 2.24. Apoptoz mekanizmasının Ekstrinsik ve İntrinsik yollarının şematik görünümü .....	34
Şekil 2.25. Mitokondriyel apoptotik sinyal yolağı.....	35
Şekil 2.26. Apoptoz mekanizmasının ölüm reseptörleri ve Bcl 2 gen ailesi ile kontrolü .....	36



<b>Şekil 2.27.</b> Bcl 2 gen ailesinin korunmuş domainlerine göre sınıflandırılması.....	38
<b>Şekil 2.28.</b> Bcl 2 ve Bax proteinlerinin X-ışını kristallografisine göre 3 boyutlu yapıları .....	39
<b>Şekil 2.29.</b> Sağlıklı ve apoptotik hücrede mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin gösterimi .....	41
<b>Şekil 3.1.</b> FAS -670 G>A rs1800682 çoğaltılan bölge .....	47
<b>Şekil 3.2.</b> FAS -1377 G>A rs2234767 çoğaltılan bölge .....	47
<b>Şekil 3.3.</b> FASL IVS2 -124 A>G rs5030772 çoğaltılan bölge .....	48
<b>Şekil 3.4.</b> BAX -248 G>A rs464878 çoğaltılan bölge .....	48
<b>Şekil 3.5.</b> BCL2 -938 C>A rs2279115 çoğaltılan bölge .....	49
<b>Şekil 4.1.</b> Real-Time PCR analizi ile, VIC ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerin, Fas -670 bölgesindeki GG homozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya) .....	52
<b>Şekil 4.2.</b> Real-Time PCR analizi ile, VIC ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerin, Fas -670 bölgesindeki AG heterozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya) .....	52
<b>Şekil 4.3.</b> Real-Time PCR analizi ile, VIC ile işaretlenen "A", FAM ile işaretlenen "G" nükleotidlerin, Fas -670 bölgesindeki AA homozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya).....	53
<b>Şekil 4.4.</b> Fas -670 G>A (rs1800682) Polimorfizmine ait genotip oranlarının kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı .....	56
<b>Şekil 4.5.</b> FAS -1377 G>A (rs2234767) Polimorfizmine ait genotip oranlarının kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı .....	58
<b>Şekil 4.6.</b> FASL IVS2 -124 A>G (rs5030772) Polimorfizmine ait genotip oranlarının kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı.....	60
<b>Şekil 4.7.</b> BAX -248 G>A (rs464878) Polimorfizmine ait genotip oranlarının kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı .....	62
<b>Şekil 4.8.</b> Bcl 2 -938 C>A (rs2279115) Polimorfizmine ait genotip oranlarının kontrol grubu ile PV ve ET hasta arasındaki dağılımı .....	64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> PV ve ET hastalıklarında cinsiyet ve yaş ortalamalarına göre dağılımı .....	54
<b>Çizelge 4.2.</b> Hasta ve Kontrol gruplarına göre yaş ortalama dağılımı .....	54
<b>Çizelge 4.3.</b> FAS -670 polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve hasta grubu arasındaki dağılımı .....	56
<b>Çizelge 4.4.</b> FAS -1377 polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve hasta grubu arasındaki dağılımı .....	57
<b>Çizelge 4.5.</b> FAS L IVS -124 polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve hasta grubu arasındaki dağılımı .....	60
<b>Çizelge 4.6.</b> BAX -248 polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve hasta grubu arasındaki dağılımı .....	62
<b>Çizelge 4.7.</b> BCL 2 -938 polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve hasta grubu arasındaki dağılımı .....	64
<b>Çizelge 4.8.</b> FAS -670 G>A, FAS -1377 G>A, FASL IVS2 -124 A>G, BAX -248 G>A ve BCL 2 -938 C>A polimorfizmlerine ait genotip oranlarının hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı .....	64

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABL</b>	Abelson Leukemia
<b>AIF</b>	Apoptoz Uyarıcı Faktör
<b>AML</b>	Akut Miyeloid Lösemi
<b>Apaf-1</b>	Apoptosis Protease Activating Factor-1
<b>ASXL1</b>	Additional Sex comb Like 1
<b>Bad</b>	Bcl 2-associated agonist of cell death
<b>Bak</b>	Bcl 2-antagonist/killer
<b>Bax</b>	Bcl 2 associated X protein
<b>BCL 2</b>	B-Cell CLL/Lymphoma
<b>BCL-XL</b>	BCL-X long form
<b>BCR</b>	Breakpoint Cluster Region
<b>BFU-E</b>	Burst forming unit-eritroid
<b>BID</b>	BH3-interacting domain agonis
<b>BIK</b>	BCL2-interacting killer;
<b>BIM</b>	BCL2-interacting mediator
<b>BMF</b>	BCL2-modifying factor
<b>CARD</b>	Caspase-Activating Recruitment Domain
<b>CBL</b>	Kronik Bazofilik Lösemi
<b>CBL</b>	Casitas B-lineage lymphoma protooncogen
<b>CEL/HES</b>	Kronik Eozinofilik Lösemi/ Hipereozinofilik Sendrom
<b>CFU-E</b>	Colony forming unit-eritroid
<b>GEMM</b>	Granülosit-Eritrosit-Monosit-Megakaryosit
<b>CMPD</b>	Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar
<b>CNL</b>	Kronik Nötrofilik Lösemi
<b>CMML</b>	Kronik Miyelomonositik Lösemi
<b>dATP</b>	Deoksi adenzin trifosfat
<b>DED</b>	Ölüm Etkinlik Alanı
<b>DISC</b>	Death İnducing Signalling Complex
<b>DIABLO</b>	Direct IAP Binding Protein With Low pI
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit

<b>EPO</b>	Eritropoietin
<b>EPOR</b>	Eritropoietin Reseptör
<b>ERK</b>	Ekstraselüler Sinyal Regülâtör Kinaz
<b>ET</b>	Esansiyel Trombositoz
<b>EZH2</b>	Enhancer of zeste homolog 2
<b>FADD</b>	Fas-associated death domain
<b>G-CSF</b>	Granülosit Stimüle Edici Faktör
<b>GM-SCF</b>	Granülosit Makrofaj Stimüle Edici Faktör
<b>HSC</b>	Hematopoietic Stem Cell
<b>ICAD</b>	Inhibitor of caspase- activated deoxyribonuclease
<b>IDH1/2</b>	Isocitrate Dehydrogenase 1 ve 2
<b>GF-I</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>IKZF1</b>	Ikaros Zinc Finger 1
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>JAK</b>	Janus Kinaz
<b>JMML</b>	Juvenil Miyelomonositik Lösemi
<b>KML</b>	Kronik Miyeloid Lösemi
<b>LNK</b>	Lenfosit Spesifik Adaptör Protein
<b>M</b>	Molar
<b>MCL1</b>	Myeloid cell leukemia 1
<b>MDS</b>	Miyelodisplastik sendrom
<b>Mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>MOMP</b>	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
<b>MPL</b>	Myeloproliferative leukemia virus oncogene
<b>MPLV</b>	Miyeloproliferatif Lösemi Virüs
<b>MPN</b>	Miyeloproliferatif Neoplazm
<b>MPTP</b>	Mitokondiriyal geçirgen transisyon por
<b>mTOR</b>	Mammalian Target Of Rapamycin
<b>NF1</b>	Neurofibromatosis-1
<b>NK</b>	Naturel Killer
<b>NOXA</b>	Proapoptotic BH3-only member of the BCL2 protein family

<b>OMM</b>	Outer Mitochondrial Membrane
<b>PARP</b>	Poli (ADP-riboz) polimeraz
<b>PCD</b>	Programmed Cell Death
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol3-kinase
<b>PH</b>	Philedelphia translokasyonu
<b>PHD</b>	Plant Homeo Domain
<b>PMF</b>	Primer Miyelofibrozis
<b>PUMA</b>	p53-up-regulated modulator of apoptosis
<b>PV</b>	Polisitemia Vera
<b>SCLL</b>	Kök Hücre Lösemileri Lenfoma Sendromu
<b>SHP-1</b>	SH2 phosphatase 1
<b>SM</b>	Sistemik Mastositozis
<b>SMAC</b>	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
<b>STAT</b>	Sinyal dönüştürücüler ve transkripsiyon aktivatör proteinleri
<b>TAD</b>	Transkripsiyon aktivasyon bölgesi
<b>TET</b>	Ten-Eleven-Translocation
<b>TNF-R1</b>	Tumor Necrosis Factor-Receptor Type I
<b>TRAAD</b>	TNF receptor-associated protein with death domain
<b>TRAIL-R1</b>	Tumor Necrosis-Factor related inducing ligand-Receptor
<b>TPO</b>	Tip 1 Trombopoietin
<b>µl</b>	Mikrolitre

## ÖZET

### Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz Hastalarında Apoptotik Yolakta Görevli Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Miyeloproliferatif neoplazmlar (MPN), hematopoietik kök hücre transformasyonundan kaynaklandığı düşünülen Polisitemia Vera (PV), Esansiyel Trombositoz (ET), Primer miyelofibrozis (PMF) ve Kronik Myeloid Lösemi (KML)'nin dahil olduğu, olgun ve fonksiyonel kan hücrelerinin aşırı üretimiyle karakterizedir. Apoptozis, tüm kanserlerde hatalı ya da baskılanmıştır. Bu sayede; kanserli hücreler ölümsüzlük ve kemoterapi ya da radyoterapiye direnç kazanır. Apoptoz hematopoietik hücre hatlarında en önemli homeostatik mekanizmalardan biridir. Bu nedenle çalışmamızda apoptozda görevli Bcl 2, Bax, Fas ve Fas Ligand genlerinde polimorfizmlerin saptananarak PV ve ET hastalıklarıyla ilintisinin araştırılması planlandı.

Bu çalışmada; Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı polikliniklerinde PV ve ET tanısı almış 93 birey hasta, 93 sağlıklı birey ise kontrol grubu olarak alındı. Her iki gruba ait kan örneklerinden DNA izolasyonunu takiben Bcl 2, Bax, Fas ve Fas L için, Real-Time PCR (Applied Biosystems) kullanılarak genotipler belirlendi.

Elde edilen veriler, SPSS v.11.5 paket programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. FAS -670 (G>A rs1800682), FAS -1377 (G>A) rs2234767, FASL IVS2 -124 (A>G rs5030772), BAX -248 (G>A rs4645878) ve BCL 2 -938 (C>A rs2279115) polimorfizmlerinin kontrol grubundaki bireyler ile PV ve ET'li hastalara ait genotip sıklıkları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ( $p<0,05$ ).

Sonuç olarak; PV ve ET patogeneğinde; FAS -670 (G>A), FAS -1377 (G>A), FASL IVS2 -124 (A>G), BAX -248 (G>A) ve BCL 2 -938 (C>A) polimorfizmlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Bu çalışmanın; PV ve ET hastalıklarında apoptotik yolakta görevli gen polimorfizmlerini inceleyen ilk çalışma olması nedeni ile bu konuyla ilgili yapılacak diğer çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Polisitemia Vera, Esansiyel Trombositoz, Real Time PCR, Apoptotik gen polimorfizmi

## ABSTRACT

### **The Research of Gene Polimorphisms That Commissioned at Apoptotic Pathway in Patients of Polycythemia Vera and Essential Trombocythosis**

The Myeloproliferative neoplasms (MPN), are characterized with excessive production of mature and functional blood cells which thought to be originated from hematopoietic stem cell transformation, in Polycythemia Vera (PV) Essential Trombocythosis (ET), Primer myelofibrosis (PMF) and Chronic Myeloid Leukemia (CML).

Apoptosis, is faulty or printed in all cancers. So, cancerous cells gain immortality or strenght against chemotherapy or radiotherapy. Apoptosis is one of the most important homeostatic mechanisms in hematopoietic cell lines. For that reason; in our study by detection of polymorphisms in Bcl-2, Bax, Fas ve Fas Ligand genes which are commissioned at apoptosis, the research of correlation with PV and ET diseases is planned.

In that sudy, in policlinics of Mersin University Medical Faculty Hematology Department 93 individuals who have taken PV and ET diagnosis have accepted as patients and 93 healthy individuals as control group. From both of the groups' blood samples sequent of DNA isolation the genotypes detected by using Real-Time PCR (Applied Biosystems) for Bcl-2, Bax, Fas and Fas L.

The acquired data, evaluated statistically by SPSS v.11.5 packet program. It has detected not to be meaningful difference in genotype frequency between the individuals of FAS -670 (G>A rs1800682), FAS -1377 (G>A) rs2234767, FASL IVS2 -124 (A>G rs5030772), BAX -248 (G>A rs4645878) and BCL 2 -938 (C>A rs2279115) polimorphisms' control group's and PV and ET patients' ( $p<0,05$ ).

As a result; in PV and ET pathogenesis it has detected the FAS -670 (G>A), FAS -1377 (G>A), FASL IVS2 -124 (A>G), BAX -248 (G>A) and BCL 2 -938 (C>A) polimorphisms not to be statistically meaningful. That study is thought to be a guide for other studies about this subject because this is the first study inspects polimorphism genes commissioned in apoptotic pathway of PV and ET patients.

**Key words:** Polycythemia Vera, Essential Trombocythosis, Real Time PCR, Polymorphism of Apoptotic Gene.

# 1. GİRİŞ

Miyeloproliferatif hastalıklar, heterojen bir hastalık grubu olmakla birlikte, multipotent kök hücrelerin bir veya birkaç kan hücre serisinde aşırı çoğalması ile karakterize hastalıklardır. Kök hücrelerden köken alan miyeloid hematolojik malignansi sınıfına girerler ve bir veya daha fazla hematopoietik hücre hattının aşırı çoğalımı, kemik iliği hipersellüleritesi ile karakterizedir. Genellikle yetişkinlerde görülürler, yıllık insidansı bir milyon kişide 5-10 olgu şeklindedir. Klonal miyeloproliferatif hastalıklar (MPN) klasik ve atipik olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Klasik MPN'ler; Philedelphia (Ph) translokasyonu ve Bcr-Abl (Breakpoint Cluster Region- Abelson proto-onkogeni) füzyon geni taşıyan, Ph (+) kronik myeloid lösemi (CML) atipik MPN'ler ise Philedelphia (Ph) translokasyonu ve Bcr-Abl füzyon geni taşımayan Ph (-); Polisitemia Vera (PV), Esansiyel Trombositoz (ET) ve Primer Miyelofibrozis (PMF)' ten oluşur (1-3).

Polisitemia Vera (PV) klonal, herhangi bir uyarandan bağımsız olarak başta eritrosit olmak üzere, kemik iliğinin her üç serisine ait hücrelerin (eritrosit, granülosit ve trombosit) fenotipik olarak normal fakat kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize malign bir hastalıktır. PV insidansı yılda 2 /100000 olgu kadardır. Erkeklerde biraz daha sık gözlenmektedir (yaklaşık %60). Her yaşta görülebilmesine rağmen, ortalama görülme yaşı 55-60 olup, yaş ilerledikçe görülme insidansı artmaktadır (4-6).

Esansiyel Trombositoz (ET), kemik iliğinde megakaryositlerin aşırı proliferasyonu ve kanda trombosit sayısında artışla karakterize, kökeni bilinmeyen, monoklonal bir miyeloproliferatif hastalıktır. Epidemiyolojik çalışmalarda hastalığın insidansı, yılda 1,5-2.0/100000 olgu olarak saptanmıştır. Ortalama tanı yaşı 55-60 olup, hastalığa yakalanma açısından, kadınlarda erkeklere oranla yaklaşık 2 kat fazladır (7).

Apoptoz veya programlı hücre ölümü, doku homeostazisi ile gelişimde kritik rol oynayan, önemli bir fizyolojik olaydır. Hücre ölümü, hücrelerin fizyolojik, patojenik veya sitotoksik uyarılara maruz kaldıklarında meydana gelir. Apoptozun ana fiziksel ve biyokimyasal belirteçlerinden bazıları: plazma membran dışına fosfatidilserin translokasyonu, hücre küçülmesi (büzülmesi), nükleer kondenzasyon, kromatin agregasyonu, apoptotik cisimciklerinin oluşumu, DNA'nın endonükleolitik degradesyonudur. Bu gibi hücre ölüm mekanizmaları; çok hücreli organizmalarda



oluşur ve embriyonik gelişim ve morfogenez, aşırı hücre çoğalması ve proliferasyonu, inflamatuvar reaksiyonlar gibi fizyolojik olaylarda önemli rol oynar. Apoptozda; hücre yüzey ve ölüm reseptörlerine gereksinim duyan ekstrinsik yolak, mitokondriyal kaynaklı intrinsik yolak ve sitotoksik-T hücre aracılı perforin/granzim B yolağı olmak üzere 3 yolak işlev görmektedir (8-10).

Ekstrinsik yolak hücre yüzey reseptörlerine sinyal proteinlerin bağlanmasıyla başlar. Fas L (Fas Ligand) hücre yüzey reseptörü olarak görev alır ve TNF (Tumor Necrosis Factor) reseptör ailesine aittir. Tip II membran proteini olarak sentezlenir. Yoğun olarak aktive olmuş T lenfositleri ve natural killer (NK) hücrelerinde eksprese olur. Yolakta FasL, Fas 'a bağlanarak apoptozu indükler. Fas (CD95/APO-1), TNF reseptör ailesine ait, tip I membran proteini. Fas aktive olduğunda FADD (Fas – associated-protein with death domain) adaptör molekülün C-(karboksi) terminal bölgesi Fas'ı toplar ve ölüm domainleri arasındaki etkileşimlerle Fas'ı bağlar. N-(amino) terminal bölgesi DED (Death Effector Domain) prokaspaz 8'i bağlar ve downstream sinyal iletimini sağlar, DISC (Death Inducing Signal Complex) kompleksi oluşur, prokaspaz 8 ve 10 aktif kaspazlar haline gelir ve hedef hücre apoptoza uğrar (11-13).

İntrinsik yolak; mitokondriyal apoptotik yolak olarakta adlandırılır ve çoğunlukla Bcl 2 (B Cell CLL//Lymphoma-2) aile üyeleri tarafından düzenlenir. Bu gen ailesi, programlı hücre ölümünün düzenleyicileri ve kritik efektörleridir. Bcl 2; mitokondri dış membranının permeabilitesini değiştirerek, mitokondriden cyt c (sitokrom c) gibi apoptotik proteinlerin salınımını düzenleyen önemli bir protein ailesidir. 3 alt gruba ayrılırlar. **1)** Bcl-2, Bcl-xL (Bcl-X long form) gibi üyeleri içeren, mitokondri dış membranıyla ilişkili ve mitokondriyal bütünlüğü sağlayan antiapoptotik üyelerdir, BH1, 2, 3, 4 domainleri içerirler. Bunların ana rolü; mitokondri membran bütünlüğünü sağlamak, cyt c salınımını ve Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor)'in bağlanmasını önlemek ve kaspaz 2 gibi kaspaz başlatıcıların inaktivasyonunu sağlayarak apoptozu durdurma. **2)** Bax (Bcl 2-associated X protein), Bak (Bcl 2-antagonist/killer) gibi üyeleri içeren ve sitozolde yerleşik, apoptoz sırasında membran bütünlüğü bozan proapoptotik üyelerdir. BH1,2,3 domainlere sahiptirler, genellikle BH4 amino terminal domainleri yoktur. **3)** Bad (Bcl 2-associated agonist of cell death), Bim (Bcl-2 interacting mediator ), PUMA (p53-up-regulated modulator of apoptosis), NOXA (Proapoptotic BH3-only member of the Bcl 2 protein family) gibi proapoptotik

BH3-only proteinlerdir. Mitokondriyel apoptoz; Bcl 2 gen ailesinin bu alt gruplarının homoloji gösteren domainlerinin birbirleriyle etkileşimiyle düzenlenir. İntrinsik yolda; bir ölüm sinyali takiben sitozolde bulunan Bax proteini, mitokondriye transloke olur ve integral membran proteini haline gelir. Daha sonra homo-oligomerler oluşturarak mitokondri membranında geniş porlar oluşturur, bu porlar apoptozda rol alan cyt c ve dATP (kaspaz 9 aktivatörleri) moleküllerin salınımını sağlar. cyt c salındıktan sonra; sırasıyla kaspaz 9 ve kaspaz 3'ü aktive eden Apaf-1'in bağlanmasıyla, apoptozom yapısı oluşur. dATP'nin hidroliziyle apoptozom yapısı aktifleşir. Kaspaz 3, ICAD (Inhibitor of Caspase Activation)'ı yıkar ve bunun sonucunda, DNA degradasyonu ve fragmantasyonu gerçekleşir (14-16).

Bu araştırmada, hematolojik malignansilerden Miyeloproliferatif hastalık grubuna dahil olan Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz'da apoptotik yolda görevli genlerde, polimorfizmlerin saptanması ve saptanan bu polimorfizmler ile hastalıklar arasında herhangi bir ilinti olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir. Şu ana kadar literatürde; PV ve ET hastalarında apoptotik yolla ilgili gen polimorfizmlerine ilişkin araştırma bulunmaması ise çalışmamızı bu konuda özgün yapmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Hematopoez ve Hematolojik Malignansiler

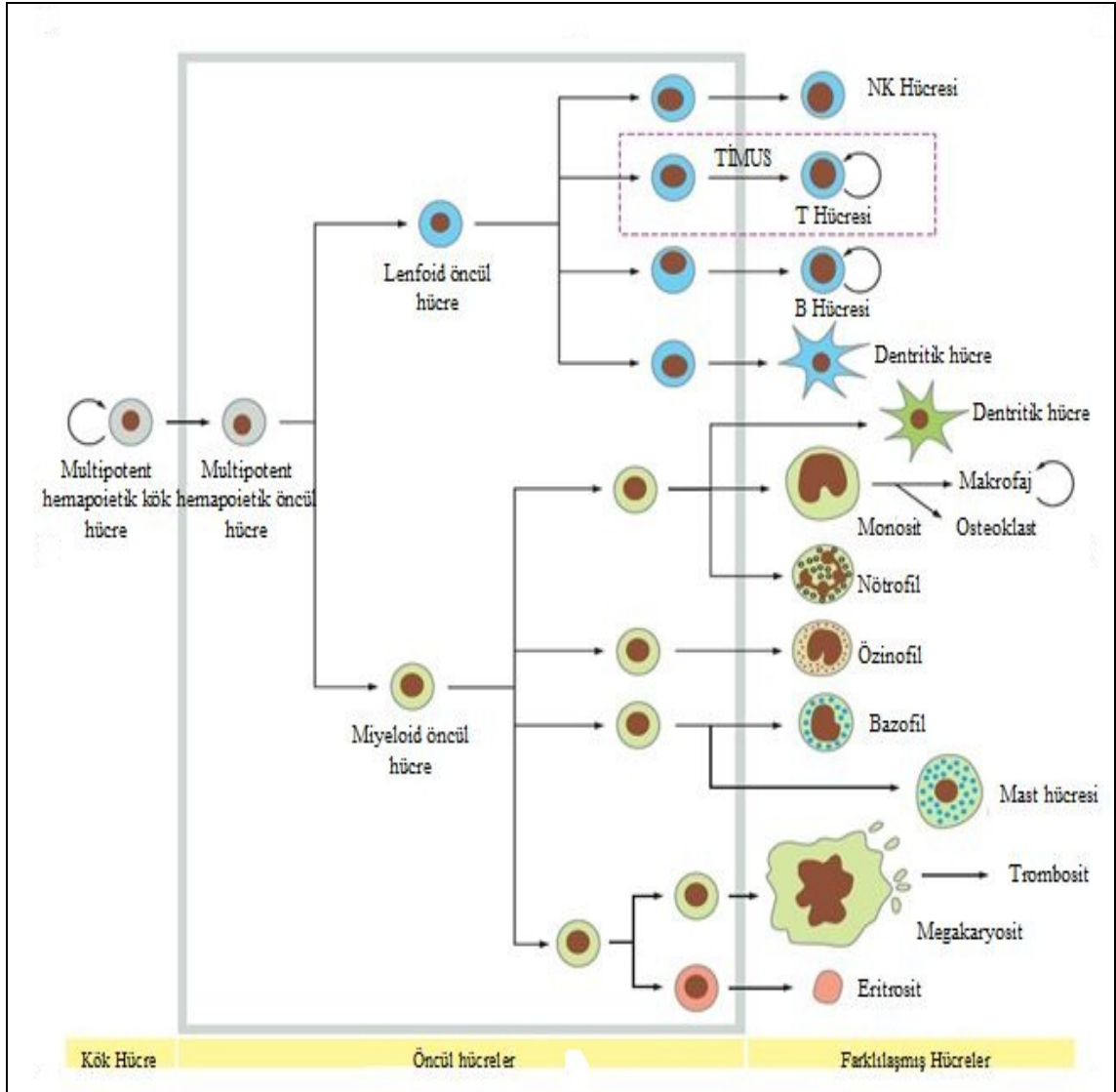
Hematopietik hücreler, ortak bir multipotent kök hücreden köken alırlar. Hematopietik kök hücreler; öncelikle miyeloid ve lenfoid olmak üzere iki farklı hücre serisine farklılaşır. Bu biyolojik süreç, hematopoez olarak adlandırılır. Hematopoez; uygun büyüme faktörlerinin varlığında, periferik kan hücrelerini (olgun lenfositler, granülositler, monositler, eritrositler ve megakaryositler/trombositler gibi) oluşturur (Şekil 2.1). Hematopietik hücrelerin malign transformasyonu sonucu ise, hematolojik malignansiler gözlenir (17).

Hematolojik malignansiler; kan, kemik iliği ve lenf nodlarını etkileyen neoplazmlardır. Miyeloid ve lenfoid hücre serisi olmak üzere bir veya iki farklı hücre serisinden köken alırlar. Lenfoid hücre serileri, normal hematopoez sürecinde; B, T, NK hücrelerine farklılaşır. Lenfoid hücre serilerindeki anomaliler; lenfoma, lenfositik lösemi ya da miyelomaya neden olurlar. Normal hematopoez sürecinde miyeloid hücre serilerinden ise eritrosit, trombosit, granülosit, mast hücreleri ve makrofajlar farklılaşır. Miyeloid hücre serilerindeki anomaliler ise; akut ve kronik miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendromlar veya miyeloproliferatif hastalıklara neden olurlar (18, 19).

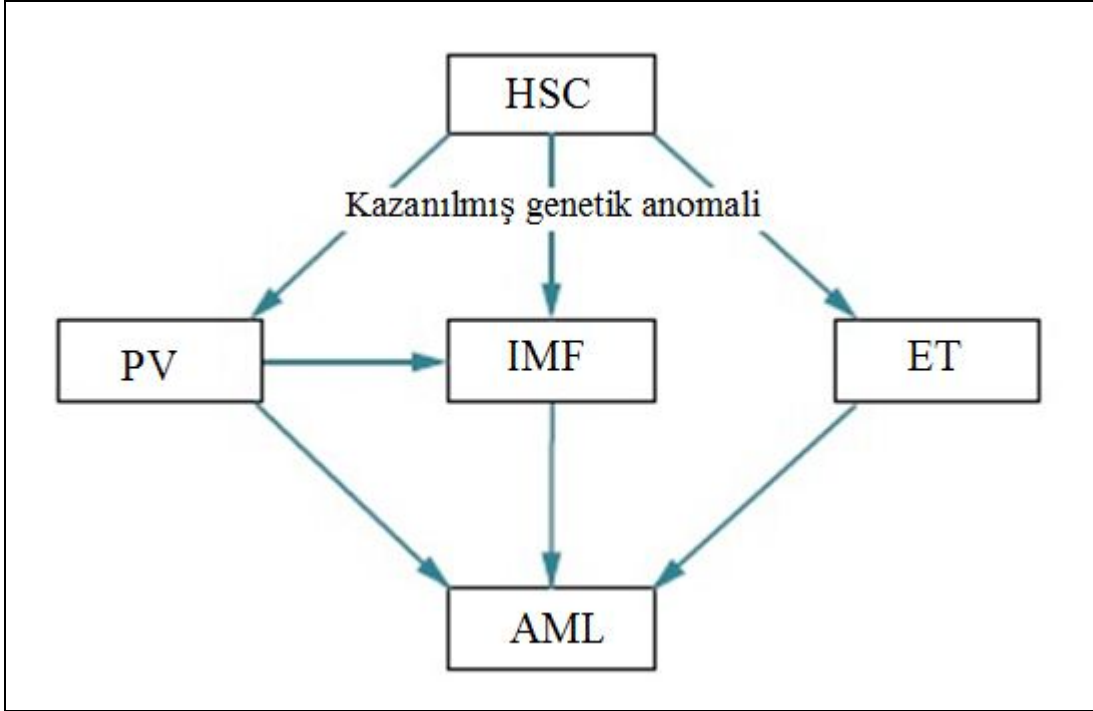
### 2.2. Miyeloproliferatif Malignansiler-Miyeloproliferatif Neoplazm (MPN):

MPN; miyeloid serideki (eritroid, granülositik, megakaryositik, monositik/makrofaj ya da mast hücreleri) bir ya da birden fazla hücre tipinin, kontrolsüz çoğalımı ile karakterize, klonal hematopietik kök hücre hastalığıdır. Bu kontrolsüzlük, kök/atasal hücre düzeyinde meydana gelen, genetik anomalilerin bir sonucu olarak değerlendirilmektedir. MPN; klinik olarak, farklı kategorideki hematolojik malignansilerle nadir olarak karıştırılabilir ama aynı zamanda löseminin bir önceki basamağı (prelösemik) olarak da düşünülebilir. Hastaların küçük bir bölümünde Akut Miyeloid Lösemiye (AML) geçiş olabilmektedir (Şekil 2.2). MPN, hematolojik

malignansiler arasında, nispeten daha nadir gözlenip, yıllık insidansı bir milyon kişide 5-10 olgu şeklindedir. Bazı olgular tesadüfen tanı alırken, %25 kadarı ise tanı anında asemptomatiktir. Ortalama 40-50 yaş aralığındaki yetişkinlerde gözlenmekle birlikte, 60 yaş ve üzerinde görülme sıklığı da oldukça yüksektir (20-22).



Şekil 2.1. Hematopoezin biyolojik şeması (17)



Şekil 2.2. Miyeloproliferatif hastalıklar ile AML'ye dönüşüm arasındaki ilişki (**HSC**: Hematopoietik Kök Hücre, **PV**: Polisitemia Vera, **ET**: Esansiyel Trombositoz, **IMF**: İdiyopatik Miyelofibrozis, **AML**: Akut Miyeloid Lösemi) (22)

### 2.2.1. MPN'nin Sınıflandırılması

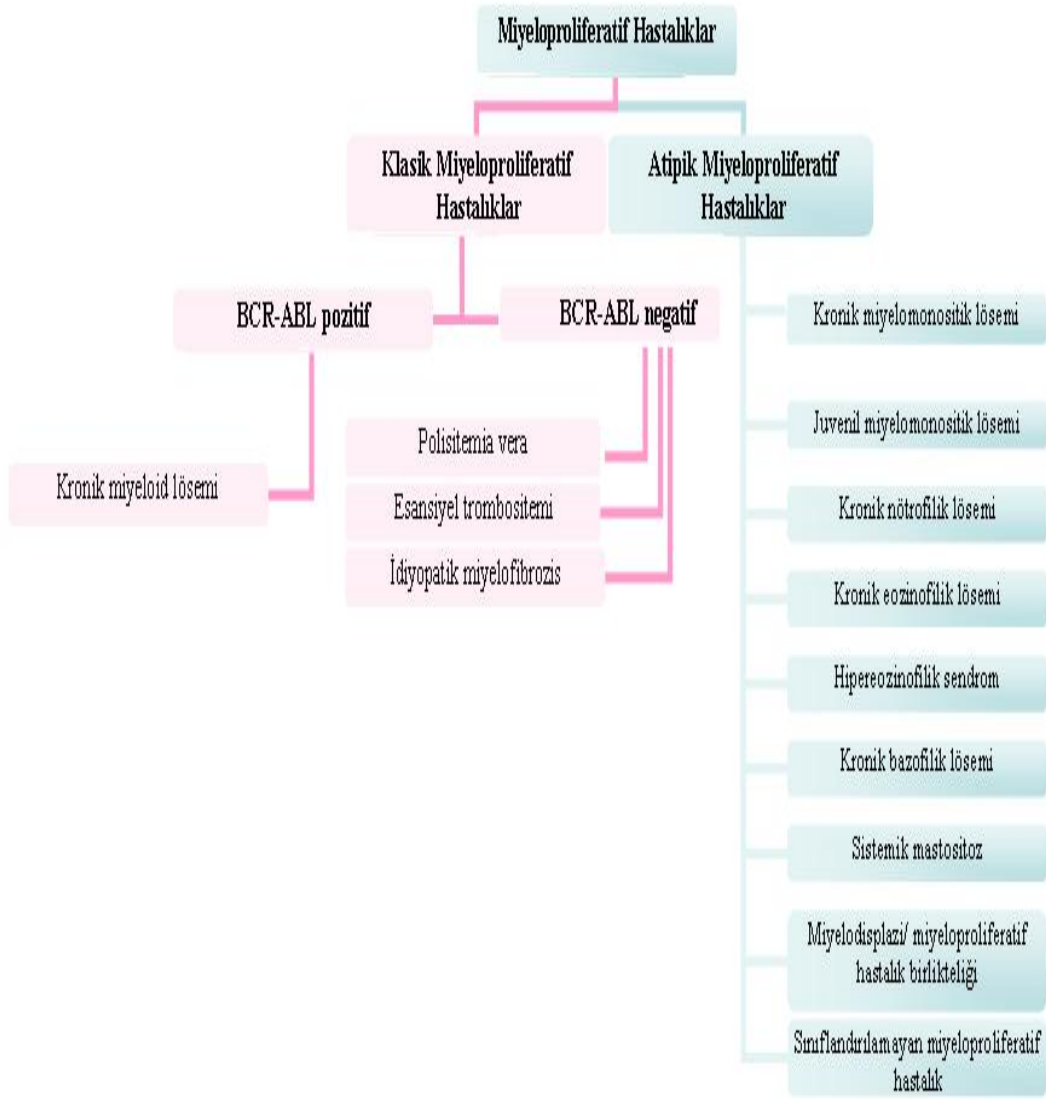
MPN'ler ilk defa 1951'de William Dameshek tarafından miyeloproliferatif hastalıklar (MPD) adı altında Polisitemia Vera (PV), Esansiyel Trombositoz (ET), Primer Miyelofibrozis (PMF) ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML) olmak üzere 4 sınıfa ayrılmıştır (23,24). Dameshek, bu hastalıkların bir multipotent kök hücreden kaynaklandıklarını, olgun kan hücrelerinin aşırı üretimi ve birikimiyle, birbirlerine benzer klinik özellikler taşıdıklarını ve her birinin diğerine dönüşebilme yeteneğine sahip olmak üzere benzerlik gösterebildiklerini belirtmiştir (25). 1960 yılında Novell ve Hungerford, KML'de Philedelphia kromozomunu tanımlamış, böylece KML, sitogenetik belirteci olan ilk miyeloproliferatif hastalık olmuştur. 1980'li yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesiyle, Philedelphia kromozomu üzerine yerleşmiş spesifik onkogenik mutasyon, Bcr-Abl (Breakpoint Cluster Region- Abelson proto-onkogeni) füzyon transkripti t(9;22)(q34;q11) tanımlanmış, bu bulgu daha sonra MPN'lerin Bcr-Abl (+), Bcr-Abl (-) miyeloproliferatif hastalıklar olmak üzere iki alt sınıfa

ayrılmalarına neden olmuştur (2, 23,26).

MPN 'ler kemik iliği ve kanda bir veya daha fazla hücre hattından köken alan (eritroid, granülosit, megakaryosit, monosit/makrofaj veya mast hücreleri) olgun miyeloid hücrelerin anormal çoğalması ve birikimiyle karakterize hastalıklardır. Benzer klinik özelliklere sahip olmalarına rağmen, farklı etiyolojik özellikler ve genetik mutasyonlar taşımaktadırlar (2, 27). Bu yüzden de sınıflandırılmaları gelişen moleküler tanı teknikleri doğrultusunda değişmektedir.

2001 yılında, Dünya sağlık örgütünün (WHO) yaptığı ilk sistematik sınıflandırma; klinikopatolojik özelliklerine göre olup; Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar (CMPD) , CMPD-benzeri hastalıklar ve sınıflandırılmayan hastalıklar olarak üç grupta toplanmıştır. KML, PV, ET, ve PMF kronik miyeloproliferatif hastalıklar (CMPD) grubunda olup, CMPD-benzeri gruba ise kronik nötrofilik lösemi (CNL), kronik eozinofilik lösemi/ hipereozinofilik sendrom (CEL/HES) dahil edilmiştir. Fakat Bcr-Abl (-) Kronik Miyeloproliferatif hastalıklarda, moleküler patogenezin anlaşılmasını sağlayan önemli gelişmelerden sonra, son yıllarda spesifik moleküler anomalilerin keşfi ile WHO kriterleri yeniden düzenlenmiştir (28). 2008 Eylül'de WHO, hematopoietik ve lenfoid neoplazmları yeniden sınıflandırmıştır. Bu sistemde hastalık (disease) kelimesinin yerine neoplazm (neoplasm) almıştır (MPD→MPN) (29). Miyeloproliferasyonun reaktif değil, neoplastik olduğu belirtilmiş Bcr-Abl (-) MPN'lerde, tanıya yönelik belirteç olarak moleküler genetik özellikler ve subtiplerini belirlemek amacıyla da histolojik karakterizasyon kullanılmıştır (30).

Hematopoietik kök hücre transformasyonu sonucu ortaya çıkan, klonal miyeloproliferatif hastalıklar buna göre; klasik ve atipik olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Klasik MPN'ler; Philedelphia (Ph) translokasyonu ve Bcr-Abl füzyon geni taşıyan, Ph (+) kronik myeloid lösemi (CML) ve Philedelphia (Ph) translokasyonu ve Bcr-Abl füzyon geni taşımayan Ph (-); Polisitemia Vera (PV), Esansiyel Trombositoz (ET) ve Primer Miyelofibrozis (PMF)' ten oluşur. Atipik (non-klasik) MPN ise; kronik nötrofilik lösemi (CNL), kronik eozinofilik lösemi (CEL), hipereozinofilik sendrom (HEL), kronik bazofilik lösemi (CBL), kronik miyelomonositik lösemi (CMML), juvenil miyelomonositik lösemi (JMML), sistemik mastositozis (SM), kök hücre lösemileri, lenfoma sendromu (SCLL) ve sınıflandırılmayan MPN'lerden oluşur (Şekil 2.3) (31, 32).



Şekil 2.3. Miyeloproliferatif Hastalıkların Sınıflandırılması (31)

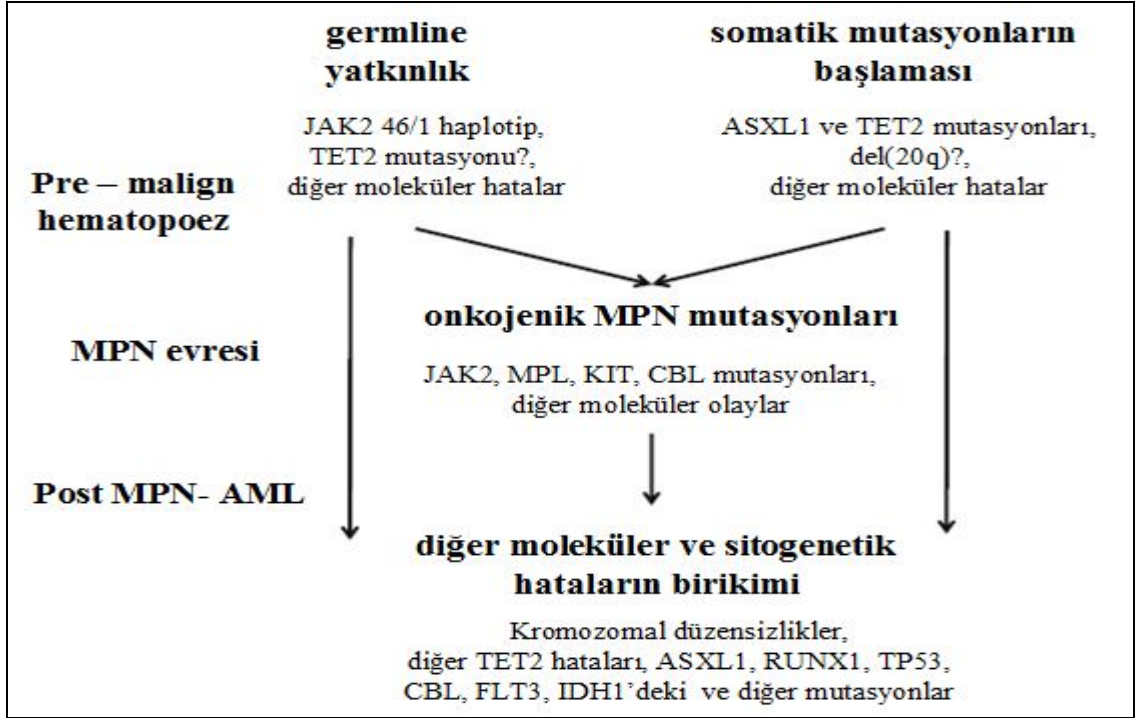
2005 yılında Bcr-Abl (-) klasik MPN'lerde JAK2V617F (Janus kinaz 2) mutasyonunun keşfi ile MPN moleküler patogenezinde genetik anomalilerin rol oynadığını gösterilmiş, ayrıca bu bulgu Dünya Sağlık Örgütü tarafından, ayırıcı tanı kriteri olarak kabul edilmiştir (33).

## 2.2.2. MPN'nin Moleküler Patogenezi

Anormal miyeloproliferasyon, sürekli olarak aktif sinyal ileti yollarının bir sonucu olarak gözlenmekte ve özellikle protein tirozin kinaz ve onunla ilintili moleküllere ait spesifik genlerdeki mutasyonları içermektedir (34).

MPN'lerin moleküler patogenezi 3 evrede düşünülebilir ve hastalığa neden olan patolojik hücrelerin evrimi 3 gruba ayrılabilir:

1. **Pre-malign evre:** Genetik yatkınlık ya da sonradan kazanılan bazı özellikler nedeni ile; hematopoietik kök hücrelerin gizli proliferatif özelliğinin olduğu ve hastalığın başlangıcı olarak tanımlanan evredir.
2. **MPN evresi:** Spesifik onkojenik mutasyonların oluşması ve buna bağlı olarak aşırı sitokin reseptör sinyal iletiminin gözlemlendiği evredir.
3. **MPN sonrası oluşan akut (AML) evre:** Çok sayıda başka ikincil mutasyonların oluştuğu ve AML'ye geçişin de olabildiği evredir (Şekil 2.4) (35).



Şekil 2.4. MPN'lerin Moleküler Patogenezi (35)



### **2.2.3. MPN’lerde Genetik Varyasyonlar**

Yıllardır yapılan yoğun klinik ve laboratuvar çalışmalarına rağmen, Bcr-Abl (-) miyeloproliferatif hastalıkların etiyojisi tam olarak bilinmemektedir. 2005 yılında miyeloproliferatif hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilen ilk moleküler genetik bulgu olan JAK2 V617F mutasyonu keşfedilmiştir. Bu keşif araştırmacıların JAK 2 ekzon 12, trombopoietin reseptör Mpl (Myeloproliferative leukemia virus oncogene), adaptör protein LNK (Lenfosit Spesifik Adaptör Protein) ve TET 2 (Ten-Eleven-Translocation) gibi hematopoietik büyüme sinyal yolları ile ilişkili diğer genlerdeki mutasyonların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Miyeloproliferatif hastalıklar ile ilgili bu tür moleküler gelişmeler, moleküler destekli yeni hastalık sınıflandırmalarının yapılması, yeni tanılmal yaklaşımaların kullanımı ve hatta mutant moleküllere yönelik yeni tedavi seçeneklerinin gündeme gelmesine yardımcı olmuştur (4, 36, 37).

### **2.2.4. MPN’lerde Sitogenetik Bulgular**

MPN’lerde sitogenetik anomali spektrumu heterojen olup, kromozomal sayısal kazançlar, kayıplar ve dengesiz translokasyonları içermektedir. Kromozomal anomaliler, PV’li hastaların %10-15’inde, ET’li hastaların ise %10 ‘unda gözlenmektedir. En sık gözlenen kromozomal anomaliler: del 20q (delesyon), 13q, 12p, trizomi 8, 9; 1q’nun parsiyel duplikasyonu ve 9p’deki anomalilerdir (37-42).

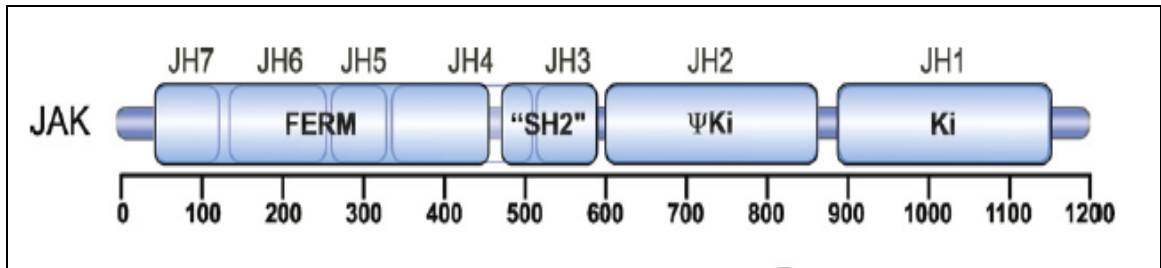
### **2.2.5. MPN’lerde Moleküler Genetik Bulgular**

#### **2.2.5.1. Janus Kinaz Sinyal İletimi ve JAK2V617F Mutasyonu**

Hematopoietik hücrelerin; farklılaşma, büyüme ve devamlılığı, sitokin adı verilen, büyüme faktörlerinin bir grubu tarafından kontrol edilmektedir. Sitokinler kendi reseptörlerine bağlanarak, Janus Kinaz ailesinin reseptör ilişkili tirozin kinazlarının, aktivasyonuna ve dolayısıyla hücre içi sinyal iletimine neden olurlar (43, 44).

Janus kinaz (JAK) ailesi, sitokin aracılıklı sinyallerin iletiminde rol oynayan bir grup (hücre içi reseptör olmayan) tirozin kinaza verilen isimdir. Bu yolağa JAK-STAT yolağı adı verilir. Bu yolaktaki transkripsiyon faktörleri ise STAT'lar (Signal Transducers and Activators of Transcription) olarak bilinir. JAK-STAT yolağı hematopoez için özellikle önemlidir. Hematopoietik hücrelerin; bölünme, farklılaşma ve apoptozis düzeyinde düzenlenmesini sağlar. Ayrıca inflamasyonda da görev alırlar (45-48).

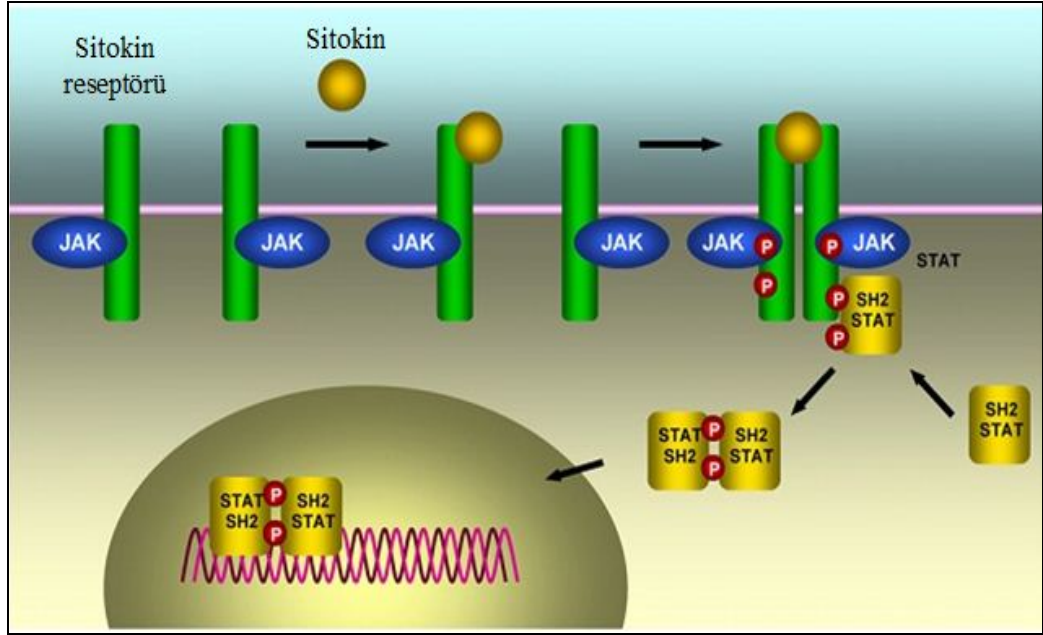
JAK ailesi; JAK1, JAK2, JAK3 ve Tirozin kinaz 2 (TYK2) olmak üzere dört üyeden oluşur. İlk defa 1989'da hematopoietik hücre hatlarında, bilinen tüm tirozin kinazların katalitik bölgelerindeki aminoasit dizilerinin benzer olduğu saptanmış ve bu şekilde tanımlanmışlardır (37, 49). JAK ailesi üyeleri farklı kromozomal yerleşime sahiptir. JAK1; 1p31.3, JAK2; 9p24, JAK3; 19p13.1 ve Tyk; 19p13.1'te bulunmaktadır. JAK' lar büyük proteinler olup, 1000'den fazla aminoasit içerirler. JAK ailesi üyelerinin yapısal kısmını meydana getiren, 7 farklı JAK homoloji bölgesi bulunmaktadır. Bunlardan, JH2; tirozin kinaza benzer yapıdaki pseudokinaz bölgesidir. **JH2**; JH1'in aktivitesini düzenlemede görev alan, normal kinaz aktivitesi için gerekli olan, fakat enzimatik aktivitesi olmayan kısımdır. JAK'ların JH3-JH4 bölgesi; Src-homoloji-2 (SH2) bölgeleri ile benzerlik göstermektedir. Amino terminal uç (NH<sub>2</sub>) olan JH4-JH7 ise FERM domain olarak adlandırılır (band 4.1, ezrin, radixin, moesin) (Şekil 2.5) (50, 51).



Şekil 2.5. JAK geninin yapısal organizasyonu (54)

İnaktif JAK enzimleri, Tip I ve Tip II sitokin reseptörlerinin sitoplazmik uçlarına tutunmuştur. Sitokin molekülünün bağlanması ile iki sitokin reseptör molekülü bir araya gelerek dimer yapı oluşturur. Sitokin reseptör dimerizasyonu sonucunda; reseptör

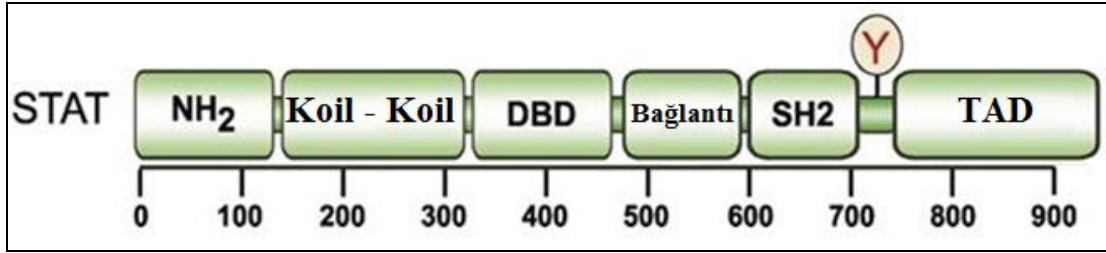
ilişkili JAK, fosforilasyon yoluyla aktive olur, sitokin reseptörlerinin sitoplazmik bölgelerindeki tirozin rezidülerini fosforile eder. Reseptörlerin bazı fosfotirozin bölgeleri ise, reseptörüne tutunan monomerik, sitozolik STAT proteinlerinin Src homolog 2 (SH2) uçları tarafından tanınır. STAT proteinleri reseptörle uyarılan JAK kinazlar tarafından fosforile edilirler. Fosforilasyon ile aktif hale gelen STAT molekülleri STAT-STAT dimerlerini oluşturur. STAT dimerleri nükleusa hareket eder, sitokine cevap veren ilgili genin promotor bölgesindeki özel DNA dizilerine bağlanır ve gen transkripsiyonunu aktive ederler (Şekil 2.6) (47, 52).



Şekil 2.6. JAK/STAT sinyal iletiminin standart şeması (47)

STAT molekülleri ise, 750-900 aminoasit içermekle birlikte 7 tanedir. Bunlar STAT 1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak isimlendirilir. STAT' lar 7 fonksiyonel bölge içerirler: **1)** amino uç bölgesi; oldukça korunumludur ve fosforile olmamış STAT' lar arasındaki homotipik dimer yapıların oluşumunu sağlar. **2)** koil-koil bölgesi; nükleer giriş çıkıştan sorumlu olan proteinlerle aktif olarak bağlanmayı sağlar. **3)** DNA bağlayıcı bölge; oldukça iyi korunumlu olup, palindromik dizilere bağlanmayı sağlar. **4)** Bağlayıcı (Linker) bölge; yapısal olarak DNA bağlayıcı bölgenin aktivasyonunu sağlar. **5)** SH2 bölgesi; en çok korunumlu olan bölgedir ve aktif

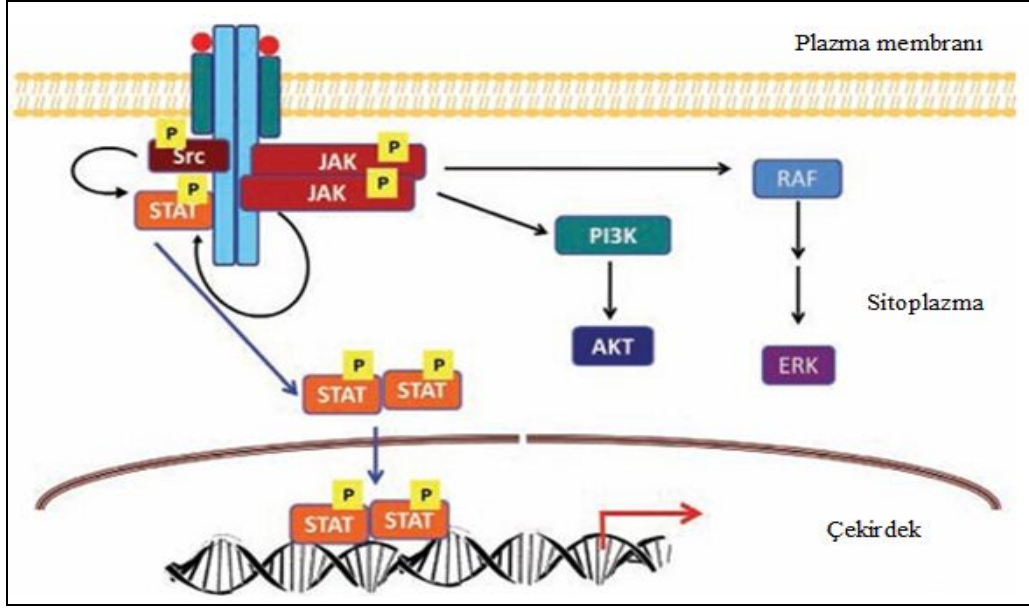
olarak STAT-STAT dimerizasyonunu sağlar. 6) Tirozin aktivasyon bölgesi; SH2 bölgesine JAK fosforilasyonunu ileterek, STAT molekülünün aktif yapısal değişime uğramasını sağlar. 7) Transkripsiyon aktivasyon bölgesi (TAD ); karboksi ucunda, STAT ailesi üyeleri arasında STAT2 hariç, son derece değişkenlik gösteren bölgedir. STAT TAD bölgesi protein stabilitesinin düzenlenmesi açısından önemlidir (Şekil 2.7) (47, 53, 54).



Şekil 2.7. STAT molekülünün yapısal organizasyonu (54)

STAT ilişkili genlerin bazıları belirlenmiştir. STAT1; interferon gama, STAT4 ve STAT6; IL-4 (interlökin 4) ve IL-12 ile aktive olurken, STAT5; prolaktin, büyüme hormonları, eritropoietin, granülosit-makrofaj stimüle edici faktör (GM-SCF) trombopoietin, IL-2, 3, 5, 6 ile aktive olur. Ayrıca STAT5'in büyüme sinyal iletimi ve farklılaşmada görev aldığı gösterilmiştir (43). Herhangi bir büyüme faktörü ile uyarılmamış STAT'lar, hücrelerde inaktif durumdadır. Örneğin; sitokin gibi bir büyüme faktörü ile uyarımı sonucunda tirozin rezidüleri fosforile olur ve reseptörde SH2 bölgesi (fosfotirozin bağlanma bölgesi) bulunduran STAT'lar birikir ve bunlar da JAK'lar tarafından tirozin-fosforilasyonuna uğrar. Farklı STAT'lar üzerine eklendikçe hetero ve homodimerler meydana gelir. Aktive olan dimerler ise hücre çekirdeğinde birikerek hedef genlerin transkripsiyonunu aktive ederler (44, 55).

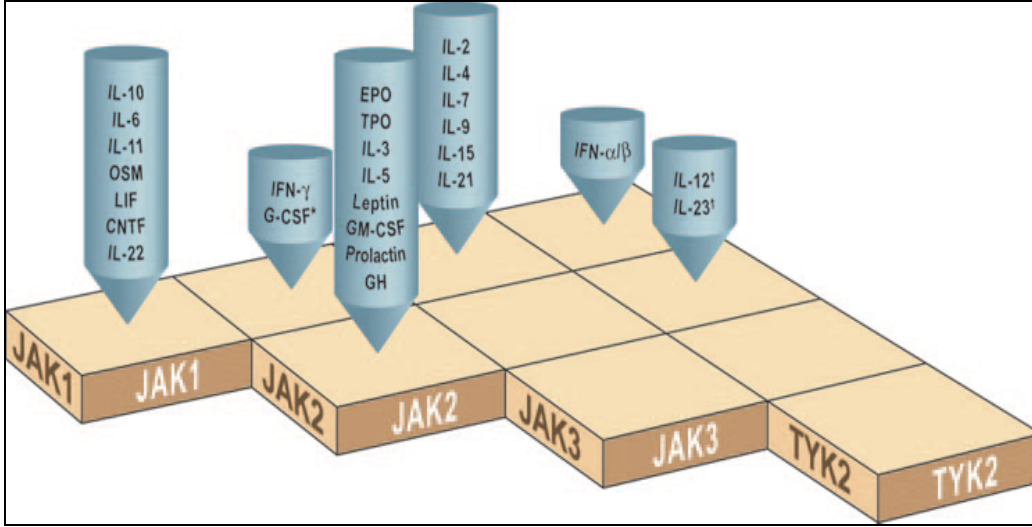
JAK'ların aktivasyonu uygun ligandın reseptöre bağlanmasıyla; STAT, PI3K/Akt/mTOR (Phosphatidylinositol3-kinase/Akt/Mammalian Target Of Rapamycin) ve MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)'ı içeren sinyal yollarının aktivasyonu ve hedef proteinlerin fosforilasyonu meydana gelir (Şekil 2.8). Farklı JAK'lar farklı reseptörlerle ilişkilidir ve sitokin sinyal iletiminde farklı rollere sahiptir (51).



Şekil 2.8. JAK/STAT aracılı sinyal iletimi (44)

Janus kinaz 2 (JAK2) bir sitoplazmik fosfotirozinkinazdır. Yapısında birbirine benzer iki kinaz domaini bulundurur: fonksiyonel olan JAK homoloji 1 (JH1) ve kinaz aktivitesi olmayan JAK homoloji 2 domainidir. Janus kinazlar bu iki bölge içeren yapıları nedeniyle eski Roma tanrısı olan, ikiye yüzlü Janus'dan esinlenerek isimlendirilmiştir. JH1 domaini aktif bir tirozin kinaz domaini iken, hemen yakınında olan JH2 domaini, katalitik olarak inaktiftir ve bu nedenle pseudokinaz adını alır (37, 46).

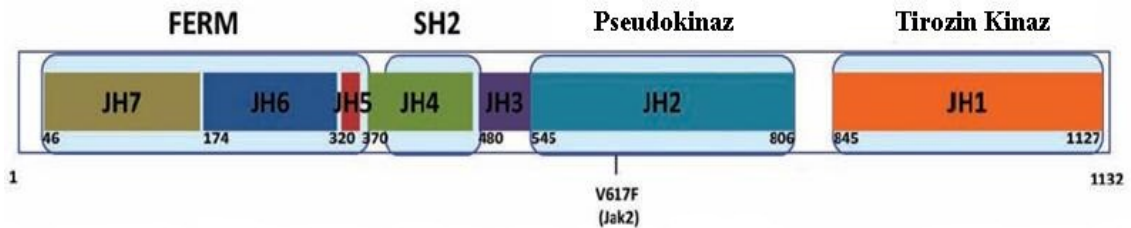
JAK2; eritropoietin, prolaktin, leptin, trombopoietin, interlökin-3,-4,-5,-6,-7,-13 granülosit stimüle edici faktör (G-CSF) ve granülosit-makrofaj stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi tip 1 ve interferon alfa, gama, beta gibi tip 2 reseptörler üzerinden, hücre içi sinyal iletiminde önemli rol oynar (Şekil 2.9) (49, 50, 56).



Şekil 2.9. JAK1, JAK2, JAK3 genlerinin etkileşime girdikleri sitokin reseptörleri (52)

JAK2 geninde meydana gelen somatik mutasyon (1849 G>T; GTC→TTC) , JAK2'nin pseudokinaz bölgesinin (JH2) 617. kodonundaki valin aminoasitinin fenilalanin ile yer değiştirmesine neden olmaktadır (Şekil 2.10). Mutasyonun PV'li hastaların %96'sında, ET'li hastaların ise %55'inde görüldüğü saptanmıştır. Mutasyonun hastalıklarda yüksek oranda görülmesi nedeniyle, JAK2V617F mutasyonu WHO tarafından 2008 yılında revize edilen tanı kriterlerinde önemli bir parametre olarak kabul edilmiştir (57, 58).

Valin 617, JAK2'nin pseudokinaz bölgesinde (JH2) bulunur. Bu kısım JAK2'nin kinaz parçası ile büyük benzerlik gösterir (JH1). Ancak katalitik aktiviteden yoksundur. JAK2 JH2 delesyonu, JAK2 kinaz aktivitesinin artmasına neden olur. Bu durum, JAK2'nin pseudokinaz parçasının, tirozinkinaz aktivitesine sahip JH1 bölgesi üzerinde baskılama yönünde etkisi olduğunu düşündürür. Dolayısı ile valinin fenilalanin ile yer değiştirmesi ile baskı ortadan kalkarak, sürekli kinaz aktivitesi oluşur (35).

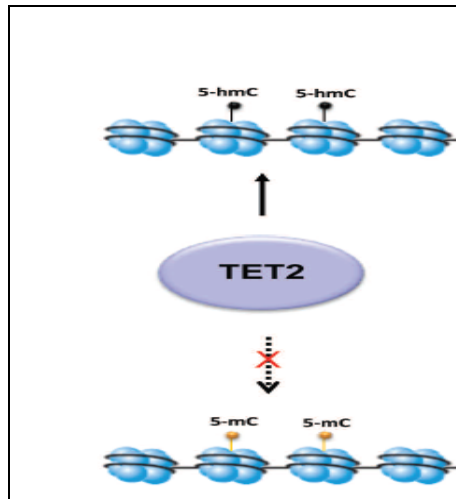


Şekil 2.10. JAK2V617F Mutasyonunun JAK gen yapısındaki yerleşimi (44)

JAK2V617F mutasyonu; fonksiyonel olarak JAK2 aktivitesini arttırmakta ve hücrelerde, eritropoietin (Epo) aşırı duyarlılığına neden olmaktadır. Deneysel olarak, in vivo, fare modellerinde JAK2V617F mutasyonu taşıyan kemik iliği hücreleri farelere enjekte edildiğinde, PV fenotipinin geliştiği görülmüştür (59). Eritropoietin reseptörü (EpoR) taşıyan Ba/F3 (insan kemik iliğinden elde edilmiş hücreler) hücrelerinde JAK2 V617F mutasyonu oluşturulduğunda ise; hücrelerin eritropoietinden bağımsız olarak bölündüğü ve hücrelerin eritropoietine aşırı duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür (37). EpoR tıpkı JAK2 gibi, homodimerik tip 1 sitokin reseptörüdür. EpoR'a benzer olarak JAK2 V617F'nin hematopoietik hücrelerin sitokinden bağımsız olarak bölünebildiği, çünkü JAK-STAT sinyal ileti yolağını aktive ettiği gözlenmiştir (35).

#### 2.2.5.2. TET 2 (Ten-Eleven-Translocation 2) Mutasyonu

TET (Ten-Eleven-Translocation) proteinleri; üç gen ailesine (TET1,TET2,TET3) sahiptir.  $Fe^{+2}$  bağımsız, 2 oxoglutarat (2-OG) ve dioksijenaz ailesi üyesidir. İki tane son derece korunumlu ortak bölge içerirler. Karboksi ucundaki bölge, katalitik dioksijenaz aktivitesine sahip olup; 5-metil sitozini (5mC), 5 hidroksimetilsitozine (hmC) dönüştürür (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinde TET geninin fonksiyonu (60)

TET1, akut miyeloid lösemilerde t(10;11)(q22;q23) füzyon proteini oluşturmasıyla karakterizedir. TET2 ise; böbrekler, beyin ve hematopoitik sistem olmak üzere çeşitli dokularda ifade edilir. TET2 geni; 11 ekzon büyüklüğünde bir gen olup, kromozomal olarak 4q24 bölgesinde yerleşiktir (60, 61). Bu aile üyeleri, 5-metilsitozinin oksidasyonu, 5-hidroksimetilsitozine dönüşümünde rol oynadıkları için, DNA'nın epigenetik olarak düzenleniminde görev alırlar (62, 63). TET2'nin somatik fonksiyon kaybı; MPN, MDS ve CMML'yi içeren farklı miyeloid malignansilerde görülür. Ph(-) MPN'lerde TET2 mutasyonları, yaklaşık %10-15 oranlarında görülüp, PV'de mutasyonel frekansı %16, ET'de ise %5'tir (39). TET2 geninde başlıca, nokta mutasyonları, delesyonlar ve frame-shift mutasyonlar olmak üzere farklı mutasyon tipleri görülür (Şekil 2.12) (35, 64). Fonksiyonel olarak; TET2 genine ait iki allelden birinde meydana gelen mutasyon fenotipe yansır. TET2 gen kopyalarının yalnızca bir tanesinin fonksiyonel olması birçok hastada hematopoitik hücre fonksiyonlarını değiştirebilmektedir (35). Fare hematopoitik kök hücrelerinde yapılan araştırmalarda; TET2 mutasyonu sonucunda, kan hücrelerinin sayısında artış, dalak büyümesi ve miyeloproliferatif fenotip gözlenmiştir (60). Ayrıca fare kök hücrelerinde Short-Hairpin RNA analizi kullanılarak yapılan çalışmada; TET2 geninin işlevi ortadan kaldırıldığında, hematopoitik kök hücrelerin bir kısmında belirgin bir artış başlarken, özellikle granülosit ve monositlerin normal farklılaşmalarının baskılandığı görülmüştür. Granülositik farklılaşmayı uyaran (G-CSF veya GM-CSF) sitokin faktörlerin varlığında ve makrofaj farklılaşmasını uyaran M-CSF yokluğunda; granülosit/makrofaj hücrelerinde artış görülmüştür. Bu çalışmalar TET2 proteininin, miyeloid farklılaşmanın farklı evrelerinde rol oynayabileceğini göstermiştir (61). Gelecekte TET2 mutasyonlarının, tıpkı JAK2 mutasyonu gibi rutin tanı kriterleri arasında yer alması beklenmektedir.

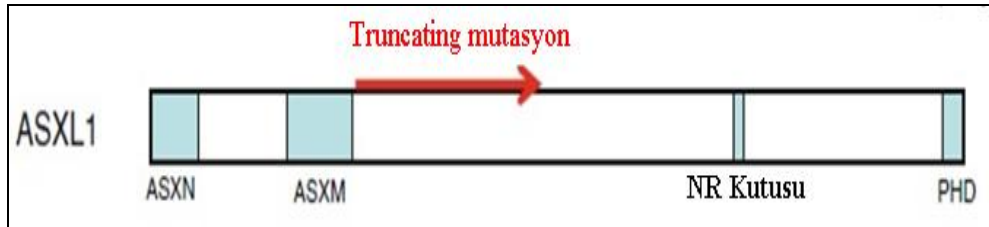




Şekil 2.12. MPN’lerde görülen TET2 gen mutasyon çeşitleri (35)

### 2.2.5.3. ASXL1 (Additional SeX comb Like 1) Mutasyonu

*ASXL1*, Polycomb (PcG) geni ve Trithorax (*trxG*) geni enhancer bölgesine ait, 20q11.1 kromozomal bölgede yerleşimli, 12-13 ekzonluk bir gendir (65). *Polycomb* ve *trithorax* grup proteinleri; hedef genlerin susturulmasında rol alan, transkripsiyonal aktivatörlerdir (66). ASXL1; yüksek korunumlu bir N-terminal ASX benzer bölge ile bir C-terminal bitkidekine benzer bölge (Plant Homeo Domain) PHD ‘den oluşur (Şekil 2.13). ASXL1 mutasyonları temel olarak 12. ekzonda PHD bölgesindeki frameshift (çerçeve kayması) ya da nonsense (anlamsız) mutasyon şeklindedir. ASXL1’in hematopoietik fonksiyonları kesin olarak bilinmemektedir. Bu konudaki çalışmalar; MPN’lerde ASXL mutasyonlarının, %10-15 oranlarında ve çoğunlukla heterozigot olarak gözleendiği yönündedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, ASXL1 geni tamamen baskılandığında; lenfoid ve miyeloid hücrelerin farklılaşma evrelerinde hata gözlenmiştir. Ayrıca MPN’lerin AML’ye geçişi sırasındaki kronik evrede ASXL1 mutasyonunun yaygın gözleendiğine dair bulgular mevcuttur (35, 60, 66, 67).



Şekil 2.13. MPN’lerde görülen ASXL1 gen mutasyonları (35)

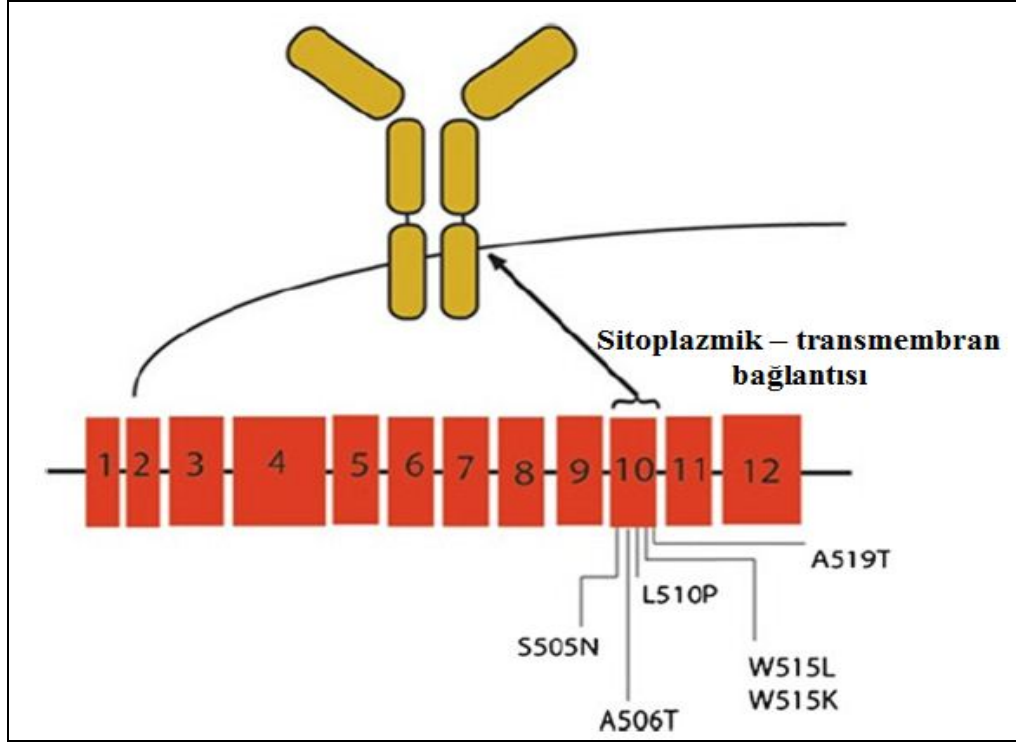
#### 2.2.5.4. MPL (Myeloproliferative Leukemia Virus) Mutasyonu

MPL; 1p34 kromozomal bölgede yerleşik, 12 ekzonluk bir gen olup, trombopoietin reseptörünü (635-680 a.a.) kodlar. MPL, megakaryositler için temel büyüme ve farklılaşma faktörüdür. Mutasyon sıklıkla, 10. ekzonda 1544. nükleotitte (MPLW515L) G'nin T'ye dönüşümü sonucunda; 515. kodondaki triptofanın yerine lösin aminoasitinin sentezlenmesine neden olur (Şekil 2.14) (68).



Şekil 2.14. MPN'lerde görülen MPL gen mutasyonu (35)

Bununla birlikte MPL geninde farklı ekzon 10 mutasyonları (MPLW515K, MPLW515S ve MPL505N gibi) tanımlanmıştır (Şekil 2.15). MPLW515L MPN'lerde görülen en sık mutasyondur. Nedeni ise, sıklıkla JAK-STAT yolağındaki JAK2V617F mutasyonu ile birlikte gözlenmesidir. Esansiyel trombositoz hastalarında sıklıkla görülen mutasyonel frekansı %3-5 arasında iken, PV'de nadir görülür (65). MPL mutasyonu; ileri yaş, cinsiyet, düşük hemoglobin düzeyi ve yüksek trombosit sayısı ile karakterizedir. MPL; hematopoezde, özellikle megakaryosit büyüme ve farklılaşmasında görevlidir. MPL mutasyonu, sitokin bağımsız büyüme ve Tpo (trombopoietin) aşırı duyarlılığında; JAK/STAT/ERK/AKT aktivasyonuna neden olur (35, 69, 70).



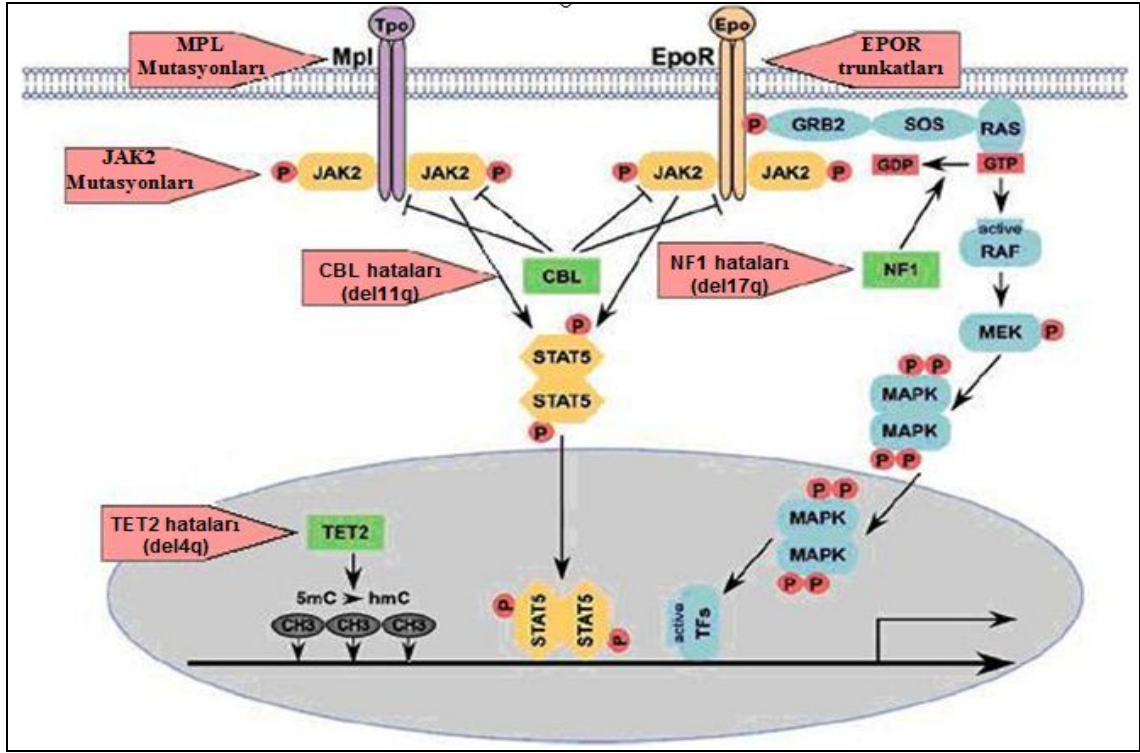
Şekil 2.15. MPL geninin 10. ekzonunda meydana gelen mutasyonlar (68)

### 2.2.5.5. LNK (Lymphocyte-specific adapter protein) Mutasyonu

LNK (Lymphocyte-specific adapter protein ya da Src homology 2 (SH2) B3) aynı zamanda Src benzeri 2 (SH2) B3 olarak bilinen, SH2-B (SH2B1) ve SH2B2'den oluşan, aracılık görevi gören protein ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler yaygın protein-protein etkileşim bölgesi ve motifleri (bir dimerizasyon bölgesi, N terminalde prolince zengin motifler, bir plekstrin benzeri (PH), SH2 bölgesi ve C ucunda korunmuş tirozin bölgesi) içerirler (71). LNK, 12q24.12 kromozom bölgesinde yerleşik, yabanıl tip ve mutant JAK2 sinyal iletimini baskılama fonksiyonuna sahip bir plazma membran aracı proteindir. Ayrıca hematopoezin erken döneminde önemli role sahiptir (72, 73, 74). LNK; trombopoietin üzerinden, JAK2 aktivasyonunun negatif düzenleyicisidir. Dolaylı olarak, LNK, SH2 bölgesiyle MPL ve Epo reseptör sinyal iletimini JAK2 aktivasyonunu baskılayarak negatif olarak düzenlemektedir. Mutant farelerde yapılan çalışmalarda; ortaya çıkan bulgular etkisinin MPN'lerin klinik ve biyolojik özelliklerine benzediğini göstermektedir. LNK mutant farelerde; sitokine aşırı duyarlılık, (CFU-GEMM; Colony forming unit-eritroid- Granülosit-Eritrosit-Monosit-Megakaryosit),

eritroid (CFU-E; Colony forming unit-eritroid), megakaryositik (CFU-MK; Colony forming unit-eritroid-Megakarosit) öncül kolonilerde farklılaşma, yüksek trombosit sayısı, olağandışı hematopoez ve fibrozisle birlikte dalak büyümesi görülmüştür (72).

MPN'lerde düşük mutasyonel frekanslarda; NF1(Neurofibromatosis-1), KIT, CBL (Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogen), EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2), IKZF1 (Ikaros Zinc Finger 1), IDH1/2 (Isocitrate Dehydrogenase 1 ve 2), Jak 2 46/1 haplotip ve Jak 2 ekzon 12 mutasyonları da görülmektedirler (Şekil 2.16) (27, 65, 70, 72, 75).



Şekil 2.16. MPN'lerde mutasyonların hedef aldığı mekanizma ve yollar (60)

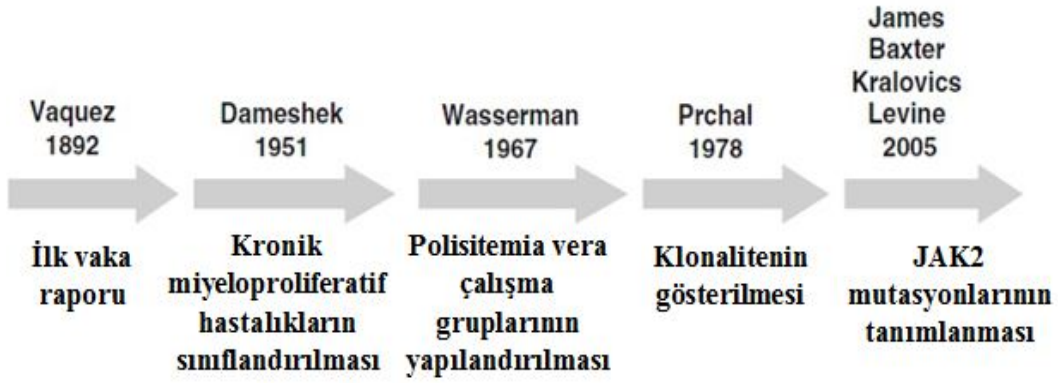
## **2.3. Polisitemia Vera**

### **2.3.1. Epidemiyoloji**

Polisitemia vera (PV) klonal, herhangi bir uyarıcı olmadan öncelikli eritrosit olmak üzere; kemik iliğinin her üç serisine ait hücrelerin (eritrosit, granulosit, trombosit) fenotipik olarak normal, ancak kontrolsüz çoğalması, birikimi ve buna bağlı olarak, sitokin aşırı duyarlılığı /bağımsızlığıyla karakterize bir hastalıktır. PV insidansı yılda 2 /100000 olgu kadardır (4-6). Erkeklerde biraz daha sık gözlenmektedir (yaklaşık %60). Her yaşta görülebilmeye rağmen, ortalama yaş 55-60 olup, yaş ilerledikçe görülme insidansı artmaktadır. Çocukluk çağında görülmesi nadirdir. Asya ülkelerinde Avrupa ülkelerine göre daha sık görülür (76-78).

### **2.3.2. Tarihçe**

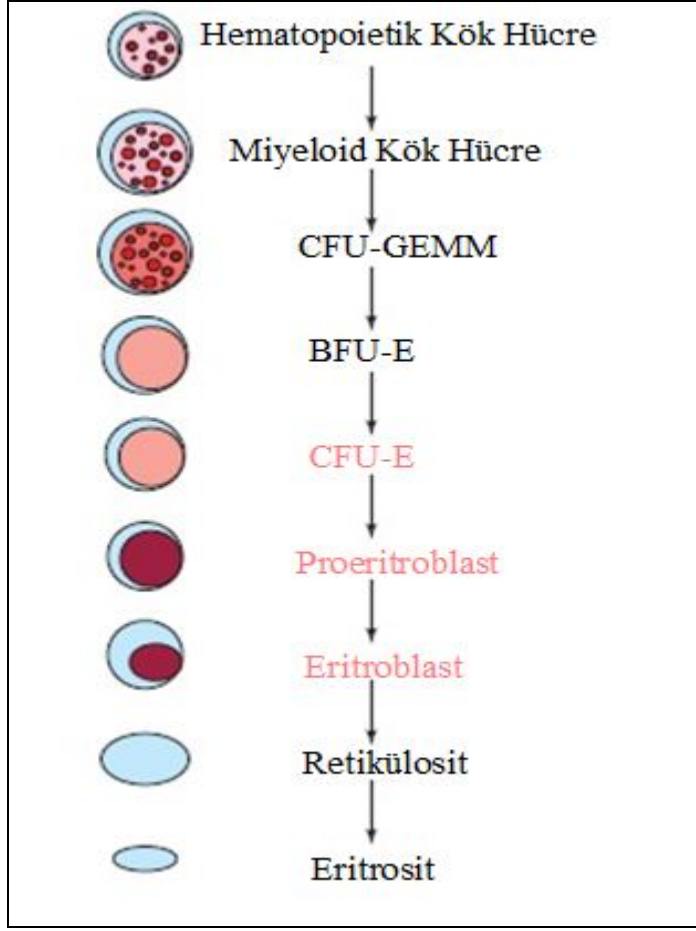
PV'nin klinik olarak ilk tanımlanması Louis Henri Vaquez tarafından 1892 yılında yapıldı. 40 yaşında ölen hastasında, otopsi sonucunda; eritrositozise eşlik eden, morarma, karaciğer ve dalak büyümesi gözleildi. Hematolojik bir hastalık olabileceği görüşünü öne sürdü. Birkaç yıl sonra Cabot ve Osler benzer olguları rapor ettiler. Bunu takiben, 1951 yılında Dameshek tarafından PV, miyeloproliferatif hastalıklar içinde ilk kez sınıflandırıldı (Şekil 2.17). 2005 yılında JAK2 mutasyonu tanımıyla ise daha kolay tanı konulabilir hale geldi (76).



Şekil 2.17. Polisitemia Vera hastalığının tarihinde dönüm noktaları sayılan gelişmeler (76)

### 2.3.3. Patofizyoloji

PV'de hematopoietik hücre serilerinde görülen artış, eritroid hücrelerde daha belirgindir. Bu nedenle araştırmalar, multipotent hematopoietik kök hücrelerin farklılaşarak olgun, nükleusu olmayan eritrosit oluşumunu sağlayan eritropoez üzerinde yoğunlaşmıştır. Epo (eritropoietin) aktifleştğinde EpoR (Epo reseptör) ekspresyonu olur. Buna paralel olarak en erken aşama olan BFU-E (Burst forming unit-eritroid) öncülleri oluşur. Daha sonra CFU-E (Colony forming unit-eritroid) oluşumu başlamaktadır. Epo gerekliliği CFU-E aşamasına kadar gözlenmemektedir. Çünkü Epo veya EpoR geni hasarlı olan farelerde yapılan çalışmalarda, BFU-E ve CFU-E öncül kolonilerin oluştuğu görülmüştür. Öncül kolonilerin oluşmasıyla, eritroblast farklılaşma ve olgunlaşması gerçekleşmektedir (Şekil 2.18) (5, 79, 80).



Şekil 2.18. Eritropoez mekanizması ve eritrosit oluşumu (79)

Eritropoezi oluşturan ana genlerden biri olan eritropoietin 34,000-dalton ağırlıkta, 165 aminoasit uzunluğunda bir glikoprotein olup; başta böbrek peritübüler hücrelerde olmak üzere pekçok dokudan sentezlenir. Epo BFU-E, CFU-E, gibi eritroid öncüllerin farklılaşması, kırmızı kan hücrelerinin oluşumu, çoğalımı, devamlılığı ve apoptozun baskılanmasının uyarılmasında görev alır (81-83). Epo reseptörü EpoR ise, 66,000-dalton moleküler ağırlıktaki sitokin süper ailesinin bir üyesi olup, hücre membranını bir uçtan diğer uca geçebilen (transmembranik) özellikte olup farklı hücre tiplerinde bulunur (84). Epo; reseptörü olan EpoR ile etkileşime girerek homodimerizasyon oluşturur. Daha sonra EpoR'un hücre içine bakan kısmında bulunan, Box motif bölgesinin JAK2'ye bağlanıp aktive edilmesiyle, eritropoezde görevli yolak başlatılır. Sitoplazmik tirozin kinaz olan JAK2, EpoR'un uç sitoplazmik bölgesindeki 8 korunmuş fosfotirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü STAT5, PI3K ve RAS/MAPK sinyal moleküllerine bağlanır. Nükleus

içerisine giren transkripsiyon aktivatörleri hedef genlere bağlanarak, apoptozun baskılanması, hücre farklılaşması gibi işlevlerin uyarılmasını sağlarlar (58, 86, 87).

Polisitemia Vera hastalığında, hematopoietik öncül hücrelerin gelişimi serum içeren ve içermeyen kültür koşullarında çalışılmıştır. Serum içermeyen koşullarda eritroid koloniler (BFU-E, CFU-E vb.) bazı büyüme faktörlerine gereksinim duymakta fakat IGF-I (Insulin-like growth factor 1), Epo, IL-3, ve GM-CSF'yi içeren bazı sitokinlere karşı aşırıduyarlılık göstermektedir. Aksine serum içeren kültürlerde ise; hücrelerin Epo olmaksızın eritroid kolonileri oluşturduğu gösterilmiştir. Bu fenomene endojen eritroid kolonileri (EEC) denir (39). Aynı fenomen Prchal ve Axelrad tarafından çalışılmıştır. Sağlıklı bireylerin kemik iliği hücrelerinin aksine, PV'li hastalardan alınan kemik iliği hücrelerinin Epo olmaksızın in vitro eritroid kolonileri oluşturduğu gösterilmiştir. Bu fenomen, PV'lilerin %97-100'sinde görülmektedir bu nedenle PV'de EEC görülmesi tanı kriteri olarak kabul edilmiştir (88). Yapılan başka çalışmada; PV hastalarından alınan eritroid öncül hücrelerin kültürü yapıldığında, Epo olmaksızın hızla geliştikleri görülmüştür (89).

SHP-1 (SH2 phosphatase 1), bir fosfataz olup JAK2'nin en önemli düzenleyicisidir ve Epo/ EpoR sinyal iletimini düzenlemede görev alır. Bu özellik SHP-1 genini, PV'de çalışılmak için aday yapmaktadır. EpoR'un sitoplazmik kısmı, Janus 2 kinazla (JAK2) etkileşen pozitif etkiye sahip düzenleyici bölge içerir. Epo bağlandıktan hemen sonra JAK2 fosforile olur, nükleus içerisinde bulunan STAT5' i uyararak eritropoieziste görevli yolağı başlatır. EpoR' un C-ucundaki sitoplazmik kısmı negatif yönde büyümeyi düzenleyen bir bölgeye sahiptir. SHP-1 geninin inaktivasyonu veya hatalı olması, JAK2/STAT5'in uzun süreli fosforilasyonuna, dolayısıyla da Epo/ EpoR'un düzensiz çalışmasına neden olur. Ayrıca SHP-1 geninde mutasyon taşıyan bireyler PV'ye benzer fenotip gösterirler ve eritroid öncülleri Epo'ya aşırı duyarlıdır (88, 90).

Epo sentezinin oksijen bağımlı düzenlenimi HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factors-1) ile kontrol edilir. HIF-1 ve -2 transkripsiyonel aktivatörler olup, her biri alfa ve beta alt birimlerinden oluşur. Sitoplazmik protein olan alfa alt birimi, oksijen bağımlı yıkım bölgesini (ODDD) ve transaktivasyon bölgesini (TAD) içerirken, beta alt birimi, nükleusta yerleşiktir. Hipoksi durumunda, sitoplazmik prolil ve asparginil hidroksilazları inaktive eder. Böylece HIF alfa yıkımdan kaçarak, transkripsiyonel



koaktivatörlerce bağlanır ve HIF beta'ya bağlanacağı yer olan nükleusa geçer. Hedef genin promotör ve düzenleyici bölgesindeki hipoksi cevap elementiyile etkileşime girerek, Epo transkripsiyonunu aktive eder (91). Normal koşullar altında Epo sentezinin uyarılması, azalmış eirtrosit sayısı veya eritrosit hemoglobinin azalmış oksijen alımı (hipoksi) uyarımı sonucunda HIF-1 tarafından yapılır. Böylece eritrosit üretimi düzenlenir. Bir hipoteze göre PV'li hastalarda HIF-1 yolağındaki doğumsal bir hata sonucu Epo geni düzensiz çalışmakta ve böylece eritrosit sayısında artış görülmektedir (92).

## **2.4. Esansiyel Trombositoz**

### **2.4.1. Epidemiyoloji**

Esansiyel trombositoz; megakaryositlerin devamlı çoğalımı sonucu trombosit sayısında belirgin artış ile karakterize, kronik miyeloproliferatif hastalıktır (93, 94). Epidemiyolojik çalışmalarda, hastalığın insidansı, yılda 1,5-2.0/100000 olgu olarak saptanmıştır. Ortalama tanı yaşı 55-60 olup, hastalığa yakalanma açısından kadınlarda erkeklere oranla yaklaşık 2 kat fazladır. ET; MPN'ler arasında en az yaygın olanıdır ve nadir görülür. Çocukluk çağında çok nadirdir, genellikle sporadik, çok azı da ailesel geçişli olabilmektedir (95, 96).

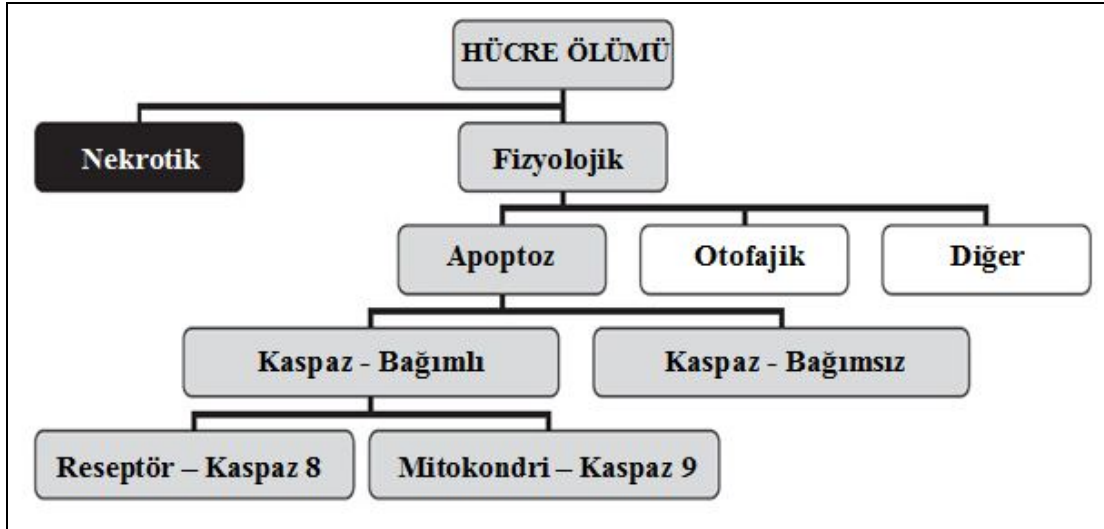
### **2.4.2. Patofizyolojisi**

Trombosit sayısındaki artış ve fonksiyonel olarak hasarlı trombositlerin varlığı, ET'nin en önemli patolojik özelliğidir. Bununla birlikte, hastalığın heterojen olmasından dolayı, nedeni tam olarak anlaşılamamış olup, spesifik tanı kriteri bulunmamaktadır (97, 98). Hastalıkla ilgili ilk bulgu, X inaktivasyon patern çalışmalarıyla tanımlanmış olup, hastalığın granülosit, trombosit ve eritrosit hücrelerini içeren kök hücre kaynaklı bir hastalık olduğu yönündedir. Daha sonraki yapılan çalışmalarda ET'li hastalardan alınan hematopoietik öncül hücrelerin, trombopoietin (Tpo) gibi sitokinlere aşırı duyarlı olduğu gözlenmiştir (93). Tpo; megakaryosit üretiminin uyarılması, bu hücrelerin olgunlaşması ve trombosit çoğalmasında görev alır

(94, 99, 100). Hematopoietik organlarda; stromal hücrelerde, kaslarda ve böbrek proksimal tübüllerde, hepatositlere eksprese edilir. 332 aminoasit uzunluğunda bir sitokindir olup, ilk defa (MPLV) miyeloproliferatif lösemi virüsünün homologu ve c-Mpl geninin ürünü olarak bulunmuştur. Tpo'nun fonksiyonu, reseptörü olan c-Mpl ile düzenlenir. c-Mpl sadece megakaryositik hücre hatlarında değil; HSC (Hematopoietic Stem Cell)'lerde ve memeli öncül hücrelerde de eksprese olur. Mpl reseptörü, sinyal aktarımı ve gen düzenlenimi için en az iki fonksiyonel bölgeyi gerektirir. Bu bölgeler JAK/STAT ve RAS/MAPK sinyal yolları ile işlev görür (101-103). Tip I hematopoietik büyüme faktör reseptör ailesine ait olan Mpl, bir veya iki korunmuş sitokin reseptör motifinden oluşurken, 20-25 aminoasitlik hücre zarını geçen bölgeye ve 70-500 aminoasitlik hücre içi bölgeye sahiptir. Tpo uyarımı ile hücre çoğalımı uyarımı ve dolayısıyla JAK/STAT yolağı aktivasyonu meydana gelir. Tpo reseptörü c-Mpl'ye bağlanarak, JAK/STAT ve RAS üzerinden hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu sağlarken; reseptör dimerizasyonunu da uyararak megakaryosit üretimi ve olgunlaşmasını başlatır. ET'li hastalarda yapılan çalışmalarda, trombopoiezisten sorumlu Tpo'da mutasyon görülmemiştir. Buna karşın ailesel otozomal dominant geçişli ET'de; Tpo ve Mpl aktive edici mutasyonlar saptanmış olup, bunlar Tpo ilişkili trombositozu neden olmaktadır. ET'de sıklıkla JAK2V617F mutasyonu (%50 oranlarında) görülmesine rağmen, hastaların %3 ile %5'inde c-Mpl mutasyonları da görülmektedir (104-107).

## **2.5. Apoptoz**

Programlı hücre ölümü (PCD); yetişkin organizmalarda embriyonik normal gelişim ve doku homeostazisinin en önemli hücresel işlevidir. Bitki biyologları tarafından 1920'de keşfedilmiştir. Hücrelerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine göre hücre ölüm mekanizmaları belirlenmiştir. Hücre ölümü; nekrotik ve fizyolojik olmak üzere 2 genel sınıfa ayrılır. Fizyolojik hücre ölümü; apoptoz, otofaji ve diğer (onkoz, pyroptosis, NETosis, mitotik katastrof, lizozomal membran permeabilizasyonu) ölüm mekanizmalarını içeren hücre ölümleridir (Şekil 2.19) (108-111).

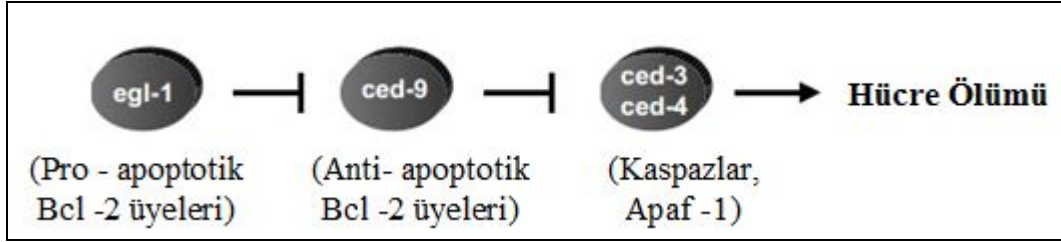


Şekil 2.19. Hücre ölümünün sınıflandırılması (112)

Apoptozis; çok hücreli organizmaların normal büyüme ve gelişimi için gereksinim duyulan; hücrelerin fizyolojik, patojenik veya sitotoksik uyarılara uğraması sonucu genetik olarak düzenlenen programlı hücre ölümüdür. İlk defa Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında, programlı hücre ölümü olarak gösterilmiş ve buna eski Yunanca’da sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen “apoptoz” adı verilmiştir. Apoptoz; embriyonik gelişim ve morfogenez, istenmeyen ve aşırı çoğalan hücrelerin azaltılması, sitokin ve önemli büyüme faktörlerinin kaybı, endokrin sistemin hasarı ve hücrelerin genotoksik hasarında, inflamatuvar reaksiyonlar, immün sistemin düzenlenmesi, kanserin önlenmesi gibi pek çok önemli fizyolojik olayda rol oynar (9, 112- 114).

Hücre ölüm mekanizmaları, bir nematod türü olan *Caenorhabditis elegans* ile yapılan genetik çalışmalarla anlaşılmıştır. Hermafrodit gelişim sırasında, üretilen 1091 somatik hücrenin 131’inin apoptotik ölümü ve eliminasyonu, birkaç genin fonksiyonu belirlenmiştir. *C. Elegans*’ta apoptozun temel nedeni, sistein proteaz olan ced-3’ün aktivasyonu ve ced-4’ün oligomerizasyonu ile oluşan ced-3/ced-4 kompleksinin oluşumu ve bu kompleksin, apoptoz inhibitörü ced-9 ve apoptoz indükleyicisi egl-1 ile düzenlenmesidir. Daha sonra memelilerde, *Drosophila Melanogaster* üzerinde yapılan çalışmalarda *C. Elegans*’ın genleriyle ilişkili, benzer genler belirlenmiş ve hücre ölümünün ana bileşenlerinin evrim sürecinde korunduğu ortaya konmuştur. Buna göre; ced-3 sistein proteazlardan olan kaspazların

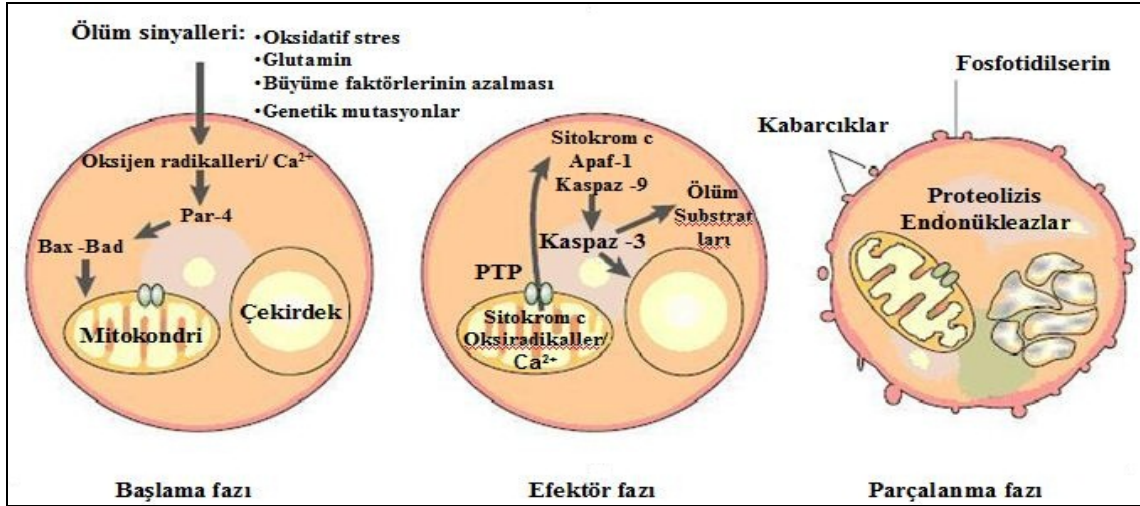
bir üyesi iken, ced-4 kaspazları aktive eden sinyal kompleksi apoptozomun çekirdek komponenti, apoptoz proteaz aktivatörü olan Apaf-1'dir. Egl-1 ve ced-9, Bcl-2 ailesinin pro- veya antiapoptotik üyeleri olup, apoptotik sinyal yollarını düzenlerler (Şekil 2.20) (115).



Şekil 2.20. *C. Elegans* modelinde Hücre ölüm mekanizmasının temel komponentleri (115)

### 2.5.1. Apoptozun Biyokimyasal ve Morfolojik Özellikleri

Hücrelerin sitozolik ekstraktlarında yapılan çalışmalarda; apoptozun biyokimyasal ve morfolojik olarak farklı fazlara ayrıldığı belirlenmiştir. **İlk fazda** (başlama fazı); pro-apoptotik üyeler apoptozun merkezi moleküler mekanizmasını aktive ederler. Bu faza sinyal aktarımı ve yıkım yollarının aktivasyonu olan, premitokondriyel faz da denir. **İkinci fazda** (efektör faz); moleküler ölüm mekanizması tam olarak aktiftir. Nükleus başta olmak üzere hücrede apoptotik değişiklikler uyarılır. Bu faza mitokondriyel membranların geçirgenliğinin gerçekleştiği mitokondriyel faz da denir. **3.fazda** (degradasyon fazı); hücrede apoptozun morfolojik özellikleri ve DNA fragmentasyonu ile yıkım gerçekleşir. Bu faza nükleaz ve proteazların aktivasyonuna neden olan mitokondriden salınan proteinleri içeren postmitokondriyel faz da denir (Şekil 2.21) (116- 118 ).



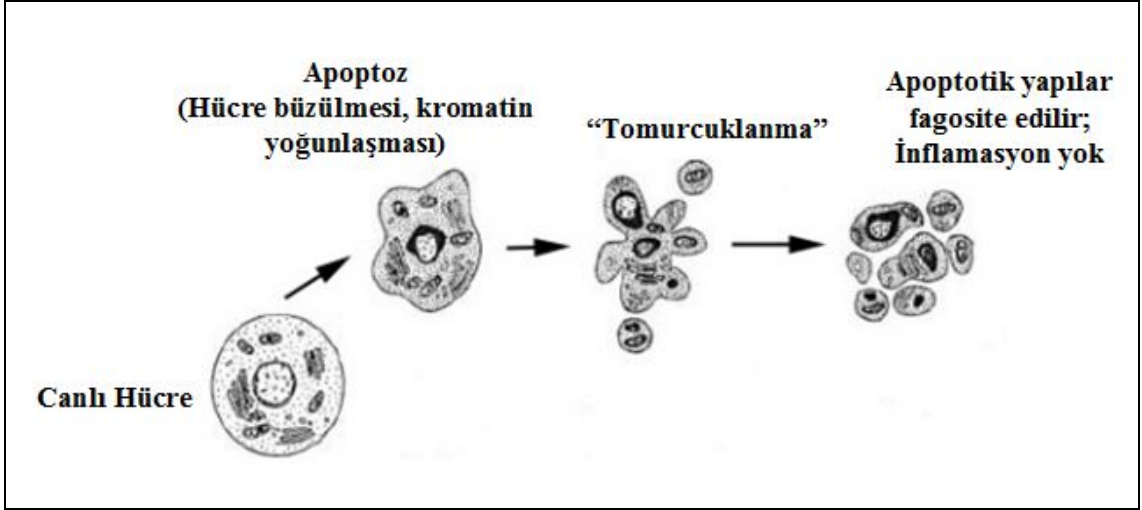
Şekil 2.21. Apoptozun Morfolojik ve Biyokimyasal oluşum fazları (117)

## 2.5.2. Apoptozun Morfolojik Özellikleri

Başta Kerr olmak üzere, 1972'de elektron mikroskobu ve ışık mikroskobuyla yapılan incelemelerde; apoptoz sırasında hücrede çeşitli morfolojik değişiklikler olduğu saptanmıştır. Buna göre özetleyecek olursak:

- Öncelikle hücreler büzüşmeye başlar, böylece boyutları küçülür. Sitoplazma yoğundur ve organeller birbirine çok yakın ve sıkıca paketlenmiştir.
- Membran bütünlüğü bozulmadan, membranın üzerinde küçük cepçikler oluşur.
- Apoptotik hücrenin kromatini membranın çevresinde toplanır ve yoğunlaşır (kromatin agregasyonu ve kondenzasyonu apoptozun en karakteristik özelliğidir.).
- Sitoplazma küçülmeye başlar ve nükleusun kondenzasyonu gerçekleşir.
- Nükleus ve sitoplazmaya ait bölümler membrana bağlı veziküller olan, apoptotik cisimcikler içine girer.
- Apoptotik cisimcikler, komşu hücreler, makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücrelerce fagolizozomlarda degrade edilir (Şekil 2.22) (16, 115, 119).

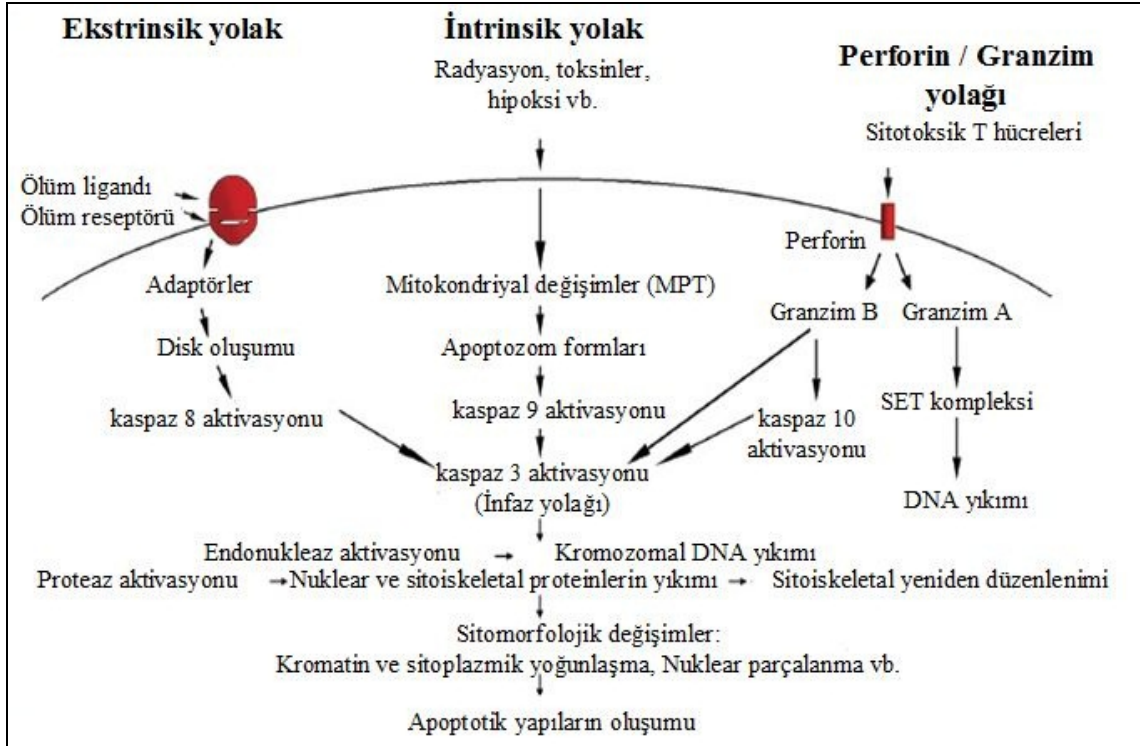
Apoptoz, nekrozdan farklı olarak inflamasyon fenomeniyle ilişkili değildir (120).



Şekil 2.22. Apoptotik hücrede görülen morfolojik değişiklikler (116)

### 2.5.3. Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptoz; kompleks, çok yönlü, moleküler olayların enerji bağımlı işleyişini gerektiren bir mekanizmadır. Apoptozda; hücre yüzey ve ölüm reseptörlerine gereksinim duyan ekstrinsik yolak, mitokondriyal kaynaklı intrinsik yolak ve sitotoksik-T hücre aracılı perforin/granzim B yolağı olmak üzere 3 yolak işlev görmektedir (10, 121) (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Apoptotik hücre ölüm çeşitlerinin şematik gösterimi (10)

### 2.5.3.1. Ekstrinsik Yolak (Reseptör Aracılı Apoptozis)

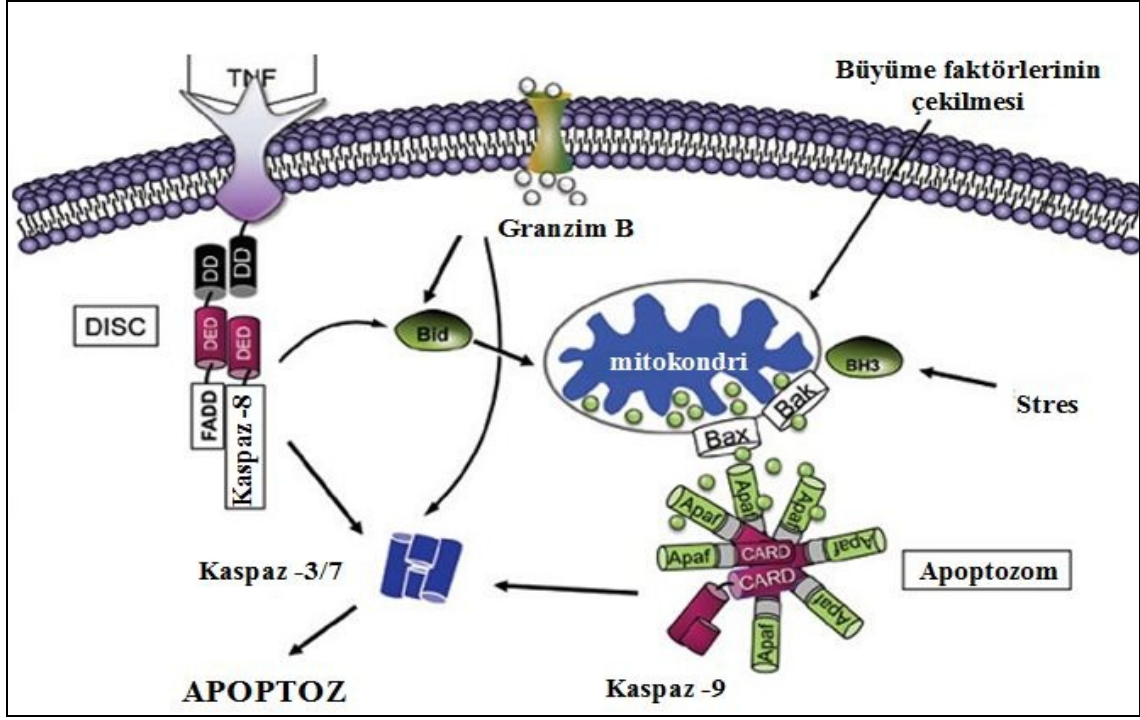
Apoptozun, ölüm reseptörü aile üyelerinin uyarılmasıyla başlar. Bugüne kadar, ölüm reseptör (DR-Death Receptor) ailesinin; TNF-R1 (Tumor Necrosis Factor-Receptor Type I), CD95 (APO/FAS), DR3, TRAIL-R1 (Tumor Necrosis-Factor related inducing ligand-Receptor Type I), TRAIL-R2 VE DR-6 (Death Receptor-6) olmak üzere 6 üyesi olduğu belirlenmiştir. TNF veya DR familyasının tüm üyeleri, benzer sistence zengin hücre dışı bölgeleri paylaşırlar. Sitos plazmik bölgeleri ise; 80 amino asitlik ölüm bölgesi adı verilen, apoptotik sinyal iletiminde merkezi rol oynayan kısımdır (10, 122).

Fas, TNF ailesine ait 45 kD'luk transmembran proteindir ve 335 aminoasitten oluşur. Varsayılan 16 a.a'lik sinyal sekansı, 80 a.a'lik ölüm domaini, 145 a.a'lik intrasellüler, 19 a.a.'lik transmembranik bölge ve 155 a.a.'lik 3 tane sistence zengin bölgeden (CRD1, CRD2, CRD3) oluşur. Tip I transmembran protein olan Fas, çoğunlukla lenfositlerde eksprese olur. PCD'nin fizyolojik düzenleniminde merkezi rol oynar. Ayrıca, immün sistemde periferel tolerans ve timik seçimde gereklidir. Fas

geni, kromozomal olarak 10q24 veya 10q23'te yerleşik olup, 25 kb'lık büyüklükte bir gendir. 9 ekzon ve 8 intron içerir. Ekzon 1; 5' untranslated bölgeden (5'UTR) ve sinyal sekansın ilk 10 a.a.'lik kısmından oluşur. Ekzon 2-5'te ekstraselüler bölge kodlanırken, ekzon 6'da da transmembran bölge kodlanır. Reseptörün sitoplazmik 36 a.a.'lik kısmını ekzon 7 ve 8 kodlarken, kalan 109 a.a.'lik kısım ölüm domainini içerir ve ekzon 9'da poliadenilasyon sinyallerine sahip 3'UTR bölgesi bulunur (123). Fas L, TNF ailesine ait tip II membran proteini. 40 kD'luk bir protein olan Fas L'nin intraselüler ve ekstraselüler bölgeleri N (amino) ve C (karboksil) uç bölgelerde yerleşiktir. Ayrıca tek bir transmembran bölge ve bir oligomerizasyon bölgesinden oluşur. Uygun reseptöre bağlandığı zaman hücrel cevabı tetikleyen trimerik ligandlardan oluşurlar (124,125).

Ölüm reseptör ailesi üyelerinin yapısında bulunan ölüm ve sitoplazmik bölgeler, apoptozun başlaması için gerekli olan sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlandığı yerlerdir. Ligandların reseptörlere bağlanmasıyla homotrimerik kompleks oluşumu tetiklenir. TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TNFR-1 (TNFR ilişkili ölüm bölgesi proteini), TRADD (TNF receptor-associated protein with death domain) ve benzer olarak Fas ilişkili ölüm bölgesi aracı proteinlerine FADD (Fas-associated death domain) bağlanırlar. Bu proteinlerin ölüm efektör domain (DED) bölgesiyle bağlanarak etkileşim bölgesi vardır. Böylece ölüme sebep olan sinyal kompleksi DISC (Death Inducing Signalling Complex) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8 'i ve prokaspaz-10'u aktive eder. Bu kaspazların aktivasyonu başta kaspaz 3 olmak üzere diğer kaspazları aktive ederek hücre ölümüne neden olur (Şekil 2.24) Aktif kaspaz DISC'ten ayrılıp kendisine spesifik hedef kaspazlara (kaspaz 3, kaspaz 8) ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan BH3-only-protein Bid (BH3-interacting domain agonist)'e bağlanır. Kaspaz 8'in DISC içindeki aktivasyonu kendisine yapısal olarak benzeyen hücrel FLICE inhibitör protein (c-FLIP) ile pozitif ve negatif olarak düzenlenir (13, 122, 126- 129).



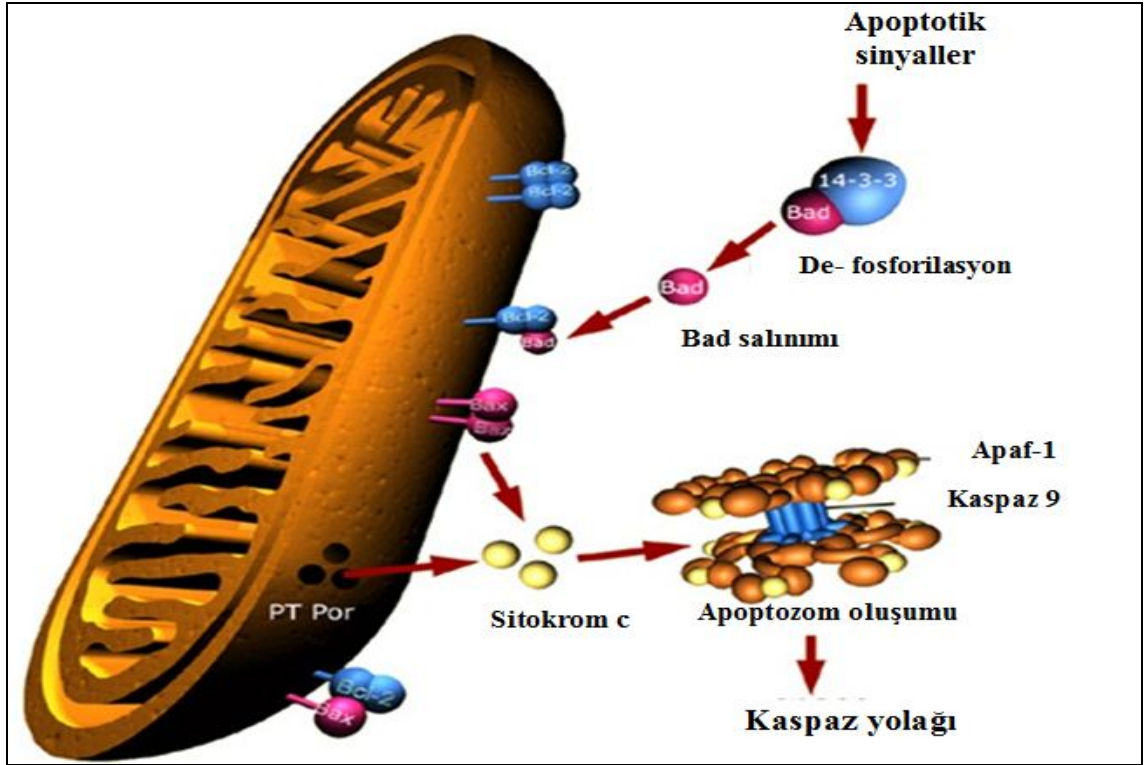


Şekil 2.24. Apoptoz mekanizmasının Ekstrinsik ve İntrinsik yollarının şematik görüntüsü (130)

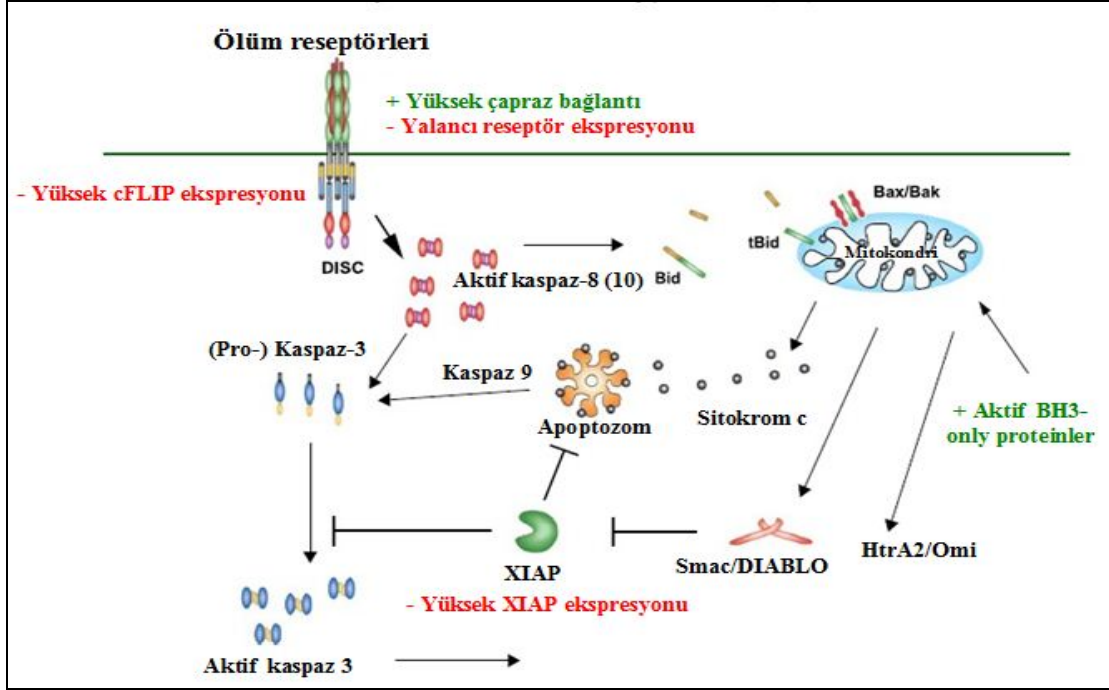
### 2.5.3.2. İntrinsik Mitokondriyal Yolak

Mitokondri; enerji üretimi, metabolizması, apoptoz ve intraselüler sinyal iletiminde önemli rollere sahiptir. Çok dinamik bir organel olup; DNA hasarı, oksidatif stres, açlık, kemoteröpotik ilaçların etkisi, sıcaklık, hormonlar gibi hücrel stres durumlarında ölüm sinyal iletiminin integrasyonu ve düzenlenmesinde merkezi rol oynar (115, 130). Mitokondri apoptoz sırasında sitoplazmaya salınan apoptojenik proteinlere sahiptir. Bunların arasında cyt c kaspaz kaskadının aktivasyonu ve hücre ölümünün gerçekleşmesinde ana role sahiptir. Ayrıca SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / Direct IAP Binding Protein With Low pI), HtrA2/Omi IAP'ye bağlanarak, antiapoptotik özelliklerini nötralize eder. Prokaspaz aktivasyonu için gerekli Hsp 60 (Heat Shock Protein 60) ve "Apoptozu Uyarıcı Faktör (AIF) de mitokondriden salınır (131). Apoptoz sırasında hücrel stresin birçok formunda mitokondriden cyt c salınımı olduktan sonra cyt c , Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen, kendisine ATP (Adenosine Tri-phosphate) veya dATP bağlanan, oligomerik Apaf-1 kompleksi'nin oluşumunu sağlar (Şekil 2.25, 2.26) Apaf-1 sinyal iletimine neden olan

kompleks domain yapısına sahiptir. Bir N- CARD (Caspase-Activating Recruitment Domain) domaini, bir nükleotid bağlayan domain ve bir oligomerizasyon domainine sahiptir (114, 132). Aktifleşen kaspaz 9, kaspaz 3 -6, -7 efektör gibi aracı kaspazların aktivasyonunu sağlar (122, 133).



Şekil 2.25. İnterinsik/Mitokondriyel apoptotik sinyal yolağı (134)



Şekil 2.26. Apoptoz mekanizmasının ölüm reseptörleri ve Bcl 2 gen ailesi ile kontrolü (132)

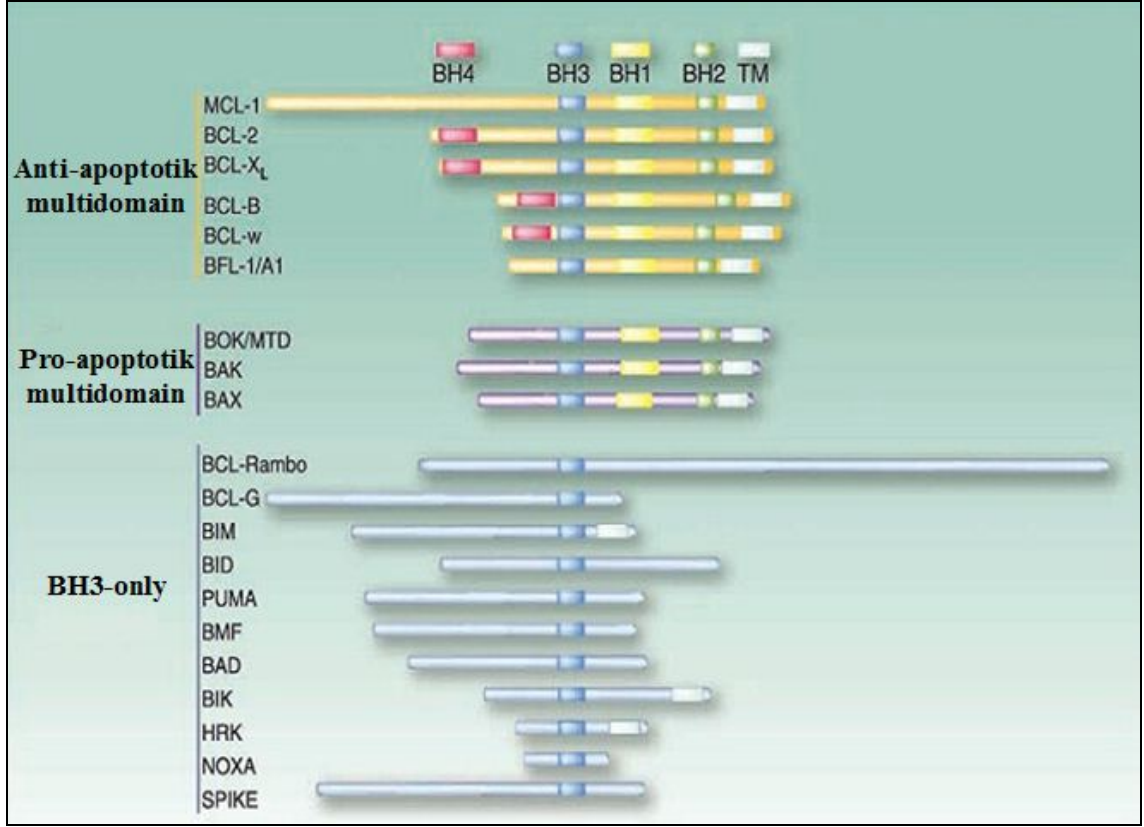
Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD: inhibitor of caspase- activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir. Böylece ICAD'ın başladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD: caspase activated deoxyribonuclease) serbestleşir. CAD, apoptozisin karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olan endonükleazdır. DNA'yı öncelikle 50-300 baz çifti uzunluğunda parçalara ayırır, daha sonra 180-200 baz çifti olacak şekilde yıkar. Ayrıca aktif kaspaz 3, ilgili proteinleri (hücre iskeleti proteinleri aktin veya nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimerazı (PARP) parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar. AIF; direkt olarak nükleusa giderek kromatin yoğunlaşmasını başlatır ve endonükleaz G; kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak nükleustaki parçalanmaya katılır (133-135).

#### 2.5.4. Apoptozun Moleküler Regülatörleri olarak BCL 2 ailesi

İntrinsik yolak ya da mitokondriyel yolakta kaspaz aktivasyonu, tamamen dış mitokondriyel membranın permeabilizasyonuna bağlıdır. Bu yapı, permeabilite transisyon porlarının komponentleri ve biyoenerjistik akışta yer alan Bcl 2 ailesi üyeleri, mitokondriyel lipitler ve proteinlerce düzenlenir (136). Özellikle mitokondriyel membranın bütünlüğü Bcl 2 gen ailesi üyelerince düzenlenir. Ayrıca embriyogenez, sinir sistemi, hematopoetik dokular ve spermatogenez gibi önemli fizyolojik olayların düzenlenmesinde de rol alırlar (132, 137).

*C. elegans*'taki benzeri Ced-9 olan Bcl 2, 18q kromozom bölgesinde, B hücreli lenfomada, t(14;18) kromozomal translokasyonunda keşfedildiği için Bcl 2 adını almıştır (138, 139). Bugüne kadar 25 Bcl 2 ailesi üyesi belirlenmiştir. Bcl 2 ailesinin tüm üyeleri BH1, BH2, BH3, BH4 domain bölgelerinden en az birisini içerirler. Yapılan mutagenез çalışmalarında BH1-4 domainlerinin homo- ve heterodimerizasyon oluşturarak bu proteinlerin birbirlerini etkilediği gösterilmiştir (140). Bcl 2 ailesi üyeleri yapısal ve işlevsel durumlarına göre 3 grup altında sınıflandırılırlar:

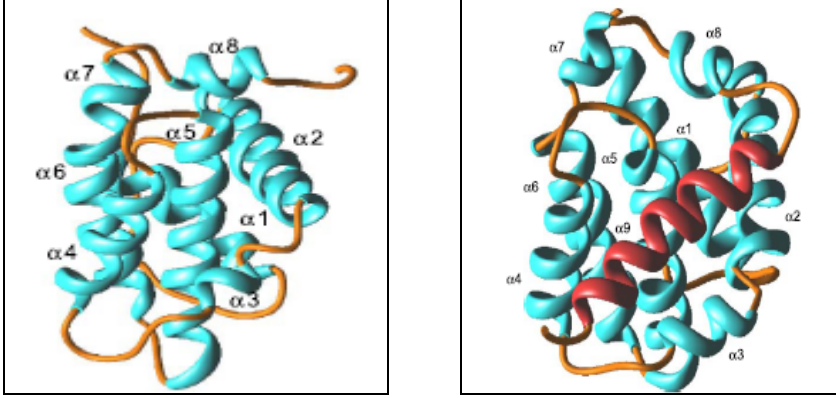
- 1) Bcl 2, Bcl-XL, Mcl-1, A1 (Bfl-1), Boo, Bcl-w'yi içeren **antiapoptotik** üyelerdir. Yapılarında BH1-BH4 domainleri bulundurmalarına rağmen bazı üyelerde BH4 domaini görülmez.
- 2) Yapılarında BH1, BH2, BH3 domainleri bulunan ve Bax, Bak, Bad, Mtd (Bok), Diva gibi proteinleri içeren **proapoptotik** üyelerdir. BH4 domaini içermemelerine rağmen bazı üyeleri BH4 homolojisi gösterirler.
- 3) Bik, Bid, Bim, BMF, NOXA, PUMA, Hrk (DP5), Blk, Bnip3, Bnip3L'yi içeren **BH-3-Only proteinlerdir**. Yapılarında yalnızca BH3 homoloji sekansları bulunur (Şekil 2.27) (14, 141).



Şekil 2.27. Bcl 2 gen ailesinin korunmuş domainlerine göre sınıflandırılması (14)

Yedi kor Bcl 2 ailesi proteinlerinin pro ve antiapoptotik üyeleri arasında herhangi ayırt edici bir farklılık yoktur. Bu yedi kor protein; amfipatik helikslerin çiftiyle, her iki yandan kuşatılan bir hidrofobik heliks-turn-heliks hairpin ile helikal yapı gösterirler (137). Membran lokalizasyon paternleri, anti- ve proapoptotik üyeler arasında farklılık gösterir. Bcl'2 gibi antiapoptotik üyeler, mitokondri dış membranın sitoplazmik yüzeyinde, endoplazmik retikulum ve nükleer membranda lokalizedir (142). Bu üyelerden Bcl 2, 8 alfa heliks yapısı şeklinde katlanmış 25-26 kD'luk bir proteindir. BH4 (10-29 aa), BH3 (90-107 aa), BH1 (133-152 aa),ve BH2 (184-199 aa) olmak üzere 4 domain, bir X domaini (192-203 aa) ve bir düzenleyici\flexible loop domaini içerir. BH1, BH2 domainleriyle birlikte BH3 domaini, pro-apoptotik proteinlerin alfa helikal, amfipatik BH3 domainleriyle heterodimerizasyonda önemli olan hidrofobik reseptör bölgesi oluştururlar (143). C terminali, intraselüler membranlarda lokalizasyonu sağlayan bir hidrofobik transmembran içerir (144). Bax, Bid gibi proapoptotik üyeler ise temel olarak sitozolde bulunurlar ve sadece aktive oldukları zaman mitokondriyel membrana transloke olurlar. Membrana bu şekilde bağlanma, apoptozun antiapoptotik

üyelerce indüklenmesini ya da inhibisyonunu sağlayan, hücre içinden cyt c salınımını sağlar (140).



Şekil 2.28. Bcl 2 ve Bax proteinlerinin X-ışını kristalografisine göre 3 boyutlu yapıları (141)

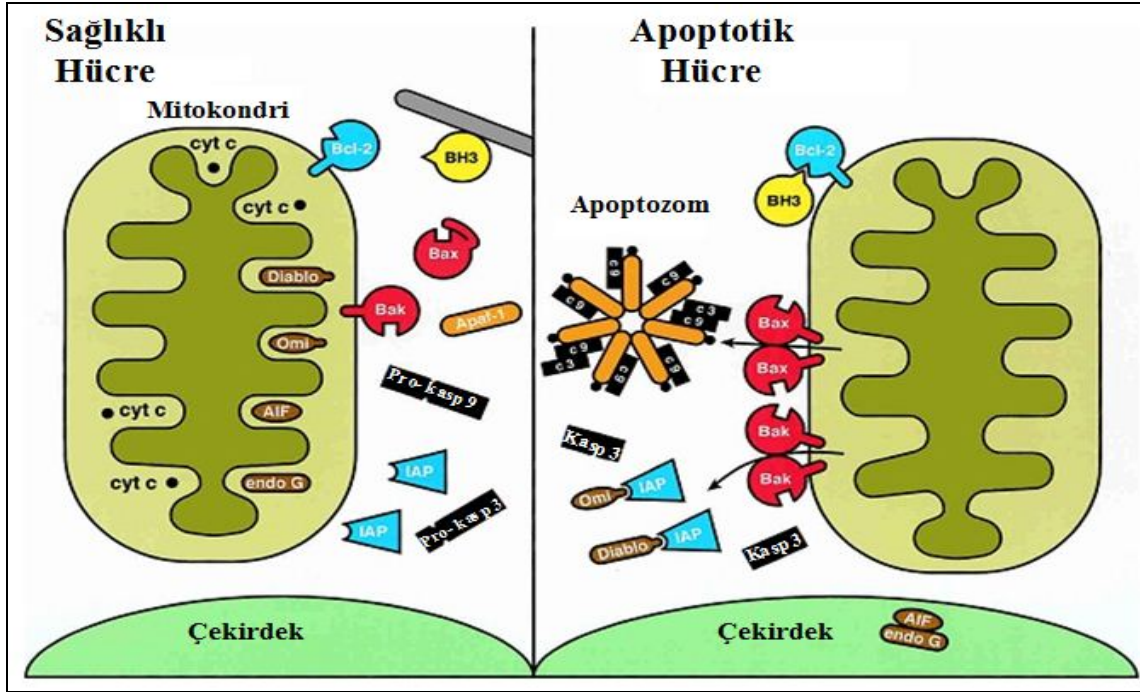
Proapoptotik üyelerden Bax; 9 alfa helikse sahiptir. Bir N terminal, iki, reaktif sistein grubu ve bir fosforilasyon bölgesi vardır. Alfa heliks 9 ve alfa heliks 5\6 hidrofobik bölge olup inaktiftir. Bax'ın sitozolik formunda görülürler. Bu bölge membran insersiyonu için gereklidir. Bax'ın BH3 domaini alfa heliks 2 yapısının içinde bulunup, diğer Bcl-2 ailesi üyeleriyle heterodimerizasyonda görev alır. Bax'ın yapısında bulunan 2 sisteinden ilki alfa 2 helikste 62.pozisyonda, ikincisi ise alfa 5\6 helikste 126. pozisyonda bulunur. Bu 2 sistein disülfid bağları ile homodimerler oluşturarak, membran insersiyonunu başlatırlar (Şekil 2.28) (145).

Proapoptotik üyelerden Bax ve Bak normalde sitoplazmada lokalizedirler. Apoptozis başladıktan sonra mitokondri dış membranına transloke olurlar. Burada konformasyonel değişimler, oligomerizasyon geçirerek dış membrana lokalizasyonları gerçekleşir ve MPTP (Mitokondriyal geçirgen transisyon por)'nin permeabilitesini arttırlar. Antiapoptotik Bcl 2 ailesi üyeleri, Bax'ın aktif konformasyonunu sağlar ve mitokondriyal dış membrana insersiyonunu önleyerek, MPTP'nin normal permeabilizasyonunu sürdürür. Böylece cyt c, AIF, SMAC/DIABLO gibi proapoptotik üyelerin salınımını engelleyerek apoptozu inhibe eder (8).

Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik ölümleri takiben, BH3-only proteinler defosforilasyonu ve yıkımı içeren posttranslasyonel modifikasyonlarla aktive olarak

mitokondriye transloke olurlar (146). Bax ve Bak proapoptotik üyelerin aktivasyonu ile OMM (Outer Mitochondrial Membrane)'ye permeabilizasyonu BH3-only proteinlerin fonksiyonuyla gerçekleşir. BH3-only proteinler doğrudan aktivatörler ve baskılanmayı kaldıran/hassaslaştıran grup olmak üzere sınıflandırılabilirler. BID, BIM gibi doğrudan aktivatör BH3 only proteinler, OMM üzerinde Bax ve Bak'ı aktive ederler. Böylece cytochrome c salınımını ile apoptozu başlatırlar (Şekil 2.29). BAD, BIK, BMF, HRK ve PUMA gibi baskılanmayı kaldıran, BH3-only proteinler ise Bcl 2, Bcl-XL gibi antiapoptotik üyelerden doğrudan aktivatör proteinleri salarak, MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization)'u başlatırlar (147). Bunların yanı sıra BH3-only proteinlerin biyolojik fonksiyonları üzerine alternatif hipotezler geliştirilmiştir. Buna göre 4 ana model hipotez belirtilmiştir:

1. BH3-only proteinler, Bcl 2 ailesi veya intrinsik mitokondiyel proteinler olmaksızın, fakat kardiyolipin gibi negatif yüklü lipitler ile otonom olarak cytochrome c salınımını indüklemektedir.
2. Antiapoptotik Bcl 2 ailesi üyelerinin aktivasyonu ve inhibisyonunu sağlar.
3. Multidomain proapoptotik Bax ve Bak'ı site salınımını için aktive ederler.
4. ANT (Adenine Nucleotide Exchanger) veya VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) gibi intrinsik mitokondiyel disfonksiyonunu uyarmakta ve böylece cytochrome c salınımını sağlamaktadır (146, 148).



Şekil 2.29. Sağlıklı ve apoptotik hücrede mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin gösterimi (149)

Hematolojik hücre serilerini içeren malignansiler, anormal genlerin ekspresyonu ya da normal genlerin anormal ekspresyonu sonucunda gelişen, moleküler genetik temelli bozukluklardır. Bu malignansilerin nedeni, büyük çoğunlukla kazanılmış klonal, genetik olaylar olup, bu hastalıkların moleküler tanısı için avantaj sağlamaktadır (149). Apoptozun malignansilerde anlaşılması, sadece bir hastalığın patogenezinin öngörü kazandırması bakımından değil, ayrıca hastalığın nasıl tedavi edileceği hakkında ipucu vermesi nedeniyle de önemlidir (150). Hedef hücrelerde apoptozun uyarılması, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapiyi içeren birçok anti-tümör tedavilerinde kritik bir mekanizmadır. Apoptozda meydana gelen hatalar, kemoterapi etkisinin sınırlandırılmasına neden olabilir. Apoptozun tam olarak anlaşılması, kemoterapötik ilaçların anti-tümör aktivitelerinin de anlaşılmasını sağlayacak bir anahtar faktördür (151). Çalışmamızda hematolojik malignansilerden Miyeloproliferatif hastalık grubuna dahil olan Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz'da apoptotik yolda görevli genlerde, polimorfizmlerin saptanması ve saptanan bu polimorfizmler ile ilintisinin araştırılması amaçlanmış olup, bu konuda literatürdeki başka araştırmalara da yön vereceği düşünülmektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **BAP-SBE TBG (GD) 2010-6 YL** kodlu proje olarak desteklenen ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan; “Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastalıklarında, apoptotik yolda görevli gen polimorfizmlerinin” araştırıldığı çalışmada, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı tarafından gerçekleştirildi. Moleküler biyolojik analizler ise Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı’nda yapıldı.

Çalışmada; hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerden DNA izolasyonu için, 4-5 ml’lik venöz kan 1 ml % 2 ‘lik etilendimetiltetraasetik asit (EDTA) içeren, 15 ml’lik santrifüj tüplerine konuldu. DNA izolasyonuna kadar +4°C de saklandı. DNA eldesi Miller’in tuz çöktürme ve DNA izolasyon kit (*Roche, Diagnostics, Mannheim Germany, Nucleospin MACHEREY-NAGEL, Germany*) yöntemlerine göre yapıldı. Elde edilen DNA’lardan FAS -670 G>A rs1800682, FAS -1377 G>A rs2234767, FASL IVS2 -124 A>G rs5030772, BAX -248 G>A rs4645878 ve BCL 2 -938 C>A rs2279115 polimorfizmlerine ait gen bölgelerinin çoğaltılması, genotiplendirilmesi ve analizleri “ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)” cihazı ve “SDS 2.0.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems)” programı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

#### 3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- ABI Prism 7500 Real Time-PCR System (Applied Biosystems)” cihazı
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Santrifüj (Nüve NF-800)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)

- Vorteks (VELP)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Elektromanyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031D)
- Buzdolabı (Arçelik-8188 NF)

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- EDTA (Sigma E-5134)
- Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- Tris EDTA Buffer
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Proteinaz K (MBI Fermentas E00491)
- Bidistile Su (Sigma W-3500)
- Amonyum asetat (AMRESCO MW 77.08)
- 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- DNA İzolasyon Kiti (Roche, Nucleospin)
- Assay Mix (**FAS -670** G>A rs1800682 için ABI, C\_9578811\_10, **FAS -1377** G>A rs2234767 için ABI, C\_12123966\_10, **FASL IVS2 -124** A>G rs5030772 için ABI, C\_32334221\_10, **BAX -248** G>A rs464878 için ABI, C\_27848291\_10, **BCL2 -938** C>A rs4645878 için ABI, C\_3044428\_10)

### 3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

#### 3.1.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

##### *Nüklei Lizis Buffer*

Tris-HCl .....1.576 g

NaCl .....23.4 g

Na<sub>2</sub>EDTA.....0.7 g

1 litre distile suya tamamlanıp çözüldükten sonra otoklavda steril edildi ve +4°C’de saklandı.

##### *%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi*

10 g SDS, 100 ml distile suda çözüldü.

##### *10 M Amonyum Asetat Tampon Çözelti*

148 g Amonyum Asetat, 200 ml distile suda çözüldü.

##### *TE Buffer*

Tris-HCl .....0.394 g

Na<sub>2</sub> EDTA .....0.093 g

250 ml distile suya tamamlanıp çözüldükten sonra otoklavda steril edildi ve +4°C’de saklandı.

##### *Proteinaz K (Fermentas)*

Liyofilize 100 mg proteinaz-K, 10 ml steril distile su ile çözümlenerek 10 mg/ml’lik konsantrasyona getirildi ve –20°C’de saklandı.

### **3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması**

Bu çalışmaya; hasta grubu olarak, Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz tanısı almış 93 hasta birey ve kontrol grubu olarak, herhangi bir klinik öyküsü olmayan sağlıklı 93 birey olmak üzere toplam 186 bireyden alınan kan örnekleri dahil edildi.

Hem hasta hem de kontrol grubunu oluşturan bireylere ait bilgiler, etik kurul tarafından uygun görülen aydınlatılmış onam formları kullanılarak alındı. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden her bireyin onayı alındıktan sonra, 4-5 ml periferik kan alınarak 1 ml, % 2'lik EDTA içeren santrifüj tüplerine konuldu.

### **3.3. FAS -670 G>A rs1800682, FAS -1377 G>A rs2234767, FASL IVS2 -124 A>G rs5030772, BAX -248 G>A rs4645878 ve BCL 2 -938 C>A Polimorfizmlerinin Real Time PCR Yöntemiyle Moleküler Genetik Analizi:**

#### **3.3.1. DNA İzolasyonu**

Hasta ve kontrol bireyelerine ait EDTA'lı tüplere alınmış periferik kandan kit ve manuel yöntem kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi (High Pure PCR Template Preparation Kit; Roche, Diagnostics, Mannheim *Germany*, NucleoSpin Genomic DNA from Blood MACHEREY-NAGEL *Germany*) ve Miller tuz çöktürme yöntemi kullanıldı (152).

##### **3.3.1.1. Miller tuz çöktürme yöntemi**

Hasta ve kontrol grubuna ait bireyelerden DNA izolasyonu için 4-5 ml venöz kan alınıp içinde 1 ml EDTA bulunan 15 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine konularak +4°C'de saklandı. DNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulandı:

1. Periferik kan örnekleri, steril soğuk distile su ile 10 ml'ye tamamlandı ve 2-3 dk hızlı karıştırılıp homojenize edildi.
2. Homojenizasyondan sonra 10 dk 2000 rpm'de santrifüjlenerek sonrasında, spernant kısımları transfer pipeti yardımıyla atıldı. Pellet zerine steril soğuk distile su ilave ile 14 ml'ye tamamlandı.

3. Soğuk distile su eklenen tüpler tekrar hızlı olarak çalkalandı ve 10 dk 2000 rpm'de santrifüjlendi.
4. Supernatant kısım; berrak bir görüntü alana kadar steril soğuk distile su ile yıkama işlemleri yaklaşık 4-5 kere tekrarlandı. Yıkama işlemi sonunda tüm eritrositlerin parçalanarak uzaklaşması sağlandı.
5. Supernatant kısım berraklaştıktan sonra, pelet üzerine lökosit nukleuslarının parçalanması amacıyla, 3 ml nüklei lizis tampon eklendi.
6. Nüklei lizis tampon eklenen tüpler yaklaşık 15-20 kere elle çalkalandı.
7. Tüplere 200 µl % 10'luk SDS ve 150 µl proteinaz-K eklenerek homojenize edildi.
8. Bir gece 37°C'de etüvde inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrası; tüplere 2 ml, 6 M Amonyum asetat eklendi ve karıştırıldıktan sonra 10 dk oda ısısında bekletildi.
10. Tüpler 15 dk 3500 rpm'de santrifüjlendi.
11. Supernatant transfer pipetiyle yeni bir tüpe alındı ve üzerini tamamlayacak şekilde, soğuk saf etanol (% 99,8) eklenerek, DNA'nın yoğunlaşması sağlandı.
12. Etanol içinde; yoğunlaşmış görülebilir hale gelen DNA mikropipet yardımıyla, dikkatlice sarılarak daha önce 500 µl TE tampon konulan ependorf tüplere aktarıldı. 37°C'lik etüvde bir gece bekletilerek, DNA'ların çözünüp homojen hale gelmesi sağlandı. Moleküler analize kadar 4°C'de saklandı.

### **3.3.2. Genotiplerin Belirlenmesi**

FAS -670 G>A rs1800682, FAS -1377 G>A rs2234767, FASL IVS2 -124 A>G rs5030772, BAX -248 G>A rs4645878 ve BCL 2 -938 C>A rs2279115 polimorfizmleri "Applied Biosystems Foster City, CA" tarafından üretilen, bir çift 900 nmol primer ve bir çift 200 nmol prob karışımını içeren "Pre-designed TaqMan Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Assays" sistemine göre Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle belirlendi.

### 3.3.2.1. SNP Özellikleri

#### FAS -670 G>A rs1800682 (ABI, C\_9578811\_10)

TCATATGGTAACTGTCCATTCCAG[A/G]AACGTCTGTGAGCCTCTCATGTTG  
C ([VIC/FAM])

```
http://www.ensembl.org/index.html  
  
ACTTTGAACAGTGTTCAACCAGAGCACGAAAGAATTACAAGATTTTTTTTTTAAAGAAAATT  
GGCCAGGAAATAATGAGTAACGAAGGACAGGAAGTAATTGTGAATGTTTAATATAGCTGG  
GGCTATGCGATTTGGCTTAAGTTGTTAGCTTTGTTTTCTCTTGAGAAATAAAAACTAAG  
GGGCCCTCCCTTTTCAGAGCCCTATGGCGCAACATCTGTACTTTTTCATATGGTAACTG  
TCCATTCCAGAAACGTCTGTGAGCCTCTCATGTTGCAGCCACAACATGGACAGCCCAGTC  
AAATGCCCCGCAAGTCTTTCTCTGAGTGACTCCAGCAATTAGCCAAGGCTCCTGTACCCA  
GGCAGGACCTCTGCGCTCTGAGCTCCATTCTCCTTCAAGACCTCCCCAACTTCCCAGGTT  
GAACTACAGCAGAAGCCTTTAGAAAGGGCAGGAGGCCGGCTCTCGAGGTCCTCACCTGAA
```

Şekil 3.1. FAS -670 G>A rs1800682 (ABI, C\_9578811\_10), çoğaltılan bölge.

#### FAS -1377 G>A rs2234767 (ABI, C\_12123966\_10)

CAGAGTGTGTGCACAAGGCTGGCAC[A/G]CCCAGGGTCTTCCTCATGGCACT  
AA ([VIC/FAM])

```
http://www.ensembl.org/index.html  
  
TTACCTCTCCTTTCCCTCCCTCACACCCCTTTTCCTTCCTTCTTTTTACATTTTTTTATT  
TAAATGAACTTTTCAATTTGGAATAGTTTTAGGATTTCAAAAAATTTGCAGAGATAATAC  
AGAGAATGCCCATATACCATCCTCCTTATCCCCTTCTTTTTGTGTCTATTAGATGCTCA  
GAGTGTGTGCACAAGGCTGGCACGCCAGGGTCTTCCTCATGGCACTAACAGTCCACTGA  
AAGGTGGAACAGAGACAAGCCTATCAACACCTACAAGACTGGTGGTAAGTGCAGTGACAG  
ATGCAAAACACAGGGTGATGGAAAGCCCTCAGGAGGGTAACCTAACCTAGATTTGAGGGC  
CCAAACAGGCTCCAGAAGAAAATGTCAACTGAGAGGAAGCCTGAAGGATGAACAGTGGGC  
TAAGCAAAGGGTTATTAATGTGTTATTAATGGGTTGAATCTAATTGGGAAGGGAGAGAGG
```

Şekil 3.2. FAS -1377 G>A rs2234767 çoğaltılan bölge

**FASL IVS2 -124 A>G rs5030772 (ABI, C\_32334221\_10)**

CAGTTCAGACCTACATGATTAGTAT[A/G]TGTTAGACTGTTGCCATTTACGGT  
T ([VIC/FAM])

```
http://www.ensembl.org/index.html

GGGACAATAATACCTACCTCAAAGGGTTGTGGTGAGTTCTAAATGCAATAACTGACATGA
CAGCTCTTTATGAATAAATGTTTATATTAATTATGTTTTATTGTAACATTATAATTTATA
CATATGTCAATCTTAATTTGGTTTTATTTTTTTACCTCTTTGTTTCTGAAATATAGACTAC
TATGAATCCTGCAGTTCAGACCTACATGATTAGTATATGTTAGACTGTTGCCATTTACGG
TTTTAAAATCTTTTTTTTAAAATGATTGGATTTAAATCCCACCAAATAATAGTTGCTA
TTTCATTTTAAACATATATTTTTCTCTCTCTATGATACAGGCCACCCAGTCCACCCCT
GAAAAAAGGAGCTGAGGAAAGTGGCCATTTAACAGGTCTGTATCTGGAAGGTACAGGT
GAGATTTGGGAAAGCTTTTGGCAAAGGCAAATGGCTGCCTGGTTTCCATTACCAGGCT
```

**Şekil 3.3.** FASL IVS2 -124 A>G rs5030772 çoğaltılan bölge

**BAX -248 G>A rs464878 (ABI, C\_27848291\_10)**

AGGCATTAGAGCTGCGATTGGACGG[A/G]CGGCTGTTGGACGGCGCCACTGC  
TG ([VIC/FAM])

```
http://www.ensembl.org/index.html

CCTGTAATCCCAGCGCTTTGGAAGGCTGAGACGGGGTTATCTCTTGGGCTCACAAGTTAG
ATCAGTTTTTTAGTCATCTATAACGTCCTGCCTGGAAGCATGCTATTTTTGGCCTCTGAGCT
TTTGCACCTTGCTAATTCCTTCTGCGCTGGGGAGAGCTCAAACCCTGCCCGAACTTCTAA
AAATGGTGCCTGGATAAATGAAGGCATTAGAGCTGCGATTGGACGGACGGCTGTTGGACG
GCGCCACTGCTGGCACTTATCGGGAGATGCTCATTGGACAGTCACGTGACGGGACCAAAC
CTCCCGAGGGAGCGAGGCAGGTGCGGTACAGTGACCCGGCGGCGCTGCGGGGCAGCGGCC
ATTTTGCGGGGCGGCCACGTGAAGGACGCACGTTACAGCGGGGCTCTCACGTGACCCGGGC
GCGCTGCGGCCGCCCGCGCGGACCCGGCGAGAGGCGGCGGGAGCGGCGGTGATGGAC
```

**Şekil 3.4.** BAX -248 G>A rs464878 çoğaltılan bölge

### BCL 2 -938 C>A rs2279115 (ABI, C\_3044428\_10)

TCCGTCCCCGGCTCCTTCATCGTCCC[A/C]TCTCCCCTGTCTCTCTCCTGGGG  
AG ([VIC/FAM])

<http://www.ensemble.org/index.html>

```
GGGGTGCGCCGGTGGGGTGCAGCGGAAGAGGGGGTCCAGGGGGGAGAACTTCGTAGCAGT
CATCCTTTTTAGGAAAAGAGGGAAAAATAAAACCCTCCCCCACCACCTCCTTCTCCCCA
CCCCTCGCCGCACCACACACAGCGCGGGCTTCTAGCGCTCGGCACCGGCGGGCCAGGCGC
GTCCTGCCTTCATTTATCCAGCAGCTTTTCGAAAATGCATTTGCTGTTTCGGAGTTAAT
CAGAAGAGGATTCCTGCCTCCGTCCCCGGCTCCTTCATCGTCCCCTCTCCCCTGTCTCTC
TCCTGGGGAGGCGTGAAGCGGTCCCCTGGATAGAGATTCATGCCTGTGCCCCGCGGTGTG
TGCGCGCGTGTAATTGCCGAGAAGGGGAAAACATCACAGGACTTCTGCGAATACCGGAC
TGAAAATTGTAATTCATCTGCCGCCGCCGCTGCCTTTTTTTTTTCTCGAGCTCTTGAGAT
```

Şekil 3.5. BCL 2 -938 C>A rs2279115 çoğaltılan bölge

#### 3.3.2.2. Real Time-PCR reaksiyon ortamı (total 25 µl):

- 12.5 µl, 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- 1.25 µl, 20X SNP Genotyping Assay Mix, FAS -670 G>A rs1800682 için ABI, C\_9578811\_10, FAS -1377 G>A rs2234767 için ABI, C\_12123966\_10, FASL IVS2 -124 A>G rs5030772 için ABI, C\_32334221\_10, BAX -248 G>A rs464878 için ABI, C\_27848291\_10, BCL2 -938 C>A rs4645878 için ABI, C\_3044428\_10 (Applied Biosystems Foster City, CA, TaqMan SNP Genotiplleme Sistemine göre üretilen bir çift 900 nmol primer ve bir çift 200nmol VIC/FAM işaretli MGB prop içeren karışım)
- 2.5 µl DNA örneği (30 ng)
- 8.75 µl Distile Su

#### 3.3.2.3. Real Time-PCR reaksiyon Şartları:

60°C'de	1 dakika ön inkübasyon	1 döngü
95°C'de	10 dakika aktivasyon	1 döngü
95°C'de	15 saniye denatürasyon	40 döngü
60°C'de	1 dakika bağlanma/uzama	40 döngü



Real Time PCR işlemi ve genotiplerin belirlenmesi “ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)” cihazı ve “SDS 2.0.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems)” programı kullanılarak gerçekleştirildi.

### **3.4. İstatistiksel Analiz**

Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastalıkları ile kontrol; Fas, Fas L, Bax, Bcl 2 genlerinin polimorfizmleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla uygulanan istatistiksel testler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı’ndan danışmanlık alınarak yapıldı.

Yaş bakımından hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında: “Independent Samples t test”, hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkilerinin incelenmesinde, ise “Chi-square veya Likelihood ratio testleri” kullanıldı. Genotipler bakımından hasta ve kontrol gruplarının “Hardy-Weinberg dengeleri” kontrol edildi. Sürekli değişkenler için; tanımlayıcı istatistikler, “ortalama ve standart sapma cinsinden”, kategorik değişkenler için ise; frekans ve yüzde olarak verilmiştir. İstatistik analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapıldı,  $p < 0,05$  için sonuçlar anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

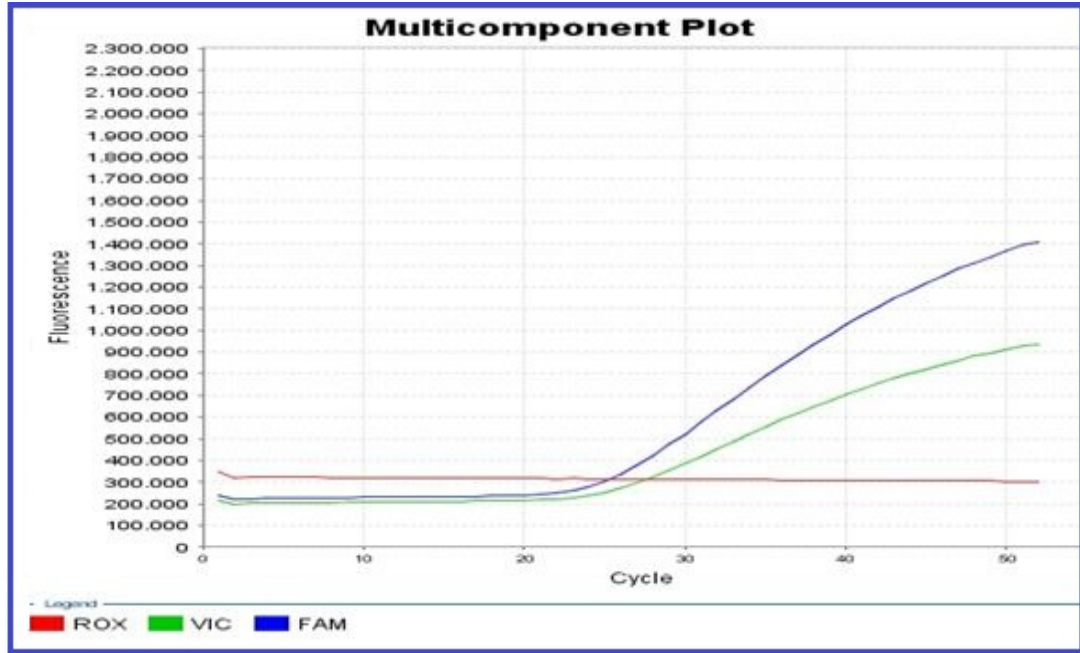
Miyeloproliferatif hastalık grubuna dahil olan Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastalıklarında, apoptotik yolda görevli Fas, Fas L, Bax ve Bcl 2 gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışmada, deney grubu Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı'nda PV ve ET tanısı almış 28-85 yaş aralığındaki 93 bireyden oluşturulurken, araştırma popülasyonunun kontrol grubu, herhangi bir hematolojik malignansiye sahip olmayan, 40-81 yaş aralığındaki 93 bireyden oluşturuldu. Kontrol ve deney gruplarındaki tüm bireylere ait DNA örneklerinden genotiplerin belirlenmesi için "ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)" cihazı ve "SDS 2.0.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems)" programı kullanıldı.

### 4.1. Real Time-PCR Analiziyle İlgili Bulgular

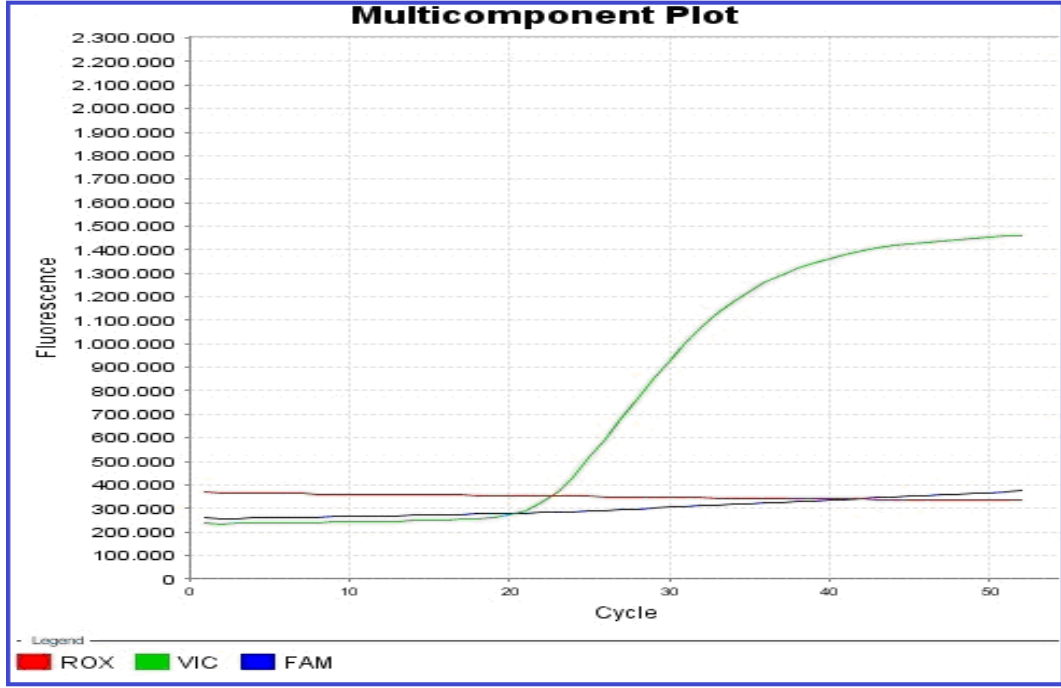
Fas -670, Fas -1377, FasL IVS2 -124, Bax -248 ve Bcl 2 -938 polimorfizmleri için 93 hasta ve 93 kontrolü içeren araştırma popülasyonundaki her bir birey için genotiplendirme işlemi, bir çift 900 nmol primer ve bir çift 200 nmol prob karışımını içeren "Pre-designed TaqMan Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Assays" sistemine göre Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle belirlendi. Her bir gen polimorfizmine ait alleller uygun floresan boya ile işaretlenip (Fas, Fas L, Bax için A= VIC, G= FAM ve Bcl 2 için A=VIC, C= FAM), elde edilen PCR amplifikasyon eğrileri ile her bir örneğin genotiplendirilmesi yapıldı (Şekil 4.1, 4.2, 4.3)



Şekil 4.1. Real-Time PCR analizi ile, VIC ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, Fas -670 bölgesindeki GG homozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)



Şekil 4.2. Real-Time PCR analizi ile, VIC ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, Fas -670 bölgesindeki AG heterozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)



Şekil 4.3. Real-Time PCR analizi ile, VIC ile işaretlenen ‘A’, FAM ile işaretlenen ‘G’ nükleotidlerin, Fas -670 bölgesindeki AA homozigot genotipik dağılımları. (ROX: Referans boya)

#### 4.2. PV ve ET Görülme Oranlarının Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı

Çalışmada hasta grubunu oluşturan PV hastalarının 19 tanesi erkek (% 50,0) ve 19'u kadın (% 50,0) olup yaş ortalamaları  $60,86 \pm 16,14$  idi. ET hastalarının 23'ü erkek (% 41,82) ve 32'si kadın (% 58,18) olup yaş ortalaması  $58,64 \pm 15,17$ 'tü. Kontrol grubu olarak seçilen sağlıklı 93 bireyin 42'si erkek (% 45,16), 51'si kadın (% 54,84) olup; bu grubun yaş ortalaması  $51,96 \pm 10,73$  idi (Çizelge 4.1).

	<b>PV</b>	<b>ET</b>	<b>KONTROL</b>
<b>n</b>	38	55	93
Yaş (yıl)(ortalama $\pm$ SS)	60,86 $\pm$ 16,14	58,64 $\pm$ 15,17	51,96 $\pm$ 10,73
CİNSİYET(K/E)	19/18	32/23	51/42

**Çizelge 4.1.** PV ve ET hastalarında cinsiyet ve yaş ortalamalarına göre dağılımı

Çalışmamızda PV ve ET hastalarını içeren toplam 93 hastanın yaş ortalaması  $59,53 \pm 15,52$  iken, sağlıklı kontrol grubu olarak seçilen 93 bireyin yaş ortalaması  $51,96 \pm 10,73$  olup; yaş bakımından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görüldü ( $p=0,001$ ) (Çizelge 4.2). Literatürden elde edilen verilere göre PV ve ET hastalıklarının bireylerde görülme yaşı; 55-60 yaş aralığında olmakla birlikte, çalışmamızda deney grubunu oluşturan PV ve ET hastalarının benzer yaş aralığında olmasına dikkat edildi.

	<b>Grup</b>	<b>N</b>	<b>Ortalama</b>
<b>YAŞ</b>	Hasta	93	59,53 $\pm$ 15,52
	Kontrol	93	50,19 $\pm$ 10,73

**Çizelge 4.2.** Hasta ve Kontrol gruplarına göre yaş ortalama dağılımı

#### 4.3. Fas -670 G>A (rs1800682) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi

Yapılan istatistiksel analizde; kontrol ve hasta gruplarının *FAS* -670 (*G>A* *rs1800682*) polimorfizmi açısından “Hardy Weinberg” dengesinde olduğu saptandı. (PV’li grup için  $p=0,758$ , ET’li grup için  $p=0,255$  ve kontrol grubu için  $p=0,601$ ).

*FAS* -670 *G>A* (*rs1800682*) polimorfizmine ait genotip oranları karşılaştırıldığında; Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastaları ile kontrol grubu arasında genotip dağılımları birbirine benzer bulundu. ( $p=0,605$ )(Şekil 4.4).

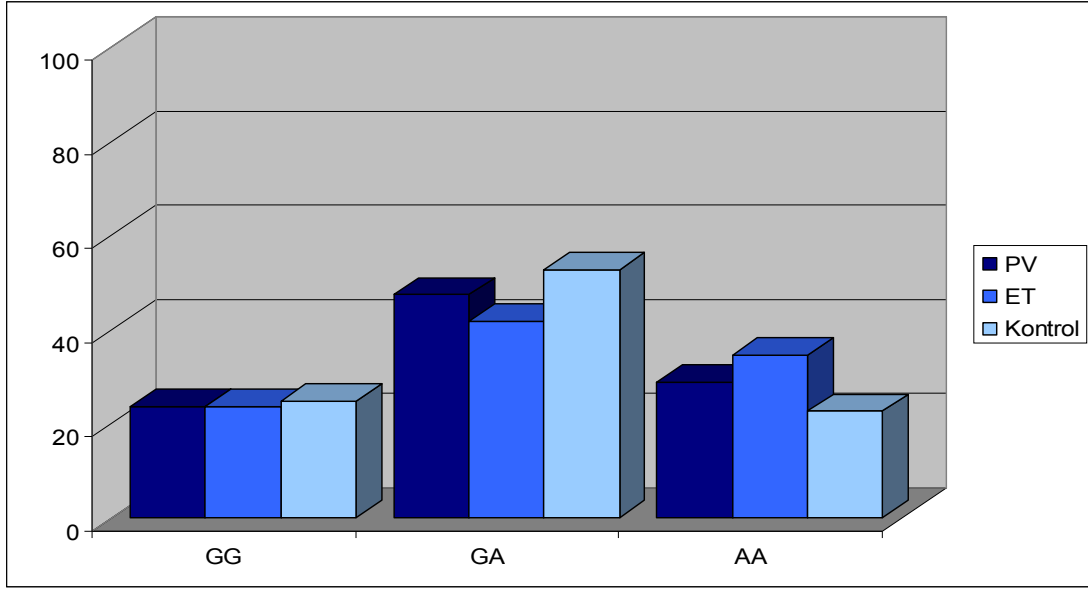
Kontrol grubundaki bireyler ile PV ve ET’li hastalarına ait genotip sıklıkları incelendiğinde ise;

- **GG** genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 24,7 iken; PV’li hastalarda % 23,7 ve ET’li hastalarda %23,6
- **GA** genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 52,7 iken; PV’li hastalarda % 47,4 ve ET’li hastalarda %41,8
- **AA** genotipinin görülme sıklığı ise; kontrol grubunda % 22,6 iken; PV’li hastalarda % 28,9 ve ET’li hastalarda %34,6 olarak bulundu.

Sonuçlar allel sıklığı açısından miktar ve oransal olarak incelendiğinde; kontrol grubunda G alleli %51,1 PV’li hastalarda %47,4 ET’li hastalarda ise 44,5 olarak bulundu. A alleli ise; kontrol grubunda %48,9 iken, PV’li hastalarda %52,6 ET’li hastalarda %55,5 olarak bulundu ( $p=0,543$ ) (Çizelge 4.3). Allel frekanslarına dair bulgulardan anlaşılacağı üzere, allel frekansları ile PV ve ET riski arasında doğrudan bir ilişki görülmemektedir.

FAS (-670) Allelleri	PV		ET		KONTROL	
	n	%	n	%	n	%
G Allel Frekansı	36	47,4	49	44,5	95	51,1
A Allel Frekansı	40	52,6	61	55,5	91	48,9
GG Genotip Frekansı	9	23,7	13	23,6	23	24,7
GA Genotip Frekansı	18	47,4	23	41,8	49	52,7
AA Genotip Frekansı	11	28,9	19	34,6	21	22,6

**Çizelge 4.3.** FAS -670 polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve hasta grubu arasındaki dağılımı (n: Allel Sayısı)



**Şekil 4.4.** Fas -670 G>A (rs1800682) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı

#### 4.4. FAS -1377 G>A (rs2234767) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi

Yapılan istatistiksel analizde; kontrol ve hasta gruplarının FAS -1377 (G>A rs2234767) polimorfizmi açısından “Hardy Weinberg” dengesinde olduğu saptandı. (PV’li grup için  $p=0,648$ , ET’li grup için  $p=0,279$  ve kontrol grubu için  $p=0,481$ ).

FAS -1377 G>A (rs2234767) polimorfizmine ait genotip oranları karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastaları arasında genotip dağılımları birbirine benzer bulundu. ( $p=0,726$ )( Şekil 4.5).

Kontrol grubundaki bireyler ile PV ve ET’li hastalara ait genotip sıklıkları incelendiğinde ise;

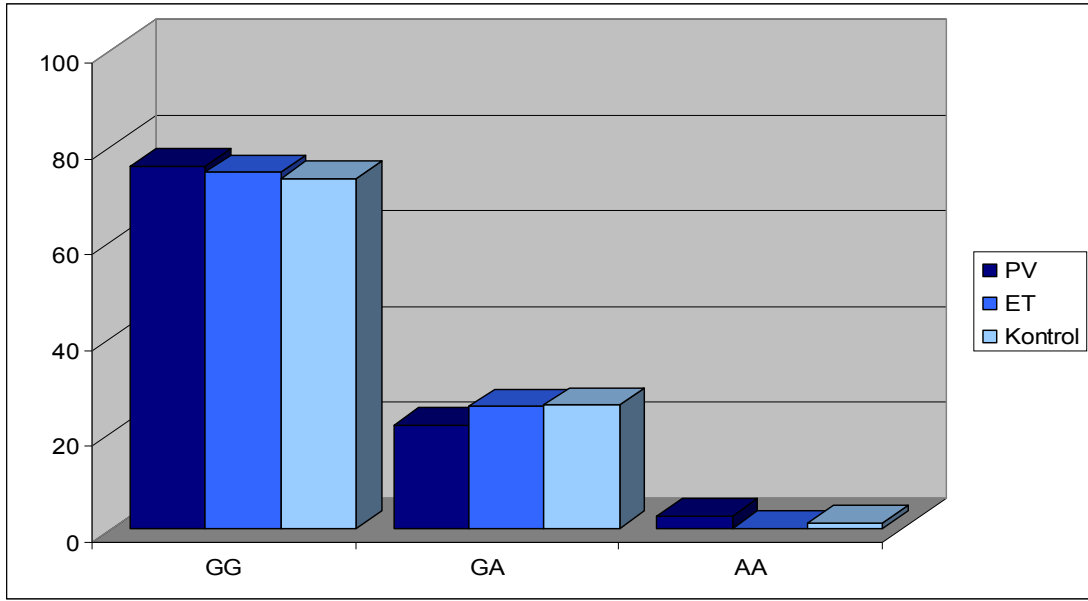
- GG genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 73,1 iken; PV’li hastalarda % 75,7 ve ET’li hastalarda %74,5
- GA genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 25,8 iken; PV’li hastalarda % 21,6 ve ET’li hastalarda %25,5
- AA genotipinin görülme sıklığı ise; kontrol grubunda % 1,1 iken; PV’li hastalarda % 2,7 ve ET’li hastalarda %0 olarak bulundu.

Sonuçlar allel sıklığı açısından miktar ve oransal olarak incelendiğinde; kontrol grubunda G alleli %86,0 PV’li hastalarda %86,5 ET’li hastalarda ise 87,3 olarak bulundu. A alleli ise; kontrol grubunda %14,0 iken, PV’li hastalarda %13,5 ET’li hastalarda %12,7 olarak bulundu ( $p=0,955$ ) (Çizelge 4.4). Allel frekanslarına dair bulgulardan anlaşılacağı üzere, allel frekansları ile PV ve ET riski arasında doğrudan bir ilişki görülmemektedir.



FAS (-1377) Allelleri	PV		ET		KONTROL	
	n	%	n	%	n	%
G Allel Frekansı	64	86,5	96	87,3	160	86,0
A Allel Frekansı	10	13,5	14	12,7	26	14,0
GG Genotip Frekansı	28	75,7	41	74,5	68	73,1
GA Genotip Frekansı	8	21,6	14	25,5	24	25,8
AA Genotip Frekansı	1	2,7	0	0	1	1,1

**Çizelge 4.4.** FAS -1377 polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve hasta grubu arasındaki dağılımı (n: Allel Sayısı)



**Şekil 4.5.** Fas -1377 G>A (rs2234767) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı

#### 4.5. FASL IVS2 -124 A>G (rs5030772) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi

Yapılan istatistiksel analizde; kontrol ve PV hasta grupları *FASL IVS2 -124 (G>A rs2234767)* polimorfizmi açısından “Hardy Weinberg” dengesinde iken; ET’li hasta grubunun “Hardy Weinberg” dengesinde olmadığı saptandı. (PV’li grup için  $p=0,309$ , ET’li grup için  $p=0,008$  ve kontrol grubu için  $p=0,772$ ).

FASL IVS2 -124 A>G (rs5030772) polimorfizmine ait genotip oranları karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastaları arasında genotip dağılımları birbirine benzer bulundu. ( $p=0,390$ )( Şekil 4.6).

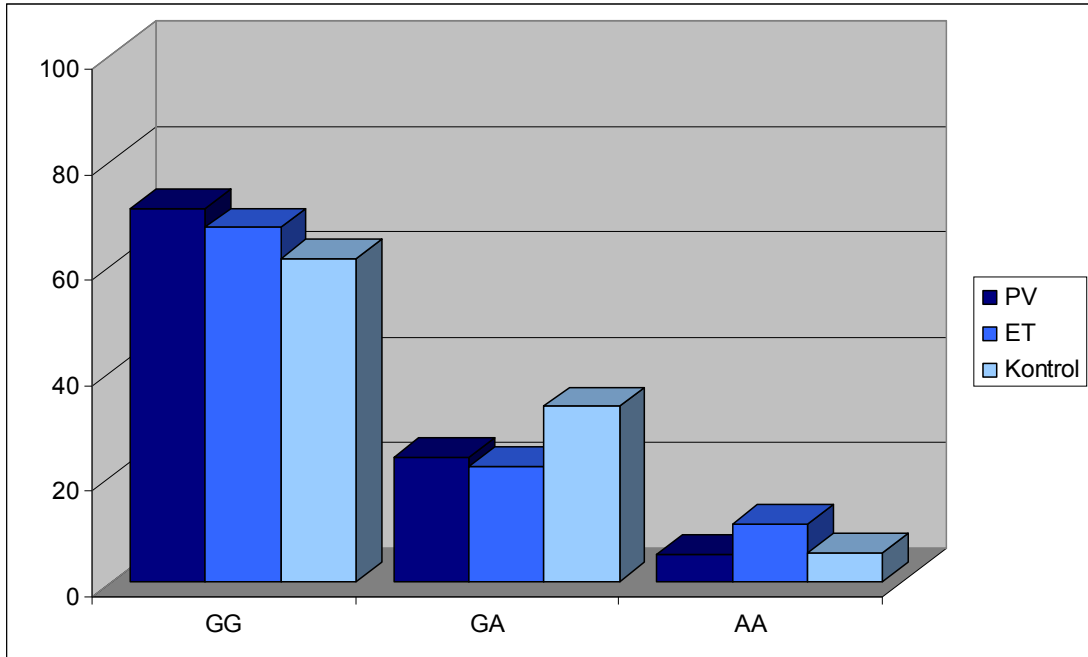
Kontrol grubundaki bireyler ile PV ve ET’li hastalara ait genotip sıklıkları incelendiğinde ise;

- **GG** genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 61,3 iken; PV’li hastalarda % 71,0 ve ET’li hastalarda %67,3
- **GA** genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 33,3 iken; PV’li hastalarda % 23,7ve ET’li hastalarda %21,8
- **AA** genotipinin görülme sıklığı ise; kontrol grubunda % 5,4 iken; PV’li hastalarda % 5,3 ve ET’li hastalarda %10,9 olarak bulundu.

Sonuçlar allel sıklığı açısından miktar ve oransal olarak incelendiğinde; kontrol grubunda G alleli %78,0 PV’li hastalarda %82,9 ET’li hastalarda ise 78,2 olarak bulundu. A alleli ise; kontrol grubunda %22,0 iken, PV’li hastalarda %17,1 ET’li hastalarda %21,8 olarak bulundu ( $p=0,650$ ) (Çizelge 4.5). Allel frekanslarına dair bulgulardan anlaşılacağı üzere, allel frekansları ile PV ve ET riski arasında doğrudan bir ilişki görülmemektedir.

FASL (-124) Allelleri	PV		ET		KONTROL	
	n	%	n	%	n	%
G Allel Frekansı	63	82,9	86	78,2	145	78,0
A Allel Frekansı	13	17,1	24	21,8	41	22,0
GG Genotip Frekansı	27	71,0	37	67,3	57	61,3
GA Genotip Frekansı	9	23,7	12	21,8	31	33,3
AA Genotip Frekansı	2	5,3	6	10,9	5	5,4

**Çizelge 4.5.** FASL IVS2 -124 A>G (rs5030772) polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve PV-ET hasta grupları arasındaki dağılımı (n: Allel Sayısı)



**Şekil 4.6.** FasL IVS -124 A>G (rs5030772) Polimorfizmine ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı

#### 4.6. BAX -248 G>A (rs464878) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi

Yapılan istatistiksel analizde; kontrol ve hasta gruplarının BAX -248 G>A (rs464878) polimorfizmi açısından “Hardy Weinberg” dengesinde olduğu saptandı. (PV’li grup için  $p=0,627$ , ET’li grup için  $0,178$  ve kontrol grubu için  $p=0,127$ ).

BAX -248 G>A (rs464878) polimorfizmine ait genotip oranları karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastaları arasındaki genotip dağılımları birbirine benzer bulundu ( $p=0,839$ ) (Şekil 4.7).

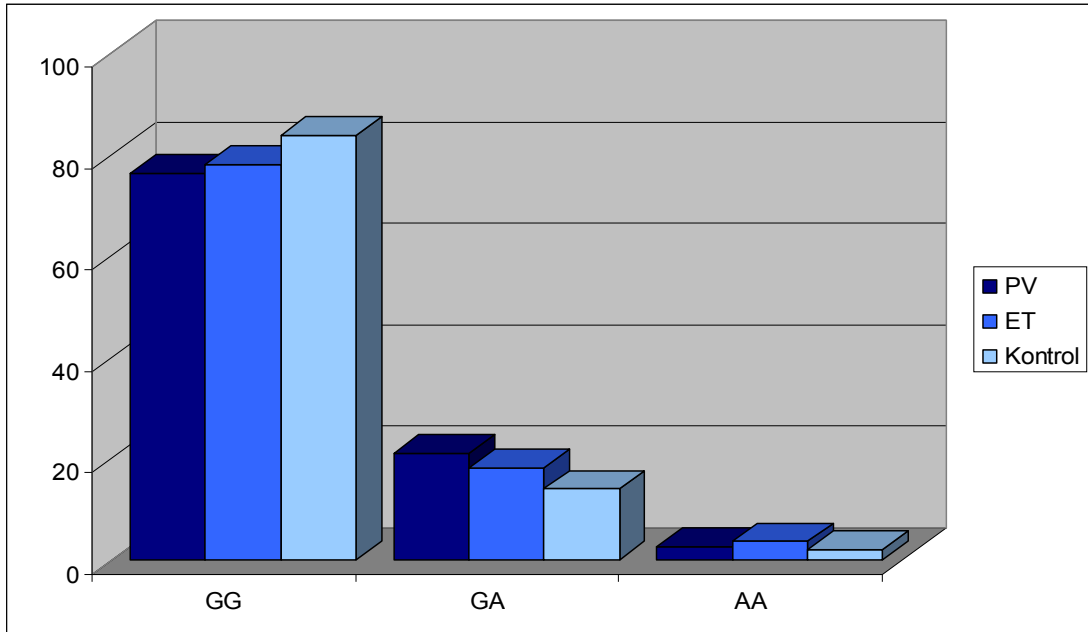
Kontrol grubundaki bireyler ile PV ve ET’li hastalara ait genotip sıklıkları incelendiğinde ise;

- GG genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 83,9 iken; PV’li hastalarda % 76,3 ve ET’li hastalarda %78,2
- GA genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 14,0 iken; PV’li hastalarda % 21,1 ve ET’li hastalarda %18,2
- AA genotipinin görülme sıklığı ise; kontrol grubunda % 2,1 iken; PV’li hastalarda % 2,6 ve ET’li hastalarda %3,6 olarak bulundu.

Sonuçlar allel sıklığı açısından miktar ve oransal olarak incelendiğinde; kontrol grubunda G alleli %90,9 PV’li hastalarda %86,8 ET’li hastalarda ise 87,3 olarak bulundu. A alleli ise; kontrol grubunda %9,1 iken, PV’li hastalarda %13,2 ET’li hastalarda %12,7 olarak bulundu ( $p=0,509$ ) (Çizelge 4.6). Allel frekanslarına dair bulgulardan anlaşılacağı üzere, allel frekansları ile PV ve ET riski arasında doğrudan bir ilişki görülmemektedir.

BAX (-248) Allelleri	PV		ET		KONTROL	
	n	%	n	%	n	%
G Allel Frekansı	66	86,8	96	87,3	169	90,9
A Allel Frekansı	10	13,2	14	12,7	17	9,1
GG Genotip Frekansı	29	76,3	43	78,2	78	83,9
GA Genotip Frekansı	8	21,1	10	18,2	13	14,0
AA Genotip Frekansı	1	2,6	2	3,6	2	2,1

**Çizelge 4.6.** BAX -248 G>A (rs464878) polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve PV-ET hasta grupları arasındaki dağılımı (n: Allel Sayısı)



**Şekil 4.7.** BAX -248 G>A (rs464878) Polimorfizmine ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı

#### 4.7. BCL 2 -938 C>A (rs2279115) Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı, PV ve ET İle İlişkisi

Yapılan istatistiksel analizde; kontrol ve PV ve ET'li hasta gruplarının *BCL2 - 938 C>A (rs2279115)* polimorfizmi açısından "Hardy Weinberg" dengesinde olduğu saptandı. (PV'li grup için  $p=0,513$ , ET'li grup için  $0,346$  ve kontrol grubu için  $p=0,591$ ).

BCL 2 -938 polimorfizmine ait genotip oranları karşılaştırıldığında; Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastaları ile kontrol grubu arasında genotip dağılımları birbirine benzer bulundu. ( $p=0,804$ )( Şekil 4.8).

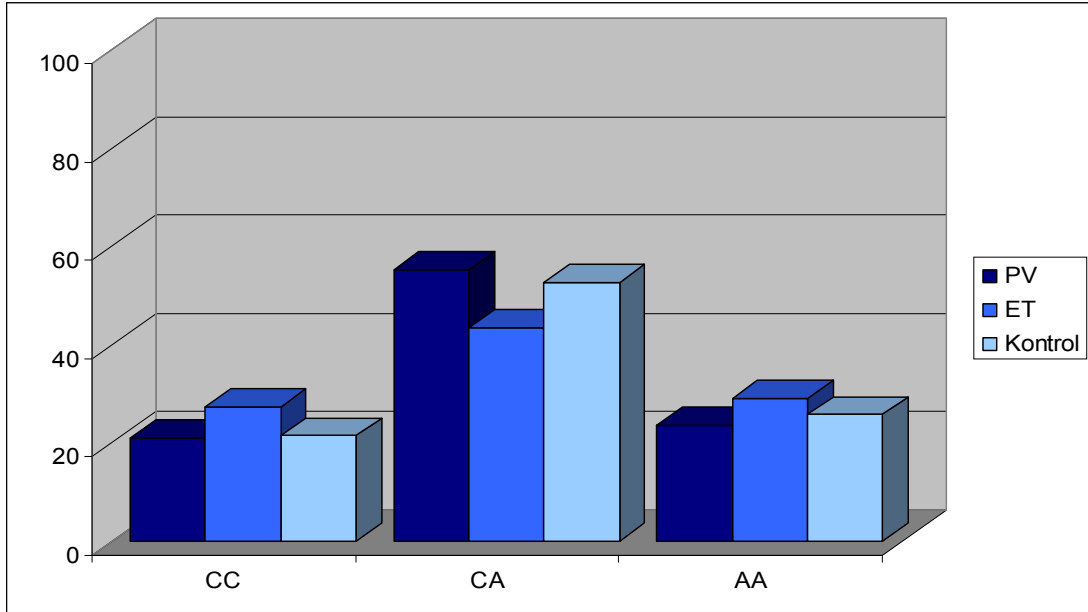
Kontrol grubundaki bireyler ile PV ve ET'li hastalara ait genotip sıklıkları incelendiğinde ise;

- **GG** genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 21,5 iken; PV'li hastalarda % 21,0 ve ET'li hastalarda %27,3
- **GA** genotipinin görülme sıklığı; kontrol grubunda % 52,7 iken; PV'li hastalarda % 55,3 ve ET'li hastalarda %43,6
- **AA** genotipinin görülme sıklığı ise; kontrol grubunda % 25,8 iken; PV'li hastalarda % 23,7 ve ET'li hastalarda %29,1 olarak bulundu.

Sonuçlar allel sıklığı açısından miktar ve oransal olarak incelendiğinde; kontrol grubunda G alleli %47,8 PV'li hastalarda %48,7 ET'li hastalarda ise 49,1 olarak bulundu. A alleli ise; kontrol grubunda %52,2 iken, PV'li hastalarda %51,3 ET'li hastalarda %50,9 olarak bulundu ( $p=0,977$ ) (Çizelge 4.7). Allel frekanslarına dair bulgulardan anlaşılacağı üzere, allel frekansları ile PV ve ET riski arasında doğrudan bir ilişki görülmemektedir.

BCL2 (-938) Allelleri	PV		ET		KONTROL	
	n	%	n	%	n	%
G Allel Frekansı	37	48,7	54	49,1	89	47,8
A Allel Frekansı	39	51,3	56	50,9	97	52,2
GG Genotip Frekansı	8	21,0	15	27,3	20	21,5
GA Genotip Frekansı	21	55,3	24	43,6	49	52,7
AA Genotip Frekansı	9	23,7	16	29,1	24	25,8

**Çizelge 4.7.** BCL 2 -938 G>A (rs2279115) polimorfizmi allel ve genotip oranlarının kontrol ve PV-ET hasta grupları arasındaki dağılımı (n: Allel Sayısı)



**Şekil 4.8.** BCL 2 -938 G>A (rs2279115) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile PV ve ET hasta grubu arasındaki dağılımı

**4.8. FAS -670 G>A rs1800682, FAS -1377 G>A rs2234767, FASL IVS2 -124 A>G rs5030772, BAX -248 G>A rs4645878 ve BCL2 -938 C>A rs2279115 polimorfizmlerine ait genotip oranlarının hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı**

Yapılan istatistiksel analizde; PV ve ET hasta gruplarının tek bir hasta grubu altında toplanıp kontrol grubu ile polimorfizmlere ait genotip oranları karşılaştırıldığında genotip dağılımları birbirine benzer bulundu (Çizelge 4.8 ).

		<b>Hasta n(%)</b>	<b>Kontrol n(%)</b>	<b>p</b>
<b>FAS-670</b>	GG	22 (23,6)	23 (24,7)	0,313
	GA	41 (44,1)	49 (52,7)	
	AA	30 (32,3)	21 (22,6)	
<b>FAS-1377</b>	GG	69 (75,0)	68 (73,1)	0,957
	GA	22 (23,9)	24 (25,8)	
	AA	1 (1,1)	1 (1,1)	
<b>FASL-124</b>	GG	8 (8,6)	5 (5,4)	0,221
	GA	21 (22,6)	31 (33,3)	
	AA	64 (68,8)	7 (61,3)	
<b>BAX-248</b>	GG	72 (77,4)	78 (83,9)	0,535
	GA	18 (19,4)	13 (14,0)	
	AA	3 (3,2)	2 (2,1)	
<b>BCL2-938</b>	CC	23 (24,7)	20 (21,5)	0,819
	CA	45 (48,4)	49 (52,7)	
	AA	25 (26,9)	24 (25,8)	

**Çizelge 4.8.** FAS -670 G>A, FAS -1377 G>A, FASL IVS2 -124 A>G, BAX -248 G>A ve BCL 2 -938 C>A polimorfizmlerine ait genotip oranlarının hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı



## 5. TARTIŞMA

Miyeloproliferatif hastalıklar; olgunlaşan kan hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize, multipotent hematopoietik kök hücre bozukluklarıdır (153). Philadelphia negatif (Ph-) klasik miyeloproliferatif hastalıklar; MPN'lerin alt kategorisi olup, Polisitemia Vera (PV), Esansiyel Trombositoz (ET) ve İdiyopatik Miyelofibroz (İMF) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu üç miyeloproliferatif hastalığın temel özelliği;

- Hücre bakımından zengin olma (kemik iliğinde hipersellülarite)
- Bağ dokuya dönüşümü (kemik iliğinde fibrozis)
- Dalak büyümesi (splenomegali)
- Sekonder tromboz veya kanama eğilimi taşımaları,
- Nadiren de olsa, akut lösemiye dönüşme riskinin bulunmasıdır (154, 155-157).

Bu hastalıklar kesin olarak birbirlerinden ayrılmazlar, birbiriyle örtüşen farklı birçok kategoride görülebilme ve birbirlerine dönüşebilme yeteneğindedirler (158). MPN'lerin moleküler patogenezi, JAK2V617F mutant allelinin belirlenmesine kadar tam olarak anlaşılammıştır. 2005 yılında miyeloproliferatif hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilen ve ilk genetik bulgu olan *JAK2* geninin JH2 domaininde 617. pozisyonda oluşan ve V617F olarak ifade edilen mutasyonun; sitokinlere aşırı duyarlılığa yol açacak şekilde, tirozin fosforilasyon aktivitesine yol açtığı görülmüş ve bu mutasyona bağlı olarak, enzimin fonksiyonel olarak aşırı derecede aktive olması, kan hücrelerinde hematopoetik büyüme faktörlerinin etkisine karşı aşırı duyarlılığa yol açtığı gösterilmiştir. PV'li hastaların %95'inde ve ET'li hastaların %50-60'ında görülen ve MPN'lerin moleküler patogenezinde rol oynayan bu keşif, hastalıkların moleküler ve biyolojik karakteristiklerinin klinik fenotiple ilintili olabileceğini göstermiş ve sorumlu olabilecek başka aday genlerdeki mutasyonlarında olabileceği düşüncesine temel oluşturmuştur (3, 37,160).

PV; sitokin bağımsızlığı/aşırı duyarlılığı ile karakterize klonal, kök hücre kaynaklı bozukluklardır. Eritrositöz ağırlıklı olmak üzere trombosit, nötrofil, bazofil, eozinofil, sayısında da artış görülür. Eritrositozis; PV'nin kritik klinik özelliği olarak belirlendiğinden bu yana, eritroid öncül hücrelerde yapılan moleküler ve biyolojik in vitro çalışmalar, PV'nin ve normal eritropoezisin anlaşılmasını sağlamış ve daha etkin

tanı ve tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasına olanak vermiştir. Teorik olarak PV'de eritroid atasal hücrelerin aşırı çoğalımı ve apoptozun baskılandığı görülür (161). Bcl 2 ve Bcl-XL, eritroid öncül hücrelerin yaşamını, gelişimini kontrol eden apoptotik hücre ölümünün anahtar düzenleyicisidir (162). Normal koşullar altında erken eritroid atasal hücreler latent durumdadır. Eritroid öncül hücreleri, hücre döngüsüne girebilmek için mitojen olarak Epo'ya gereksinim duyarlar. Epo olmadığı veya işlev görmediği zaman, hücre döngüsü G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> evresinde durur. Bcl-2 ve Bcl-XL latent durumda bulunan hücrelerin apoptoza girmelerini önler. Bcl-2 geninin aşırı ekspresyonu veya bir defekti, eritroid öncül hücrelerin bölünme ve farklılaşmaya devam etmelerini sağlar. Aksine PV'de Epo olmaksızın, Bcl 2 ve Bcl-XL'nin aşırı ekspresyonu ile apoptoz baskılanarak, eritroid öncül hücrelerin yaşamlarını ve terminal farklılaşmalarını devam ettirdikleri görülmüştür (163). Bu durum bize apoptotik yolakta görevli genlerde defektlerin olabileceğini düşündürmüştür.

Esansiyel trombositoz, kemik iliğinde megakaryosit hiperplazisi ile ilişkili, periferik kanda trombosit sayısındaki artışla karakterize miyeloid bir bozukluktur. Tpo trombosit üretimi, megakaryosit ve öncüllerinin farklılaşması, çoğalması ve yaşamsal fonksiyonlarından sorumlu anahtar genidir. Meydana gelen bir defekt sonucu, Tpo'nun işlevini kaybetmesi, megakaryositik öncül hücrelerde hücre apoptoza neden olur (164,165). Fakat ET hastalarında yapılan çalışmalarda, trombopoiezisten sorumlu gen Tpo ve reseptörü c-Mpl'de mutasyon bulunmamıştır. Bu durum megakaryosit/trombosit, oluşum ve farklılaşmasında önemli rol alan apoptoz mekanizmasında görevli genlerde bir hasar olabileceğini düşündürmüştür (106).

Her yaşam bir ölümü gerektirir. Çok hücreli organizmalar istenmeyen, hasarlı veya enfekte hücreleri, programlı hücre ölümü çeşidi olan apoptoz ile ortadan kaldırırlar. Apoptozun kontrolü; normal gelişimde, doku homeostazisinde ve patojenlere karşı savunmada hayati rollerinin tanınmasıyla önem kazandı ve hatalı apoptozun kanser, otoimmün ve dejeneratif hastalıklarda rol oynadığı anlaşıldı (166). Kanserde; hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki dengenin kaybı söz konusudur. Bu durumda, ölmesi gereken hücreler ölüm sinyalleri alamadıklarından yaşamlarını devam ettirmektedirler. Buna neden olan problem, apoptozun herhangi bir basamağında meydana gelmiş olabilir. İki ucu keskin kılıç gibi apoptoz, bir problemin nedeni ve çözümü olabilir. Bu nedenle apoptoz, karsinogenezde ve kanser tedavisinde önemli rol

oynamaktadır. Günümüzde apoptoz, hücre ölümünün çeşitli yönlerini hedef alan ve tedavide yeni ilaçların araştırılması gibi cesaret verici çalışmalara yön vermektedir (150).

Apoptozun ekstrinsik ölüm yolağı; transmembran reseptör aracılığıyla düzenlenen bir yolaktır. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptör gen süperailisi üyeleridir. TNF reseptör ailesine ait, tip I membran proteini Fas, yine aynı ailenin üyesi olan tip II membran proteini Fas L'a bağlanarak programlı hücre ölümünü başlatır ve prokaspazların etkin kaspazlara dönüşmesini de içeren, bir hücre sinyal yolağını tetikler. Fas/Fas L sistemi, apoptoz yoluyla etkili bir şekilde hücrede düzenlenir. Periferal homeostazinin ve timusta T hücrelerinin gelişimi gibi immün sistemin düzenlenmesinde rol oynarlar. Özellikle timusta timositlerin gelişimi sırasında, timositlerin negatif/pozitif seçiminde önemli rol oynar. Periferde, otoreaktif lenfositlerin ve klonal artış, birikim fazından sonra periferal lenfositlerin aktivasyon indüklü hücre ölümü denilen bir mekanizmayla ortadan kaldırılmasını sağlar. Ayrıca sitotoksik T lenfositlerin ve Naturel Killer hücrelerinin düzenlenmesiyle apoptozu başlatırlar. Fas/Fas L'de meydana gelen ve genin ekspresyon düzeyini etkileyen nokta mutasyonları, bazı immün sistem hastalıkları ve ek olarak birçok tümör tipinin patogenezinde rol oynar. Bazı araştırmacılar, solid tümörlerde Fas L geni genellikle yüksek düzeyde eksprese olurken; Fas geninin daha düşük düzeyde eksprese olduğunu saptamışlardır. Fas L'nin yüksek düzeydeki ekspresyonu, tümör hücrelerinin apoptoz yolağını bağımsız aktive ederek, antiapoptotik genlerin yüksek düzeyde düzenlenimi veya apoptoz hatalı tümör hücrelerinde invazyonu artırma gibi tümör hücrelerine bazı avantajlar sağlar (168-170).

İntrinsik yolak ya da mitokondriyel yolakta ise, kaspaz aktivasyonu; tamamen dış mitokondriyel membranın geçirgenliğine bağlıdır. İntrinsik yolak geçirgenliğini sağlayan transisyon porlarının bir parçası ve biyoenerjetik akışta yer alan Bcl 2 aile üyeleri, mitokondriyel lipitler ve proteinler tarafından düzenlenir (136). Bcl 2 aile proteinleri, hematopoietik sitokinlerle, programlı hücre ölümünde anahtar role sahiptir (171). Apoptoz; pro- ve antiapoptotik Bcl 2 aile proteinlerinin konsantrasyonu ile düzenlenir. Bu iki grup proteinin antagonistik davranış şekilleri, heterodimer oluşturma yeteneklerine bağlıdır (172). Bcl 2 ailesinin tüm üyeleri BH1, BH2, BH3, BH4 domain bölgelerinden en az birisini içerir. Yapılan mutageniz çalışmalarında, BH1-4 domainlerinin homo- ve heterodimerizasyon oluşturarak, bu proteinlerin birbirlerini

etkilediği gösterilmiştir (140).

Çalışmamızda, hematopoietik kan hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma sürecinde homeostazisi sağlayan apoptoz mekanizmasında görevli; Bcl 2, Bax, Fas ve Fas Ligand gen polimorfizmlerinin, PV ve ET hastalıklarıyla ilintili olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)'ler genel anlamda insan genomundaki genetik varyasyonların %90'dan fazlasını oluşturur. SNP'ler tek başlarına hastalığa neden olmazlar fakat belirli bir hastalığın gelişme olasılığının belirlenmesinde yardımcı olabilirler. Birçok SNP sessizdir. Örneğin; bir gen fonksiyonu ve fenotipi üzerinde belirgin bir etki göstermezler. Bununla birlikte SNP'ler, birey için önemli sonuçlara sahip, belirli bir hastalığa ya da belli farmasötikal reaksiyonlara yatkınlıkla ilişkilidir. Ayrıca hastalık riskini etkileyen tek bir gendeki değişimler ile SNP'lerin belirli kombinasyonlarının çoklu genlerde yerleşik olduğu ve belli bir hastalığın gelişiminde yatkınlık sağladığı düşünülmektedir. Genlerin promotör bölgesindeki allelik varyasyonlar, genin transkripsiyon faktör bağlama bölgesi veya diğer düzenleyici bölgeleri etkileyerek nitelik ve nicelik bakımından değiştirebilir. Birçok SNP'nin kanser gibi malignansilerinin gelişiminde ve kemoterapiye dirençte önemli olan, apoptoz gibi yollarda gerekli olduğu bilinmektedir (173, 174). Bu nedenle çalışmamızda, apoptotik yolda görev alan FAS -670 G>A (rs1800682), FAS -1377 G>A (rs2234767), FASL IVS2 -124 A>G (rs5030772), BAX -248 G>A (rs4645878) ve BCL 2 -938 C>A (rs2279115) SNP'lerinin hematolojik malignansilerden PV ve ET'nin moleküler patogenezindeki rolünü araştırdık.

Çeşitli karsinogenez çalışmaları genetik polimorfizmlerle, malignansi gelişimi arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Bu araştırmalar, apoptotik yolda yer alan genlerde özellikle, apoptozda rol oynayan, en önemli mekanizmalardan biri olan, Fas/Fas L sistemi üzerinde yoğunlaşmıştır. Karsinogenezde Fas/Fas L sisteminin görev aldığı 2 mekanizma önerilmiştir. Birincisi: Fas eksprese eden hücrelerde Fas L, T lenfositlerde apoptozu başlattığından, malign hücrelere karşı, hücre-düzenli sitotoksik reaksiyonlarda bu sistemin rol oynamasıdır. İkincisi ise; malign hücreler, Fas L'nin düşük ekspresyonu sağlayıp, Fas L eksprese eden lenfositlerin öldürülmesiyle de immün sistemden kaçabilmesidir (168, 175).

Fas -670 G>A (rs1800682) ve Fas -1377 G>A (rs2234767) tek nükleotid

değişimleri; promotör bölgede, STAT1 (signal transducers and activators of transcription 1) ve SP1 (Stimulatory Protein 1) için bağlama bölgelerinin tekrarlayan dizilerinde yerleşiktir. Bu iki polimorfizm, Fas ve Fas L genlerinin ekspresyon düzeyinde azalmaya neden olur. Fas L IVS -124 (rs5030772) polimorfizmi ise, Fas L geninin 2. intronunda yerleşiktir. Yaptığımız çalışma sonucunda; Fas -670, Fas L -1377 ve Fas L IVS -124 polimorfizmlerine ait genotip oranları ve allel frekanslarının kontrol ile Polisitemia vera ve Esansiyel trombositoz hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını saptadık. Bu polimorfizmi saptayabilmek için; PV ve ET'nin nadir görülen hematolojik malignansi olması nedeniyle, hasta sayımızın yeterli olamayabildiği sonucuna vardık. Ayrıca, literatürü incelediğimizde, bu polimorfizmlere ait; değişik malignansilerde farklı veriler olduğunu gözlemledik. Populasyonlar arasında da farklı olabileceğini sonucundan yola çıkarak, populasyonumuzda ilgili polimorfizmlerin hastalık etiopatogenezinde anlamlı derece de önemli olmayabilir.

Örneğin; Kang ve ark. (2007) servikal kanserlerde, Fas -670 ve Fas -1377 polimorfizmlerinin, servikal kanserin histolojik subtipleri veya ileri evre riskiyle ilişkili olmadığını belirlemişlerdir. Yine Chatterje ve ark. (2009) Afrika populasyonda yaptıkları çalışmada, FAS -670 G>A ve FAS -1377 G>A polimorfizmlerinin servikal kanserde risk faktörü olmadığını belirtmişlerdir (175, 176).

Farre ve ark. (2008), yetişkin T hücre lösemisinde (ATL), Fas -670 polimorfizminin; hastalığa yatkınlık, hastalığın klinik tablosu ve sağkalımla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (177).

Hsu ve ark. (2008), *Helicobacter pylori* enfekte bireylerde, gastrik kanserde prekanseröz lezyonlar olan gastrik atrofi ve intestinal metaplazi lezyon gelişiminde, FAS -670 ve FAS -1377 polimorfizmlerinin kritik belirleyiciler olduklarını göstermişlerdir (178). Wang ve ark.'nın Güney Çin populasyonu üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada ise, bu polimorfizmlerin gastrik kanserlerle ilişkisi olmadığını göstermişlerdir (179).

Görmüş ve ark. (2007), Fas -1377 polimorfizmi ile akciğer kanseri riski arasında bir ilişki olmadığını fakat sigara içen bireylerde, bu polimorfizmin yüksek düzeyde görüldüğünü ve sigara içen bireylerde akciğer kanseri gelişimi üzerinde etkisi olabileceğini belirtmişlerdir (180).

Zhu ve ark. (2010), Fas -1377 polimorfizminin, Çin populasyonunda Renal

hücre kanserinde risk faktörü olduğunu göstermişlerdir ve hatta bu polimorfizmin Renal hücre kanserine yatkınlıkta belirteç olabileceğini tanımlamışlardır (181).

Shao ve ark. (2011), FAS -670 ve FAS -1377 polimorfizmlerinin yine Çin populasyonunda prostat kanserinde bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir (182).

Cao ve ark. (2010), Fas -1377 polimorfizminin, Nazofaringal karsinomlarda bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (183).

Liakouli ve ark., Fas -670 polimorfizminin bir kronik otoimmün hastalık olan sistemik skleroz yatkınlığı ile ilişkili olduğunu ve hastalığın patogenezinde apoptozun genetik kontrolünün bir rolünü göstermişlerdir (184).

Zhang ve ark. (2009), Fas -670 ve Fas -1377 promotör bölge polimorfizmlerinin, özellikle sigara içen bireylerde kanser gelişiminde, düşük penetrans risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (185).

Sun ve ark. (2004), Fas -670 ve Fas -1377 polimorfizmlerinin skuamoz hücre karsinom gelişiminde artan bir risk taşıdığını göstermişlerdir (186).

Ciermela ve ark. (2010), Fas -670 ve Fas L IVS -124 polimorfizmlerinin, İtalyan ve Macar populasyonlarında preeklampsi yatkınlığında rol oynadığını göstermişlerdir (187).

Qureshi ve ark. (2010), Fas -1377 polimorfizminin, melanoma veya skuamoz hücre karsinomları ile ilişkisi olmadığını fakat bazal hücre karsinom riski ile önemli bir ilişkisi olduğunu, ve Fas L IVS -124 polimorfizminin de melanomun artan riskiyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir (188).

Zhang ve ark. (2006), Fas -670 polimorfizminin özellikle alkol alan bireylerde, ileri yaştaki kadınlarda ve faringial kanserli hastalarda özellikle ileri düzeydeki tümörler ve baş-boyun skuamoz hücre karsinomlarının gelişiminde ana risk faktörü olduğunu belirlemiş fakat Fas L IVS -124 polimorfizminin, baş-boyun skuamoz hücre karsinomları ile ilişkisi olmadığını göstermişlerdir (189).

Apoptoz mekanizmasının mitokondriyal yolağında görev alan Bcl 2 geni, sadece antiapoptotik düzenleyici protein değil, aynı zamanda çoğalmayı baskılama yönünden de görev alır. 3 ekzon ve 2 promotör bölgesine sahiptir. -938 promotör polimorfizminin lokalize olduğu P2 (2. promotör), translasyon başlama bölgesinin 1400 bp yukarısında bulunur ve transkripsiyonu yönlendiren P1 (1. promotör) üzerinde negatif düzenleyici olarak görev yapar. Bcl 2 sadece antiapoptotik düzenleyici protein değil ayrıca

proliferasyon inhibitörü olarak da görev alır. Bu yüzden Bcl 2'nin tümöröenezde fonksiyonel etkisi birden fazladır. Bu da Bcl 2 ekspresyonunun neden tümör tipine bağlı olarak değiştiğini ve tanısal önemini açıklayabilir. Bcl 2 geninin fonksiyonunu/ekspresyonunu değiştiren polimorfizmler, sadece apoptoz mekanizmasını etkilemekle kalmaz; tedavide Bcl 2 hedefli ilaç kullanımında da yol gösterici, önemli bir belirteç olabilir (183, 190). Klinik olarak displazi ve metaplaziler, çoğunlukla Bcl 2'nin aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir. Bcl 2, dis- ve metaplastik hücrelerin yaşamını devam ettirerek, invazif karsinom ve adenom gelişimini başlatır. Bcl 2'nin diğer bir özelliği; hücre döngüsünde, hücrelerin yeniden G<sub>0</sub> evresine girişlerinin önlenmesiyle, hücre döngüsünün ilerlemesi yönünde etkisi vardır. Bu ise, invazif kanserlerin sınırsız büyüme ve gelişimini sağlamaktadır. Displastik-metaplastik lezyonlar ve adenomların; invazif kanserlerle karşılaştırıldığında, neden Bcl 2 geninin ortalamasının üzerinde eksprese edildiğini açıklamaktadır (191). Yaptığımız çalışmada; apoptozun intrinsik yolağında görevli Bcl 2 gen ailesinin antiapoptotik bir üyesi olan Bcl 2 geninin, negatif düzenleyici element olarak görev yapan P2 promotöründeki polimorfizmini inceledik. Genin ekspresyon düzeyini etkileyen, Bcl 2 -938 C>A (rs2279115) polimorfizmine ait genotip oranları ve allel frekanslarının kontrol ile Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz hastaları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını saptadık (p<0,05). Yapılan analizler sonucunda; Bcl 2'de ekspresyon düzeyini değiştiren tek nükleotid değişimi gözlenmemiştir. Bcl 2 -938 C>A polimorfizminin literatürde diğer malignansilerle ilişkisi araştırıldığında; Bcl 2, hem normal hematopoietik hücrelerde, hem de AML'nin lösemik blast hücreleri gibi malign hematopoietik hücrelerde de eksprese olmaktadır. Bunun üzerine Moon ve ark. (2009) *de novo* AML' de Bcl 2 proteini veya gen ekspresyonunun AML için kemoterapiyi takiben bir tanı belirteci olabileceğini önermişlerdir. Bcl 2 ekspresyon düzeyinin, AML'de Bcl 2 indüksiyonu veya Bcl 2 overeksprese hücrelerinin seçilimi yoluyla kemoterapide artabildiği bilinmektedir. Ayrıca Bcl 2 protein ve gen ekspresyonunun yüksek düzeyine sahip AML hastaları, daha kısa yaşam süresi gösterirken, kemoterapiye de düşük oranlarda cevap vermektedir. Moon ve ark. çalışma sonucunda, Bcl 2 -938 C>A polimorfizminin lösemide genel sağkalımla ve kemoterapiyi takiben remisyon oranıyla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (192).

Nückel ve ark. (2007) B- hücre lenfositik lösemide (B-CLL) yaptıkları

çalışmada, Bcl 2 -938 C>A polimorfizminde AA genotipinin Bcl 2'nin artmış ekspresyonuyla ilişkili olduğunu ve CLL hastalarında prognostik açıdan genetik markır olarak kullanılmasının uygun olduğunu belirtmişlerdir (193).

Hwan ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, Bcl 2 -938 polimorfizminin klonal miyeloproliferatif hastalık olan CML'ye yatkınlık ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermişlerdir (194).

Zhang ve ark. (2011), göğüs kanseri gelişimi ve hastalığın klinik ve patolojik etkisi üzerine yaptıkları çalışma sonucunda, Bcl 2 -938 polimorfizminin göğüs kanserine yatkınlık, göğüs kanserinin patolojik tanısında ve lenf bezi tutulumu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (190).

Bachmann ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, Bcl 2 -938 polimorfizminin prostat kanserli hastalarda, hastalığın tekrarlama ve genel sağkalımla ilişkili olmadığını belirtmişlerdir (183).

Apoptozun düzenlenmesinde görev alan anahtar moleküllerden biri de Bax proteindir. Bax promotöründe, p53 respons elementleri, TATA kutusu, kanonikal E-kutusu ve NFkappaB bağlama bölgeleri bulunur. p53 yanıt elementi ve dimerizasyon bölgeleri kodlayan ORF (Open Reading Frame)'yi içeren promotör bölgesindeki mutasyonlar, Bax geninin proapoptotik fonksiyonunu yok ederek, tümör oluşumunu başlatır. Bax geninde ekzon 3'ün G8 kısmında çerçeve kayması mutasyonları hematopoietik malign hücre hatları, lenfomalar ve kolorektal kanserlerde belirlenmiştir. Bax geninin, apoptozun indüklenmesini sağlayan proapoptotik fonksiyona sahip olması, Bcl 2 ve p53 gibi diğer genlerin birçoğunun, apoptoz yolağını kısmende olsa Bax geni ile etkileşime girerek düzenlemeleri, Bax geninin kanser çalışmalarında ilgi görmesine neden olmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Bax'ın bir tümör baskılayıcı gen olduğunu göstermiştir. Gendeki delesyonların, lenfoid hiperplaziler ile ilişkili ve hematopoietik kısımda, önemli bir negatif büyüme kontrol fonksiyonu olduğu gösterilmiştir (195, 196). Yaptığımız çalışmada; apoptozun intrinsik yolağında görevli Bcl 2 gen ailesinin proapoptotik üyesi olan Bax geninin, 5'- UTR (Untranslated Region) bölgesinde meydana gelen ve genin ekspresyon düzeyininin azalmasına neden olan, BAX -248 G>A (rs4645878) polimorfizmine ait genotip oranları ve allel frekanslarının kontrol ile Polisitemia vera ve Esansiyel trombositoz hastaları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını saptadık. Aynı polimorfizmin diğer malignansilerle ilişkisinin olup-



olmadığını literatürde araştırdığımızda farklı bulgularla karşılaştık.

Saxena ve ark. (2002) Bax promotöründe meydana gelen Bax -248 polimorfizminin, CLL'de Bax'ın azalmış ekspresyonu ile ilişkili olduğunu, konvansiyonel tedaviye tam yanıtta başarısızlıkla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (196). Skogsberg ve ark. (2008), BAX -248 polimorfizminin CLL'nin sağkalım süresi ve prognostik belirteç olarak kullanılması açısından anlamlı olmadığını belirtmiştir (197)

Apoptotik uyarıların engellenmesi, malign hücrelerin en temel karakteristik özelliğidir ve apoptotik yolda görev alan moleküllerdeki değişimler, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda; apoptotik ekstrinsik ve intrinsik yollarda görev alan **FAS** -670 G>A (rs1800682), **FAS** -1377 G>A (rs2234767), **FASL** IVS2 -124 A>G (rs5030772), **BAX** -248 G>A (rs4645878) ve **BCL 2** -938 C>A (rs2279115) gen polimorfizmlerinin PV ve ET hastalıkları ile ilişkili olmadığını saptadık. Apoptozis ile ilişkili genlerde, genin ve proteinin ekspresyon düzeyini değiştiren SNP araştırmalarının, birçok kanser türünde çalışıldığı bilinmekte fakat hematolojik malignansi sınıfına giren PV ve ET'de; apoptotik yolda görevli bu genlerde meydana gelen polimorfizmleriyle ilgili şu ana kadar yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle elde edilen sonuçların bu hastalıklar üzerinde yapılacak çalışmalara yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Miyeloproliferatif neoplazmlar (MPN); miyeloid hücre serisindeki artış ile karakterize, Polistemia Vera (PV), Esansiyel Trombositoz (ET)'nin dahil olduğu hastalık grubudur. Bu hastalıkların nedeni tam olarak bilinmemektedir. Fakat yapılan moleküler genetik araştırmalar bu tip malignansilerin, büyük çoğunlukla elde edilmiş klonal, genetik olaylar sonucu ortaya çıktıklarını göstermiştir. Bu durum, hastalıkları moleküler tanı çalışmaları için uygun hale getirmektedir. Özellikle, bu tip hematolojik malignansilerde, hematopoietik kan hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma sürecinde homeostazisi sağlayan apoptoz mekanizmasının anlaşılması, sadece hastalığın patogenezinin öngörü kazandırması bakımından değil, ayrıca tedaviye yanıtta yol gösterici olması nedeniyle önemlidir.

38 PV ve 55 ET'li olmak üzere toplam 93 hasta ve 93 sağlıklı bireyde, Real-Time PCR ile; apoptotik yolakta görevli, **FAS** -670 G>A (rs1800682), **FAS** -1377 G>A (rs2234767), **FAS L** IVS2 -124 A>G (rs5030772,) **BAX** -248 G>A (rs4645878) ve **BCL 2** -938 C>A (rs2279115) polimorfizmleri araştırıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde; bu polimorfizmler açısından, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişkisinin bulunmadığı saptandı ( $p < 0,05$ ). Nadir gözlenen PV ve ET hasta sayımızın populasyonu yeterince yansıtamıyabileceğini ve bu konuda farklı merkezlerce ve daha çok sayıda hasta içeren çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca araştırmaya dahil edilen, varyant genlerden kaynaklanabilme olasılığı da sözkonusudur. Ayrıca, PV ve ET olgularında, apoptotik süreçte yer alan diğer moleküler değişimlerin de araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

- 1) **Kralovics R, R. C. Skoda.** Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Reviews*, **2005**; 19:1–13.
- 2) **Tefferi A., Gary Gilliland D.** Oncogenes in Myeloproliferative Disorders. *Cell Cycle*, **2007**; 6(5): 550-566.
- 3) **Fanny B.M., Hajer M., Christophe D., Anabell A., Claudine R., Ste'phanie H., Elizabeth M., Bruno C., Sylvie C., Carole T., Ste'phane G., Pierre F., Florence C.,-Nadine V.-B., Marie C. L. B.e-K., Jean J. K., Laura V.** Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **2009**; 116: 5961-5971.
- 4) **Spivak J. L.** Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*, **2002**; 100(13): 4272-4290.
- 5) **Amos G., Srdan V., Donghoon Y., Ko-Tung C., Taghi M., Roberto N., Jorge C., William V., and Josef T. P.** Imatinib effect on growth and signal transduction in polycythemia vera. *Experimental Hematology*, **2007**; 35:931–938.
- 6) **Chunhua D., Ik-Joo C., Sanford B. K.** Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt/PKB. *Experimental Hematology*, **2005**; 33: 152–158.
- 7) **Hoffbrand V., Catovsky D., Tuddenham GD E., Green R.A.** *Postgraduate Haematology*. Sixth Edition, UK. Wiley-Blackwell, **2011**: 694.
- 8) **Ting-Jun F., Li-Hui H., Ri-Shan C., Jin L.** Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **2005**; 37(11): 719–727.
- 9) **Thomadaki H.** Bcl 2 Family Of Apoptosis-Related Genes: Functions and Clinical Implications in Cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **2006**; 43(1):1–67.
- 10) **Elmore S.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, **2007**; 35:495–516.
- 11) **Frederick L. K., Xinbo Z.** Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta*, **2002**; 27–45.
- 12) **Shigekazu N.** Fas Ligand -Induced Apoptosis. *Annu. Rev. Genet*, **1999**; 33:29–55.
- 13) **Avi A.** Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **2008**; 325–331.
- 14) **Nika N. D.** BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clin Cancer Research*, **2007**;13(24).
- 15) **Dario C. A.** Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem. J.*, **2010**; 430, 199–205.

- 16) **Zeiss C. J.** The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Vet Pathol*, **2003**; 40:481–495.
- 17) **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** *Molecular Biology Of the Cell. 5 th Edition*; Garland Science. P1456-1457 **2008**.
- 18) **Kelly L. P.** Rehabilitation and Exercise Considerations in Hematologic Malignancies. *Am. J. Phys. Med. Rehabil* , **2011**; (90): 5.
- 19) **Ayalew T.** Classification of chronic myeloid disorders: From Dameshek towards a semi-molecular system. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, **2006**; 19(3): 365-385.
- 20) **Anderson LA, Duncombe AS, Hughes M, Mills ME, Wilson JC, MF McMullin.** Environmental, lifestyle, and familial/ethnic factors associated with myeloproliferative neoplasms. *American Journal of Hematology*, **2011**; 00:000–000.
- 21) **Finnegan K.** Myeloproliferative Neoplasms: An Overview. *Clinical Laboratory Science*, **2011**; 24(3): 178-182.
- 22) **Provan D. Gribben J.** *Molecular Haematology 2 th Edition*. UK. Blackwell Publishing **2005** ;P90.
- 23) **Tefferi A.** The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*, **2008**; 22: 3–13.
- 24) **Wadleigh M, Tefferi A.** Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol*, **2010**; 91: 174–179.
- 25) **Vannucchi AM, Guglielmelli P, Rambaldi A, Bogani C, Barbui T.** Epigenetic therapy in myeloproliferative neoplasms: evidence and perspectives. *J.Cell. Mol. Med*, **2009**;13(8A): 1437–1450.
- 26) **Ross L. L., D. Gary G.,** Myeloproliferative disorders. *Blood*, **2008**; 112(6): 2190-2198.
- 27) **Roland J., Robert K.** Molecular basis and clonal evolution of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, **2010**; 95(4): P666.
- 28) **Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A.** Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms. *Ca Cancer J Clin*, **2009**;59: 171-191
- 29) **Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW.** The 2008 World Health Organization Classification System for Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer*, **2009**; 15: 3842-3849.
- 30) **Martha W. Ayalew T.** Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol*, **2010**; 91:174–179.
- 31) **Ayalew Tefferi D. Gary Gilliland.** Oncogenes in Myeloproliferative Disorders. *Cell Cycle*, **2007**; 6(5): 550-566.
- 32) **Omar Abdel-Wahab.** Genetics of the myeloproliferative neoplasms. *Current Opinion in Hematology*, **2011**; 18: 117–123.
- 33) **Tefferi A, Thiele Juergen, Vardiman JW.** The 2008 World Health Organization Classification System for Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer*, **2009**;115:3842–7.
- 34) **Srdan V., Tefferi A.** *Myeloproliferative Disorder*. Humana Pres. USA 2011; P1.
- 35) **Francois D., Dorota J., Christophe M., Nicole C.** Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*, **2010**; 91:165–173.

- 36) **C.M. Vadikolia a C. Tsatalas a K. Anagnostopoulos b G. Trypsianis c D. Pantelidou a I. Bazdiara a A. Anastasiadis a E. Spanoudakis a I. Kotsianidis a D. Margaritis a A. Kortsaris b G. Bourikas.** Proteolytic Matrix Metalloproteinases and Inhibitors in BCR-ABL1-Negative Myeloproliferative Neoplasms: Correlation with JAK2 V617F Mutation Status. *Acta Haematol*, **2011**; 126:54–62.
- 37) **Fabio P.S. Santos,1 Srdan Verstovsek.** JAK2 Inhibitors: Are They the Solution?. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, **2011**; 11(S1): 28-36.
- 38) **Anna D. P.** Single Chromosomal Abnormalities in Philadelphia-negative Chronic Myeloproliferative Disorders. *In vivo*, **2007**; 21: 867-870.
- 39) **Kralovics R, Skoda RC.** Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Reviews*, **2005**; 19:1–13.
- 40) **Annette L., John F. Staropilib, Jesus M. H., Janina A. L., Frank C. K., Paola D. C.** Translocation t(1;9) is a recurrent cytogenetic abnormality associated with progression of essential thrombocythemia patients displaying the JAK2 V617F mutation. *Leukemia Research*, **2011**; 35: 1188– 1192.
- 41) **Anna D. P.** Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: Clinical implications. *Cancer Letters*, 2007; 255: 12–25.
- 42) **Srdan V., Tefferi A.** *Myeloproliferative Disorder*. Humana Pres. USA **2011**; P71.
- 43) **Thomas B., Jens S., Britta L., Tom B., R., Josef B.** Activation of STAT5 during EPO-directed suppression of apoptosis. *Cellular Signalling*, **2000**; 12: 23–30.
- 44) **Shashidhar S. J., Stacey J. B., Lewis R. S., Premkumar R E.** JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer*, **2011**; 1(10): 979–993.
- 45) **Thomas B., Jens S., Britta L., Tom B., Robert J., Josef B.** Activation of STAT5 during EPO-directed suppression of apoptosis. *Cellular Signalling*, **2000**; 12: 23–30.
- 46) **Tamotsu I., Munehiro U., Humitsugu Y., Shigeto U., Takahiko U., Naoki K., Taku S., Mitsuhiro I., Takayo S., Kazuo K.** JAK2 V617F-Dependent Upregulation of PU.1 Expression in the Peripheral Blood of Myeloproliferative Neoplasm Patients. *Plos One*, **2011**; 6(7): 1-10.
- 47) **Julio V., Katja R., Falko L., Christina K., Olaf W., Robert J.** Systems biology. of JAK-STAT signalling in human malignancies. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **2011**;106: 426-434.
- 48) **Celine S. N., Ste´ phane P., Mascia A., Zsolt C., Assia F., Charlotte Javalet., Eon S., Clarrisa B., Kyungmin L., Min Z., Bong-Kiun K., Pierre G., Pascal D., Stephen M. F., Zuner A. B., Kwangwook C., Graham L. C.,** The JAK/STAT Pathway Is Involved in Synaptic Plasticity. *Neuron*, **2012**; 73: 374–390.
- 49) **Matthew M. S., Pawel D.** The many faces of Janus kinase. *Biochemical Pharmacology*, **2011**; P1-10.
- 50) **Kamran G., Arian L., John J. O.** Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*, **2009**; 228(1): 273–287.
- 51) **Haiying Z., Dongqing Y., Golam M.** Differential biological activity of disease-associated JAK2 mutants. *FEBS Letters*, **2011**; 585: 1007–1013.

- 52) **Peter J. M.** The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J. Immunol*, **2007**; 178: 2623-2629.
- 53) **Martha L. S., Abbie L., Susan A. K., Kristina L. B., Roger K. W.** JAK/STAT/SOCS-Signaling Pathway and Colon and Rectal Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, **2011**; 000:2-12.
- 54) **Christian S., Courtney P.** Inteférons pen the JAK–STAT pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **2008**; 19: 311–318.
- 55) **Jin-bing Z., Yang Z., Guang-zhao L., Xing-fen S., Chun-hua H.** Activation of JAK2/STAT pathway in cerebral cortex after experimental traumatic brain injury of rats. *Neuroscience Letters*, **2011**; 498: 147– 152.
- 56) **Lyne V., Josiane P.** JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochemical pharmacology*, **2006**; 71:713– 721.
- 57) **Hong-Cui Ca., Jiang L., Jun Q., Dong-Ming Y., Yun L., Jing Y., Qin C., Hai-Yan C., Gao-Fei X.,** Detection of the JAK2 Mutation in Myeloproliferative Neoplasms by Asymmetric PCR With Unlabeled Probe and High Resolution Melt Analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **2011**; 25: 300–304.
- 58) **Ross L. L., D. Gary G.,** JAK-2 mutations and their relevance to myeloproliferative disease. *Current Opinion in Hematology*, **2007**;14:43–47.
- 59) **Ching-Liang H., Yi-Ying W., Hsiu-Man H., Ping-Ying C., Wei-You K., Yeu-Chin C., Tsu-Yi C.** Rapid identification of heterozygous or homozygous JAK2V617F mutations in myeloproliferative neoplasms using melting curve analysis. *Journal of the Formosan Medical Association*, **2012**; 111: 34-40.
- 60) **Alessandro M. V., Flavia B.** Epigenetics and mutations in chronic myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, **2011**; 96(10):1-5.
- 61) **Elodie P., Cyril Q., Olivier A. B., Jean-Luc V.,** JAK2V617F/TET2 mutations: does the order matter?. *Haematologica*, **2011**; 96(5): 638-640.
- 62) **Kelly Moran-C., Linsey R., Alan S., Omar Abdel-W., Delphine Ndiaye-L., Camille L., Maria E. F., Aparna V., Jay P., Xinyang Z., Fabiana P., Suveg P., Jozef M., Chunxiao S., Qing D., Chuan H., Sherif I., Miloslav B., Jiri Z., Stephen D. N., Ari M., Lucy A. G., Iannis A., Ross L. L.** *Tet2* loss leads to increased hematopoietic stem cell selfrenewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*, **2011**; 20(1): 11–24.
- 63) **Myunggon K., Hozefa S. B., Jungeun A., Edward D. L., Elizabeth C. T., Ryan H., Angeliki T., Klaus R., Sergei B. K., Anjana R.** Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *PNAS*, **2011**; 108(35): 14566-14571.
- 64) **Reuther GW.** Recurring mutations in myeloproliferative neoplasms alter epigenetic regulation of gene expression. *Am J Cancer Res*, **2011**;1(6):752-762.
- 65) **Tefferi A.** Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*, **2010**; 24: 1128–1138.
- 66) **Pratcorona M., Abbas S., Sanders MA., Koenders JE., Kavelaars FG., Erpelinck-Verschueren CAJ., Zeilemakers A., Löwenberg B., Valk PJM.** Acquired mutations in *ASXL1* in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*, **2012**; 97(3):388-392.

- 67) **Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, Torres E, Serrano S, Bellosillo B.** TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, and c-CBL genes in JAK2- and MPL-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*, **2012**; 9: 533–541.
- 68) **Srdan V., Tefferi A.** *Myeloproliferative Disorder*. Humana Pres. USA **2011**; P47
- 69) **Vakil E, Tefferi A.** BCR-ABL1—Negative Myeloproliferative Neoplasms: A Review of Molecular Biology, Diagnosis, and Treatment. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, **2011**; 11(S1): 37-45.
- 70) **Tefferi A.** Molecular drug targets in myeloproliferative neoplasms: mutant ABL1, JAK2, MPL, KIT, PDGFRA, PDGFRB and FGFR1. *J. Cell. Mol. Med*, **2009**; 13(2): 215-237.
- 71) **Fanny Baran-M., Hajer M., Christophe D., Anabell A., Claudine R.** Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **2010**; 116: 5961-5971.
- 72) **Francesco P., Margherita M., Domenica C., Mario C.** Myeloproliferative neoplasms: From JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. *Oncotarget*, **2011**; 2(6):1-6.
- 73) **Jason D. M., James L. Z., Garry P. N., Jason Go., Stephen T. O., Erin F. S., Carol J., Matthew B. H., Yury G., Kenneth D. G.** Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **2010**; 116(6):1-12.
- 74) **Saskia G., Sina H., Verena N., Sigal G., Hubert S., Christian H. B., H. Phillip K.** Adaptor protein Lnk binds to PDGF receptor and inhibits PDGF-dependent signaling. *Experimental Hematology*, **2011**; 39:591-600.
- 75) **Letter to the Editor** JAK2 46/1 haplotype predisposes to splanchnic vein thrombosis associated BCR-ABL negative classic myeloproliferative neoplasms. *Leukemia Research*, **2012**;36(2012):7-9.
- 76) **Raffaele L., Maria Anna N., Angelo P., Leonardo Di G.** Polycythemia vera. *Intern Emerg Med*, **2010**; 5: 375–384.
- 77) **Srdan V., Tefferi A.** *Myeloproliferative Disorder*. Humana Pres. USA **2011**; P7.
- 78) **Hoffbrand V., Catovsky D., Tuddenham GD E., Green R.A.** *Postgraduate Haematology*. Sixth Edition **2011**; UK. Wiley-Blackwell P688.
- 79) **Terri D. R., Manprit C., Dwayne L. B.** Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in Cell Biology*, **2005**; 15(3): 146-155.
- 80) **Jacob P. L., Ping Fua, Xiaohong J., Kelly H. S., Anil P., Murat O. A.** Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Experimental Hematology*, **2009**; 37:1411–1422.
- 81) **Gregoli. PA, Bondurant MC.** The Roles of Bcl-XL and Apopain in the Control of Erythropoiesis by Erythropoietin. *Blood*, **1997**; 90( 2): 630-640.
- 82) **Joneja B, Wojchowski DM.** Mitogenic Signaling and Inhibition of Apoptosis via the Erythropoietin Receptor Box-1 Domain. *The Journal Of Biological Chemistry*, **1997**; 272(17):11176–11184.
- 83) **Stopka T., Zivny J.H., Stopkova P., Prchal J.F., Prchal J.T.** Human Hematopoietic Progenitors Express Erythropoietin. *Blood*, **1998**; 91(10): 3766-3772.

- 84) **Francesca M., Alberto L., Giulio C., Eleonora S., Federica T., Teresa R., Elena C., Camillo A., Luciano A., Felicita A.** Erythropoietin in heart and vessels: focus on transcription and signalling pathways. *J Thromb Thrombolysis*, **2008**; 26:183–187.
- 85) **Peta A. Tilbrook, S. Peter Klinken.** The erythropoietin receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **1999**; 31:1001-1005.
- 86) **Mark J. K., Stephen T. S., Stephen J. B.,** New insights into erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*, **2002**; 9:93–100.
- 87) **Don M. W., Madhu P. M., Pradeep S., Jing F., Vinit K., Estelle H., William K., Oleg B.** Erythropoietin-dependent erythropoiesis: New insights and questions. *Blood Cells Molecules and Diseases*, **2006**; 36: 232–238.
- 88) **Heike L. P.** Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur. J. Biochem*, **2000**; 267:3395-3401.
- 89) **Fernández-L., José L.** Apoptosis and polycythemia vera. *Current Opinion in Hematology Issue*, **1999**; 6(2):94.
- 90) **Fernandez L., Se L., Maite S., Carlos R., Cristina S., Adalberto B.** Pathogenesis of polycythemia vera. *Haematologica*, **1998**; 83:150-158.
- 91) **Hong-Hee W., Inho P., Eunjung L., Jong-Won K., Doheon L.** Comparative analysis of the JAK/STAT signaling through erythropoietin receptor and thrombopoietin receptor using a systems approach. *BMC Bioinformatics* **2009**; 10(1 1):53.
- 92) **Josef T. P.** Molecular Biology of Polycythemias. *Internal Medicine*, **2001**; 40(8): 681-687.
- 93) **Petro E. P., Fabian S.** Thrombotic complications in essential thrombocythemia (ET): Clinical facts and biochemical riddles. *Blood Cells Molecules, and Diseases*, **2006**; 36: 379–384.
- 94) **Lei Zhang H., Aihong ., Shihong L., Bin L., Fengwu T., Yi F., Lihua Z., Rench H., Zhong Chao H.** Early down-regulation of Bcl-xL expression during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-induced CD34+ bone marrow cells in essential thrombocythemia. *Haematologica*, **2004**; 89:1199-1206.
- 95) **Randi M.L, Putti M.C., Pacquola E., Luzzatto G., Zanenco L., Fabris F.,** Normal Thrombopoietin and its Receptor (c-mpl) Genes in Children With Essential Thrombocythemia. *Pediatr Blood Cancer*, **2005**; 44:47–50.
- 96) **Hoffbrand V., Catovsky D., Tuddenham GD E., Green R.A.** *Postgraduate Haematology*. Sixth Edition; UK. Wiley-Blackwell **2011**: P694.
- 97) **Eula`lia P.,Blanca E., Olaya V., Lourdes F., Carles B., Sergi S., Francese S.** Detection of abnormalities of PRV-1, TPO, and c-MPL genes detected by fluorescence in situ hybridization in essential thrombocythemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **2006**; 167: 39–42.
- 98) **Argirios E. T., Georgios K. N., Panagiotis T., Katerina Z., Athanasios Z., Violetta K., Petros K., Spyros C., John D., Georgios M.** Direct evidence for normalization of platelet function resulting from platelet count reduction in essential thrombocythemia. *Blood Coagulation and Fibrinolysi*, **2011**; 22:457–462.
- 99) **Hoffbrand V., Catovsky D., Tuddenham GD E., Green R.A.** *Postgraduate Haematology*. Sixth Edition **2011**; UK. Wiley-Blackwell P693.
- 100) **Srdan V., Tefferi A.** *Myeloproliferative Disorder*. Humana Pres. USA: **2011**; P23.



- 101) **Albert E. G., Kr Von Dem Bornem B.** Thrombopoietin and its receptor: structure, function and role the regulation of platelet production. *Baillikre "s Clinical Haematology*, **1998**; 11(2): 409-426.
- 102) **Warren S. A.** Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene Targeting. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **1999**; 31: 1027-1035.
- 103) **Minoru K., Jun-ichi K., Takashi K., Mitsuo N., Makoto A.,** Role of the thrombopoietin (TPO) / Mpl system: c-Mpl-like molecule/TPO signaling enhances early hematopoiesis in *Xenopus laevis*. *Develop. Growth Differ*, **2002**; 44: 63–75.
- 104) **Francisco C.** Management of Essential Thrombocythemia. *Hematology*, **2011**; 2011:215-21.
- 105) **Kaushansky K.** Molecular mechanisms of thrombopoietin signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **2009**; 7(1): 235–238.
- 106) **Provan D., Gribben J.** *Molecular Haematology* 2th Edition. UK. Blackwell Publishing **2005**; P100.
- 107) **Andrew I.** Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood*, **2006**;107(11): 4214-4222.
- 108) **Edward A. Miao Jayant V. Rajan Alan A.** Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews*, **2011**; 243(1):206-14.
- 109) **Rajesh P. R., R., Rajeshwar P. S.,** Apoptosis: Molecular Mechanism and Pathogenicity, *Excl Journal*, **2009**; 8:155-181.
- 110) **Dewaldt E., Pierre Marcel D., Th'er'esa Louise C.** On Programmed Cell Death in Plasmodium falciparum: Status Quo. *Journal of Tropical Medicine*, **2010**; 2011:1-15.
- 111) **Richard A. L., Zahra Z.,** When Cell Die II. *A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death*. Wiley-Liss. **2004**; P4.
- 112) **Artem P., Andrey N. K., Aliaksandr V. K., Paras N. P.** Biophotonic probing of macromolecular transformations during apoptosis. *PNAS*, **2010**; 107(29):12771–12776.
- 113) **Lyonel G. I., Esther D. I.,** Apoptosis. *The Oncologist*, **1999**; 4:332-339.
- 114) **Peter D. M., Stefan J. R.** Molecular cell death platforms and assemblies. *Current Opinion in Cell Biology*, **2010**; 22:828–836.
- 115) **Andreas G.** Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, **2003**; 4-26.
- 116) **Mark P.M.** Apoptosis In Neurodegenerative disorders. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* **2000**;1:1-10.
- 117) **Antti S., Kari P.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, **2000**; 45: 528–537.
- 118) **Markus L., Guido K.** The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and Incognita. *Experimental Cell Research* **2000**; 256:19–26.
- 119) **A. Susan E.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, **2007**; 35(4): 495–516.
- 120) **S. Van C., W.V an den B.** Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat. Histol. Embryol*, **2002**; 31: 214–223.

- 121) **Tang D., Lotze MT., Kang R., Zeh HJ.** Apoptosis promotes early tumorigenesis. *Oncogene*, **2011**; 30: 1851–1854.
- 122) **Inna N. L.** Systems biology of apoptosis signaling Networks. *Current Opinion in Biotechnology*, **2010**; 21: 1–5.
- 123) **Richa S., Vandana P., Manisha P., Ghosh K.** APO-1/Fas gene: Structural and functional characteristics in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Indian Journal of Human Genetics*, **2009**; 15(3):1-5.
- 124) **Pascal S., Jean-Luc B., Nils H., Chantal M., Patricia S., Alexey T., Manuel C. P., Ju" rg T.** Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas Ligand Interaction. *The Journal Of Biological Chemistry*, **1997**; 272( 30):18827–18833.
- 125) **Kavurma MM., Khachigian LM.,** Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death and Differentiation*, **2003**; 10:36–44.
- 126) **Ssang-Goo C., Eui-Ju C.** Apoptotic Signaling Pathways Caspases and Stress-Activated Protein Kinases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **2002**; 35(1): 24-27.
- 127) **Kaufmann T., Strasser A ., Jost PJ.** Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differentiation*, **2012**; 19:42–50.
- 128) **Ayalew T., Gary Gilliland D.** Oncogenes in Myeloproliferative Disorders **2007**; *Cell Cycle* 6(5):550-566.
- 129) **Munoz Pinedo C.** Signalling Pathways That Regulate Life And Cell Death. Evolution of Apoptosis in the Context of Self-Defense. *Landes Bioscience and Springer Science*, **2011**;1-20.
- 130) **Eric V., Matthew D.H., LydiaW.S.F., Marcia C.H.** Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *TIBS-794*, **2010**;1-7.
- 131) **Carlos G. F., Mirjam E., Frank A. E. K.** Apoptosis : Target of Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*, **2002**; 8: 2024-2034.
- 132) **Martin R. S., Henning W.** The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**; 1644(2-3):125-32.
- 133) **Phil D.** Apoptosis Eriřim: <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash>. Eriřim Tarihi: 03.04.2012.
- 134) **Yoshiharu M., Yoshio K.** Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Virol*, **2005**; 15: 169–178.
- 135) **Mauria A. O., Rebecca Kirby.** Apoptosis: A reviewof pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **2008**; 18(6): 572–585.
- 136) **Mauria A. O., Rebecca Kirby.** Apoptosis: A reviewof pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **2008**;18(6): 572–585.
- 137) **Richard J. Y., Andreas S.** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Molecular Cell Biology*, **2008**; 9: 47-59.

- 138) **Tsujimoto Y., Shimizu S.** VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death and Differentiation*, **2000**; 7:1174-1181.
- 139) **Mehul P. P., Aisha M., Priya S. P., Asher A. Chanan-K.** Targeting the Bcl-2. *Current Opinion in Oncology*, **2009**; 21:516-523.
- 140) **Andrew M. P., Edward T. O., Stephen W. F.** Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**; 1644: 83- 94.
- 141) **Yoshihide T., Shigeomi S.** Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Letters*, **2000**; 466:6-10.
- 142) **Korsmeyer SJ ., Wei1 MC., Saito M., Weiler S., Oh KJ., Schlesinger PH.** Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of Cytochrome. *Cell Death and Differentiation*, **2000**; 7:1166-1173.
- 143) **Hanada M., Christine A.S., Sato T., Reed J.C.** Structure function analysis of Bcl-1 protein. *The journal of biological chemistry*, **1995**; 270(20):11962-11969.
- 144) **Yi-Ping R., Paul B., Vivien C. Y., Clark W. D.** Targeting Bcl-2 based on the interaction of its BH4 domain with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2009**; 1793: 971-978.
- 145) **Lina G., Marc D.,** Multistep and multitask Bax activation . *Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society*, **2010**; 000:1-10.
- 146) **Luca S. Stanley J. K.** Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2003**; 304(3):437-44.
- 147) **Jerry E. C., John C. F., Christopher P. D., Richard W. K., Tomomi K., Douglas R. G.** Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *PNAS*, **2008**; 105(51): 20327-20332.
- 148) **Adams J. M.** Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development*, **2003**;17:2481-2495.
- 149) **Bagg A.** The Molecular Genetics of Hematologic Malignancies. *Clinical And Diagnostic Labarotry Immunology*, **1995**; 2:255-262.
- 150) **Wong R. SY.** Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **2011**; 30(87):1-14.
- 151) **Mor G., Montagna M. K., Alvero A.B.** Modulation of Apoptosis to Reverse Chemoresistance. *Methods in Molecular Biology*, **2000**; 414:1-257.
- 152) **Miller SA., Dykes DD., Polesky HI.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.*, **1988**;16:12-15.
- 153) **Wanlong M., Hagop K., Xi Z., Xiuqiang W., Zhong Z., Chen-Hsiung Y., SusanO., Francis G., Jean Marie B., Maher A.** JAK2 Exon 14 Deletion in Patients with Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *PLoS One*, **2010**; 5: 1-7.
- 154) **Ayalew T.** Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, **2011**; 86: 293-301.
- 155) **Vainchenker W. and Constantinescu S. N. A.** Unique Activating Mutation in JAK2 (V617F) Is at the Origin of Polycythemia Vera and Allows a New Classification of Myeloproliferative Diseases. *Hematology*, **2005**; 2005:195-200.

- 156) **Kralovics R, Passamonti F, Buser A. S, Soon-Siong Teo, B.S., Tiedt R, Passweg J.R., Tichelli A., Cazzola M., and Skoda R.C.** A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. *The New England Journal of Medicine*, 2005; 352:17.
- 157) **F. Delhommeau. D. F Pisani, C. James, N. Casadevall, S. Constantinescu and W.Vainchenker.** Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell. Mol. Life Sci*, 2006; 2939–2953.
- 158) **Provan D. Gribben J.** *Molecular Haematology* 2 th Edition. UK. Blackwell Publishing 2005; P91.
- 159) **Fabio P.S. Santos, Srdan V.** JAK2 Inhibitors: Are They the Solution. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 2011; Vol. 11: S1-36.
- 160) **Ayalew T.** Classification, Diagnosis and Management of Myeloproliferative Disorders in the JAK2V617F Era. *American Society of Hematology*, 2006; (2006):240-245.
- 161) **Amos G., Srdan V., Donghoon Y., Ko-Tung C., Taghi M., Roberto N., Jorge C., William V., Josef T. P.** Imatinib effect on growth and signal transduction in polycythemia vera. *Experimental Hematology*, 2007; 931–938.
- 162) **Zeuner A., Pedini F., Francescangeli F., Signore M., Girelli G., Tafuri A. and Ruggero M.** Activity of the BH3 mimetic ABT-737 on polycythemia vera erythroid precursor cells *Blood*, 2009; 113(7): P1-4.
- 163) **Jerry L. S.** Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*, 2002; 100(13):4272-9.
- 164) **Ross L. L., Mark H.** New Advances in the Pathogenesis and Therapy of Essential Thrombocythemia. *American Society of Hematology*, 2008; P76-82.
- 165) **Kozuma Y ., Kojuma H., Yuki S ., Suzuki H., Nagasawa T .** Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin mediated Akt activation , which prevents the cleavage of Bcl-xL. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007; 5: 1274–1282.
- 166) **Adams J. M. and Cory S.** The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*, 1998; 281(5381):1322-6.
- 167) **Zhaoyu J. Wafik S.E.D.** Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 2005; 4(2), 139-163.
- 168) **María Villa-M., Javier S., Eduardo P.G.** A Role for the Fas/FasL System in Modulating Genetic Susceptibility to T-Cell Lymphoblastic Lymphomas. *Cancer Res.*, 2007; 67:5107-5116.
- 169) **Katherine D.C., Marilie D.G., Mary Beth T., Fang Fang Z., Meenakshi A., Sybil M.E., Sharon K.S., Susan L.T., Alfred I.N., Regina M.S.** Genetic polymorphisms in the apoptosis associated genes FAS and FASL and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 2007; 28:2548–2551.
- 170) **Mari´a Villa-M., Elena Gonza´lez-G., Marta N.S., Javier S., Jose´ Ferna´ndez-P.** Modulation of the Fas-apoptosis-signalling pathway by functional polymorphisms at Fas, FasL and Fadd and their Implication in T-cell lymphoblastic lymphoma susceptibility. *Carcinogenesis*, 2010; 31 (12) :2165 2171.
- 171) **Keita K., Tomoko W., Ken-ichi S., Hitoshi E., Keiya O., and Norio K.** Thrombopoietin Regulates *Bcl-xL* Gene Expression through Stat5 and Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation Pathways. 2002; 277(10): 8329–8337.

- 172) **Fanny B.M., Hajer M., Christophe D., Anabell A., Claudine R., Ste'phanie H., Elizabeth M., Bruno C., Sylvie C., Carole T., Ste'phane G., Pierre F., Florence C., Nadine V.B., Marie C. B.K., Jean J. K., and Laura V.** Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **2010**; 116: 5961-5971.
- 173) **Lena Franziska K., Gisela Werle-S., Heike D., Phillip Johannes M., Lutz E., Helmut B., Siegfried T., Claus Peter H., Niels R., Michael T., Angela R.** Polymorphisms in the Apoptotic Pathway Gene BCL-2 and Survival in Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.*, **2011**; 6: 183–189.
- 174) **Irina B., Eva G., Wen-Yu C., Sabine R., Philipp S., Alexander M., Peter Reimer & Martin W., Bernhard P., Andreas R., Hans Konrad M.H., Thomas R.** Analysis of single nucleotide polymorphisms in the FAS and CTLA-4 genes of peripheral T-cell lymphomas. *J Hematopathol* **2008**; 1:11–21.
- 175) **Kang S., Seung Myung D., Sang Soo S., Jae Weon K., Sang Yoon P.** FAS -1377 G/A polymorphism and the risk of lymph node metastasis in cervical cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **2008**; 180:1-5.
- 176) **Koushik C., Malin E., Ulf G., Collet D., Lize van der M., Ushma G., Margaret H., Anna L. W.** Fas and FasL gene polymorphisms are not associated with cervical cancer but differ among Black and Mixed-ancestry South Africans. *BMC Research Notes*, **2009**; 2:238.
- 177) **L. Farre, A. L. Bittencourt, G. Silva-Santos, A. Almeida, A. C. Silva, D. Decanine, G. M. Soares, L. C. Alcantara Jr. S. Van Dooren, B. Galvao-Castro, A. M. Vandamme, and J. Van Weyenbergh.** FAS -670 promoter polymorphism is associated to susceptibility clinical presentation, and survival in adult T-cell leukemia *Journal of Leukocyte Biology*, **2008**; 83: 220-222.
- 178) **Ping-I H., Pei-Jung L., E-Ming W., Luo-Ping G., Gin-Ho L., Feng- Woei T., Tai- An C., Hsiao-Bai Y., Hui-Chun C., Weir-Sen L., Kwok-Hung L.** Polymorphisms of Death Pathway Genes *FAS* and *FASL* and Risk of Premalignant Gastric Lesions. *Anticancer Research*, **2008**; 28: 97-104.
- 179) **Meilin W., Dongmei W., Ming T., Weida G., Hengchuan X., Hongbin S., Zhengdong Z.** FAS and FAS Ligand Polymorphisms in the Promoter Regions and Risk of Gastric Cancer in Southern China. *Biochem Gene*, **2009**; 47:559–568.
- 180) **Görmüş U, Eregen A, Yaylım Eraltan I, Yılmaz H, Turna A, Bozkurt N, İşbir T.** Fas-1377 A/G Polymorphisms in Lung Cancer. *In vivo*, **2007**; 21: 663-666.
- 181) **Jian Z., Chao Q., Meilin W, Fu Y., Xiaobing J., Xiaoxin M., Qi D., Pu L, Jian Y., Qiang Zhengdong Z., Changjun Y.** Functional Polymorphisms in Cell Death Pathway Genes and Risk of Renal Cell Carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, **2010**; 49:810–817.
- 182) **Pengfei S., Qi D., Chao Q., Meilin W., Jialin T., Jian Z., Jiawei C., Qiang C., Jie L., Bin X., Zhengdong Z., Wei Z., Changjun Y.** Functional Polymorphisms in Cell Death Pathway Genes FAS and FAS Ligand and Risk of Prostate Cancer in a Chinese Population. *The Prostate*, **2011**; 71:1122–1130.
- 183) **Hagen S. B., Lukas C. H., Klaus J. S., Caroline F. H., Philip K., Reinhard B., Holger N., Andreas E., Herbert R., Kurt Werner S., Winfried S., Angelika E., Alexander S. and Johannes H.S.** Regulatory BCL2 promoter polymorphism (2938C>A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma. *Int. J. Cancer*, **2011**; 129:2390–2399.

- 184) **V. Liakouli, M. Manetti, A Pacini, B. Tolusso, C. Fatini, A. Toscano, P. Cipriani, S. Guiducci, L. Bazzichi, V. Codullo, L. Ruocco, L. Dell’Orso, F. Carubbi, A. Marrelli, R. Abbate, S. Bombardieri, G. Ferraccioli, C. Montecucco, G. Valentini, M. Matucci Cerinic, L. Ibba- Manneschi, R. Giacomelli.** The 2670G.A polymorphism in the FAS gene promoter region influences the susceptibility to systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, **2009**; 68:584–590.
- 185) **Zhizhong Z., Hengchuan X., Weida G., Meilin W., Lin Y., Suping H., Zhengdong Z.** FAS promoter polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 34 case–control studies. *Carcinogenesis*, **2009**; 30(3) 487–493.
- 186) **Tong S., Xiaoping M., Xuemei Z., Wen T., Ping X., Dongxin L.** Polymorphisms of Death Pathway Genes FAS and FASL in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, **2004**; 96(13).
- 187) **Pasquapina C., Sonia B., Enrrico B., Luca M., Chiara B., Mario C., Felice P.** Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes in preeclamptic women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **2010**; 148 144–146.
- 188) **Abrar Q., Hongmei N., Michael D., Jiali H.** Polymorphisms of FAS and FAS Ligand Genes and Risk of Skin Cancer. *J Dermatol Sci*, **2010**; 58(1): 78–80.
- 189) **Zhengdong Z., Li-E W., Erich M. S.** Polymorphisms of *FAS* and *FAS* Ligand Genes Involved in the Death Pathway and Risk and Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res*, **2006**; 12:5596-5602.
- 190) **Ning Z., Xiaoyan L., Kai T., Liyu J., Tingting M., Shi Y., Cunzhong Y., Meena S. M., Faming L., Bruce G H., Qifeng Y.** BCL-2 (-938C > A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *BMC Medical Genetics*, **2011**; 12:48.
- 191) **C. Belka, W. Budach.** Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int. j. radiat. biol*, **2002**; 78(8) 643-658.
- 192) **Joon Ho M., Sang K. S., Myung-Hoon L., Jun Ho J., Kihyun K., ChulWon J., Dong Hwan K.** *Leukemia Research*, **2010**; 166–172.
- 193) **Holger N., Ulrich H. F., Maja B., Ludger S., Jens S., Jan D., Karl H. J., Ulrich D. Winfried S.** Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the *BCL2* gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **2007**; 290-297.
- 194) **Dong H.D., Kim, Wei X., Clement M., Xiangdong L., Katherine S., Hans A.** Genetic variants in the candidate genes of the apoptosis pathway and susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Blood*, **2009**; (113) :11.
- 195) **Peng H., Aiello A., Packham G., Isaacson P. G, Pan L.** Infrequent Bax Gene Mutations In B-Cell Lymphomas. *J. Pathol*, **1998**; 186: 378–382.
- 196) **Anurag S., Oksana M., Koravangattu S., Sathiyarayanan V., David P. S.** Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(2248)A, in the 50-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Letters*, **187** **2002**; 199–205.
- 197) **Skogsberg A., Tobin G., Krober A., Kienle D., Thunberg U., Aleskog A., Karlsson K., Laurell A., Merup M., Vilpo J., Sundstrom C., Roos G., Jernberg-Wiklund H., Doehner H., Nilsson K., Stilgenbauer S., Rosenquist R..** The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the Bax gene does not correlate with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, **2006**; 20, 77–81.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Hatay'da doğdu. İlkokul ve ortaokul eğitimini Antakya Atatürk Ortaokulu'nda, lise eğitimini ise Antakya Atatürk Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2010 yılında Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine ve görevine devam etmektedir.