

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE (MPN) JAK2 VE MPL GEN  
MUTASYONLARININ PATOLOJİ ARŞİV MATERYALLERİ KULLANILARAK  
SAPTANMASINDA YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİLERİNİN YERİ**

**Şenay BOYACIGİL**

**Danışman Öğretim Üyesi**  
**Prof. Dr. Işınsu KUZU**

**ANKARA**

**2012**

## ÖZET

Bu çalışmada patoloji arşiv materyalinden elde edilen DNA örnekleri ile yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak JAK2 ekzon 12 ve ekzon 14 (JAK2V617F) ve MPL ekzon 10 (MPLW515L, MPLW515K, MPLA506T ve MPLA519T) mutasyonlarının araştırılması ve patoloji arşiv materyallerinde mutasyonlu hücre oranı hastalık prezentasyonu ilişkisinin tespitinde yeni nesil dizileme teknolojilerinin duyarlılığı araştırılmıştır. .

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2001-2011 yılları arasında kemik iliği biyopsi ve yayma preparatları incelenen BCR ABL negatif MPN (ET, PV, PMF) tanısı almış hastalar çalışmaya alınmıştır. JAK2 ve MPL mutasyonlarını saptamak amacıyla yeni nesil dizileme (pirosekanslama) yöntemi kullanılarak moleküler analiz gerçekleştirilmiştir.

Yaş, cinsiyet dağılımları ile laboratuvar bulguları hastalıkların evreleriyle beklenen sınırlar içerisinde bulunan serimizde tüm olguların % 76.5'inde JAK2 ekzon 14 V617F mutasyonu bulunduğu ve % 23.5 olgunun yabani tip olduğu saptanmıştır. JAK2 ekzon 12 mutasyonu hiç bir olguda saptanmamıştır. MPL ekzon 10 mutasyonu ise sadece 1 ET tanılı olguda (% 2.9) saptanmıştır. ET (% 75) ve PMF (% 75) tanı gruplarında JAK2V617F mutasyonu klasik kaynaklarda bildirildiğinden daha yüksek oranda, PV (% 78,6) olgularında ise daha düşük oranda bulunmuştur. JAK2V617F-pozitif klonunun büyüklüğü anlamında olan "Allel burden" oranı en düşük PMF olgularında, bunu izleyen oranda ET ve en yüksek PV olgularında bulunmuştur. Sellülarite ve kan lökosit düzeyleri ile allel burden oranı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu çalışmada kemik iliğindeki tüm farklı klonları içeren materyallerde, yeni nesil dizileme teknolojisinin metot olarak tercih edilmesindeki en önemli avantajlarından biri olan allel burden durumunun yüksek hassasiyet ile tespit edilebildiği görülmüştür.

## **ABSTRACT**

In this study, we aimed to investigate JAK2 exon 12 and JAK2 exon 14 (JAK2V617F) mutations and MPLW515L, MPLW515K, MPLA506T and MPLA519T mutations, on DNA extracted from pathology archive materials using Next Generation Sequencing Technologies. Also we aimed to evaluate the relationship between disease presentation and the “allele burden” ratios by this molecular analysis on bone marrow samples.

The bone marrow biopsies and smears diagnosed as BCR ABL negative MPN (ET, PV, PMF) between 2001-2011 in Ankara University Faculty of Medicine Department of Pathology were selected for the study. The molecular analysis by using Next Generation Sequencing (pyrosequencing) was performed for detection of JAK2 and MPL mutations.

Our series showed compatible age, gender and laboratory findings with the stages of the disease groups. JAK2 exon 14 V617F mutation was examined in %75 of the patients. None of the cases carried JAK2 exon 12 mutation. MPL exon 10 mutation was examined only on one ET case (%2,9). The diagnostic groups ET (%75) and PMF (%75) in our series were presenting higher JAK2V617F mutation compared to the classical literature. In the PV (%78,6) group the mutation ratio was lower than the classical literature. “Allel burden” which represents the amount of JAK2V617F mutated clone ratio was lowest among PMF cases, followed by ET. The ratio was highest among PV cases. A positive relation between cellularity, blood leukocyte levels and allel burden was examined. We determined that performing the next generation sequencing method for the bone marrow samples which contain all of the different clones, has the advantage of giving information on detection of allel burden status with high sensitivity.

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Ben biyolog olmaya etrafımdaki çoğu meslektaşım gibi çocukken değil çok geç karar verdim. Bu kararın, hayatımda aldığım en yerinde kararlardan biri olduğunu, yüksek lisansımın sonuna geldiğim şu an bu teşekkür yazısını yazarken daha iyi anlıyorum. Biyolojiyi benim gözümde anlamlı kılan en önemli özelliği, hayatımda gördüğüm gizemli, olağanüstü ve birbiriyle ilgisizmiş gibi gözükken çoğu olayın nasıl da mantığa yatkın ve birbirleriyle muhteşem bir uyum içinde olduklarını göstermiş olmasıdır. Bu benim hayata olan bakış açımı etkiledi. Çünkü ne kadar öğrenirseniz, o kadar daha fazla şeyi sorgulamaya başlıyorsunuz ve bu işin en heyecan verici tarafı öğreneceklerinizin bir sonunun olmayacağını bilmek.

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her türlü imkanı sağlayan, her zaman sabır ve hoşgörü ile yol gösteren, ne kadar yoğun olursa olsun değerli vaktini ayıran, öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam, danışmanım Prof.Dr. Işınsu Kuzu'ya,

Bana daha yüksek lisansa başladığım ilk günden beri yardımını esirgemeyen, alanındaki engin bilgi ve tecrübelerinden yararlanabildiğim için kendimi şanslı hissettiğim değerli hocam, Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Tezimin deneylerinden, analizine, düzeltmelerine kadar her evresinde çok büyük emeği olan, bilgi ve tecrübesini sonuna kadar paylaşmaktan çekinmeyen, her konuda bana bir hocadan çok abla gibi yaklaşan, bu tezden sonra da aynı yakınlığı hissedeceğimden emin olduğum sevgili Dr.Yeşim DOĞAN'a,

Laboratuvar bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan değerli arkadaşlarım Uzm.Bio. Yasemin ŞAHİN'e, Uzm.Bio.Öznur ÇOŞKUN'a ve Bio. Cennet CAN SİNUP'a,

Dokuların arşivden çıkarılmasında emeği geçen Yusuf Arslan ve Alaattin Alptekin'e,

İstatistik çalışmalarımı gerçekleştiren Dr. Beyza DOĞANAY ERDOĞAN'a,

DNA dizi analizi çalışmalarında destek olan değerli ROCHE ekibinden Sn. İnanç FİDANCI ve Birben Erdem'e,

Bu yola çıktığım ilk günden beri bana benden daha çok güvenen, cesaretlendiren, bitmek bilmeyen sorularıma hiç usanmadan cevap veren, Pazar sabahlarında bile bana bilgisayar

başında zamanını ayırmaktan imtina etmeyen, hem hocam hem de ikinci ağabeyim olan Murat Ağabey'ime,

Bana her koşulda destek olan, kimsenin olmadığı zamanlarımda her daim yanımda olan, sorunlarımı kendisininmiş gibi benimseyip çözümler üreten, hayatımın çoğu anını anlamlandıran çok sevgili arkadaşım Umut YAYLAOĞLU'na,

Hayatım boyunca verdiğim iyi ve kötü bütün kararlarıma rağmen, aramızda kilometreler de olsa her zaman yanımda hissettiğim çok değerli aileme, beni bugünlere getirdikleri için TEŞEKKÜR EDERİM.

**Şenay BOYACIGİL.**

**2013**

**Ankara**

<b>ÖZET</b>	<b>i</b>
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2.KURAMSAL TEMELLER</b>	<b>4</b>
2.1. MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER	4
2.2. TARİHÇE	5
2.3. TANI	7
2.4. BCR-ABL-NEGATİF MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER	8
2.4.1. POLİSİTEMİA VERA (PV)	8
2.4.2. ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ (ET)	10
2.4.3. PRİMER MİYELOFİBROZİS (PMF)	13
2.5. JAK2 GENİ ve ÖZELLİKLERİ	15
2.5.1. JAK2 GENİNİN YERİ VE YAPISI	15
2.5.2. JAK-STAT YOLAĞI	15
2.5.3. JAK2 MUTASYONLARI	17
2.5.3.1. JAK2 V617F Mutasyonu	19
2.5.3.2. JAK2 Ekzon 12 Mutasyonları	21

2.6. MPL MUTASYONLARI	22
2.7. GERMLİNE JAK2 HAPLOTİPİ	24
2.8. JAK2 MUTASYONLARI VE ALLEL BURDEN KAVRAMI	25
2.9. JAK2 MUTASYONLARININ SAPTANMASININ ÖNEMİ	27
2.10. MPN'LER İÇİN HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ	27
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>30</b>
3.1. MATERYAL	30
3.2. YÖNTEM	30
3.2.1. MOLEKÜLER YÖNTEM	31
3.2.1.1. DNA İzolasyonu	31
3.2.1.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini	32
3.2.1.3. Kalite Kontrol PCR	32
3.2.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi	33
3.2.1.5. JAK2 ve MPL Mutasyon Analizleri	34
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	42
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b>	<b>43</b>
4.1. DEMOGRAFİK BULGULAR	43
4.2. KLİNİK, LABORATUVAR ve HİSTOPATOLOJİ BULGULARI	44
4.3. MOLEKÜLER BULGULAR	47
4.3.1. DNA İZOLASYONU ve SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZ	47
4.3.2. MUTASYON ANALİZ SONUÇLARI	49
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>57</b>

5.1. YÖNTEMİN DEĞERLENDİRİLMESİ

61

**6. REFERANSLAR**

69



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1:</b> Miyeloproliferatif Neoplazilerin Sınıflandırılması	4
<b>Şekil 2.2:</b> WHO 2008 Sınıflamasına göre MPN grubuna giren hastalıklar ve patogeneizde sorumlu olan genler	6
<b>Şekil 2.3:</b> MPN'lerin modern tanısal algoritması	7
<b>Şekil 2.4:</b> JAK2 geninin yapısı	15
<b>Şekil 2.5:</b> JAK-STAT yolağı	16
<b>Şekil 2.6:</b> JAK2 V617F'nin MPN'lerdeki onkopatogenetik rolü	17
<b>Şekil 2.7:</b> JAK2V617F mutasyonu ve allel burden ilişkisi	26
<b>Şekil 3.1:</b> Yöntemde iş akışı	32
<b>Şekil 3.2:</b> Yeni nesil dizileme işlem sırası	34
<b>Şekil 3.3:</b> Yeni nesil dizileme reaksiyonu	35
<b>Şekil 3.4:</b> emPCR	40
<b>Şekil 4.1:</b> DNA kalite ölçümü amaçlı yapılan “size ladder” temsili agaroz jel Fotoğrafi	47
<b>Şekil 4.2:</b> Amplikon PCR sonuçları temsili agaroz jel görüntüsü	49
<b>Şekil 4.3:</b> Agilent Bioanalyzer sonuçları temsili görüntüsü	50
<b>Şekil 4.4:</b> Sekans sonuç temsili görüntüsü	52
<b>Şekil 5.1:</b> 9p Heterozigotluk Kaybı (LOH)	63
<b>Şekil 5.2:</b> Allel burden forward/reverse dizi tutarlılık durumu	66
<b>Şekil 5.3:</b> Ultra deep sequencing duyarlılık seviyesi	67

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 3.1:</b> Kalite Kontrol PCR protokolü	33
<b>Tablo 3.2:</b> MPL Ekzon 10 Primer Dizileri	36
<b>Tablo 3.3:</b> JAK2 Ekzon 12 Primer Dizileri	36
<b>Tablo 3.4:</b> JAK2 Ekzon 14 Primer Dizileri	36
<b>Tablo 3.5:</b> JAK2 Ekzon 12 ve Ekzon 14 PCR Protokolü	37
<b>Tablo 3.6:</b> MPL Ekzon 10 Protokolü	37
<b>Tablo 3.7:</b> JAK2 Ekzon 12 PCR programı	38
<b>Tablo 3.8:</b> JAK2 Ekzon 14 PCR programı	38
<b>Tablo 3.9:</b> MPL Ekzon 10 PCR programı	39
<b>Tablo 3.10:</b> emPCR protokolü	41
<b>Tablo 3.11:</b> emPCR amplifikasyon programı	41
<b>Tablo 3.12:</b> Bead katmanları	42
<b>Tablo 4.1:</b> Tanı gruplarındaki hastaların yaş dağılımı	43
<b>Tablo 4.2:</b> Hastalık gruplarında cinsiyet dağılımı	44
<b>Tablo 4.3:</b> Klinik ve patoloji parametrelerinin tanılara göre dağılımı	45
<b>Tablo 4.4:</b> Hastalık gruplarında kemik iliği retikülün artış derecelerinin dağılımı	46
<b>Tablo 4.5:</b> Splenomegali varlığının tanı gruplarında dağılımı	46
<b>Tablo 4.6:</b> İzole edilen DNA'lara ait temsili spektrofotometre sonuçları	47
<b>Tablo 4.7:</b> Pürifikasyon sonrası ampikon kütüphanelerinin picogreen ölçüm sonuçları	51

<b>Tablo 4.8:</b> Tanı gruplarına göre JAK2 V617F mutasyonu dağılımı	53
<b>Tablo 4.9:</b> Tanı gruplarının allel burden oranları	54
<b>Tablo 4.10:</b> Mutasyonlu hücre oranı “Allel Burden” ile yaş ve klinik patolojik parametrelerin karşılaştırılması	54
<b>Tablo 4.11:</b> JAK2 mutasyonu allel burden durumu ile cinsiyet, tanı grupları ve splenomegali dağılımı	55
<b>Tablo 4.12:</b> Tanı gruplarında allel burden ve retikülin ilişkisi ve tanı gruplarında allel burden sellülarite ilişkisi	56
<b>Tablo 5.1:</b> JAK2 V617F mutasyonunun hastalıklardaki dağılımı	62

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AML</b>	Akut Miyeloblastik Lösemi
<b>BCR-ABL</b>	Break Point Cluster- Abelson fusion gene
<b>BCL-XL</b>	B-cell lymphoma-extra large
<b>c-MPL</b>	Trombopoietin reserptörü
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>Epo</b>	Eritropoietin
<b>ET</b>	Esansiyel trombositemi
<b>FERM</b>	4.1, ezrin, radixin, moesin
<b>JAK2</b>	Janus kinaz 2
<b>JH</b>	Janus homoloji
<b>KML</b>	Kronik miyeloid lösemi
<b>LOH</b>	Loss of heterozigosity
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MDS</b>	Miyelodisplastik sendrom
<b>MPN</b>	Miyeloproliferatif Neoplaziler
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Ph</b>	Philedelphia
<b>PMF</b>	Primer miyelofibrozis
<b>PV</b>	Polistemia vera
<b>Rpm</b>	Devir/dakika

<b>SOCS</b>	Suppressors of Cytokine Signaling
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>TPO</b>	Trombopoietin
<b>TYK2</b>	Tirozin kinaz 2
<b>UPD</b>	Uniparental Disomy
<b>WHO</b>	World Health Organization

## 1.GİRİŞ

Miyeloproliferatif neoplaziler günümüzde patogenezerinde bulunan bazı moleküler genetik anomaliler ve klinikopatolojik özellikleri ile sınıflandırılırlar. BCR-ABL pozitif ve BCR-ABL negatif olarak iki ana gruba ayrılırlar. BCR-ABL pozitif grubu Kronik miyeloid Lösemi (KML) meydana getirir. BCR-ABL negatif grupta yer alan neoplaziler arasında en büyük grubu JAK2 mutasyonu ilişkili Esansiyel Trombositemi (ET), Polistemia Vera (PV) ve Primer Miyelofibrozis (PMF) meydana getirmektedir. Bu gruptaki neoplazilerin patogenezinde JAK2 ve MPL gen mutasyonlarının rolü ve tanısal değeri olduğu konusunda kuvvetli veriler bulunmaktadır. Ancak buna rağmen klinik ve patolojik özellikleri ile ET, PV veya PMF profilini yansıtan vakaların tümünde JAK2 mutasyonu saptanmamaktadır. JAK2 mutasyonu saptanması durumunun bu hastalıkların tanısındaki yeri, BCR-ABL ve KML ilişkisi kadar mutlak tanısal şart değildir. JAK2 negatif hastalar da bulunmaktadır. ET, PV, PMF li hastalarda yapılan çalışmalar JAK2 mutasyonlarının varlığı ve mutasyonlu klonun miktarının yani “allel burden” durumunun, hastalıkların ilerlemesi ve farklı hastalık prezentasyonları ile arasında ilişki bulunduğu konusunda görüşler vardır. JAK2 mutasyonları bu grup hastalarda ekzon 14 ve ekzon 12 de görülmektedir. JAK2 ekzon 14 mutasyonu negatif hastalarda JAK2 ekzon 12 ve MPL genlerinde daha düşük oranda mutasyonlar bulunabilmektedir. JAK 2 ekzon 14 mutasyonu V617F şeklinde bir nokta mutasyondur. JAK2 ekzon 12 mutasyonları çeşitli delesyon ve insersiyonların olduğu, MPL mutasyonları ise birden çok çeşit nokta mutasyonu şeklindedir. Bu mutasyonlarla ilgili literatürdeki bilgiler farklı serilerde birbirlerinden çok farklı oranlarda bildirilmektedir. Hastalarda daha önceki çalışmalarda ve rutinde incelenen materyal genellikle çevre kanı örnekleridir. Ayrıca geçmişteki çalışmalarda mutasyonun tesbiti için çok farklı yöntemler kullanılmıştır.

Sadece tanısal amaçlı değil hedeflenmiş tedavilerde bu grup hastalıklarda önem kazanmaktadır. BCR-ABL mutasyonu ile oluşan tirozin kinaz aktivitesine karşı geliştirilen ilaç olan imatinib benzeri JAK2 inhibitörü ilaçlar da geliştirilmektedir. Bu nedenle JAK2 ilişkili neoplazilerde bu hedeflenmiş tedaviye aday hastaların belirlenmesinde de bu mutasyonların tespitinin önemi bulunmaktadır.

DNA dizileme teknolojileri biyoloji ve sağlık alanında çalışan bilim insanlarına, moleküler klonlama, patojenik genlerin bulunması, karşılaştırmalı çalışmalar ve evrim çalışmaları

gibi çok çeşitli uygulamalarda yardımcı olmaktadır. DNA dizileme teknolojilerinin hızlı, kesin, kolay uygulanabilir ve ucuz olması gerekmektedir. Geçtiğimiz otuz yılda, DNA dizileme teknolojileri konusunda çok önemli gelişmeler kaydedildi. 1977’de, Frederick Sanger, zincir-sonlanma esasına dayanan DNA dizileme teknolojisini (Sanger Sekanslama), Walter Gilbert ise DNA’nın kimyasal modifikasyonu ve ardından onun spesifik bazlarda kesilmesi esasına dayanan başka bir DNA dizileme tekniği geliştirdi. Sanger sekanslama yüksek verimliliği ve düşük radyoaktivitesinden dolayı laboratuvar ve ticari dizileme uygulamalarında birincil yöntem olarak kabul görmüştür. Ancak bu yöntemler her ne kadar altın standart yöntemler olsa da mutasyon gösteren hücre oranı ile ilgili sağlıklı bilgi vermekten uzak ve %20 altındaki mutasyonlu klonları saptamak açısından yetersiz kalan yöntemlerdir.

Yeni nesil dizileme teknolojileri, yüksek verim, düşük maliyet gibi özellikleri ile Sanger sekanslamadan üstünlüğü olan yeni sekans yöntemleridir. Bu çalışmada amplicon sekanslama ve emulsion PCR temeline dayalı Roche 454 sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde beadler içerisinde hapsedilen MID işaretli ampliconlar kalıp olarak kullanılmaktadır. Bu beadler içerisinde dideoksi-nükleotidleri kullanarak zincir sonlandırma reaksiyonu yerine, nükleotitleri birleştirirken ortaya çıkan pirofosfatın (Ppi) kullanılması esasına dayanan sentez esnasında okuma yapılmaktadır. Bu sayede her bir ampliconun sekanslanması ve çoğalan ampliconlardaki mutasyon oranı anlaşılabilir. Bu çalışmayı planlarken hipotezlerimiz:

Bu çalışmayı planlarken hipotezlerimiz:

- 1- ET, PV, PMF grubu JAK2 mutasyonu ilişkili miyeloproliferatif neoplazilerde hastalıkların ilerlemesi ve farklı hastalık prezentasyonları ile “allel burden” durumu arasında ilişki bulunduğu,
- 2- JAK 2 exon 14 mutasyonu negatif hastalarda Jak2 exon 12 ve MPL genlerinde bilinen veya alternatif mutasyonların hastalık patogenezi açıklayabilecek şekilde düşük oranlarda da olsa alternatif anomaliler olarak saptanabileceğini düşünüyoruz.
- 3- Geçmişte yapılan çalışmalarda ET ve PMF grubu hastalarda mutasyonun daha düşük oranlarda saptanmasının, kullanılan yöntemlerin duyarlılığı ve hastalıklarda “allel burden” durumu ile ilişkili olduğunu. Daha duyarlı yöntemler kullanarak ve kemik iliğinde mutasyonların dağılımının bulunmasını bu anomalilerle hastalık ilişkisini açıklamada daha yeterli lacağını düşünüyoruz.

Bu hipotezlerimizi kanıtlamak için :

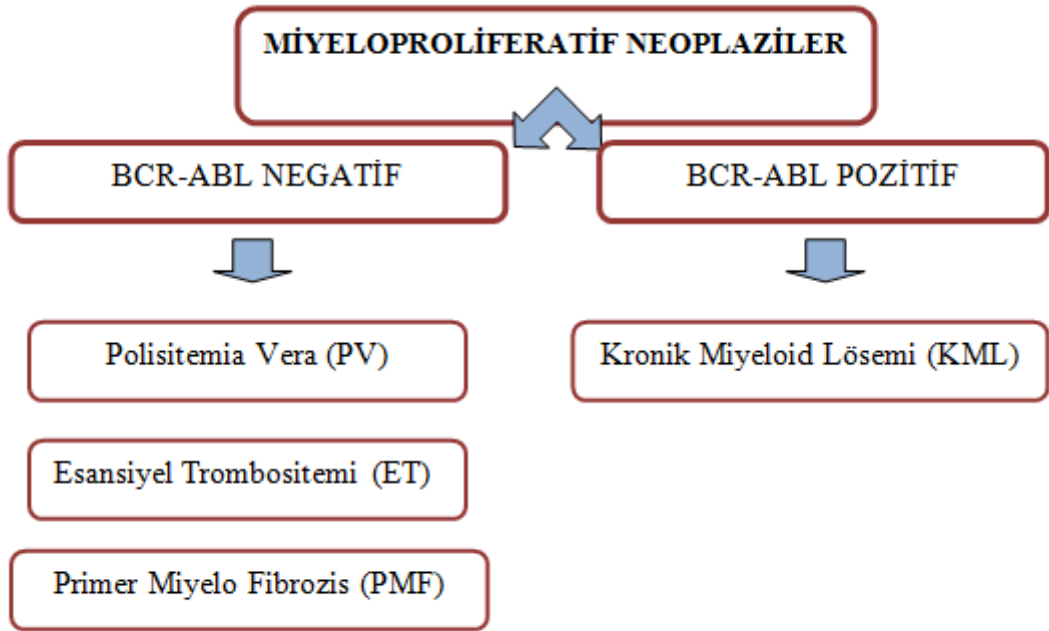
- 1- Çalışmamızda materyal olarak, rutinde incelenen çevre kanı yerine tüm kemik iliği hücrelerini içeren örnekler olan, kemik iliği aspirasyon yaymalarını kullanmayı amaçladık.
- 2- Yöntem olarak da birden çok mutasyonu tarayabileceğimiz ve aynı zamanda allel burden durumu ile ilgili bilgi verebilecek yeni nesil dizileme tekniklerini kullanmayı amaçladık.
- 3- JAK 2 ve MPL mutasyonlarının “allel burden” durumu ile hastalık evresi açısından bilgi veren, tanı sıradaki klinik ve patolojik parametrelerini karşılaştırmayı amaçladık.



## 2.KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER

Hematopoetik kök hücreler, kan hücrelerini yapan kök hücrelerdir. Miyeloproliferatif neoplaziler olgun hematopoetik kök hücrelerin kontrolsüz artışı, hematopoetik progenitor kök hücrenin temel homeostatik özelliklerini kaybettiğini göstermektedir (Berkofsky-Fessler 2010).



**Şekil 2.1:** Miyeloproliferatif Neoplazilerin sınıflandırılması

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), olgun eritroid, miyeloid, ve megakaryositik seri hücrelerinin kemik iliğinde artışı ve ekstramedüller hematopoez ile karakterlidirler (Tsiakalou et al. 2009).

## 2.2. TARİHÇE

MPN'lerin genetik sebeplerinin içyüzüne ilk bakış 1976-1981 yıllarında gerçekleşir. Üç klasik MPN'nin hepsinin genetik olarak anormal bir hematopoetik progenitör kök hücreden kaynaklanan klonal hastalıklar olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Kilpivaara and Levine 2008).

1980'lerde, Kronik Miyeloid Lösemi, moleküler seviyede, ABL protoonkogeninin BCR genine füzyonuna neden olan kromozomal yapının yeniden düzenlenmesi ile tanımlanmıştır (Tsiakalou et al. 2009).

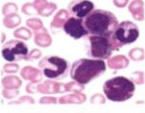
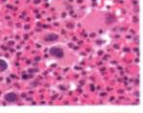
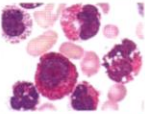
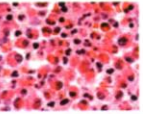
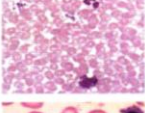
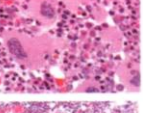
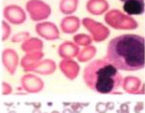
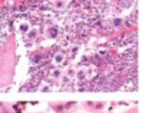
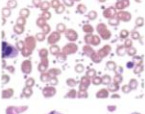
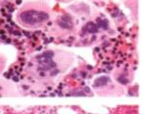
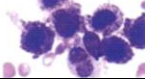
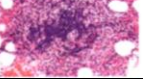
Lösemnin aksine, BCR-ABL negatif miyeloproliferatif neoplaziler olan Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositeminin moleküler tabanı yakın zamana kadar belirsiz olarak kalmıştır. 2005'te JAK2 kinaz geninin tek baz değişiminin (G→T) PV ve ET ile çok güçlü bir ilişki içinde olduğu keşfedilmiştir (Tsiakalou et al. 2009).

MPN'ler ilk olarak farklı MPN'ler arasındaki patogenetik ve klinik benzerlikleri belirleyen William Dameshek tarafından gruplandırılmışlardır. 2005'in başlarında JAK2V617F mutasyonunun keşfinden sonra farklı MPN'ler birçok gen keşif çalışmasının kaynağı olmuştur. Bu da MPN'li hastalarda, hastalığın patogenezi dahil olduğu bilinen genlerdeki yeni mutasyon serileri ve yeni genlerdeki mutasyonların ortaya çıkmasını sağlamıştır (Tefferi 2008).

MPN'lerdeki genetik keşiflerin tarihi genomik teknolojinin gelişiminin tarihini de yansıtır. MPN'lerin genetik temellerinin ilk çalışmaları, farklı MPN'lerin klonal, kök hücre orijinini gösteren seminal X inaktivasyonuna dayanmaktadır. Daha sonra, Sanger sekansa erişiminin artmasıyla İnsan Genom Projesi'nin tamamlanması, JAK2 ve MPL mutasyonlarının keşfinden kısmen sorumlu olan aday-tabanlı sekanslama yaklaşımlarını arttırmıştır (Kralovics 2008).

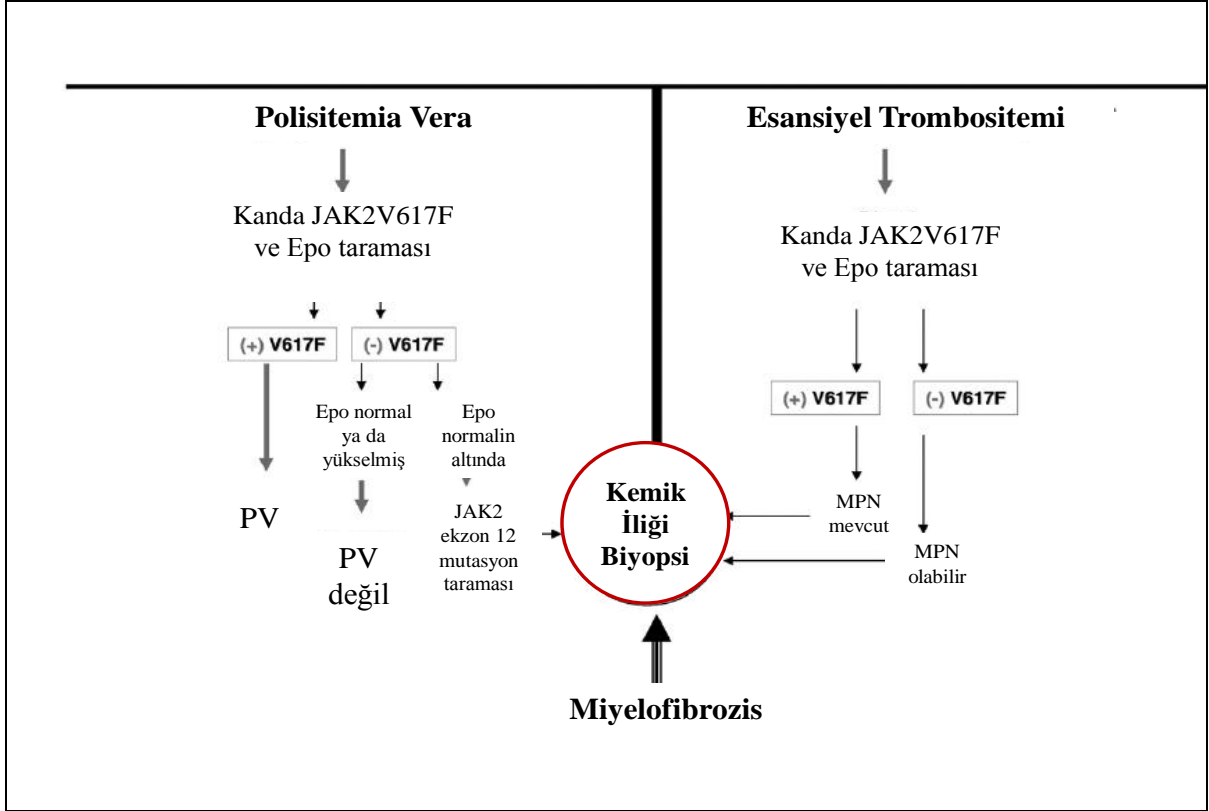
Bu çalışmaların her biri X kromozom geni glukoz-6 fosfat dehidrojenaz (G-6-PD)'in poliformizmini, bu genin heterozigot olduğu kadınlarda tanımlayarak avantaj kazanmışlardır. PV, ET ve PMF'li hastaların granülositlerinin, trombositlerinin ve kırmızı kan hücrelerinin G-6-PD alleli için iki ihtimalden sadece birini içerirken, diğer bütün vücut dokularının G-6-PD alleli için iki ihtimali de içerdiği gösterilerek bu hastalıkların

klonal yapısı kanıtlanmıştır. Geniş X kromozomu inaktivasyonu çalışmaları ve MPN'lerdeki somatik gen mutasyonu tanımlama çalışmalarına rağmen, MPN patogenezinin dahil olan hiçbir spesifik gen 20 yıldan fazla süre geçene kadar tanımlanamamıştır (Verstovsek and Tefferi 2010).

CML			<i>ABL1</i>
Myeloid neoplasms with eosinophilia			<i>PDGFRA, PDGFRB, FGFR1</i>
PV			<i>JAK2 V617F, JAK exon 12</i>
PMF			<i>JAK2 V617F, MPL W151L/K</i>
ET			<i>JAK2 V617F, MPL W151L/K</i>
Mastocytosis			<i>KIT D816V</i>

**Şekil 2.2:** WHO 2008 Sınıflamasına göre MPN grubuna giren hastalıklar ve patogenezinde sorumlu olan genler (Swerdlow et al. 2008).

### 2.3. TANI



Şekil 2.3: MPN'lerin modern tanısal algoritması (Tefferi et al.2011)

BCR-ABL negatif miyeloproliferatif neoplazi tanısı almış vakaların çoğu, neoplastik hücrelerin olgunlaşmasının kemik iliğinde etkin olduğu ve periferik kandaki granülosit, eritrosit ve/veya trombositlerin sayılarının arttığı proliferatif fazda teşhis edilmektedir. Başlangıçları sinsi olan MPN'ler, miyelofibrozis, etkin olmayan hematopoez ve/veya transformasyondan dolayı kemik iliği bozukluğu sonucu akut lösemiye dönüşme potansiyeline sahiptir (Passamonti et al. 2011).

Bazı hastalarda, ilk proliferatif evre görülmez ya da kısa sürer. Bu yüzden MPN ile ilerlemiş evrede karşı karşıya kalınır (Murphy 1997).

Tanıda splenomegali (dalak büyümesi) ve hepatomegali (karaciğer büyümesi) çok yaygındır ve hastalık süresince daha belirgin hale gelir. Organomegali aşırı sayıdaki kan hücrelerinin dalak ve karaciğere el koymalarından, kan hücrelerinin kemik iliği dışındaki organlarda üretilmesinden (ekstra medüller hematopoez) ya da her ikisinden kaynaklanır (Murphy 1997).

WHO (Dünya Sağlık Örgütü)'nun MPN'ler için olan tanısal algoritmaları ve sınıflandırması, MPN'lerin tedavisinden önce, başlangıçta var olan klinik, laboratuvar, morfolojik ve genetik bulgulara dayanmaktadır. Bir MPN'den şüphelenildiği zaman, hemogram dikkatlice bir periferik kan filmi ile ilişkilendirilmelidir. Şüphelenilen hastalığa göre, ek laboratuvar testleri (serum eritropoetin, serum laktat dehidrojenaz (LDH) ve temel kimyasal profiller, karaciğer fonksiyon testleri, demir testleri, koagülasyon ve trombosit fonksiyon testleri gibi) hastanın tam olarak değerlendirilmesi ve tanısı için gerekli olabilir (Vardiman et al. 2009).

Bazılarının, kemik iliği örneklerinin bazı MPN'lerin tanısını garantilemediği tartışmasına rağmen, kemik iliği histolojisi WHO tanısal ana hatlarının önemli bir parametresidir. Üstelik, JAK2V617F, BCR-ABL1 ve diğer genetik anormallikler için periferik kandan moleküler genetik çalışmaları başarıyla gerçekleştirilmesine rağmen, kemik iliği örnekleri bir MPN'si olduğundan şüphelenilen bir hasta için şiddetle tavsiye edilen rutin sitogenetik çalışmalar için en iyi materyali sağlamaktadır (Vardiman et al. 2009).

Miyeloproliferatif neoplazilerin yıllık görülüş sıklığı, hiçbir klinik ve hematolojik anormalliği olmayan JAK2V617F mutasyonu taşıyan sağlıklı deneğin yaklaşık %10'u ile kıyaslanarak, her 100,000 kişide 0.5 ile 6.5 arasında değişmektedir (Cankovic et al. 2009).

## **2.4. BCR-ABL-NEGATİF MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER**

JAK2 V617F mutasyonu BCR-ABL negatif miyeloproliferatif neoplazide en yaygın olarak görülen mutasyondur. Polistemia Vera, Esansiyel Trombositemi ve Primer Miyelofibrozis'in major tanı kriterleri arasındadır.

### **2.4.1. POLİSİTEMİA VERA (PV)**

Polistemi, birim hacimdeki kırmızı kan hücrelerinin sayısının artışıdır. Polistemi'nin birçok nedeni vardır. Primer ve sekonder polistemi doğuştan veya sonradan olabilir. Sonradan olan tek polistemi Polisitemia Vera'dır. Batı dünyasında yıllık olarak rapor edilen vaka sayısı 100.000 bireyde 1-3 vaka iken bu oran Asya'da daha düşüktür. Nadir görülen bir bozukluktur. Bir ailesel yatkınlık söz konusudur. 60'lı yaşlarda daha sık rastlanır ve nadiren 20 yaşından küçük hastalarda da görülür. Erkekler, kadınlardan daha çok etkilenir. PV'li hastaların %90'ından fazlasında kazanılmış somatik mutasyon

JAK2V617F görülür ve geri kalanların çoğunda JAK2 ekzon 12 aktive edici mutasyonları gözlenir. Bu bulgular PV'yi diğer polistemilerden ayırmaktadır. PV sadece eritroid prekürsörlerin değil ayrıca granüositlerin, megakaryositlerin ve onların prekürsörlerinin de kemik iliğindeki klonal proliferasyonudur, bu yüzden lökositoz (lökositlerin artışı) ve trombositoz (trombositlerin artışı) genellikle periferik kandaki kırmızı kan hücrelerinin artışına eşlik eder (Türk Hematoloji Derneği, <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/69/bolum-ii-bcr-abl-negatif-klasik-kronik-miyeloproliferatif-neoplaziler.pdf>, 2012; Verstovsek and Tefferi 2010).

PV'nin 3 kliniko-patolojik evresi tanımlanmıştır;

1-Pre-polisitemik evre; hafif eritrositoz sınırında ve genelde belirgin trombositoz

2- Polisitemik evre

3-Post-polisitemik evre; anemiye içeren sitopeni ve kemik iliği fibrozu, ekstramedüller hematopoezle karakterize edilir (Verstovsek and Tefferi 2010).

Akut lösemiye dönüşüm olasılığı düşüktür ancak bazı hastalar önceki sitotoksik terapilerle ilişkili olarak miyelodisplastik ya da blast evre geliştirebilir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Polisitemia Vera tanı kriterleri (2008);

Tanı için 2 majör ve 1 minör veya iki minör kriterle beraber birinci majör kriterin varlığı gerekir.

### **Majör Kriterler**

1. Hemoglobin erkek için >18,5 gr/dl, kadın için >16,5 gr/dl veya eritrosit kütlesi artışının diğer bulguları\*
2. JAK2 V617F veya JAK2 ekzon 12 mutasyonu gibi diğer fonksiyonel olarak benzer mutasyonların varlığı

### **Minör Kriterler**

1. Yaşa göre hipersellülarite gösteren kemik iliği biyopsisi; belirgin eritroid, granüositik ve megakaryositik çoğalma ile kendini gösteren üç dizi hiperplazisi (panmiyelozis)

2. Normal referans aralığının altında serum eritropoetin düzeyi

3. In vitro endojen eritroid koloni oluşumu

\* Yaş, cinsiyet, yaşanan yerdeki yükseltiye göre belirlenmiş referans aralığının 99 persentil üzerindeki hemoglobin veya hematokrit değeri. Kişiye özel bazal hemoglobin değerinde, demir eksikliği anemisinin düzeltilmesi ile ilişkisiz olarak, en az 2 gr/dl düzeyinde, belgelenmiş ve devamlılık gösteren bir artışın varlığında, erkekte 17 gr/dl, kadında 15 gr/dl hemoglobin değeri. Eritrosit kütesinin öngörülen normal ortalama değerinden % 25'den daha fazla artışı.

Tanı neredeyse her zaman polisitemik evrede yapılır. En yaygın başlangıç semptomları (baş ağrısı, halsizlik, parestezi, skotom, eritromelalji) mikrodolaşımdaki trombotik olaylarla ilişkilidir. Diğer semptomlar, kaşıntı, gut ve gastrointestinal hemoraj (kanama)dır (Türk Hematoloji Derneği, <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/69/bolum-ii-bcr-abl-negatif-klasik-kronik-miyeloproliferatif-neoplaziler.pdf>, 2012; Verstovsek and Tefferi 2010).

Latent ya da pre-polisitemik vakalarda JAK2V617F mutasyonu varsa, serum eritropoetini seviyesi düşükse ve kemik iliği PV'nin tipik morfolojik özelliklerini gösteriyorsa tanı kanıtlanabilir. PV'deki en belirgin fiziksel bulgular; kan hücrelerindeki artış % 80, splenomegali % 70 ve hepatomegali % 40-50'dir (Gruppo Italiano Studio Policitemia, Ann Intern Med 1995).

Tedavi görmeyen PV hastaları tromboz veya hemorajdan genelde 1-2 yıl içinde hayatlarını kaybetmektedirler. Ancak düzgün bir tedavi ile sağkalım, özellikle tanı anında 70 yaşından küçük hastalarda, 15 yıl ve üstü olarak rapor edilmiştir (Verstovsek and Tefferi 2010).

#### **2.4.2. ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ (ET)**

Kemik iliğinde trombosit ana hücrelerinde, kan sayımında ise trombositlerde artış (trombositoz) ile karakterize bir hastalıktır. İdiyopatik myelofibrozis (IMF), Kronik Miyeloid Lösemi (KML), Polisitemia Vera (PV) gibi bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Diğer miyeloproliferatif neoplazilerle karşılaştırıldığında daha iyi prognozlu olup, kadınlarda daha sık gözlenir. Nadir görülen bir hastalıktır. Kemik iliğinde kontrolsüz olarak çoğalan trombosit ana hücreleri (megakaryosit) aşırı miktarda trombosit üretirler.

Bazı hastalarda trombositlerin sayısı fazla olmasına rağmen fonksiyonel olarak çalışmadıklarından bu hastalarda kanama oluşurken bazı hastalarda ise fazla çalıştıklarından damarlarda tıkanmalara neden olurlar (Verstovsek and Tefferi 2010).

ET için WHO 2008 tanı kriterleri;

Tanı için 4 kriterin tümünün karşılanması gerekir.

1. Trombosit sayısının sürekli olarak  $\geq 450.000/\mu\text{L}$  olması
2. Megakaryositik dizinin hakimiyetinde, büyük olgun megakaryositlerin sayısında artış bulunan, proliferasyon gösteren kemik iliği biyopsi örneği. Nötrofilik granülopoezde dikkate değer artış ve sola kayma olmamalıdır. Eritropoezde dikkate değer bir artış yoktur.
3. Polisitemia vera, primer miyelofibroz, BCR-ABL pozitif kronik miyelositik lösemi, miyelodisplastik sendrom veya diğer miyeloid neoplazilerin WHO tanı kriterlerinin bulunmaması
4. JAK2 V617F veya diğer klonal bir belirteçin gösterilmesi veya JAK2 V617F yokluğunda reaktif trombositoz bulgusunun olmaması
  - a. Değerlendirme süreci boyunca süreklilik.
  - b. Düşük serum ferritini varlığında, demir yerine koyma tedavisi hemoglobin miktarını polisitemia vera düzeyine yükseltmemelidir. Polisitemia veranın dışlanması hemoglobin ve hematokrit düzeyleri temel alınarak yapılır, eritrosit kütlesi ölçümü gerekli değildir.
  - c. Önemli düzeyde retiküler fibroz, kollajen fibroz ve çevresel kanda lökoeritroblastoz olmamalı veya primer miyelofibrozis için tipik megakaryosit morfolojisinin (bozuk sitoplazma/çekirdek oranlı ve hiperkromatik, kabarcıklı veya düzensiz büklümlü ve yoğun kümeleşme gösteren çekirdekli, küçükten büyüğe değişen megakaryositler) eşlik ettiği belirgin hipersellüler kemik iliği olmamalı.
  - d. BCR-ABL füzyon geni pozitif olmamalıdır.
  - e. Diseritropoez ve disgranülopoez bulunmamalıdır.
  - f. Demir eksikliği anemisi, splenektomi, cerrahi, infeksiyon, yangı, bağ dokusu hastalıkları, metastatik kanser ve lenfoproliferatif bozukluklar reaktif trombositoz nedenleri içinde yer alır. Buna karşın, reaktif trombositoz ile ilişkili bir durumun varlığı eğer ilk üç kriter karşılanıyorsa esansiyel trombositemi ihtimalini dışlamaya yetmeyebilir (Türk Hematoloji Derneği, <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/69/bolum-ii-bcr-abl-negatif-klasik-kronik-miyeloproliferatif-neoplaziler.pdf>, 2012).



X-bağımlı genlerin polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA metilasyonundan yararlanan çalışmalar, ET'li hastaların büyük çoğunluğunun monoklonal hematopoeze sahip olduğunu göstermiştir. JAK2V617F mutasyonu vakaların yaklaşık % 50'sinde, MPLW515K/L mutasyonu ise % 1-2'sinde tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar megakaryosit proliferasyonu ve trombosit üretimini uyaran yolların aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır (Thiele et al. 2008).

En büyük megakaryositik gelişme ve farklılaşma faktörü olan serum trombopoetin seviyesinin yükselmiş olduğu gösterilmiştir. Trombopoetin sirkülasyon seviyesi, MPL'ye bağlanma derecesiyle düzenlenmektedir. Megakaryositlerin ve trombositlerin kütlesi artarken, bu bağlanmanın sonucu olarak trombopoetin seviyesi düşer. Normal olarak MPL-trombopoetin kompleksi yok edildiği kadar trombositler sirkülasyondan uzaklaştırılır, trombopoetin seviyeleri daha fazla trombosit üretimini uyarmak için artar. Megakaryositlerde trombopoetin MPL ile bağlanması normalde MPL'nin konformasyonel olarak değişimini ve JAK kinazın MPL'nin sitoplazmik domainine aşırı derecede bağlanmasını başlatır. Bu, STAT, PI3K ve MAPK yolları aracılığıyla proliferasyon, endoreduplikasyon ve megakaryosit kütle artışı uyaran sinyalizasyonu başlatır (Kaushansky 2008).

Spesifik olarak ET'yi tanımlayan yegane bir test yoktur, trombositozu yol açabilecek diğer bütün nedenler tanıdan önce elimine edilmelidir. Her ne kadar JAK2V617F mutasyonu ET'li hastaların yaklaşık yarısında ve MPL mutasyonu da % 1-2'sinde görülse de, bu mutasyonlar spesifik değildir. Ama yine de bu mutasyonlardan birinin bulunması trombositozun klonal yapısını kanıtlamaktadır (Jones et al. 2005).

Hastaların % 5'inden azında akut lösemiye transformasyon görülmektedir. Ortalama sağkalım süresi 10-15 yıl olarak belirtilmiştir.

### 2.4.3. PRİMER MİYELOFİBROZİS (PMF)

Miyelofibrozis, üzerinde hematopoezin gerçekleştiği yapısal iletişim ağını sağlayan ekstrasellüler matriks proteinlerinin yoğunluğunun ve sayılarının artışıdır (Klco et al. 2010).

Reaktif miyelofibrozis enfeksiyonlarda, iltihabi durumlarda, metabolik bozukluklarda ve neoplastik hastalıklarda ve sekonder olarak fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalmaktan meydana gelebilir (Verstovsek and Tefferi 2010).

PMF, megakaryositlerin ve granülositlerin baskın olarak artışı ve ilerleyen miyelofibroz, aşırı anjiojenez ve ekstramedüller hematopoezi içeren kemik iliğinin yeni bir biçim kazanmasıyla karakterize edilen bir klonal MPN'dir (Verstovsek and Tefferi 2010).

Primer Miyelofibrozis için WHO tanı kriterleri;

Tanı için 3 majör ve 2 minör kriter gereklidir.

#### **Majör Kriterler**

1. Genellikle retikülin ve/veya kollajen fibrozla birlikte megakaryositik proliferasyon ve atipi varlığı veya belirgin retikülin fibrozu yokluğunda, megakaryosit değişikliklerine, granülositik çoğalma ve sıklıkla eritropoez azalması ile kendini gösteren, artmış kemik iliği hücreliliği eşlik etmelidir.

2. Polisitemia vera, BCR-ABL pozitif kronik miyelositik lösemi, miyelodisplastik sendrom veya diğer miyeloid neoplaziler için WHO kriterlerinin karşılanmaması

3. JAK2V617F veya diğer klonal belirteçlerin (örn MPLW515K/L) gösterilmesi veya klonal belirteç yokluğunda, kemik iliği fibrozu veya diğer değişikliklerin enfeksiyon, otoimmün bozukluk, diğer yangısal durumlar, saçlı hücreli lösemi ve diğer lenfoid neoplaziler, metastazlı tümör veya toksik (kronik) miyelopatilere sekonder olduğunu gösteren bulgu olmaması (Türk Hematoloji Derneği, <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/69/bolum-ii-bcr-abl-negatif-klasik-kronik-miyeloproliferatif-neoplaziler.pdf>, 2012).

## Minör Kriterler

1. Lökoeitroblastoz
2. Serum laktat dehidrogenaz düzeyinde artış
3. Anemi
4. Splenomegali
  - a) Bozuk çekirdek/sitoplazma oranı, hiperkromatik, kabarcıklı veya düzensiz büklümlü çekirdek ve yoğun kümeleşmelerle ile kendini gösteren küçükten büyüğe doğru giden değişik çapta megakaryositler
  - b) Düşük serum ferritini varlığında, demir tedavisi ile hemoglobin miktarı polisitemia vera tanısı için gerekli düzeye çıkmamalıdır.
  - c) BCR-ABL+ olmamalıdır.
  - d) Diseritropoez ve disgranülopoez olmamalıdır.
  - e) Reaktif miyelofibroz nedenlerinin varlığı PMF tanısını dışlamaz.
  - f) Lökoeitroblastoz sınırdan veya belirgin olabilir (Türk Hematoloji Derneği, <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/69/bolum-ii-bcr-abl-negatif-klasik-kronik-miyeloproliferatif-neoplaziler.pdf>, 2012).

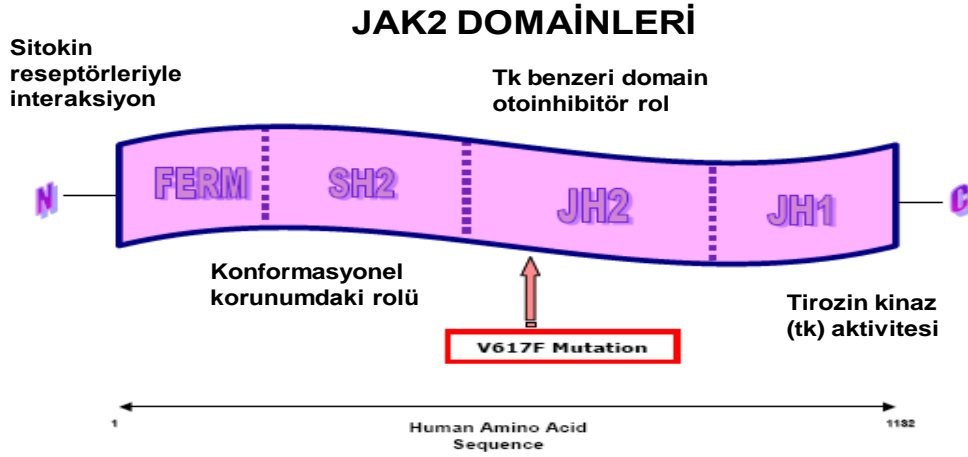
PMF'nin patogeneziindeki anormal megakaryopoezin mekanizmasını araştırmak için yapılan bir girişimde, birkaç transgenik fare modeli üretilmiştir. Bu modeller, hem JAK2V617F mutasyonlu hem de normal megakaryopoezin ekstrinsik (trombopoetin ve reseptörü MPL) ve intrinsik (GATA1 transkripsiyon faktörü) kontrolüne müdahale eden mutasyonlara dayandırılmaktadır. Hayvan modellerinin, MPL mutasyonlular JAK2V617F mutasyonlulardan daha fazla PMF-benzeri fenotipte olduğu gösterilmiştir (Varicchio vd 2009).

PMF ilerleyen bir hastalıktır ve tanıdaki bulgular hastada semptomların ilk kez görüldüğü evreye bağlıdır. Hastaların yaklaşık % 70 kadarıyla ilk kez fibrotik fazda karşı karşıya kalınmaktadır (Verstovsek and Tefferi 2010).

## 2.5. JAK2 GENİ ve ÖZELLİKLERİ

### 2.5.1. JAK2 GENİNİN YERİ ve YAPISI

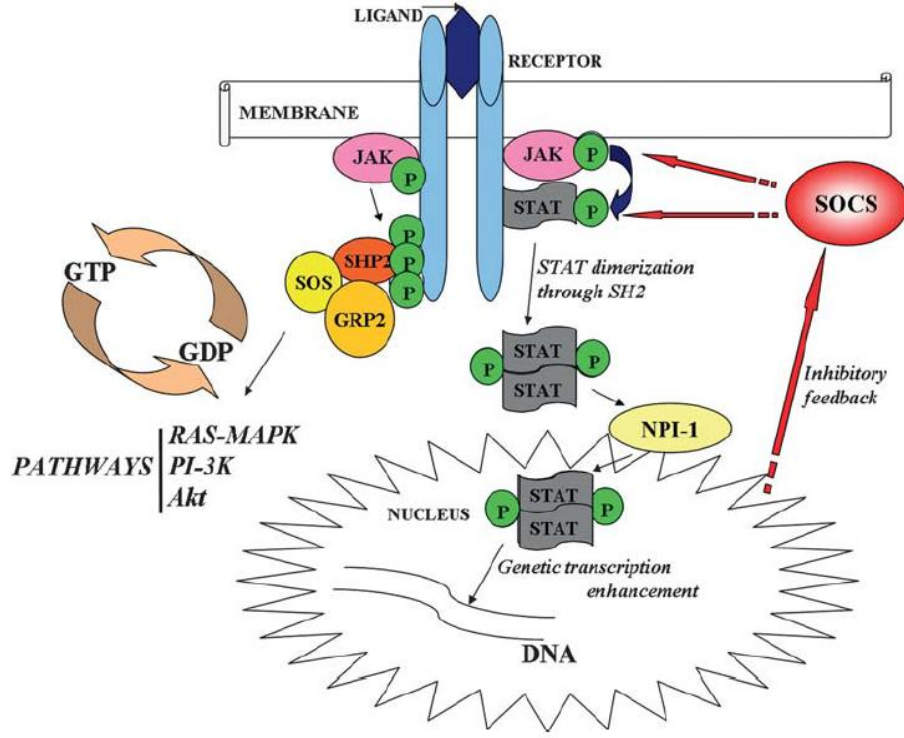
9p24'te yer alan JAK2 geninin 25 ekzonu vardır. 1132 aminoasitten oluşan bir protein kodlamaktadır (Tefferi 2010). Her JAK bir aktif tirozin kinaz domaini JAK homoloji 1 (JH1), bir katalitik olarak inaktif psödokinaz domaini JAK homoloji 2 (JH2), bir SRC homoloji 2 domaini (SH2) ve tip 1 sitokin reseptörlerinin bağlandığı bir amino terminal FERM homoloji domaini içermektedir (McLornan et al. 2006).



Şekil 2.4: JAK2 geninin yapısı (McLornan 2006)

### 2.5.2. JAK-STAT YOLAĞI

Tirozin kinazların Janus (JAK) ve Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) ailesi hücre sel hayatta kalım, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoza aktif olarak dahil olan çeşitli sinyal transdüksiyon yollarının kritik elemanlarıdır. STATlar, çeşitli sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörlerine cevap veren yedi transkripsiyon faktöründen oluşmaktadır (Er et al. 2009).



Şekil 2.5 :JAK-STAT yolağı (Vladareanu et al. 2010)

Aktive olan STAT hedef gen transkripsiyonunu arttırmak için hücre içinde dimerleşir ve translokasyona uğrar. STATlar, başta Janus (JAK) aracılığıyla olmak üzere tirozin fosforilasyonu ile aktive olurlar (Veneri et al. 2009).

Tirozin kinazlar (JAK1, JAK2, JAK3 ve Tirozin Kinaz 2) tip 1 ve tip 2 sitokin reseptörleri ilgili ligandlarıyla (eritropoetin, trombopoetin) karşılaştığında hücre-içi ve hücreler arası tirozin fosforilasyonu yoluyla aktive edilir (Veneri et al. 2009).

JAK2 FERM domainin etkileşimi ayrıca EPO reseptörünün sitoplazmik domaininin hücre yüzeyiyle iletişimde bir role de sahiptir. Normal fizyolojik koşullar altında bir ligand bir reseptöre bağlandığında konformasyonel değişim gerçekleşir. JAK2 proteini daha sonra tirozin fosforilasyonunu katalizlediği reseptörün sitoplazmik domainiyle bağlantı kurar. Bu ilk olarak transkripsiyon faktörü olarak görev yapan daha sonra fosforile olan, homodimerize ve transloke olan STAT moleküllerinin güçlenmesini sağlarlar. Tirozin fosforilasyonu aynı zamanda sitokin sinyalizasyon yollarındaki diğer anahtar düzenleyici olayları da modifiye ederler (McLornan et al. 2006).

### 2.5.3. JAK2 MUTASYONLARI

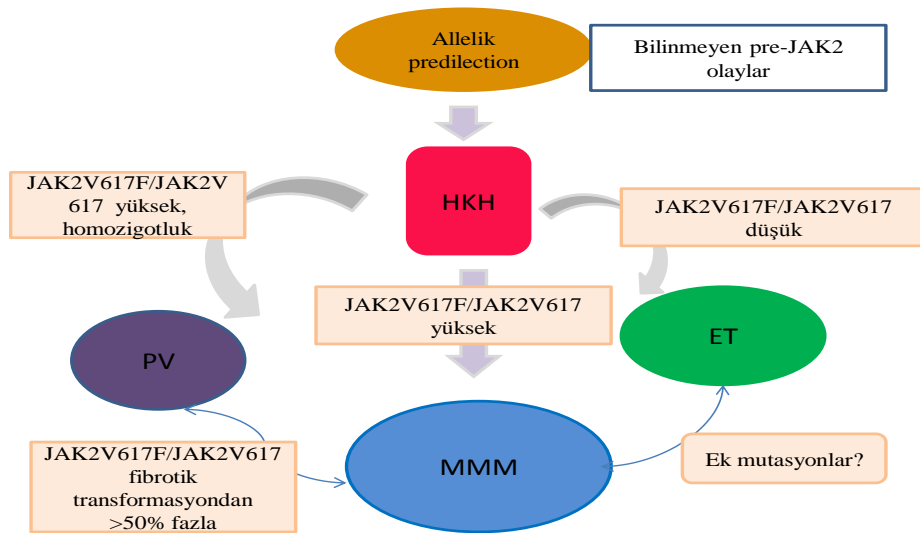
JAK2 mutasyonları ekzon 12 ve ekzon 14 mutasyonları olarak iki grupta incelenmektedir.

JAK2V617F ve JAK2 ekzon 12 mutasyonlarının neredeyse bütün hastalarda görüldüğü PV'nin aksine, ET ve PMF'nin yarısına yakını JAK2V617F negatiftir. JAK2V617F negatif ET ve PMF'lerde JAK2'de tanımlanmış başka bir mutasyon gözlenmemiştir (Kilpivaara and Levine 2008).

JAK2V617F mutasyonunun Polisitemia Vera, Esansiyel Trombositemi ve Primer Miyelo Fibrozis hastalıkları arasında dağılımı heterojen olarak gözükmemektedir. JAK2V617F allel burden (mutant allelerin, yabancı tip allelere oranı) ve hastalık fenotipindeki, komplikasyonundaki ve evrimindeki potansiyel etkisi konusuna olan ilgi giderek artmaktadır (Burjanivova et al. 2009).

JAK2V617F-negatif hastalarda ise 10 farklı JAK2 ekzon 12 mutasyonu bugüne kadar tespit edilmiştir. Polisitemia Vera benzeri ancak farklı kemik iliği morfolojisi ve farklı klinik bulgular gösteren bir hastalık birkaç JAK2 ekzon 12-pozitif hastalarda tanımlanmıştır (Burjanivova et al. 2009).

Tek bir mutasyonun nasıl olup da üç ayrı hastalığın patogeneziye katkıda bulunduğu önemli bir sorudur. Bu hastalıkların fenotipik çeşitliliğini açıklamak için birkaç hipotez önerilmiştir.



Şekil 2.6 : JAK2 V617F'nin MPN'lerdeki onkopatogenetik rolü (Vladareanu et al. 2010)

Bunlar;

### ***1-Gen dozaj***

JAK2V617F'nin homozigotluğu kromozom 9p24'teki uniparental dizominin sonucudur. Uniparental dizomi (UPD) bir homolog kromozom çiftinin hepsi veya bir parçasının tek ebeveyninden aktarılmasıdır. İlk çalışmalar JAK2V617F homozigotluğunun PV'de ET'den daha yaygın olduğunu göstermiştir.

Gen dozaj hipotezi ayrıca Scott ve arkadaşları tarafından homozigot JAK2V617F mutant eritroid kolonilerin daha çok PV'li hastalarda, nadiren de ET'li hastalarda gözlemlendiği gösterilmiştir (Vladareanu et al. 2010).

9p24 uniparental dizomisi ve JAK2V617F homozigotluğu PV'nin ilk gelişiminde ET'den daha yaygın olması, JAK2 sinyalizasyonunun yüksek seviyede olması eritroid fenotipe avantaj sağlarken, düşük JAK2 seviyesinin megakaryosit fenotipine avantaj sağladığını göstermektedir (Vladareanu et al. 2010).

Bu hipotezi destekleyen in vivo çalışmalar, hematopoetik kompartmanlardaki JAK2V617F'nin aşırı ekspresyonunun ilgili trombositoz olmadan, lökositöz ve polisitemiye neden olduğunu göstermiştir. MPN fenotipiyle ilgili JAK2V617F için homozigot ve heterozigot hücrelerdeki aşırı sinyalizasyonda farklılıklar olabileceği ihtimali vardır.

JAK2V617F gen dozajının MPN patogenezi etkileme mekanizmasının açıklığa kavuşması için yeni çalışmalar gerekmektedir (Kilpivaara and Levine 2008).

### ***2-Germline düzenleyiciler***

Pardanani ve arkadaşları JAK2, MPL, EPOR, ve GCSFR'deki SNP'lerin fenotipi etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır.

MPN'li 179 hastadaki 32 SNP'in analizi PV ve ET ile ilişkili spesifik SNP'leri belirlemelerine imkan tanımıştır. Bu veri tek bir bağlantıdan olsa bile, MPN fenotipiyle ilgili host genetik varyasyon kanıtını sağlamıştır (Kilpivaara and Levine 2008).

### ***3-Eğilimli alleller***

MPN gelişimine yatkınlığı olan allellerde, JAK2V617F bir somatik allel olarak kazanılmaktadır.

Bu, JAK2 sinyal yolağındaki mutasyonların gelişimine spesifik seçici bir avantaj sağlayan MPN eğilimli alleller olduğunu göstermektedir (Vladareanu et al. 2010).

### ***4-Ek somatik mutasyonlar***

MPN'li hastalarda sitogenetik anormallikler gözlenmiştir. Bunların en önemlisi kromozom 20q'daki delesyondur. Ayrıca, bütün hematopoetik hücrelerinde 20q delesyonu yokluğu sadece küçük bir grup JAK2V617F- pozitif hastalarda gözlenmiştir.

Bu veriler, bazı hastalarda JAK2V617F alleli kazanımından önce ortaya çıkan bir "pre-JAK2 alleli" olduğunu düşündürmektedir. En ilginç olan veri ise, JAK2V617F-pozitif MPN'den JAK2V617F-negatif akut lösemiye dönüşen hastalardan gelmiştir. Bu durum hematopoetik progenitöre dönüştüren bir "pre-JAK2 alleli" olduğunu göstermektedir. Bu allellerin kimliği ise hala sır olarak kalmaktadır (Kilpivaara et al. Levine 2008).

#### **2.5.3.1. JAK2 V617F Mutasyonu**

JAK2V617F, JAK2 geninin 14. ekzonunda 617. kodonun 1849. pozisyonundaki Guanin nükleotidinin Timin nükleotidine transversiyonu sonucu Valin aminoasitinin Fenilalanin aminoasitine dönüştüğü somatik bir nokta mutasyonudur (Tefferi 2010).

Bütün hücrelerde bulunan kalıtsal mutasyonların aksine, somatik mutasyonlar vücudun sadece belli hücrelerinde meydana gelir ve çoğunlukla onkogeniktirler (Tsiakalou vd 2009).

MPN patogeneğinde ilk olarak tanımlanan spesifik mutasyon JAK2V617F'dir. JAK2, hem tip I hem de tip II sitokin reseptörlerinin downstreaminde bulunan bir sitoplazmik nonreseptör tirozin kinaz kodlamaktadır ( Tefferi 2008).

JAK2V617F mutasyonu 2005'te dört bağımsız grup tarafından keşfedilmiştir. Başlangıçtaki bu dört grubun hepsi JAK2V617F mutasyonunun en çok PV(% 81-99) daha sonra ET (% 41-72) ve en son olarak da MF (% 39-57)'de heterozigot ya da homozigot



halde bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, homozigot JAK2V617F mutasyonunu mitotik rekombinasyondaki bir mutant allelin duplikasyonunun sonucu olduğunu da hepsi göstermiştir (Verstovsek and Tefferi 2010).

JAK2V617F'nin bir onkogen olduğunu doğrulayan birçok in vitro ve in vivo çalışma yapılmıştır. Ancak, bu çalışmalardan en önemlileri JAK2V617F'nin ifade edildiği fare kemik iliği naklinin olduğu in vivo deneylerdir. Bu bağlamda, alıcı farelerdeki JAK2V617F'nin ifadesi, polisitemia, strain-spesifik lökositoz, ekstramedüller hematopoez ve trombositoz yokluğuyla belirgin bir MPN'ye neden olduğu gösterilmiştir (Kilpivaara and Levine 2008).

JAK2V617F mutasyonu downstream hedeflerin ligand bağımsız aktivasyonunu etkinleştirir. Bunun sonucu olarak da hücre döngüsündeki G1 fazından S fazına geçiş hızlanmış olur. JAK2V617F BCL-XL ve siklin D2 protein ekspresyonunu teşvik eder (Vakil and Tefferi 2011).

JAK2V617F mutant proteini aşırı fosforile edilir ve STAT5, MAK/ERK ve PI3K/AKT sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar. Tüm aktivasyon tip 1 homodimerik sitokin reseptörüyle bir ligandın etkileşimine kısmen bağlıdır. Bu durum, bu mutasyonun etkilerinin neden esas olarak bu tip reseptörleri dominant olarak ifade eden eritroid, miyeloid ve megakaryositik hücre hatlarında görüldüğünü açıklayabilir (Vakil and Tefferi 2011).

JAK2 mutasyonu ayrıca reseptör aracılı apoptozu da inhibe eder ve MPL reseptör ekspresyonunda düşüklüğe neden olur. Hücre hatlarında, JAK2, STAT5 ve PI3K yollarının aşırı aktivasyonu ile ilişkili olarak, JAK2V617F, IL3 ve eritropoetin gibi hücrelerde sitokin bağımsız hücre büyümesini stimüle eder (Vladareanu et al. 2010).

JAK2 mutasyonu ayrıca tedavi yanıtını da etkilemektedir. ET'li hastalar içinde, V617F mutasyonu olanlar mutasyonsuz hastalara kıyasla, hidrosikarbamiduma daha duyarlı iken anagrelide değildir. Tedavi yanıtı JAK2-pozitif periferik kan hücrelerinin hesaplanmasıyla direkt olarak değerlendirilebilir. Bu özellikle allogenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu yapılan hastalar için önemlidir (Vladareanu et al. 2010).

Spesifik JAK inhibitörlerinin gelişmesi BCR-ABL pozitif KML'ye benzer olarak hastalık takibine imkan sağlayabilir (Vladareanu et al. 2010).

### 2.5.3.2. JAK2 Ekzon 12 Mutasyonları

JAK2 ekzon 12 mutasyonları, Scott ve arkadaşları tarafından JAK2V617F-negatif PV'li hastalardaki JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, STAT5A ve STAT5B'nin kodlayan bütün ekzonlarının sistematik olarak yeniden sekanslanmasıyla keşfedilmiştir (Scott et al. 2007).

JAK2 ekzon 12 'de kodonlardaki küçük delesyonlar ya da insersiyonlar olan K539L allelini ve 3 tane daha alleli içeren dört yeni mutasyon tanımlanmıştır. Bu dört mutasyonun JAK2'nin ardışık aktivasyonuna neden olduğu fonksiyonel olarak doğrulanmıştır. JAK2K539L allelinin eritrositöz ve PV fenotipine neden olduğu gösterilmiştir.

JAK2 ekzon 12 mutasyonlarının ilk keşfinden sonra H538Q'yı da içeren birçok mutasyon daha belirlenmiştir (Li et al. 2008).

JAK2 ekzon 12 mutasyonlarının ilk keşfedildiği zaman, sadece JAK2V617F mutasyonu taşımayan hastalarda meydana geldiği düşünülmüştür. Ancak, yakın bir zamanda ender PV hastalarının hem JAK2 ekzon 12 hem de JAK2V617F mutasyonu taşıdığı görülmüştür. Klonal analizler JAK2V617F mutasyonu ve JAK2 ekzon 12 mutasyonlarının bağımsız klonlarda meydana geldiğini ve bu iki mutasyonun muhtemelen hücre davranışında ve bir MPN'nin varlığını gösteren yatkınlık alleli üzerinde çakışan etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Li et al. 2008).

MPN'lerdeki JAK2 aktive edici somatik nokta mutasyonlara ek olarak, lösemilerde ve nadir olarak da klasik MPN'lerde JAK2'yi içeren birkaç kromozomal translokasyon bulunmuştur.

JAK2'nin TEL(Translokasyon ETS Lösemi veya ETV6) ile füzyonu insan malinitelerinde tanımlanan ilk JAK2 somatik değişimidir (Lacronique et al. 1997).

Tanımlanan bütün TEL-JAK2 füzyon proteinleri JAK2'nin JH1 kinaz domainini içermektedir ve JH2 psödo kinaz domainini içeren bazı translokasyonlarda bulunmuştur (Peeters et al. 1997).

TEL-JAK2 füzyonu JAK2'nin temel kinaz aktivitesine yol açmaktadır. İkinci en çok rapor edilen JAK2 translokasyonu JAK2'nin PCM1 ile birleşmesidir (Verstovsek and Tefferi 2010).

Yakın zamanda ALL’li bir hastada yeni nesil transkriptom sekanslama yöntemi ile JAK2 ve Striatin geni arasındaki translokasyon keşfedilmiştir (Mullighan et al. 2009).

## 2.6. MPL MUTASYONLARI

MPL (trombopoetin reseptörü), proto-onkogen c-MPL tarafından kodlanır. Trombopoetin reseptörü c-MPL aracılığıyla megakaryopoez ve trombopoezin önemli bir regülatörünü temsil eden bir trombopoetindir. Bu reseptör, CD34+ hematopoetik progenitörleri, megakaryositleri ve trombositleri üzerinden ifade edilir. MPL ve eritropoetin reseptöründeki mutasyonlar ilk olarak ailesel eritrositoz ve trombositozda tanımlanmıştır.

MPL geninde şu anda MPLW515L, MPLW515K, MPLS505N, MPLA519T içeren bir seri mutasyon bilinmektedir. MPL mutasyonları ET ve MF’li hastaların % 8 kadarında meydana gelmektedir ancak MPN’li hastalardaki MPL mutasyonlarının gerçek frekansı JAK2V617F yaygınlığı için yapılan çalışmalar kadar geniş olmadığı için tam olarak bilinmemektedir (Pardanani et al. 2006).

JAK2 ekzon 12’de olduğu gibi MPL’de de yalnızca JAK2V617F mutasyonu taşımayan hastalarda meydana geleceği düşünülmüştür. Ancak birçok rapor JAK2V617F ve MPL mutasyonlarının aynı anda MPN’li hastalarda olabileceğini göstermiştir (Beer vd 2009, Guglielmelli et al. 2007, Pardanani et al. 2006).

2005’te JAK2V617F mutasyonunun keşfinden beri, birkaç rapor JAK2V617F MPN’den kaynaklanan akut miyeloid lösemisinin (AML) lösemik blastlarının sıklıkla JAK2 yabanıl tip olduğu tutarlı bir şekilde bildirilmiştir (Campbell et al. 2006).

Bu MPN ve AML’nin iki farklı progenitör hücreden kaynaklanabileceğini ya da JAK2V617F’den önce bir anormallik taşıyan, hem AML hem de MPN’ye sebep olan atasal bir klonun var olabileceği öne sürülmektedir (Theocharides et al. 2007).

Son olarak, JAK2 ve MPL mutasyonlarının keşfi MPN’lerin ailesel vakalarının olası genetik nedenleri için yoğun çalışmalara yol açmıştır. Japonya’da ailesel bir ET türünde germline MPLS505N tanımlanmış olmasına rağmen, bu zamana kadar JAK2’de hiçbir kalıtsal mutasyon tanımlanmamıştır (Verstovsek and Tefferi 2010).

MPL genindeki somatik mutasyonlar ilk olarak Pikman ve arkadaşları tarafından EPO-R, MPL ve GCSF-R'nin aday gen yeniden sekanslaması esnasında keşfedilmiştir (Vladareanu et al. 2010).

Pikman ve grubu MPL mutasyonlarının intrasellüler JAK2/STAT yolağında JAK2V617F mutasyonuna benzer olarak aktive edici bir etkiye sahip olduğunu keşfetmişlerdir (Vladareanu et al. 2010).

MPL'nin sitoplazmik domainiyle transmembran domaininin bağlandığı yerdeki lösin ve triptofan değişimiyle bilinen MPL W515L mutasyonu, sitokin-bağımsız hücre proliferasyonuna ve JAK2, STAT, AKT ve ERK'in aşırı fosforilasyonuna yol açmaktadır (Vladareanu et al. 2010).

Hücre yüzeyinde, JAK2 mutasyonunun c-MPL ekspresyonunun down regülasyonuna neden olması c-MPL ekspresyonunun PV ve MMM hastalıklarında düşük olması bu hastalıkların karakteristik özelliği olduğunu, ayrıca PV ve diğer eritrositoz tiplerinin arasındaki tanı farklılıklarının bir unsuru olduğunu göstermektedir (Vladareanu et al. 2010).

Megakaryositlerin ve trombositlerin hücre yüzeyindeki trombopoetin reseptörünün(MPL) azalmış ekspresyonu Polistemia Vera ve Miyelofibrozis'te bilinen bir durumdur ancak, bu olaydan sorumlu mekanizmanın tam olarak nasıl olduğu büyük ölçüde belirsiz kalmıştır (Fleischman et al. 2012).

Pecquet ve arkadaşları, MPL ekspresyonunun JAK2V617F mutant proteini tarafından düşürüldüğünü göstermişlerdir.

Royer ve arkadaşlarının önceki bir çalışmasında yabancı tip JAK2'nin MPL'nin endoglikozidaz H-dirençli formunu stabilize ettiğini ve dolayısıyla hücre yüzeyindeki toplam reseptör seviyelerinin yükselişini göstermiştir. Bu son çalışmada Pecquet ve arkadaşları JAK2V617F'nin bu yeteneğini kaybettiğini göstermişlerdir. Sonuç olarak, JAK2V617F eksprese eden hücreler proteozom tarafından MPL degradasyonunda bir artış gösterirler (Fleischman et al. 2012).

Yakın zamanda, MPL ligandı trombopoetin yüksek konsantrasyonlarının hücre yüzeylerinde antiproliferatif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu megakaryosit gelişiminin geç evrelerinde proliferasyonu düşüren bir fizyolojik mekanizma gibi hizmet

edebilir. Bu nedenle, geç megakaryosit evresinde düşük seviyede MPL eksprese eden genetik olarak modifiye edilmiş farelerde trombositoz gelişir (Fleischman et al. 2012).

## **2.7. GERMLİNE JAK2 HAPLOTİPİ**

MPN'li ailelerin olması uzun zamandır MPN gelişimine eğilimli germline genlerin varlığını akla getirmektedir (Kralovics et al. 2003).

Üstelik hem epidemiyolojik veriler hem de ailesel çalışmalar kalıtımsal faktörlerin MPN'lere eğilimli olabileceğini göstermiştir Ayrıca JAK2 genindeki kalıtımsal olarak aktarılan SNP(tek nükleotit polimorfizmi)'lerin spesifik MPN alttürleriyle ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (Jones et al. 2009).

JAK2 mutasyonları ailesel MPN'lerin potansiyel bir nedeni olarak değerlendirilmiştir ancak JAK2'de hiçbir germline mutasyon tespit edilmemiştir (Landgren et al. 2008).

MPN'li ailelerin birikmiş çalışmalarından, çoğu soydaki kalıtım paterninin düşük etkinlikteki bir otozomal dominant özellik ile tutarlı olduğu görülmektedir. Ancak, MPN'ye germline olarak eğilimli hiçbir sitogenetik ya da genetik lokus, JAK2'nin kendi içindeki bir risk SNP'nin 2009'da keşfine kadar ilişkilendirilememiştir (Jones et al. 2009).

2009'da, üç ayrı rapor JAK2'inin kendisini içeren ve hem JAK2V617F mutasyonu hem de MPN'nin gelişimiyle ilişkilendirilen bir germline haplotip bloğu (46/1 de denilmektedir) yayınlanmıştır. Bu haplotip bloğu belirgin olarak MPN hastalarında zenginleştirilmiş ve JAK2 ekzon 12 ve 13'ün arasındaki intronun içinde yer alan bir SNP (rs10974944) ile işaretlidir. Bu üç çalışmanın üçü de bu haplotip için heterozigot olanların, diğer kromozomdan daha fazla eğilimli SNP alleli ile birlikte JAK2V617F mutasyonu kazanma ihtimalinin yüksek olduğunu göstermiştir (Olçaydu et al. 2009).

Önerilen güncel hipotezler, 46/1 haplotipinin, MPN ve JAK2V617F gelişimi için nasıl risk oluşturduğuna atıfta bulunan iki hipotez içermektedir. İlk hipotez, haplotipin JAK2 lokusundaki mutasyonların artmış frekansına sebep olduğudur ve bu mutasyonların bir klonal bozukluk gösterme gibi seçici büyüme avantajları ile sonuçlandığıdır. Bu hipotez daha önce tanımlanmış olan bağımsız klonlarda birçok kez JAK2 mutasyonu kazanan MPN hastası örnekleriyle güçlü bir şekilde desteklenmiştir. Ancak, bu "hiper- mutability" denilen hipotez haplotipin uzak bir nükleotitteki mutasyon sıklığının arttırması

mekanizması hakkında hiçbir açıklama getiremedikleri gerçeğiyle engellenmiştir. Ayrıca, haplotip JAK2V617F negatif MPN'lerde de zenginleştirilmiştir (Pardani et al. 2010).

İkinci hipotezin fikri ise, JAK2V617F mutasyonunun farklı haplotiplerde eşit ihtimalde meydana geldiği, ama risk haplotipinde mutasyon olanların daha güçlü bir büyüme avantajı kazanmakta olduğudur. Bu “fertile ground” denilen hipotezi haplotipin bir büyüme avantajı bahsedebileceği mekanizması önerilmediği ya da tanımlanamadığı gerçeğiyle engellenmiştir (Olcaşdu et al. 2009).

Son zamanlarda haplotipin aynı zamanda JAK2 ekzon 12 ve MPL mutasyonları riskini de arttırdığının keşfi fertile ground hipotezini hiper mutability hipotezinden daha fazla desteklemektedir. Yine de, haplotipin hastalık patogenezini etkileyen henüz tanımlanmamış fonksiyonel bir varyantla ilişki içinde olduğu olasılığı hala bulunmaktadır (Seaman et al. 2009).

## **2.8. JAK2 MUTASYONLARI ve ALLEL BURDEN KAVRAMI**

JAK2V617F mutasyonunun ve bu mutasyonun allel burden durumunun prognostik rolü çeşitli hücre ve hayvan modelleri olduğu gibi geniş hasta serilerini kullanan yoğun araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Yüksek allel burden varlığının, hücre-içi sinyal yollarının artmış aktivasyonunun temelinde olduğu ve PV'nin klinik fenotipiyle ilişkili olduğu konusunda bir konsensusa varılmıştır. Diğer taraftan miyelofibrozisteki düşük allel burden, sağkalımın azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Vannucchi 2011).

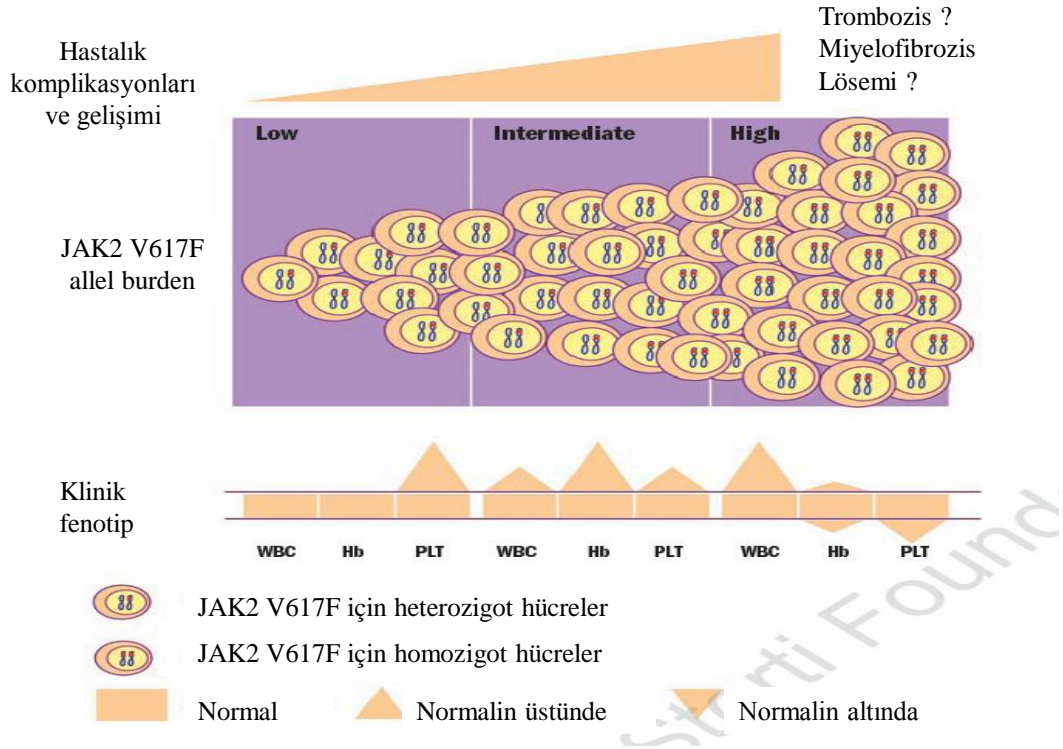
Mutasyonun keşfinden sonra en kafa karıştırıcı soru, tek bir mutasyonun nasıl en az üç farklı hastalığa sebep olduğudur (Passamonti et al. 2009).

Bu hipotezlerden biri, hastalık fenotipi ve JAK2V617F mutant allellerinin oranı yani hematopoetik hücrelerdeki yabancı tip, mutant oranı anlamına gelen *allel burden* kavramı arasındaki ilişkiyi öne sürmektedir (Passamonti et al. 2009).

JAK2 mutasyonu allel burden durumunun, downstream JAK/STAT sinyal yollarının aktivasyon seviyesi yoluyla hastalık fenotipini etkileyebileceği olasılığı birçok deneysel ve klinik gözlemlerle desteklenmiştir (Vannucchi et al. 2008, Passamonti et al. 2008).

JAK2V617F'yi çeşitli seviyelerde ifade eden transgenik fareler bu hipotezi desteklemektedir. JAK2V617F'nin düşük seviyeleri trombositozisle belirgin ET-benzeri

bir fenotipe sebep olurken, mutant allellerin daha yüksek seviyeleri PV-benzeri fenotipe neden olmaktadır (Passamonti et al. 2009).



**Şekil 2.7:** JAK2V617F mutasyonu ve allel burden ilişkisi (Passamonti, Rumi 2009).

Birçok çalışma, JAK2V617F allel burden durumunun MPN hastalarındaki klinik uç noktalarla ve hematolojik karakteristiklerle bağlantılı olduğunu göstermiştir (Vannucchi et al. 2008).

Bazı bakış açılarına göre; fenotip, normal ve mutasyonlu JAK2 mRNA arasındaki oranla yakın bir ilişki halindedir. Düşük oranda mutasyonlu JAK2 eksprese eden farelerin lökosit, hemogloblin ve trombositlerinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Bu da düşük JAK2V617F ekspresyonunun ET fenotipine, yüksek JAK2V617F ekspresyonunun ise PV fenotipine avantaj sağladığının bir göstergesidir (Tiedt et al. 2008).

Allel burden'ın ölçümü; tanı, tedavinin takibi ve minimal rezidüel hastalıkların tespiti için kritik öneme sahiptir (Tsiakalou et al. 2009).

JAK2 mutasyonları homozigot ya da heterozigot durumda bulunabilir. Literatür bulgularına göre, JAK2 mutasyonunun homozigotluğu 9. kromozomun kısa kolundaki mitotik rekombinasyondan meydana gelmektedir. Homozigotluk PV ve PMF hastalarında % 30 civarındayken, ET'li hastalarda daha nadirdir (% 2-4) (Veneri et al. 2009).

Sonuç olarak, 2008'de JAK2V617F alleli miyeloproliferatif neoplaziler için Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasında (WHO)'nün tanısal belirteçlerine dahil edildi. Bir analitik kimyacıya göre; zor olan insan genomik DNA'sındaki birçok normal allelin varlığı içinde JAK2V617F mutant allelin tespiti için duyarlı, sağlam ve pratik metotlar geliştirmektedir. Üstelik mutant allel burden'ın hesaplanmasında, prognostik önem ve tedavinin izlenmesinin yararlılığı ile miyeloproliferatif klonun büyüklüğünün tahminini sağlaması beklenmektedir (Tsiakalou et al.2009).

## **2.9. JAK2 MUTASYONLARININ SAPTANMASININ ÖNEMİ**

JAK2V617F mutasyonunun tespiti;

1-Polisitemia Vera (PV), Esansiyel Trombositemi (ET) ve Primer Miyelo Fibrozis (PMF) hastalıklarının ilk teşhisinde,

2-Mutasyonun durumundan dolayı hastalıkların prognozunda,

3-Kök hücre transplantasyonundan sonra hastaların izlenmesinde,

4-Tirozin Kinaz inhibitör tedavisinden potansiyel olarak yararlanabilecek hastaların seçiminde önemli rol oynamaktadır (Siebolts et al. 2010).

## **2.10. MPN'LER İÇİN HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ**

JAK2 inhibitörlerinin güvenli ve etkili olacağı, spesifik JAK2 kinaz aktivitesi inhibitörlerinin PMF'de faz I/II denemelerinde ve post-PV/ET miyelofibrozunda kliniklere gireceği konusunda en baştan beri umut vaad etmiştir ( Kilpivaara and Levine 2008).

Koloni deneyleri JAK2 inhibitörlerinin JAK2 ekzon 12 ya da MPL mutasyonlu hastalar için değerini ve JAK2-MPL negatif hastalardaki JAK2 inhibitör terapisinin PV, ET ve PMF'nin patogenezinin merkezinin JAK-STAT sinyalizasyonu olduğu hipotezinin direkt bir testine imkan verebileceğini göstermiştir ( Kilpivaara and Levine 2008).



Bu hastalıklarda JAK2 inhibitör geliştirmeye önemli bir ilgi olmasına rağmen, bu ajanların klinik arenaya girmesiyle ilgili önemli endişeler olduğunu akılda tutulması gerekmektedir. Bunlardan ilki, in vitro sistemler kullanılarak çalışılması gereken ancak JAK2 inhibitörleri ile tedavi edilen bazı hastaların direnç göstermeye meyilli olmalarıdır ( Kilpivaara and Levine 2008).

Üstelik, bu veri JAK2V617F-pozitif MPN’li hastalarda sıklıkla JAK2V617F-negatif akut miyeloid lösemi meydana geldiğini gösteriyor, bu da JAK2 inhibitör terapisinin lösemik transformasyon riskini arttırdığını gösteriyor.

JAK-STAT yolağı ruxolitinib (INCB018424), SAR302503 (TG101348), CYT387, lestaurtinib (CEP-701), SB1518, AZD1480, BMS911543, LY278544 ve XL019 gibi ATP-taklidi küçük molekül kinaz inhibitörleri ve panobinostat (LBH589), vorinostat (MK0683), givinostat (ITF2357) ve SB939 gibi histon deasetilazları içeren birçok ilaç grubu tarafından inhibe edilmektedir (Tefferi and Pardanani 2011).

#### **a)Ruxolitinib**

Ruxolitinib (INCB018424) bir JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 inhibitörüdür. İlacın JAK2, STAT5, ERK1/2 ve Akt fosforilasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Ruxolitinibin ayrıca PV’li hastalarda endojenlerin ve sitokin-destekli eritroid progenitörlerin gelişimini de inhibe ettiği gösterilmiştir (Tefferi and Pardanani 2011).

#### **b)SAR302503 (TG101348)**

SAR302503 (TG101348) bir JAK2/FLT3 inhibitördür. SAR302503 HEL (İnsan Eritrolösemi Hücreleri) ve murin Ba/F3 JAK2V617F hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. Bu hücrelerin SAR302503’e maruz kalmaları STAT5 fosforilasyonu konsantrasyonunu hücre proliferasyonunu inhibe edecek seviyeye düşürmektedir. SAR302503 hem HEL hem de Ba/F3 JAK2V617F hücrelerini doza bağlı olarak apoptoza yönlendirdiği gösterilmiştir (Tefferi and Pardanani 2011).

#### **c)CYT387**

CYT387 bir JAK1, JAK2 ve TYK2 inhibitörüdür. CYT387 bBa/F3-JAK2V617F ve HEL hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir. CYT387’nin JAK2V617F-pozitif PV

hastalarında eritroid koloni gelişimini baskıladığı gösterilmiştir (Tefferi and Pardanani 2011).

**d)Lestaurtinib**

HEL hücrelerinde, lestaurtinib JAK2V617F ve onun downstream hedefleri STAT5 ve STAT3'ün fosforilasyonunu inhibe etmektedir (Tefferi and Pardanani 2011).

**e)SB1518**

SB1518, hem yabancıl tip JAK2 hem de JAK2V617F'nin ve FLT3'ün güçlü bir inhibitörüdür. Bu ilaç JAK1 ve JAK3'e karşı daha az etkilidir. İlaç ayrıca STAT3 ve STAT5'in JAK2-aracılı fosforilasyonunu inhibe eder (Tefferi and Pardanani 2011).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. MATERYAL**

Retrospektif (geriye dönük) olarak 2001-2011 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda kemik iliği biyopsi ve yayma preparatları incelenen ve BCR ABL negatif MPN tanısı almış 12 ET, 14 PV ve 8 PMF, toplamda 34 vaka çalışmaya alınmıştır. Bu hastalara ait kemik iliğinde gözlenen morfolojik parametreler olan sellülarite, kemik iliği retikülin artışı varlığı ve derecesi ayrıca yeniden (0-3 derecelendirme sistemine göre) değerlendirilmiştir. Hastaların çalışmada incelenen biyopsilerinin alındığı zamanda yapılmış olan ve bu hastalık grubunda tanısal önemi olan klinik ve laboratuvar parametreler arasında bulunan; kan lökosit düzeyi, hemoglobin değeri, trombosit miktarı gibi özellikler ile splenomegali varlığı hastane bilgi sisteminden alınmıştır. Bu şekilde patoloji arşivinde anonimize edilen MPN tanılı hastalara ait kemik iliği yayma örneklerinden uygun olanları ve parafin doku örneklerinden yapılan kesitler DNA eldesi için kullanılmıştır.

#### **3.2. YÖNTEM**

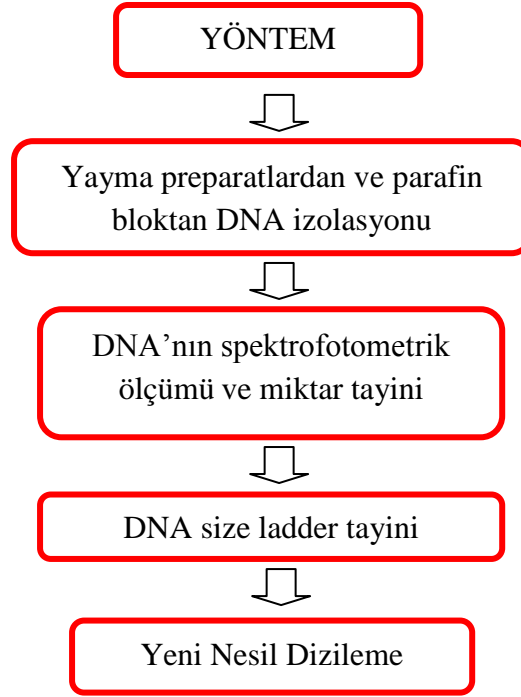
Bu tez çalışmasında, belirlenen olgulara ait kemik iliği aspirasyon yayma preparatları ve parafin bloklarından DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu DNA'lar üzerinde moleküler analizler yapılmıştır.

Moleküler yöntem olarak ilk önce seçilen örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen DNA'ların konsantrasyon analizi yapılmıştır. Bu aşamadan sonra ise elde edilen DNA'ların kalitesi Size Ladder PCR ile kontrol edilmiştir. Daha sonra JAK2 ve MPL mutasyonlarını saptamak amacıyla yeni nesil dizileme (pirosekanslama) yöntemi kullanılarak moleküler analiz gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.1.1. DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen örnekler Qiagen, QiaAmp DNA FFPE Tissue Kit (Katalog No: 56404) kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için aşağıdaki protokol izlenmiştir:

- 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınan 10 mg'dan az doku örneğinin üzerine 180 ul Buffer ATL ve 20 ul Proteinaz K eklenir. 15 saniye vortekslenir.
- Tüp çalkalamalı inkübatöre yerleştirilir ve 56<sup>0</sup>C'de gece boyu inkübe edilir.
- 90<sup>0</sup>C'de 1 saat inkübe edilir.
- 200 ul Buffer AL eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
- 200 ul soğuk absolut etanol eklenir. Dikkatlice karıştırılıp 15 saniye vortekslenir. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Spin yapılır.
- Lizat, membrana değmeden "QIAamp minElute Coloumn"a aktarılır. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 8000 rpm (6000g)'de 1 dakika santrifüj edilir. Kolon temiz tüpe aktarılır.
- Membrana değmeden 500 ul Buffer AW1 eklenir. 8000 rpm (6000g)'de 1 dakika santrifüj edilir. Kolon temiz tüpe aktarılır.
- Membrana değmeden 500 ul Buffer AW2 eklenir. 8000 rpm (6000g)'de 1 dakika santrifüj edilir. Collection tüpünün içindeki sıvı dökülür ve tekrar kolona yerleştirilir.
- Membranın tamamen kuruması için 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Membrana değmeden tam merkezine 20-100 ul Buffer ATE veya distile su eklenir.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 12 ve 13. basamaklar tekrarlanır. Kolonlar atılıp tüplerin kapakları kapatılır.



**Şekil 3.1:** Yöntemde iş akışı

### **3.2.1.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini**

Spektrofotometrik olarak DNA'nın saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. DNA 260 nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda, fenol ve diğer bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbanans vermektedir. Buna göre DNA'nın saflığı değerlendirilirken  $A_{260}/280$  ve  $A_{230}/280$  oranları dikkate alınmaktadır. Bu çalışmada da bu prensiplere uyularak DNA saflık ve miktar analizi yapılmıştır.

### **3.2.1.3. Kalite Kontrol (Size Ladder) PCR**

Kemik iliği yayma preparatlarından elde edilen DNA örneklerinin kalite tayini housekeeping genler için düzenlenmiş multiplex PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Size ladder PCR kitinin içerisinde 100, 200, 300,400 ve 600 baz çifti boyutlarında olan çeşitli house-keeping gen bölgelerini çoğaltmak için tasarlanmış primer çiftleri

bulunmaktadır. Size Ladder PCR için İn Vivo Scribe Specimen Control Size Ladder-Unlabeled (katalog no:2-096-0020) kiti kullanılmıştır.

<i>Malzeme</i>	<i>1 örnek için miktar</i>
Mix	45 ul
Thermostart Taq Polimeraz	0,25 ul
DNA	5 ul

**Tablo 3.1:**Kalite Kontrol PCR protokolü

### Amplifikasyon Programı

95 <sup>0</sup> C’de	7 dk	
95 <sup>0</sup> C’de	30 sn	} 35 döngü
60 <sup>0</sup> C ‘de	45 sn	
72 <sup>0</sup> C’de	90 sn	
72 <sup>0</sup> C’de	10 dk	
15 <sup>0</sup> C’de	bekletilir.	

### 3.2.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Size ladder PCR’ı yapılan DNA’ların PCR ürünlerinin kalite ve boyutunu kontrol etmek amacıyla Agaroz jel elektroforezinde yürütölüp görüntülenmiştir. Görüntüleme için Vilber Lourmat Doc Print görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

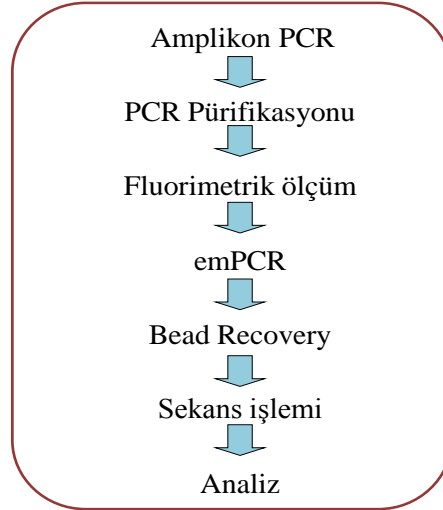
Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonların hazırlanışında aşağıdaki protokol izlenmiştir:

- Etidyum bromür son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde sulandırılır.100 ul DNA ladder’ın üzerine 240 ul 6X loading dye ve 660 ul ddH2O(duble distile su) eklenerek DNA ladder hazırlanır.

- 5X TBE (Tris-HCL (katalog no: 77-86-1), Borik Asit (katalog no: 10043-35-3), EDTA) hazırlanması için 54 g Tris Base, 27.5 g Borik asit ve 20 ml 0.5 M EDTA (katalog no: 6381-92-6) deiyonize su ile karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Hacmi 1000 ml'ye tamamlanır.
- 5X TBE'nin deiyonize su ile 1/5 oranında sulandırılması ile 1X TBE (Tris-HCL, Borik Asit, EDTA) hazırlanır.
- Agaroz; % 2'lik jel için 2g/100 ml olacak şekilde hassas terazide tartılır. Üzerine 100 ml 1X TBE eklenip mikrodalgada kaynatılarak agarozun çözünmesi sağlanır. Sıcaklığı 60-70 0C'ye düştükten sonra jel trayine dökülüp katılaşması için 30 dk beklenir.
- % 2'lik agaroz jel, elektroforez tankına yerleştirilir. 3 ul DNA ve 3 ul 6X loading dye ile karıştırılarak jelin kuyucuklarına yüklenir. Örnekler, 120 voltta 30 dakika yürütülür. Jel, UV görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğraflanır.

### 3.2.1.5. JAK2 ve MPL Mutasyon Analizleri

#### Yeni Nesil Dizileme

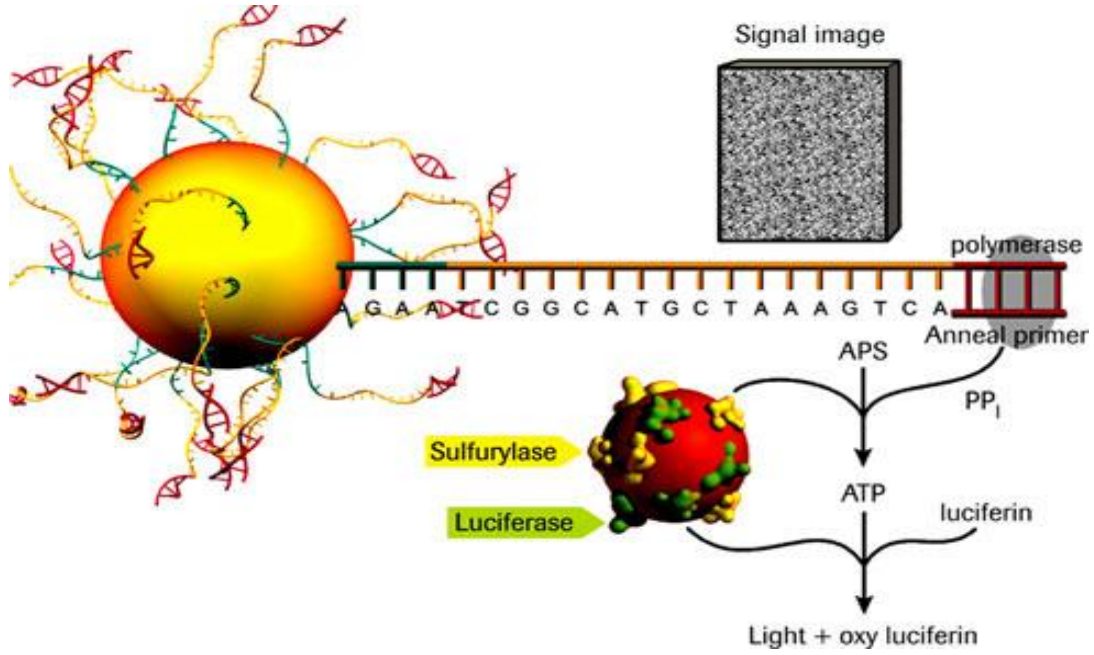


Şekil 3.2: Yeni nesil dizileme işlem sırası

JAK2 geni ekzon 12 ve 14 için, MPL geni ekzon 10 mutasyonlarının saptamak için yeni nesil dizileme tekniği kullanılmıştır. Bu teknik sentez esnasında dizileme esasına

dayanmaktadır. Dizileme reaksiyonu sırasında, kalıp DNA dizisine her nükleotit bağlanmasından sonra Apiraz enzimi ortamdaki diğer nükleotitleri uzaklaştırır. Nükleotitlerin takılmasıyla yapılan üretimden sonra DNA Polimeraz bir pirofosfat (PPi) açığa çıkarır. Sülfirilaz enzimi ise bu pirofosfatları ATP'ye dönüştürür. Üretilen her ATP Luciferaz enzimi tarafından kullanılır. Luciferaz her ATP'yi hidrolize eder ve oxy-luciferin ve luciferin substratından ışığa oluşturur.

Amplikon kütüphanelerinin hazırlığı, amplifikasyon ve sekanslama 2-4 gün süren bir çalışma gerektirmektedir. Bu işlemde klonlamaya gerek duyulmaz, çünkü emulsion PCR aşamasında benzer mantıkla amplifikasyon klonal olarak gerçekleştirilmektedir. Dizileme sırasında görüntünün eş zamanlı olarak takip edilebildiği bu sistemin okuma uzunluğu 400 baz-çiftidir. Hata oranının ise % 1-2 olduğu literatürdeki çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.



<http://454.com/products/technology.asp>

**Şekil 3.3:** Yeni nesil dizileme reaksiyonu

Yeni nesil dizileme aşamasında aşağıdaki işlemler uygulanmıştır;



## Amplikon PCR

Bu PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizilerinin başında anahtar dizi (TCAG) olarak adlandırılan bir dizi bulunmaktadır. Anahtar diziden sonra ise MID (Multiplex Identifiers) adı verilen barkod görevi yapan 15 ayrı örnek için 15 farklı diziye sahip bir oligonükleotit dizisi bulunmaktadır. Bu örneklerin barkodlanması olarak düşünülebilir, bu şekilde her örneğe kimlik kazandırılarak amplifikasyon tamamlanır. Bu barkodlama işleminin amacı amplikonların sekans aşamasında birbirleriyle kolayca ayırt edilerek okunmasını sağlamaktır.

Roche FastStart High Fidelity PCR Systems kiti (katalog no: 03 553 400 001) kullanılarak JAK2 ekzon 12, ekzon 14 ve MPL ekzon için ayrı PCR reaksiyonları hazırlanmıştır.

Master mix hazırlanır. Her örneğin her amplikonu için bir PCR reaksiyonu hazırlanmıştır.

Bu aşamada aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

<b>MPL Ekzon 10 Forward Primer</b>	
5'- <b>TCAG</b> - <b>MID</b> -CTCCTAGCCTGGATCTCCTTG-3'	
<b>MPL Ekzon 10 Reverse Primer</b>	
5'- <b>TCAG</b> - <b>MID</b> - CCTAGTCGCCGAGGTGAG-3'	
Amplikon Uzunluğu	345 baz çifti

Tablo 3.2: MPL ekzon 10 primer dizileri

<b>JAK2 Ekzon 12 Forward Primer</b>	
5'- <b>TCAG</b> - <b>MID</b> - CTCCTCTTTGGAGCAATTCA-3'	
<b>JAK2 Ekzon 12 Reverse Primer</b>	
5'- <b>TCAG</b> - <b>MID</b> - CC AAT GTC ACA TGAATG TAA ATC-3'	
Amplikon Uzunluğu	280 baz çifti

Tablo 3.3 :JAK2 Ekzon 12 primer dizileri

<b>JAK2 Ekzon 14 Forward Primer</b>	
5'- <b>TCAG</b> - <b>MID</b> - TGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGCAT-3'	
<b>JAK2 Ekzon 14 Reverse Primer</b>	
5'- <b>TCAG</b> - <b>MID</b> - TACAGTGTTTTTCAGTTTCAAAAA-3'	
Amplikon Uzunluğu	342 baz çifti

Tablo 3.4: JAK2 ekzon 14 primer dizileri

<i>Malzeme</i>	<i>Stok Konsantrasyon</i>	<i>1 örnek için miktar</i>	<i>Final Konsantrasyon</i>
<i>FastStart Buffer</i>	10X	5 ul	1X
<i>d NTP mix</i>	10 mM	1 ul	0.2 mM
<i>Forward primer</i>	10 pmol	2 ul	0.4 pmol
<i>Reverse primer</i>	10 pmol	2 ul	0.4 pmol
<i>FastStart HiFi Polimeraz</i>	5 U/ul	0.5 ul	0.05 U
<i>DNA</i>	25 ng/ul	2 ul	50 ng
<i>Moleküler Biyoloji Grade Su</i>	37.5 ul	37.5 ul	
<i>Toplam</i>		50 ul	

**Tablo 3.5:** JAK2 Ekzon 12 ve Ekzon 14 PCR Protokolü

<i>Malzeme</i>	<i>Stok Konsantrasyon</i>	<i>1 örnek için miktar</i>	<i>Final Konsantrasyon</i>
<i>MgCl<sub>2</sub> 'süz buffer</i>	10 X	5 ul	1X
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	25 mM	9 ul	4.5 mM
<i>d NTP</i>	10 mM	1 ul	0.2 mM
<i>Enzim</i>	5 U/ul	0.5 ul	0.02 U
<i>DNA</i>	25 ng/ul	4 ul	100 ng
<i>Primer (F+R)</i>	10 pmol	4 ul	0.8 pmol
<i>Su</i>		24 ul	
<i>DMSO</i>		2.5 ul	
<i>Toplam</i>		50 ul	

**Tablo 3.6:** MPL Ekzon 10 PCR Protokolü

Liyofilize halde sentezlenen primerler, son konsantrasyonları 100 pmol/μl olacak şekilde deiyonize su ile sulandırılır. Stok primerin 1/10 sulandırılması suretiyle 10 pmol/μl primer hazırlanır.

DNA örnekleri moleküler biyoloji grade su ile 25 ng/ul olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR master mix 24 ul olacak şekilde tüplere ya da plate'e dağıtılır ve her tüpe 1ul'e dilüe edilmiş DNA konur.

BİO-RAD C1000 Thermal cycler'da aşağıdaki protokollerle PCR yapılmıştır;

<i>Basamak</i>	<i>Döngü</i>	<i>Süre (dk)</i>	<i>Sıcaklık</i>
<i>Başlangıç denatürasyonu</i>	1	5:00	94 <sup>0</sup> C
<i>Denatürasyon</i>	35	0:45	94 <sup>0</sup> C
<i>Annealing</i>		0:45	58 <sup>0</sup> C
<i>Uzama</i>		0:45	72 <sup>0</sup> C
<i>Son uzama</i>	1	10:00	72 <sup>0</sup> C

**Tablo 3.7:** JAK2 Ekzon 12 PCR Programı

<i>Basamak</i>	<i>Döngü</i>	<i>Süre ( dk)</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Döngü</i>	<i>Süre (dk)</i>	<i>Sıcaklık</i>
<i>Başlangıç denatürasyonu</i>	1	5:00	95 <sup>0</sup> C	1	5:00	95 <sup>0</sup> C
<i>Denatürasyon</i>	10	0:30	95 <sup>0</sup> C	25	0:30	95 <sup>0</sup> C
<i>Annealing</i>		0:30	60 <sup>0</sup> C→55 <sup>0</sup> C		0:30	55 <sup>0</sup> C
<i>Uzama</i>		0:30	72 <sup>0</sup> C		0:30	72 <sup>0</sup> C
<i>Son uzama</i>				1	7:00	72 <sup>0</sup> C

**Tablo 3.8:** JAK2 Ekzon 14 PCR Programı

<i>Basamak</i>	<i>Döngü</i>	<i>Süre ( dk)</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Döngü</i>	<i>Süre (dk)</i>	<i>Sıcaklık</i>
<i>Başlangıç denatürasyonu</i>	1	10:00	95 <sup>0</sup> C	1	5:00	95 <sup>0</sup> C
<i>Denatürasyon</i>	10	0:30	95 <sup>0</sup> C	25	0:30	95 <sup>0</sup> C
<i>Annealing</i>		0:30	63 <sup>0</sup> C→58 <sup>0</sup> C		0:30	55 <sup>0</sup> C
<i>Uzama</i>		0:30	72 <sup>0</sup> C		0:30	72 <sup>0</sup> C
<i>Son uzama</i>				1	10:00	72 <sup>0</sup> C

**Tablo 3.9:**MPL Ekzon 10 PCR Programı

### PCR Pürifikasyonu

Pürifikasyon içerisinde manyetik beadler (boncuklar) bulunan Agencourt AMPure XP kiti (katalog no:A63880) ile yapılmıştır. PCR ürünlerinin bu manyetik beadlere bağlanması ile çeşitli yıkama aşamalarıyla saflaştırılması sağlanır.

PCR ürünlerinin pürifikasyonundan sonra Agilent 2100 Bioanalyzer sistemi ile pürifikasyonu yapılmış ampikon kütüphanelerinin boyut ve kalitesi kontrol edilmiştir. Bu sistemde bir cam çipin kanallarına jel doldurulduktan sonra çipin kuyularına örneklerin yüklenmesiyle elektroforezin gerçekleştiği bir sistemdir. Özelliği ise çok düşük oranda amplifikasyonun gerçekleştiği örnekleri bile hassasiyetle ölçmesidir.

### Pürifikasyon Sonrası Ölçüm

Kütüphane ölçümü Quant- İT PicoGreen dsDNA Assay Kit (katalog no:P7589) ve flourimetre kullanılarak yapılır. Öncelikle standart eğrinin oluşturulabilmesi için 1’den 8’e kadar numaralandırılmış olan tüplerde standartlar hazırlanır. Standart eğri oluşturarak örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

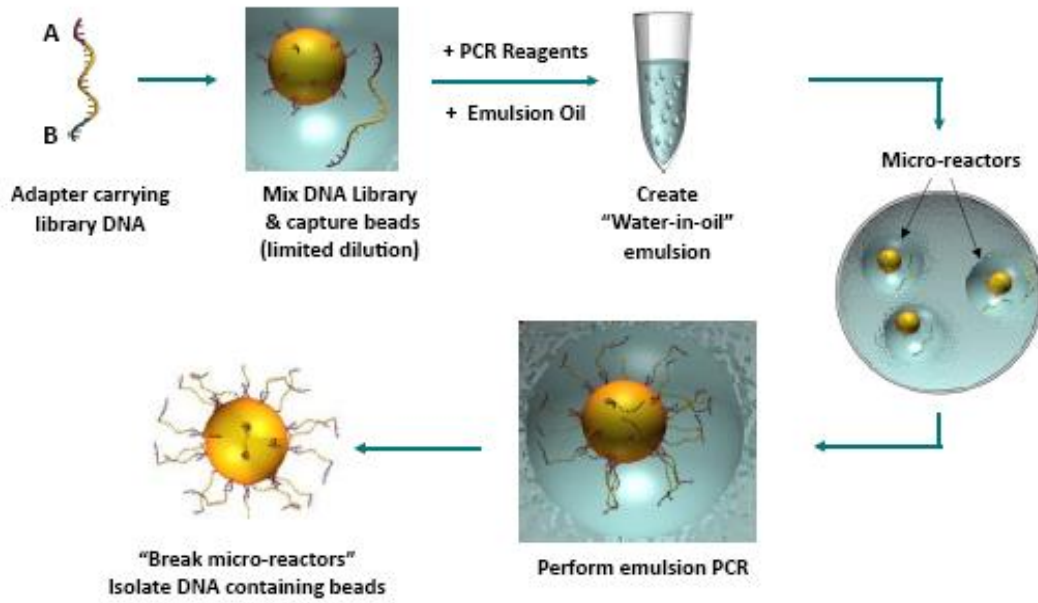
Burada tespit edilen konsantrasyon için molecule/ul ‘ye dönüştürecek excel üzerinde bir hesaplama yapılır.

Burada sonuç  $10^9$ 'dan daha büyük bir değer çıkarsa,  $10^9$ 'a dilüe edilir. Dilüsyon için aşağıdaki denklem kullanılır. Bu dilüsyonun amacı her ampikon örneğinden eşit oranda alınarak pool oluşturmaktır.

$$Z = \frac{\text{Molecule/ul}}{10^9} - 1$$

1ul örnek ile yukarıda denklemde hesaplanan  $Z$  ul kadar TE karıştırılıp  $1 \times 10^9$  molekül/bead 'e dönüştürülür. Daha sonra pool'un son konsantrasyonu  $1 \times 10^7$  olacak şekilde dilüsyon yapılır. Dilüe edilen örnekten 1/10 dilüsyon ile  $1 \times 10^6$  pool elde edilir.

### Emulsion PCR (emPCR)



[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)

**Şekil 3.4:** emPCR

Ampikon kütüphanelerinin ölçümü de yapıldıktan sonra emPCR adı verilen, yeni nesil dizileme yönteminin temelini oluşturan en önemli basamak gerçekleştirilir. Bu işlemde spesifik adaptörleri olan DNA'lar denatürasyonla tek zincir haline getirilir ve

amplifikasyon beadleri (boncukları) tarafından yakalanarak her fragment ayrı bir mikroreaktörün içinde olacak şekilde klonal olarak çoğaltılmış olur. Bu şekilde her amplikon kendini çoğaltma şansı elde ederek sekans aşamasında tek bir varyasyonun bile gözden kaçırılmasının önüne geçilmiş olur. Bu PCR’da emPCR kit (katalog no: 05 996 538 001) kullanılmıştır.

**EmPCR işlemi için aşağıdaki protokol takip edilmiştir;**

<i>Su</i>	235ul	235ul
<i>Additive</i>	260ul	260ul
<i>Amp. Mix</i>	135ul	135ul
<i>Amp Primer</i>	40ul (A)	40ul (B)
<i>Enzim karışımı</i>	35ul	35ul
<i>Pipiase</i>	1ul	1ul
<i>Toplam</i>	676 ul	676ul

**Tablo 3.10:** emPCR protokolü

Tablo3.11 deki program kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilir.

<b>94 C</b>	4dk	50 döngü
<b>94 C</b>	30sn	
<b>58 C</b>	4.5dk	
<b>68 C</b>	30 sn	
<b>10 C</b>	Hold	

**Tablo 3.11:** emPCR amplifikasyon programı

Her amplikonun ayrı mikroreaktörlerde amplifiye olduğu EmPCR sonrasında bu ürünler emPCR Oil and Breaking Kit ( katalog no: 05 996 511 001) ile toplanmaktadır, çeşitli yıkamalardan sonra diğer aşamalara hazır hale getirilmektedir. Bu geri kazanım aşamasında emPCR Kit Bead Recovery Reagents kiti (katalog no: 05 996 490 001) kullanılmıştır.

Üzerinde amplikon kütüphanlerinin bulunduğu DNA beadler, daha sonra enrichment beadler ile bağlanarak zenginleştirilirler ve ardından farklı yıkama aşamalarından geçirilirler. Daha sonra bu zenginleştirilmiş DNA beadler'e sekans primerleri bağlanır.

Bu aşamadan sonra elde edilen beadler bead counter ile ölçülürler ve 500 molekül/bead hattına indirilirler. Bu indirgemenin sebebi Picotiter Plate'in her kuyucuğuna tek bir amplifiye olmuş DNA bead'inin girmesini sağlamak ve her kuyucuktan tek bir dizinin okunmasını sağlamaktır. Bunun için 500 molekül/bead oranı ideal olarak belirlenmiştir.

**Bu aşamalardan sonra sekans çalışması için aşağıdaki protokol takip edilmiştir;**

Sekans çalışması için zenginleştirilmiş DNA beadleri ile birlikte farklı bead katmanları hazırlanarak (packing bead, enzim bead, pipiase bead) no: 05 996 619 001) Picotiter Plate'e yüklenir. Sekans işlemi Roche GS Junior 454 Sequencing cihazında gerçekleştirilmiştir. Sekans sonuçları değerlendirilirken JSI SeqPilot yazılımı kullanılmıştır.

<i>Bead katmanı</i>	<i>Bead Tipi</i>
<i>1.katman</i>	Enzim bead öncesi katman
<i>2.katman</i>	DNA+Packing bead
<i>3.katman</i>	Enzim bead sonrası katman
<i>4.katman</i>	Pipiase bead

**Tablo 3.12:** Bead Katmanları

### 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sürekli ve kesikli veriler ortalama±standart sapma, ortanca(minimum-maksimum) biçiminde, kategorik veriler ise frekans ve yüzdeler ile özetlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda uygun olarak “Mann Whitney U” testi, “Kruskal Wallis” testi ya da “Fisher’s Exact” testi kullanılmıştır. İki sürekli ya da kesikli değişken arasındaki korelasyona ise Spearman korelasyon katsayısı ile bakılmıştır. Bütün analizler için SPSS 15.0 for Windows paket programı kullanılmıştır. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4.ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1.DEMOGRAFİK BULGULAR

Hastaların yaş dağılımı 29-75 arasındadır, ortalama yaş 56 bulunmuştur. ET tanılı olguların yaş dağılımı 29-73 arasında değişirken, ortanca yaş 61.5 dur. PV tanılı olguların yaş dağılımı 35-72 arasında değişirken ortanca yaş 57'dir. PMF tanısı alanlarda ise olguların yaş dağılımı 30-75, yaş ortancası 51 bulunmuştur (Tablo 4.1). İstatistiksel olarak gruplar arasında yaş dağılımı bakımından anlamlı fark olmadığı görülmüştür ( $p=0.661$  Kruskal-Wallis).

Tanı	Yaş Ortalaması (±Standart sapma)	Ortanca (Max-Min)
ET (n=12)	56 (±14)	61.5 (29-73)
PV (n=14)	55 (±13)	57 (35-72)
PMF (n=8)	52 (±14)	51 (30-75)
P*	0,661	

**Tablo 4.1:** Tanı gruplarındaki hastaların yaş dağılımı. \* $P < 0,05$  (Kruskal-Wallis).

Hastaların cinsiyet dağılımı incelendiğinde; 34 olgunun % 44'ü (n=15) kadın, % 56'sı (n=19) ise erkektir. ET tanılı hastaların % 40'ı (n=6) kadın, % 31.6'sı (n=6) erkektir. PV Tanılı hastaların % 26.7'si (n=4) kadın, % 52.6'sı (n=10) erkektir. PMF tanılı hastaların % 33.3'ü (n=5) kadın, % 15.8 (n=3) erkektir. Tanı gruplarına göre cinsiyetin dağılımının istatistiksel olarak incelenmesinde anlamlı fark bulunmadığı görülmüştür ( $P=0.276$ , Fisher's Exact testi) (Tablo 4.2).



Cinsiyet	Tanı		
	ET N (%)	PV N (%)	PMF N (%)
<b>Kadın</b> n:15	6 (% 40)	4 (%26.7)	5 (%33.3)
<b>Erkek</b> n:19	6 (%31.6)	10 (%52.6)	3 (%15.8)
P*	0276		

**Tablo 4.2 :** Hastalık gruplarında cinsiyet dağılımı. \* $P \leq 0,05$ , Fisher's Exact testi

#### 4.2.KLİNİK, LABORATUVAR VE HİSTOPATOLOJİ BULGULARI

Hastalık tanılarında ve takibinde önemi olan laboratuvar bulguları incelendiğinde ET olgularında (n=12) kan lökosit değeri ortalaması 15/dl, PV olgularında (n=14) 16/dl, PMF olgularında ise (n=8) 15/dl olarak tespit edilmiştir. Ortalama hemoglobin değerleri ise ET (n=12) için 12 gr/dl, PV (n=14) için 15 gr/dl, PMF (n=8) için ise 10 gr/dl olarak gözlenmiştir. Ortalama trombosit miktarları ET (n=12) için 885/dl, PV (n=14) için 602/dl, PMF (n=8) için ise 394/dl olarak gözlenmiştir. PMF tanılı hastaların lökosit, trombosit ve hemoglobin değerleri PV ile ET ye göre daha düşük bulunmuştur. Trombosit miktarı beklendiği gibi ET tanılılarda diğerlerine göre yüksek bulunmuştur ( Tablo 4.3) .

Histopatolojik parametreler arasında bulunan ve tanı gruplarında farklılık gösterebilen kemik iliği hücre yoğunluğu olan sellülarite değerlendirildiğinde; tüm tanı gruplarında ortalama olarak % 85 ve üzerinde bulunmuştur. En yüksek sellülarite PV grubundaki hastalarda saptanmıştır ( ortalanca: 92.5; 80-100). En düşük sellülarite ET tanılı hastalarda ortalama % 85 (ortalanca 90; 60-100) bulunmuştur.

Bu değerlerin tanı gruplarındaki dağılımının anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak araştırıldığında hemoglobin (p=0,006) ve trombosit değerlerinin (p=0,014) tanı gruplarında dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p \leq 0,05$ , Kruskal Wallis) (Tablo 4.3).

Tanı		Lökosit ( $\pm$ SD)	Hemoglobin ( $\pm$ SD)	Trombosit ( $\pm$ SD)	Sellülarite (%)
ET (n:12)	Ortalama	15 ( $\pm$ 8)	12 ( $\pm$ 4)	885 ( $\pm$ 473)	85 ( $\pm$ 16)
	Ortanca (min-max)	12.3 (5.5-33.6)	12.6 (1.5-15.4)	825 (375-1972)	90 (60-100)
PV (n:14)	Ortalama	16 ( $\pm$ 9)	15 ( $\pm$ 3)	602 ( $\pm$ 240)	93 ( $\pm$ 7)
	Ortanca (min-max)	12.2 (5.9-35)	14.3 (9-18.3)	605 (231-1011)	92.5 (80-100)
PMF (n:8)	Ortalama	15 ( $\pm$ 18)	10 ( $\pm$ 3)	394 ( $\pm$ 526)	85 ( $\pm$ 25)
	Ortanca (min-max)	9.5 (1.1-56.8)	8.9 (7.1-16.4)	195 (30-1599)	95 (30-100)
P *		0.313	0.006	0.014	0.518

**Tablo 4.3:** Klinik ve patoloji parametrelerinin tanılara göre dağılımı. (\* $P \leq 0,05$  Kruskal Wallis)

Histopatolojik parametreler arasında bulunan ve bu grup hastalıkta hastalık ilerlemesiyle ortaya çıkan kemik iliği retikülin artışı oranının tanı gruplarındaki dağılımı incelendiğinde, ET ve PV tanılı hastalarda retikülin artışı derecelerinin düşük olduğu, buna karşılık PMF tanılı hastalarda ise retikülin artışı derecelerinin yüksek olduğu görülmüştür. ET olgularının (n=12) % 16.7'si (n=2) grade 0, % 50'si (n=6) grade 1, % 16.7'si (n=2) grade 2 ve % 16.7'si (n=2) grade 3 olarak tespit edilmiştir. PV olgularının (n=14) % 7.1'i (n=1) grade 0, % 64.3'ü (n=9) grade 1, % 21.4'ü (n=3) grade 2 ve % 7.1'i (n=1) grade 3 olarak tespit edilmiştir. PMF olgularının (n=8) % 12.5'i (n=1) grade 1, % 25'i (n=2) grade 2, % 62.5'i (n=5) grade 3 olarak tespit edilmiştir. Ancak bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ( $p=0.076$  Fisher's Exact testi) (Tablo 4.4)

Tanı	Retikülin			
	Grade 0 (%)	Grade 1 (%)	Grade 2 (%)	Grade 3 (%)
ET (n=12)	2 (% 16.7)	6 (% 50)	2 (% 16.7)	2 (% 16.7)
PV (n=14)	1 (% 7.1)	9 (% 64.3)	3 (% 21.4)	1 (% 7.1)
PMF (n=8)	0 (% 0)	1 (% 12.5)	2 (% 25)	5 (62.5)
P*	0.076			

**Tablo 4.4:** Hastalık gruplarında kemik iliği retikülin artışı derecelerinin dağılımı. (\* $p \leq 0,05$  Fisher's Exact testi).

Bu grup hastalarda hastalığın ilerlemesiyle ortaya çıkan splenomegali varlığının tanı gruplarında dağılımı incelendiğinde ET olgularının (n=12) % 41.7'sinde (n=5) splenomegali gözlenirken % 58.3'ünde (n=7) gözlenmemiştir. PV olgularının (n=14) % 69.2'sinde (n=9) splenomegali gözlenirken, % 30.8'inde (n=4) gözlenmemiştir. PMF olgularının (n=8) % 87.5'inde (n=7) splenomegali gözlenirken, % 12.5'inde (n=1) gözlenmemiştir. Tanı grupları arasında splenomegali görülme oranlarının dağılımı istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.1$  Fisher's Exact testi) (Tablo 4.5).

Tanı	Splenomegali	
	Var	Yok
ET (n=12)	5 (% 41.7)	7 (% 58.3)
PV (n=14)	9 (% 69.2)	4 (% 30.8)
PMF (n=8)	7 (% 87.5)	1 (% 12.5)
P*	0.100	

**Tablo 4.5:** Splenomagali varlığının tanı gruplarında dağılımı (\* $p \leq 0,05$  Fisher's Exact testi).

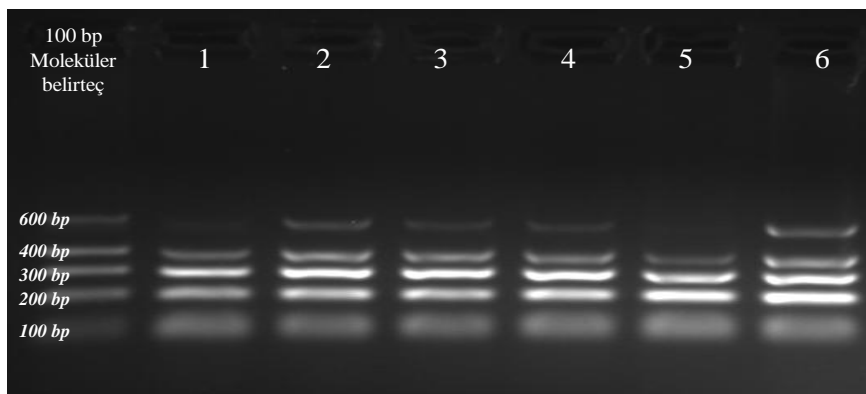
### 4.3. MOLEKÜLER BULGULAR

#### 4.3.1. DNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Analiz

Olgulardan, yöntem bölümünde ifade edildiği şekilde elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve kaliteleri spektrofotometrik analiz ve size ladder PCR ile değerlendirilmiş ve bu analizlerden elde edilen sonuçlara göre tüm DNA'ların mutasyon analizine uygun (5-20 ng/ul) konsantrasyon ve kalitede olduğu gözlenmiştir.

Size ladder PCR kitinin içerisinde 100, 200, 300, 400 ve 600 baz çifti boyutlarında olan çeşitli house-keeping gen bölgelerini çoğaltmak için tasarlanmış primer çiftleri bulunmaktadır. Bu şekilde örnek DNA'nın kalitesi, agaroz jel elektroforezinde 100 baz çiftlik merdiven ile birlikte yürütülerek size ladder PCR'ı sonucu 300–600 bç aralığında bulunmuş, hiçbir olguda 300 bç altında DNA parçalanması bulunmamıştır. Parafin dokulardan elde edilenlerde ise en uzun 600 bç en kısa 300 bç bulunmuştur. Bu şekilde hedef genlerimiz için PCR ve sekans başarısı tahmini ve DNA uygunluğu tahmin edilemeye çalışılmıştır.

Nanodrop sonuçlarına çok geniş bir aralığa sahipken (18-2396 ng/ul) en düşük olan konsantrasyon miktarı dahi çalışmamıza dahil olabilecek miktarda bulunmuştur. Örnekler arasındaki DNA konsantrasyon farklılıkları yayma preparatlarda bulunan kemik iliği hücre sayısının değişken olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.1: DNA kalite ölçümü amaçlı yapılan “size ladder” temsili agaroz jel fotoğrafı

Örnekler	ng/ul	A260/280
1	2396	1.8
2	69	2
3	18	3.2
4	78	2
5	25	2.2
6	24	4.2
7	425	1.8
8	20	1.9
9	71	1.9
10	29	2.3
11	28	2.6
12	30	2
13	150	1.9
14	24	2.4
15	32	2.3
16	80	2.1
17	35	2.4
18	911	1.9
19	427	1.9
20	35	2.2
21	177	1.7
22	23	2.4
23	783	1.8
24	36	1.9
25	75	2
26	105	1.9
27	175	1.8
28	798	1.8
29	252	1.8
30	26	3
31	1027	1.8
32	325	1.8
33	433	1.8
34	584	1.8

**Tablo 4.6:** İzole edilen DNA'lara ait spektrofotometre sonuçları

### 4.3.2. Mutasyon Analizi Sonuçları

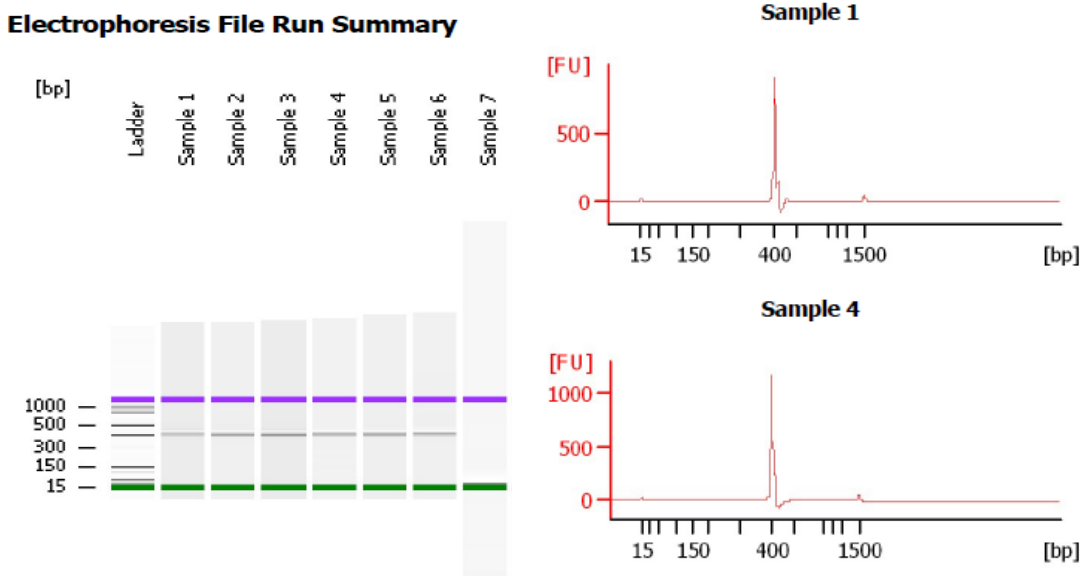
Amplikon PCR sırasında kullanılan primer dizilerinde anahtar diziden sonra ise MID (Multiplex Identifiers) adı verilen barkod görevi yapan 15 ayrı örnek için 15 farklı diziye sahip bir oligonükleotit dizisi bulunmaktadır. Bu şekilde her DNA örneğinin amplifikasyon ürünü birbirinden ayırt edilecek hale getirilmektedir. Bu işlemin sebebi, pürifikasyon sonrası yapılan ölçümün ardından bütün amplikonların tek bir havuz haline getirilerek diğer işlemlere devam edilecek olmasıdır. Bizim çalışmamızda kullanılan materyal kemik iliği aspirasyonu yayma preparatlarıydı. Biz çalışmamızda elimizde yayma preparatları bulunan 4 vakanın parafin bloklarını da dahil edip iki materyalin sonuçlarında nasıl bir farklılık olacağını gözlemlemeyi düşündük. Ancak parafin bloklardan elde edilen DNA'ların kaliteleri de iyi olmasına rağmen PCR aşamasında başarısız sonuç alınmıştır ve çalışmaya dahil edilememişlerdir.



**Şekil 4.2:** Amplikon PCR sonuçları temsili agaroz jel görüntüsü

Amplikon PCR ardından yapılan pürifikasyondan sonra elde edilen ürünün durumu, kaybedilip kaybedilmediği ve olası primer dimerlerden kurtulup kurtulamadığımızı anlamak için kullandığımız Agilent 2100 Bioanalyzer sistemi ile beklediğimiz şekilde

primer dimer oranının yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir. Ancak pürifikasyonda kaybettiğimiz ürünler de olmuştur ve bu örnekler çalışmaya dahil edilememiştir.



**Şekil 4.3:** Agilent Bioanalyzer sonuçları temsili görüntüsü

Pürifikasyon sonrasında yapılan flurimetrik ölçüm ile ürünlerin pürifikasyon sonrası konsantrasyonları ölçülmüş ve hepsinin eşit konsantrasyonda havuza katılacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır. Kaybedilen ürünler olduğu bu aşamada da gözlenmiştir.

Çalışmamızdaki 34 vaka örneğinin JAK2 ve MPL genlerinin toplamda 3 bölgesi için sekans aşaması üç koşulda tamamlanmıştır. Birinci koşulda toplamda 15.210.084 baz okunmuştur. Bizim ilgilendiğimiz 3 gen bölgesinin (JAK2 ekzon12 ve 14, MPL ekzon10) tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 46.210 olarak gözlenmiştir.

İkinci koşulda toplamda 22.455.501 baz okunmuştur. Bizim araştırdığımız 3 gen bölgesinin (JAK2 ekzon12 ve 14, MPL ekzon10) tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 73.257 olarak gözlenmiştir.

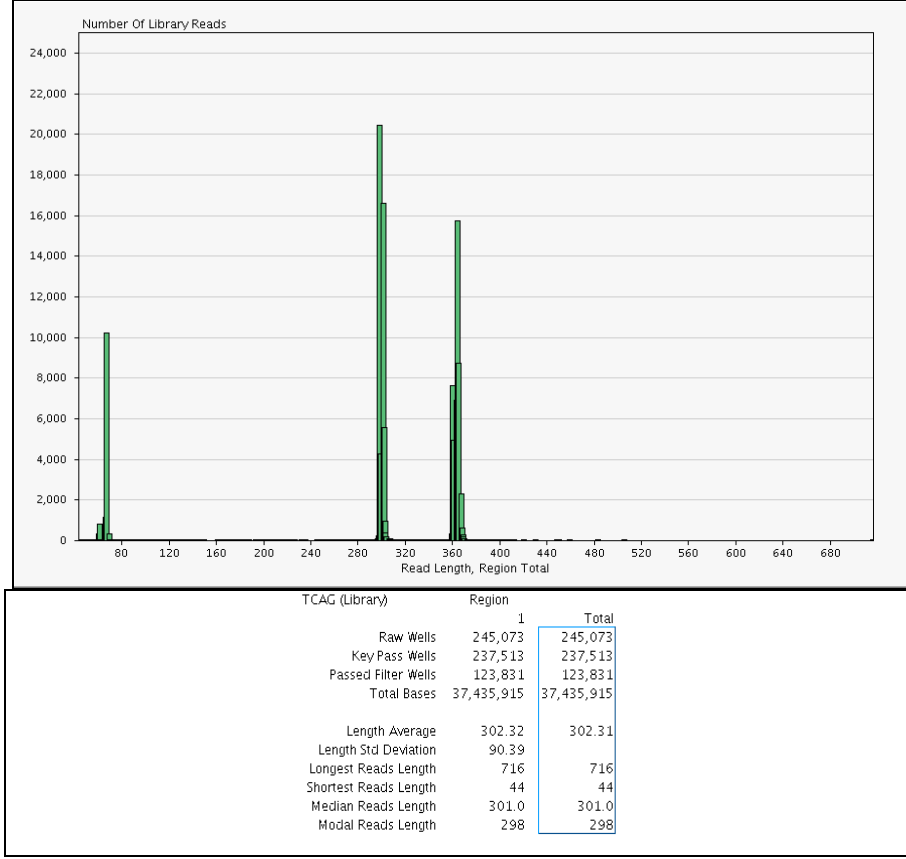
Üçüncü koşulda ise toplamda 37.435.915 baz okunmuştur. Bizim araştırdığımız 3 gen bölgesinin (JAK2 ekzon12 ve 14, MPL ekzon10) tamamının geçerli bir şekilde okunduğu fragman sayısı ise 123.831 olarak gözlenmiştir. Bir fragmanın kaç kere okunduğu

anlamına gelen “coverage”, birinci koşumda ortalama 500, ikinci koşumda bu sayı 700, üçüncü koşumda ise 1400 civarı olarak gözlenmiştir.

Örnek	JAK2 Ekzon 14 (ng/ul)	JAK2 Ekzon 12 (ng/ul)	MPL Ekzon 10 (ng/ul)
1	77.86	29.25	-
2	21.46	28.84	5.69
3	37.59	4.77	-
4	56.67	32.38	16.50
5	21.01	16.16	40.31
6	31.91	3.03	33.50
7	58.62	6.71	32.72
8	3.43	2.42	8.11
9	47.47	44.69	25.43
10	19.76	8.70	12.14
11	2.88	11.02	45.82
12	11.07	8.40	23.65
13	8.66	39.49	17.46
14	6.21	19.71	31.38
15	0	34.51	23.98
16	34.37	2.26	30.43
17	17.27	21.13	34.10
18	35.90	40.14	42.73
19	31.45	18.69	22.96
20	27.50	31.11	-
21	10.24	37.93	21.83
22	28.21	30.99	21.39
23	23.25	24.53	31.39
24	53.52	38.10	-
25	34.16	111.76	29.56
26	27.35	10.04	10.88
27	11.00	-	5.78
28	36.17	12.56	5.34
29	28.51	39.20	48.78
30	50.41	68.69	18.32
31	34.72	34.74	54.16
32	26.36	45.59	27.92
33	71.12	61.08	43.79
34	33.76	51.03	46.99

**Tablo 4.7:.**Pürifikasyon sonrası amplicon kütüphanelerinin picogreen ölçüm sonuçları





**Şekil 4.4:** Sekans sonuç temsili görüntüsü

Tüm olguların % 76.5'inde (n=26) JAK2 ekzon 14 V617F mutasyonu bulunduğu ve % 23.5 olgunun (n=8) yabancı tip olduğu saptanmıştır. JAK2 ekzon 12 mutasyonu hiç bir olguda saptanmamıştır. MPL ekzon 10 mutasyonu ise sadece bir olguda (% 2.9) saptanmıştır. JAK2 ekzon 14 bölgesinde mutasyon varlığı ve oranı istatistiksel olarak değerlendirilebilecek nitelikte olduğundan bu sonuçların dağılımı araştırılmıştır. MPL mutasyonu bulunan hastada aynı zamanda JAK2 V617F mutasyonu da mevcuttur. Bu hastada MPL mutasyonu da, JAK2 mutasyonu da izole edilen hücrelerin %31'inde bulunmuştur. Parafin bloklardan elde edilen DNA örnekleri ile çalışıldığında amplifikasyon aşamasında tüm örneklerde başarısız sonuç alınmıştır. Bu olgular için mutasyon incelemesi yaymalardan elde edilen DNA kullanılarak yapılmış, kalan 2 olgu çalışma dışı bırakılmıştır.

ET (n=12) olgularının % 75'inde (n=9) JAK2V617F mutasyonu bulunurken, %25'inin (n=3) yabancı tip olduğu saptanmıştır. PV (n=14) olgularının (n=11) %78.6'sında JAK2V617F mutasyonu saptanırken, (n=3) %21.4'ünün yabancı tip olduğu saptanmıştır. Sekiz PMF olgusunun (n=6) %75'inde JAK2V617F mutasyonu saptanırken, (n=2)

%25'inin yabancı tip olduğu saptanmıştır. JAK2V617F mutasyonu varlığının tanı grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir dağılımının olmadığı anlaşılmıştır (p= 1,00, Fisher's Exact) (Tablo 4.7).

Tanı	JAK2 V617F Mutasyonu	
	Yok	Var
ET (n=11)	3 (% 25)	9 (% 75)
PV(n=14)	3 (% 21.4)	11 (% 78.6)
PMF (n=8)	2 (% 25)	6 (% 75)
P*	1,00	

**Tablo 4.8:** Tanı gruplarına göre JAK2 V617F Mutasyonu dağılımı (\*p≤0,05 Fisher's Exact testi)

Mutant allellerin yabancı tip allellere oranı ve dolaylı olarak da mutasyon bulunduran hücrelerin tüm kemik iliği hücreleri arasındaki oranını ifade eden “allel burden” durumunun tanı grupları ve tüm demografik, klinik, laboratuvar ve patolojik parametreler ile karşılaştırılmıştır. Yaş, trombosit miktarları, hemoglobin değerleri ile “allel burden” durumunun istatistiksel anlamlı bir ilişki bulundurmadığı anlaşılmıştır. Buna karşılık histopatolojik parametrelerden sellülaritenin artışı ile allel burden oranının yüksek bulunuşu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır ( p= 0.050, Spearman kolerasyon katsayısı (Tablo 4.9 ) Lökosit artışı ile JAK2 allel burden durumu karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı bir dağılım bulunduğu saptanmıştır (p= 0.003, Spearman kolerasyon katsayısı).

Örnek	Tanı	JAK2V617F Allel burden (%)
1	ET	42
2	PV	7
3	PMF	27
4	PV	9
5	ET	43
6	PMF	31
7	ET	33
8	PV	17
9	ET	20
10	ET	36
11	PMF	75
12	PV	86
13	PMF	9
14	PV	7
15	PV	78
16	ET	80
17	PV	91
18	ET	98
19	ET	10
20	PMF	28
21	PV	79
22	PV	73
23	PMF	73
24	PMF	47
25	PV	35
26	ET	36

**Tablo 4.9:** Tanı gruplarının allel burden oranları

	Allel Burden (%)	
	Korelasyon katsayısı r	P*
Yaş	0.092	0.654
Lökosit	0.566	<b>0.003</b>
Hemoglobin	0.090	0.662
Trombosit	-0.157	0.444
Sellülarite	0.388	<b>0.050</b>
Retikülin	0.314	<b>0.118</b>

**Tablo 4.10:** Mutasyonlu hücre oranı “Allel Burden” ile yaş ve klinik, patolojik parametrelerin karşılaştırılması (p<0,05, Spearman korelasyon katsayısı)

JAK2V617F mutasyonunu allel burden oranının cinsiyet ile ilişkisi araştırılmış, kadınlarda (n=12) ortalama % 42 allel burden durumu saptanırken. erkeklerde (n=14) bu % 50 olarak bulunmuştur. Bu farklılığın istatistiksel anlamlı olmadığı bulunmuştur (p=0.527, Mann-Whitney U).

Allel burden oranı ortalaması ET olgularında (n=9) % 47, PV olgularında (n=10) % 48, PMF olgularında (n=7) ise % 41 olarak saptanmıştır. Tanı gruplarına göre allel burden oranında istatistiksel anlamlı bir dağılımının bulunmadığı saptanmamış (p=0.822, Kruskal Wallis).

Splenomegalisi olan olgularda (n=17) allel burden oranı ortalama % 54 iken, splenomegalisi olmayan olgularda (n=9) bu oran % 31 olarak saptanmıştır. Splenomegali varlığı ile allel burden oranı arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunmadığı saptanmıştır (p=0.100, Mann-Whitney U) (Tablo 4.10 ).

		Allel Burden % ortalama (SD)	Allel Burden (Min.-Max.)	P
<b>Cinsiyet (n)</b>	Kadın (n=12)	42 (±31)	32 (7-98)	0.527
	Erkek (n=14)	50 (±30)	51.5 (7-91)	
<b>Tanı (n)</b>	ET (n=9)	47 (±28)	42 (10-98)	0.822
	PV (n=10)	48 (±36)	54 (10-91)	
	PMF (n=7)	41 (±25)	31 (9-75)	
<b>Splenomegali (n)</b>	Var (n=17)	54 (±30)	18.5 (0-80)	0.100
	Yok (n=9)	31 (±23)	33 (7-80)	

**Tablo 4.11** :JAK2 mutasyonu Allel Burden durumu ile cinsiyet, tanı grupları ve splenomegali dağılımı. (\*P≤ 0,05 Mann-Whitney U).

Allel Burden (%)	Sellülarite		Retikülin	
Tanı	r	p	r	p
ET	0.668	<b>0.049</b>	0.299	0.435
PV	0.430	0.214	0.518	0.125
PMF	0.112	0.811	0.540	0.211

**Tablo 4.12:** Tanı gruplarında allel burden ve retikülin ilişkisi ve tanı gruplarında allel burden sellülarite ilişkisi

Her tanı grubunda allel burden ve retikülin ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p < 0,05$ , Spearman kolerasyon katsayısı). Her tanı grubunda allel burden ve sellülarite ilişkisine bakıldığında ise ET hariç istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. ET grubunda allel burden ve sellülarite arasında pozitif yönlü doğrusal bir ilişki olduğu saptanmıştır (Tablo 4.11) ( $p < 0,05$ , Spearman kolerasyon katsayısı).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada patoloji arşiv materyalinden elde edilen DNA örnekleri ile yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak JAK2 ekzon 12 ve ekzon 14 (JAK2V617F) ve MPL ekzon 10 (MPLW515L, MPLW515K, MPLA506T ve MPLA519T) mutasyonlarının araştırılması ve bu yöntemle patoloji arşiv materyallerinde yöntemin mutasyonlu hücre oranı hastalık prezentasyonu ilişkisinin tespitinde yeni nesil dizileme teknolojileri ile duyarlılığının saptanması yanında, hastalıkların evresi ile ilgili bilgi veren bazı morfolojik ve klinik, laboratuvar parametrelerin kemik iliğindeki hastalıklı hücre miktarını yansıtan mutant allel/ yabancı allel oranı (Allel Burden) ile ilişkili olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

BCR- ABL negatif MPN grubu ET, PV, PMF olarak tanımlanan hastalıklar kemik iliğinde klonal hematopoetik kök hücrelerin kontrolsüz çoğalması, bir ya da birkaç seriyi ilgilendiren artmış efektif hematopoez ile karakterli kronik seyirli neoplastik hastalıklardır. Bu kontrolsüz proliferasyonun kök hücre ya da progenitör hücre düzeyinde genetik anomaliler ile gerçekleştiği düşünülmektedir.

2005'te JAK2V617F'nin PV ve ET ile çok güçlü bir ilişki içinde oldukları keşfedilmesi ile bu hastalıkların patogenezi ve moleküler özellikleri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. JAK2V617F mutasyonu PV'de % 95, ET'de % 55 ve PMF'de % 65 oranında bildirilmektedir. MPL ekzon 10 mutasyonları ise ET ve PMF'li hastalarda % 3-15 mutasyon sıklıkla tespit edildiği bildirilmiştir. MPLW515L en sık görülen MPN ilişkili MPL mutasyonudur. Morfolojik özellikleri ile birbiri ile örtüşen MPN grubu hematolojik neoplastik hastalıklarda moleküler özelliklerin dağılımı ve hastalık prezentasyonu arasındaki ilişki bulunduğu konusunda hipotezler ileri sürülmektedir. JAK2 ve MPL mutasyonlarının homozigot ve heterozigot olup olmadığı, bu mutasyonları gösteren klonların oranı "allel burden" kavramının burada önemi bulunduğu ileri sürülmektedir.

İncelediğimiz hasta serisinde ET, PV, PMF tanı gruplarının yaş dağılımları genel olarak orta yaş grubunda görüldükleri şekilde literatür ile uyumlu bulunmuştur (Bain et al. 2010, Verstovsek and Tefferi 2010). ET tanı grubunda yaş ortalaması 56, PV tanı grubunda 55, PMF tanı grubunda ise yaş ortalaması 52 bulunmuştur. İncelediğimiz hasta serisinde yaş profili genel olarak literatür ile uyumlu bulunmaktadır. Hastalık gruplarına göre yaş dağılımının istatistiksel anlamlılık göstermemesi de beklenen bir durumdur (tablo 4.1)

Hastalıkların cinsiyete göre dağılımı serimizde literatürde de bildirildiği gibi PV grubu için erkek hakimiyetini bulundurmaktadır. Bizim serimizde de kaynaklarla uyumlu olarak ET grubunda her iki cinste de eşit dağılım bulunmuştur. PMF grubunda serimizde kadın hasta oranı erkeklerden daha fazladır. Kaynaklarda farklı serilerde ET ve PMF için değişik cinsiyet dağılımları bildirilmiştir. Bu iki grupta belli bir cinsiyete göre dağılımı özelliği bildirilmemesi nedeniyle verilerimiz literatürle uyumsuz değildir (Swerdlow et al. 2008).

Histopatolojik bulgular arasında bulunan ve bu grup hastalıkların morfolojik tanı özellikleri arasında bulunan kemik iliği sellülaritesi ve retikülin valığı açısından serimizdeki hastalar değerlendirildiğinde, Sellülarite serimizde ET grubunda literatürde belirtildiğinden (ortanca % 90) daha yüksektir. Ancak PV (ortanca % 92,5) ve PMF (ortanca % 95) gruplarıyla karşılaştırıldığında bunlara göre daha düşük bulunmuştur (Tablo 4.3). Bu hastalıklardan özellikle ET ve PMF için farklı klinik dönemlerinde farklı sellülaritenin görülebilmesi nedeniyle sellülarite değerleri diğer serilerde geniş bir spektrumda dağılım gösterebilmektedir (Bain et al. 2010). Serimizdeki bu durumda hastalık antitelerinin bu özelliğinden kaynaklanmış olduğu düşünülmüştür.

Kemik iliğinde hastalık seyriindeki ilerleme ile birlikte ET ve PV de son dönemlerde, PMF de ise genellikle daha erken dönemde saptanan retikülin fibrozis açısından hasta serimiz değerlendirildiğinde (Tablo 4.4), ET ve PV grubunda hastalık tanımları ile uygun olarak büyük çoğunlukta olgunun düşük derecede (grade 1) retikülin varlığı bulundurduğu gözlenmiştir. PMF hastalarının ise büyük çoğunluğunun (% 87,5) Grade 2 ve üzeri yüksek derecede retikülin bulundurduğu saptanmıştır. Bilindiği gibi son dönem hastalıkta bu hastalıkların tümünde klinik tablo birbiriyle örtüşebilen fibrotik görünümde olabilmektedir (Swerdlow et al. 2008). Serimizde retikülin değerinin tanı gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması hastalıkların tanı anında farklı evrelerde bulunması ile açıklanabilir.

Periferik kan bulguları değerlendirildiğinde kan hemogloblin düzeylerinin PV grubunda ve trombosit miktarının ET grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu görülmüştür (Tablo 4.3). Hemogloblin ve eritrosit artışının PV, trombosit artışının da ET için birincil tanısal özellikler arasında bulunması bu sonucun beklenen sebebidir. Buna rağmen PV grubunda saptanan en düşük Hemogloblin değerinin, ET grubunda ise saptanan en düşük trombosit değerinin tanısal kriterlerin altında olması seyrek olguda da olsa ilerlemiş hastalık profilinin varlığı ile açıklanabilir (Verstovsek and Tefferi 2010). PMF

grubunda kan değerlerinin en büyük aralıkta değişiklik göstermesi hastalığın diğerlerine göre daha hızla son dönem evreye gidiş bulundurması ve evre ile ilişkili olarak kan değerlerinde düşüş şeklinde değişikliklerin ortaya çıkması beklenmektedir.

Splenomegali bu hastalıklarda özellikle de ileri evrelerde artan ekstremedller hematopoezin belirtisi olarak kemik iliği retikülin artışı ile paralel artış göstermektedir (Swerdlow et al. 2008). Serimizde en fazla oranda PMF grubunda, ikinci sıklıkta PV ve en seyrek de ET grubunda splenomagali bulunması bu karakteristik beklenen özelliklerle uyum göstermektedir. Splenomegali görülmesi ile hastalık grupları arasında ilişki bulunmaması bu grup hastalıkların beklenen özelliklerindedir.

Klasik bilgiler arasında MPN grubu hastalıklardan % 95 gibi yüksek oranda PV hastalarında V617F bulunduğu şeklindeyir. Geçmişte yapılan pek çok çalışmada kullanılan yöntemlerin duyarlılığı, mutasyon bulunduran hücre oranı gibi pek çok nedenle değişken sonuçlar bildirilmiştir. Bu çalışmada incelenen olguların % 76.5'inde JAK2 V617F mutasyonu saptanmıştır. JAK2 V617F mutasyonunun tanı gruplarına dağılımının değerlendirilmesinde daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak PV de biraz daha yüksek (% 78,6) oranda, ancak ET ve PMF'de de % 75 gibi klasik bildirilen oranlardan yüksek oranda JAK2 V617F mutasyonu bulunmuştur ( Tablo 4.8).

Serimizde incelediğimiz hastalardan sadece bir ET tanılı hastada (% 2.9) MPLW515K mutasyonu saptanmıştır. MPL mutasyonu izole edilen hücrelerin % 31'inde, JAK2 mutasyonu da izole edilen hücrelerin yaklaşık % 31'inde bulunmuştur. Farklı zamanlarda yapılan bu amplifikasyonlarda aynı oranda MPLW515K ve JAK2 V617F mutasyonunun bulunması bu mutasyonu taşıyan hücrelerin aynı hücreler olduğunu kuvvetle desteklemektedir. Oysa daha önceki çalışmaların bir kısmında bu iki mutasyonun birlikte bulunmayacağı, genellikle JAK2 V617F olmayan hastalarda bulunduğu bildirilmiştir. İki mutasyonu birlikte taşıyanlarda oligoklon varlığı ile bu birlikteliğin açıklanabileceği bildirilmektedir (Verstovsek and Tefferi 2010). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda JAK2V617F ve MPL mutasyonlarının aynı anda MPN'li hastalarda olabileceğini göstermiştir (Beer et al. 2009). Bu gördüğümüz tek olgu verileri aynı klonda da iki farklı mutasyonun bulunabileceğini desteklemektedir.

JAK2 ekzon 12 mutasyonlarının ilk keşfedildiği zaman, sadece JAK2V617F mutasyonu taşımayan hastalarda bulunduğu belirtilmiştir (Swerdlow et al. 2008). Ancak, yakın bir



zamanda ender PV hastalarının hem JAK2 ekzon 12 hem de JAK2V617F mutasyonu taşıdığı bildirilmiştir (Swerdlow et al. 2008). Klonal analizler JAK2V617F mutasyonu ve JAK2 ekzon 12 mutasyonlarının bağımsız klonlarda meydana geldiğini ve bu iki mutasyonun muhtemelen hücre davranışında ve bir MPN'nin varlığını gösteren yatkınlık alleli üzerinde çakışan etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Li et al. 2008). JAK2 ekzon 12 mutasyonu 35 olgunun hiç birinde tespit edilmediğinden bu hasta serisinde bu konuda yorum yapmamız mümkün olamamıştır.

Ha ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 103 hastanın 73'ünde (%71.8) JAK2 V617F mutasyonu saptamışlardır. PV vakalarının % 95.5'inde, ET vakalarının % 68.8'inde, PMF vakalarının ise % 52.9'unda JAK2 V617F mutasyonu tespit etmişlerdir. PV ve PMF gruplarının içinde JAK2 V617F-pozitif, JAK2 V617F-negatif hastalarının klinikohematolojik verilerini kıyasladıklarında anlamlı bir farklılık saptamamışlardır. Bunun aksine JAK2 V617F-pozitif ET hastaları JAK2 V617F-negatif ET hastalarından daha yaşlı, daha yüksek nötrofil fraksiyonları, daha yüksek trombotik olay sıklığı ve daha yüksek miyelofibrozu oranları sergilediklerini göstermişlerdir (Ha et al. 2012).

Literatür bulgularına göre, JAK2 mutasyonunun homozigotluğu 9. kromozomun kısa kolundaki mitotik rekombinasyondan meydana gelmektedir. Homozigotluk PV ve PMF hastalarında % 30 civarındayken, ET'li hastalarda daha nadirdir (% 2-4) (Veneri et al. 2009).

*JAK2V617F* mutasyonu tanımlanıp MPN ile bağlantısı bulduktan sonra mutasyonunun tespiti rutin hale gelmiştir. Mutasyonun sadece varlığının tespit edilmesi değil aynı zamanda mutant allel /yabanıl tip allel oranının tespitinin de klinik tablo ile ilişkilendirilmesi mutasyon tespitinde kullanılan yöntemlerin hassasiyet ve doğruluk oranlarının büyük önem kazanmasına neden olmuştur.

Son zamanlarda JAK2 V617F mutasyonu allel burden durumuna, bu durumun hastalık fenotipine ve hastalık seyrine olan etkisine olan giderek artmıştır. Çalışmaların başlangıç noktası allel burden'ın klinik önemi ve bu allel burden'ı kantitatif analizlerle doğru olarak değerlendirilmesidir. (Passamonti and Rumi 2009).

Alvarez-Larran ve arkadaşları çalışmalarında, JAK2V617F allel burden oranının zaman içinde artıp artmadığını anlamak için tedavi almamış PV'li ve ET'li hastalarda ileriye dönük olarak allel burden oranlarını ölçmüşlerdir ve 46/1 haplotipin durumuna göre

kıyaslamışlardır. PV'li hastalarda allel burden oranının yılda 46/1 haplotip negatif olanlarda %1, heterozigot olanlarda % 0.8 ve homozigot olanlarda ise % 6 arttığını tespit etmişlerdir. ET'li hastalarda ise 46/1 haplotipinin allel burdena hiç bir etki yapmadığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak tedavi almamış 46/1 haplotipi için homozigot olan PV'li hastalarda allel burden oranında artış saptamışlardır (Alvarez-Larran et al. 2012).

Bu çalışmada allel burden'in cinsiyetlere göre dağılımında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Colaizzo ve arkadaşları da allel burden oranının kadınlarda ve erkeklerde benzer olduğunu gözlemlemişlerdir (Colaizzo et al. 2011).

Allel burden'in ölçülmesi JAK2V617F-pozitif klonun boyutunu değerlendirmek için gerekli olabilir. Çeşitli allel burden seviyelerinde JAK2 ekspresyonu olan fareler kullanılan bir çalışmada ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada düşük allel burden oranına sahip fareler ET-benzeri fenotip sergilerken yüksek allel burden oranına sahip fareler PV-benzeri fenotip sergilemiştir. Allel burden'in ölçülmesi ayrıca JAK2 inhibitörleriyle tedavi edilmiş hastaların takibinde de önem arz edebilecektir (Morishita et al. 2011).

Kuriakose ve arkadaşlarının çalışması ve diğer araştırmalar yüksek allel burden oranının (> 50 %) genelde daha şiddetli hastalık fenotipine neden olduğunu göstermişlerdir (Kuriakose et al 2012).

Shivarov ve arkadaşları, V617F allel burden oranının hesaplanmasının klinik öneme sahip olduğunu ileri sürmektedir. ET'nin PV ve PMF'ye kıyasla daha düşük allel burden ile ilişkili olması bunun bir göstergesidir (Shivarov et al 2011).

### **5.1. Yöntemin Değerlendirilmesi**

*JAK2V617F* mutasyonu tanımlanıp MPN ile bağlantısı bulunduktan sonra mutasyonunun tespiti rutin hale gelmiştir. Mutasyonun sadece varlığının tespit edilmesi değil aynı zamanda mutant allel /yabanıl tip allel oranının tespitinin de klinik tablo ile ilişkilendirilmesi mutasyon tespitinde kullanılan yöntemlerin hassasiyet ve doğruluk oranlarının büyük önem kazanmasına neden olmuştur.

Araştırıcılar								
Hastalıklar	Green	Vainchenker	Gilliland	Skoda	Cross	Zhao	Jelinek	Boyacıgil*
PV	% 97	% 88	% 74	% 65	% 81	% 83	% 86	<b>% 78.6</b>
ET	% 57	% 43	% 32	% 23	% 41		% 30	<b>% 75</b>
PMF	% 50	% 43	% 35	% 57	% 43		% 95	<b>% 75</b>

**Tablo 5.1:** JAK2 V617F mutasyonunun hastalıklardaki dağılım oranları (McLornan 2006).

Baxter ve arkadaşları periferik kandan elde ettikleri DNA örneklerini kullanarak dizileme, allel-spesifik PCR gibi yöntemler kullanarak PV'li hastaların % 97'sinde, ET'li hastaların % 57'sinde, PMF'li hastaların ise % 50'sinde JAK2V617F mutasyonu saptamışlardır (Baxter et al. 2005).

James ve arkadaşları kemik iliği ve kandan elde ettikleri DNA örnekleri üzerinde gerçekleştirilen western blot, sekanslama ve FISH yöntemleri ile PV'li hastaların % 88'inde, ET'li ve PMF'li hastaların % 43'ünde JAK2V617F mutasyonu saptamışlardır (James et al. 2005).

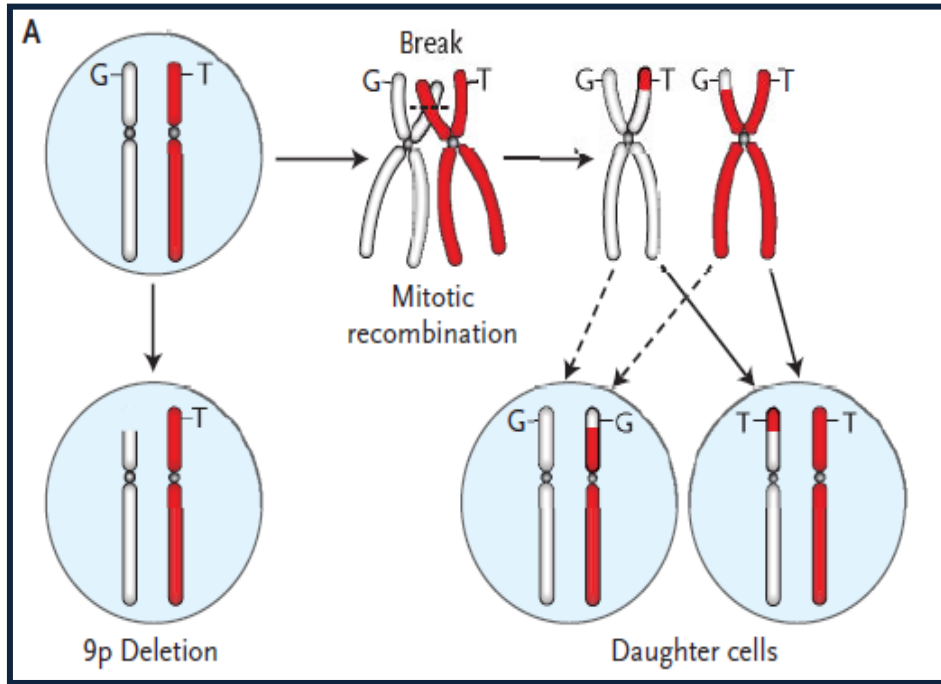
Levine ve arkadaşları yanak mukozası ve kan örneklerinden elde ettikleri DNA örneklerinde sekanslama, kantitatif PCR ve FISH metotları ile PV'li hastaların % 74'ünde, ET'li hastaların % 32'sinde, PMF'li hastaların ise % 35'inde JAK2V617F mutasyonu saptamışlardır (Levine et al. 2005).

Zhao ve arkadaşları periferik kandan elde edilen DNA'lar üzerinde yaptıkları sekans analizleriyle PV'li hastaların % 83'ünde JAK2V617F mutasyonu saptamışlardır (Zhao et al. 2005).

Jelinek ve arkadaşları periferik kan ve kemik iliğinden elde ettikleri DNA örnekleri üzerinde pirosekanslama yöntemini uygulayarak PV'li hastaların % 86'sında, ET'li hastaların % 30'unda, PMF'li hastaların ise % 95'inde JAK2V617F mutasyonu tespit etmişlerdir (Jelinek et al. 2005).

Levine ve arkadaşları 2005'te 164 PV hastasının granülositlerinden elde ettikleri DNA'ların sekans analizi sonucunda 80 (% 49) hastada heterozigot, 41 (% 25) hastada ise homozigot JAK2V617F mutasyonu tespit etmişlerdir. 115 ET hastasının 34'ünde (% 30) heterozigot, 3'ünde (% 3) ise homozigot JAK2V617F mutasyonu saptamışlardır (Levine et al. 2005).

Kralovics ve arkadaşları periferik kan ve yanak mukozasından elde ettikleri DNA'lar üzerinde yaptıkları çalışmada PV'li hastaların % 65'inde, ET'li hastaların % 23'ünde, PMF'li hastaların ise % 57'sinde JAK2V617F mutasyonu tespit etmişlerdir. 128'i PV, 93'ü ET ve 23'ü (IMF) tanısı almış 244 hastanın 51'inde mikrosatellit haritalama yöntemi ile homozigot JAK2V617F mutasyonunu içeren 9p LOH (9p heterozigotluk kaybı) tespit etmişlerdir. Heterozigotluk kaybının nedeni mitotik rekombinasyon olarak açıklanmıştır.



Şekil 5.1: 9p Heterozigotluk Kaybı (LOH) (Kralovics et al. 2005)

9p LOH'ı olmayan geriye kalan 193 hastanın 66'sında heterozigot JAK2V617F bulunurken, 127'sinde mutasyon saptanmamıştır.

PV hastalarındaki JAK2V617F mutasyon frekansı 128'de 83 yani % 65 olarak tespit edilmiştir. PMF hastalarında 23'te 13 yani % 57, ET hastalarında ise 93'te 21 yani % 23 olarak saptanmıştır (Kralovics et al. 2005).

Jones ve arkadaşları periferik kandan elde ettikleri DNA'lar ile yaptıkları çalışmada ARMS PCR ve pirosekanslama yöntemlerini kullanmışlardır. 72 PV hastasının 58'inde (% 81), 59 ET hastasının 24'ünde (% 41) ve 35 PMF hastasının 15'inde (% 43) JAK2V617F mutasyonu tespit etmişlerdir. V617F'nin homozigotluk oranı % 43 iken 9pLOH ile sıkı bir korelasyon içinde olduğu gözlenmiştir. ARMS (Amplification Refractory Mutation Systems) ve sekanslama birçok hastada mutant bantların yabancı-tip bantlardan daha güçlü olduğunu ve hatta bazı vakalarda yabancı-tip bandın neredeyse görülemediğini göstermiştir, bu da mutant klondaki mutasyonların homozigot olabileceğini düşündürmüştür. ARMS ve sekanslama sonuçları her zaman kantitatif olmadığı için, V617F mutasyonunun allel oranını güvenilir şekilde sağlama kapasitesine sahip bir pirosekanslama analiz tasarlamışlardır. DNA'sına ulaşılan 90 mutant örneğe pirosekanslama uygulanmıştır ve çoğu örneğin ARMS analizinden daha güçlü bantlarla homozigotlukları doğrulanmıştır. Bütün rezidüel yabancı-tip sinyallerin içinde 2 homozigot vaka pirosekanslama ile yakalanmıştır, bu durum pirosekanslamanın hassasiyetinin yaklaşık % 5 olduğunu göstermektedir. ARMS yöntemi ile % 100 yabancı genotipte bulunan örneklerin % 23'ünün pirosekanslama ile yabancı olduğu bulunmuştur (Jones et al. 2005). Bu bilgiler pirosekanslamanın burada güvenilirliğini ortaya koymaktadır.

Literatürde yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere kullanılan yöntemler ve materyallerin farklı olması mutasyon ile bu hastalık ilişkisi ve prezentasyonu arasında elde edilen bilgilerin yorumlanmasını güçleştirmektedir. Çalışmamızda kemik iliği örneğinin kullanılmış olması ve mutasyon oranlarının diğer çalışmalardan daha farklı dağılmasını açıklayan sebeplerden biridir. İkinci bir faktör de kullandığımız duyarlı yöntemdir.

Mutasyonun sadece varlığını tespit etmede kullanılabilen RFLP yöntemi kolay uygulanabilmesi ve özel ekipman gerektirmemesi nedeni ile pratik olmasına rağmen hem miktar tayinine imkan vermemesi hem de kısmi kesim sonucu hatalı pozitif sonuç verme olasılığı nedeni ile tercih edilmemektedir. Direkt Sekanslamanın hassasiyeti >20% civarındadır. Ancak protokol uzmanlık ve özel ekipman gerektirir. AS PCR (allel spesifik PCR) % 1-2 mutant allel yakalama hassasiyetine sahip, oldukça hassas bir yöntemdir. Rt

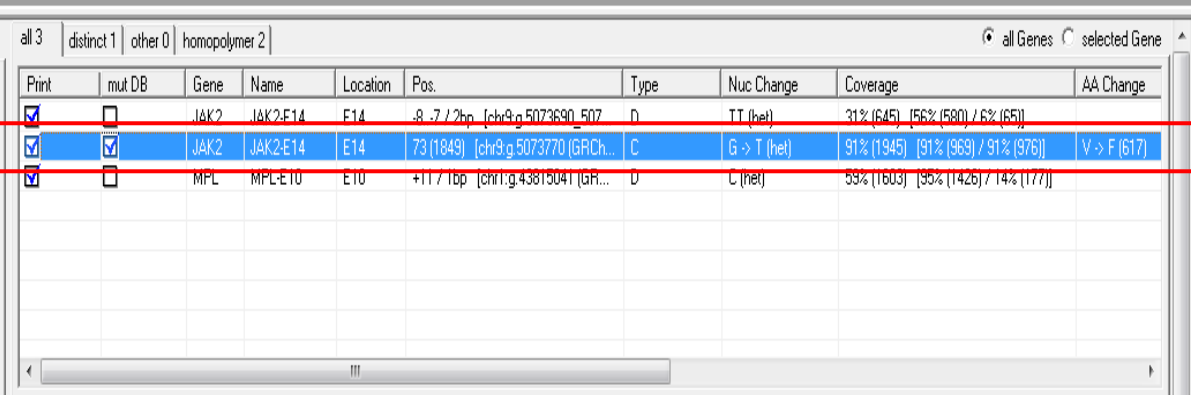
AS PCR ise % 0.5 hassasiyette sonuç verir ancak dikkatli bir primer ve prob dizaynı gerektirir. Oldukça hassas olan bu teknikte hatalı pozitif sonuç verilmemesi için CT cut off değerinin çok dikkatle belirlenmesi gerekir (Hujismans et al. 2011).

Amplification Refractory Mutation System PCR (ARMS-PCR) tek bir nükleotit farkı olan iki kalıbı ayırabilmektedir, ancak bu uzun oligonükleotidlerin non-spesifik hibridizasyonu sebebiyle bu metodun uygulanması güç ve yanlış pozitif sonuçlar olasılığı yükselmektedir (Siebolts et al. 2009).

Çok hassas teknikler kullanıldığında alınan düşük sinyalin gerçekten mutasyon olup olmadığının belirlenmesi hatalı pozitif sonuç açısından önemlidir. Farklı teknikler kullanıldığında, bunlardan birinde mutasyon tespit hassasiyetlerinin altında kalındığında sonuç negatif, doğrulandığı hassas tetkikte ise pozitif olduğunda, mutasyon tayininin yorumunda güçlük ortaya çıkmaktadır ( Kjaer et al. 2012). Bu nedenle sekans içeriği ile ilgili bilgi üretmeyen hassas yöntemlerin yerine kullanılacak altın standart olarak kabul edilen bir dizileme tekniği büyük önem kazanmaktadır. Sanger Sekanslama yıllardır mutasyon tespitinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntem %20'nin altındaki sekans varyantlarının tespitinde kullanılamamaktadır. PCR ürünlerinin klonlanmasını gerektiren minör varyant tespit teknikleri ise hem çok zaman alan pahalı uygulamalardır, hem de PCR kaynaklı hata payı içermeleri nedeni ile tercih edilmezler. Bu açıdan heterojen hücrelerin bir arada bulunduğu örnekler içerisinde daha az sayı ile temsil edilen hücrelerin dizilenmesi amaçlı sentez sırasında sekanslama teknolojisini kullanan yeni nesil sekanslama, sanger sekanslamaya önemli bir alternatif sunmaktadır. Bu yaklaşımda DNA fragmentleri mikro boyuttaki boncuklar (beadler) üzerinde yer alan adaptör diziler tarafından yakalanır. Her bir fragment kendine ait bead üzerinde bağımsız olarak kendini milyonlarca kez çoğaltır ve yine aynı bead üzerinde picotiter plate üzerinde bağımsız bir kuyucukta kendi sekansını temsil etme şansı yakalar. Bu nedenle kompleks bir örnek içerisindeki her varyantın sekansı daha yaygın varyantlar tarafından baskılanmadan kendini temsil edebilecek sayıya ulaşmış olur (Thomas 2006, Vandenbroucke 2011).

Kohlmann tarafından Roche 454 yeni nesil dizileme sisteminin mikrovaryantları tespit etmede ki gücünü araştırmak için yapılan bir çalışmada standart sanger sekanslamanın cut off değeri olarak kabul edilen % 10'un çok altında temsil edilen mikrovaryantların

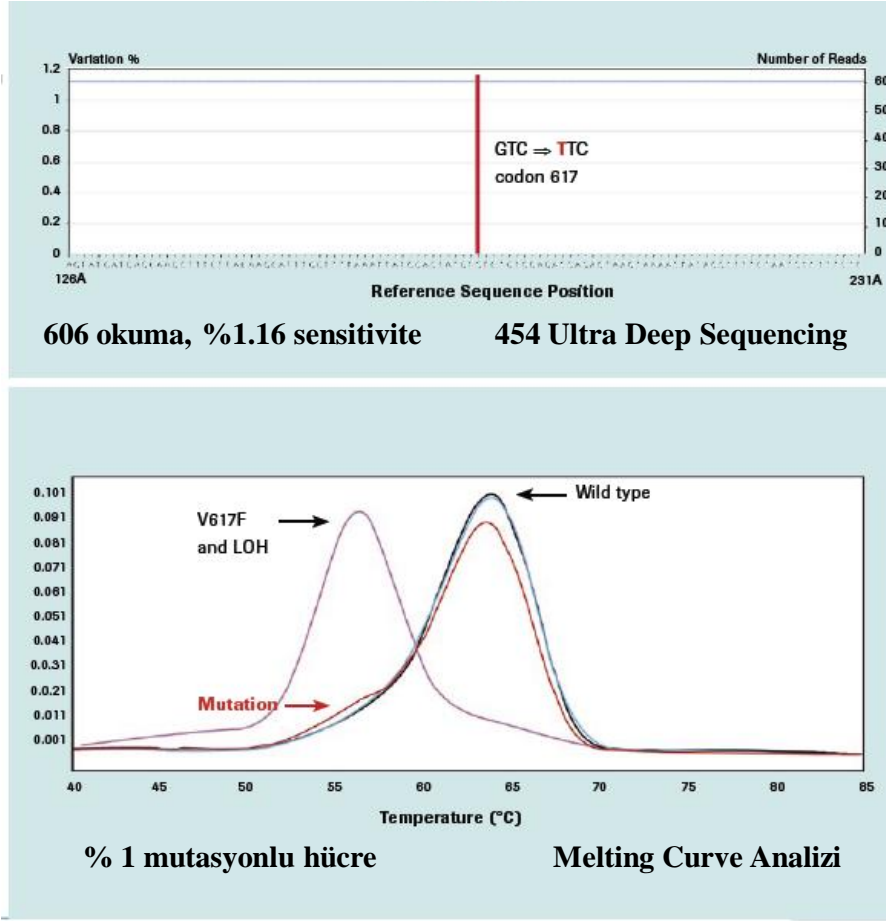
gösterilebileceğini ortaya koymuştur. Hatta şekilde gösterildiği gibi JAK2 V617F mutasyonu %1.16 hassasiyet ile tespit edilmiş ve bu bulgu melting curve analizi ile desteklenmiştir.



Print	mut DB	Gene	Name	Location	Pos.	Type	Nuc Change	Coverage	AA Change
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	JAK2	JAK2-E14	E14	-8..-7 / 2bp [chr9:g.5073690_507	D	TT (het)	31% (645) [56% (580) / 6% (65)]	
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	JAK2	JAK2-E14	E14	73 (1849) [chr9:g.5073770 (GRCh...	C	G > T (het)	91% (1945) [91% (969) / 91% (976)]	V > F (617)
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	MPL	MPL-E10	E10	+11 / 1bp [chr1:g.43613041 (GR...	D	C (het)	59% (1603) [95% (1426) / 14% (177)]	

**Şekil 5.2:** Allel burden forward/reverse dizi tutarlılık durumu

Bizim çalışmamızda JAK2V617F allel burden yüzdeleri hem forward hem de reverse dizilerde eşit oranda tespit edilmiştir (Şekil 5.2). Bu durum kullanmış olduğumuz yeni nesil dizileme sistemi olan Roche 454 sisteminin allel burden durumunu ölçmedeki güvenilirliğini göstermiştir.



Şekil 5.3 :Ultra deep sequencing duyarlılık seviyesi (Schnittger et al. 2006).

#### SONUÇ;

- 1- İncelediğimiz serimizde hastalıkların yaş ve cinsiyet dağılımları ile laboratuvar bulguları literatürde bildirilen ve hastalıkların evreleriyle ilişkili beklenen sınırlar içerisinde.
- 2- Tüm olguların % 76.5'inde JAK2 ekzon 14 V617F mutasyonu bulunduğu ve % 23.5 olgunun yabanıl tip olduğu saptanmıştır. JAK2 ekzon 12 mutasyonu hiç bir olguda saptanmamıştır. MPL ekzon 10 mutasyonu ise sadece 1 olguda (% 2.9) saptanmıştır.
- 3- ET ve PMF tanı gruplarında JAK2V617F mutasyonu ve yabanıl tip oranları klasik kaynaklarda bildirildiğinden daha yüksek oranda bulunmuştur. PV olgularında JAK2V617F mutasyonu ve yabanıl tip oranları klasik kaynaklarda bildirildiğinden



daha düşük oranda bulunmuştur. Bu farklılığın sebepleri arasında en önemlisi kullanılan materyal, yöntem ve daha az oranda hastalık evresiyle ilişkilidir.

- 4- Son yıllarda hastalık fenotipi, hastalık seyri ile hakkında bir fikir vermesi ve hatta tedaviye yön vermeye başlamış olan JAK2V617F-pozitif klonunun büyüklüğü anlamında kullanılan “Allel burden” oranı en düşük PMF olgularında, bunu izleyen oranda ET ve en yüksek PV olgularında bulunmuştur.
- 5- Bu çalışmada kemik iliğindeki tüm farklı klonları içeren materyallerde, yeni nesil dizileme teknolojisinin metot olarak tercih edilmesindeki en önemli avantajlarından biri olan allel burden durumunu yüksek hassasiyet oranı ile tespit edilebildiği görülmüştür.
- 6- Tüm olgular için kemik iliğinde sellülarite ve kan lökosit düzeylerinin artışı ile allel burden arasında pozitif yönlü doğrusal anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bu parametrelerin allel burden ile en paralel artış gösterdiği tanı grubu ET dir.

## 6. REFERANSLAR

Bain, BJ., Clark, DM., Wilkins, BS. 4th edition, 2010. Bone Marrow Pathology. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 640p, UK.

Baxter, JE., Scott, LM., Campbell, PJ., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, GS., Bench, AJ., Boyd, EM., Curtin, N., Scott, MA., Erber, WN., Green, AR. 2005. Acquired Mutation of the Tyrosine Kinase JAK2 in Human Myeloproliferative Disorders. *The Lancet* (365); 1054-1061.

Beer, PA., Jones, AV., Bench, AJ. Et al. 2009. Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *Br J Hematol*, (144); 904-908.

Berkofsky-Fessler, W., Buzzai, M., Kim, M., Fruchtman, S., Najfeld, V., Min, D., Costa, FF., Bischof JM., Soares, MB., McConell, MJ., Zhang, W., Levine, R., Gilliland, DG., Calegero, R., Licht, JD. 2010. Transcriptional Profiling Of Polycythemia Vera Identifies Gene Expression Patterns Both Dependent And Independent From The Action Of JAK2V617F. *Clin Cancer Res*.September 1; 16(17): 4339–4352.

Burjanivova, T., Marjinek, J., Lasabova, Z., Minarik, G., Szepe, P., Balharek, T., Vanochova, A., Polacek, H., Plank, L. 2009. A Novel JAK2 Exon 12 Mutation Identified in the Retrospective Analysis of Paraffin-embedded Tissues of Polycythemia Vera Patients. *Diagn Mol Pathol*,(18);108–111.

Campbell, PJ., Baxter, EJ., Beer, PA. et al. 2006. Mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformations. *Blood*, (108); 3548-3555.

Cankovic, M., Whiteley, L., Hawley, R., Zarbo, R., Chitale, D. 2009. Clinical Performance of JAK2 V617F Mutation Detection Assays in a Molecular Diagnostics Laboratory Evaluation of Screening and Quantitation Methods. *Am J Clin Pathol*, (132);713-721.

Er, T., Lin, S., Chang, J., Hsieh, L., Lin, S., Wang, L., Lin, CW., Chang, CS., Liu, TC. 2009. Detection of the JAK2 V617F missense mutation by high resolution melting analysis and its validation. *Clinica Chimica Acta*, ( 408); 39–44.

Fleischman, AG., Tyner, JW., 2012. JAK2 V617F Down-modulates MPL. *Blood*, Vol. 119 (20).

Gruppo Italiano Studio Policitemia. 1995. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients for 20 years. *Ann Intern Med*, (123); 656-664.

Guglielmelli, P., Pancrazzi, A., Bergamaschi, G., Rosti, V., Villani, L., Antonioli, E. et al. 2007. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol* (137); 244-247.

James, C., Ugo, V., Le Couedic, JP., Stoerk, J., Delhammeou, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslove, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, JL., Constantinescu, SN., Casadevall, N., Vainchenker, W. 2005. A Unique Clonal JAK2 Mutation Leading to Constitutive Signalling Causes Polycythemia Vera. *Nature*, (434); 1144-1148.

Jelinek, J., Oki, Y., Gharibyan, V., Bueaso-Ramos, C., Prchal, JT., Verstovsek, S., Benan, M., Estey, E., Kantarijan, HM., Isse, JPJ., 2005. JAK2 Mutation 1849 G>T is Rare In Acute Leukemias But Can Be Found in CMML, Philadelphia Chromosome-Negative CML, And Megakaryocytic Leukemia. *Blood*, (10); 3370-3373.

Jones, AV., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, C., Zhang, L., Score, J., Seear, R., Chase, AJ., Grand, FH., White, H., Zoi, C., Loukopoulos, D., Terpos, E., Vervessou, EC., Schultheis, B., Emig, M., Ernst, T., Lengfelder, E., Hehlmann, R., Hochhaus, A., Oscier, D., Silver, RT., Reiter, A., Cross, NCP. 2005. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, (106); 2162-2168.

Jones, AV., Chase, A., Silver, RT., et al. 2009. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics*, Vol.1, (4); 446-449.

Kaushansky, K. 2008. Historical Review : megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, (111); 981-986.

Kralovics, R., Stockton, DW., Prchal, JT. 2003. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the nearly pathogenesis of the disease. *Blood*, (108); 3793-3796.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, AS., Teo, SS., Tiedt, R., Passweg, JR., Tichelli, A., Cazzola, M., Skoda, RC. 2005. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*, (352); 1779-1790.

Kilpivaara, O., Levine, RL. 2008. JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms: Discovery and Science. *Leukemia*, (22); 1813-1817.

Klco, JM., Vij, R., Kreisel, FH., Hassan, A., Frater, JL. 2010. Molecular pathology of myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol*, (133); 602-615.

Lacronique, V., Boureux, A., Valle, VD. et al. 1997. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*, (278); 1309-1312.

Landgren, O., Goldin, LR., Kristinsson, SY., Helgadóttir, EA., Samuelsson, J., Björkholm, M. 2008. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*, (112);2199-2211.

Levine, RL., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, BL., Wernig, G., Huntly, BJP., Boggon, TJ., Wlodarska, I., Clark, JJ., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, JC., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Fröhling, S., Döhner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, RA., Tefferi, A., Griffin, JD., Eck, MJ., Sellers, WR., Meyerson, M., Golub, TR., Lee, SJ., Gilliland, DG. 2005. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in

polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, Vol. 7. (4); 387-397.

Li, S., Kralovics, R., De Libero, G., Theocharides, A., Gisslinger, H., Skoda, RC. 2008. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon 12 and JAK2-V617F mutations. *Blood*, (111); 3863-3866.

McLornan, D., Percy, M., McMullin, MF. 2006. *JAK2 V617F*: A Single Mutation in the Myeloproliferative Group of Disorders. *Ulster Med J*,75(2); 112-119.

Mullighan, CG., Morin, R., Zhang, J. et al. 2009. Next generation transcriptomic resequencing identifies novel genetic alterations in High-Risk (HR) childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): a report from the Children's Oncology Group (COG) HR ALL TARGET Project. *Blood*, 114(22): 704.

Murphy, S. 1997. Therapeutic dilemmas:balancing the risks of bleeding, thrombosis and leukemic transformation in myeloproliferative disorders (MPD). *Thromb Haemost*, (78); 622-626.

Olcaydu, D., Harutyunyan, A., Jager, R. et al. 2009. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Natur Genetics*, (41); 450-454.

Pardanani, AD., Levine, RL., Lasho, T. et al. 2006. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*, (108); 3472-3476.

Pardanani, A., Lasho, TL., Finke, CM., Gangat, N., Wolanskyj, AP., Hanson, CA., Tefferi, A. 2010. The JAK2 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of JAK2V617F mutational status-clinical correlates in a study of 226 consecutive patients. *Leukemia*, 24(1); 110-114.

Passamonti, F., Rumi, E. 2009. Clinical relevance of *JAK2* (V617F) mutant allele burden. *Haematologica*, 94(1).

Passamonti, F., Maffioli, M., Caramazza, D., Cazzola, M. 2011. Myeloproliferative Neoplasms: From JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. *Oncotarget*, Vol.2. (6); 485-490.

Peeters, P., Raynaud, SD., Cools, J. et al. 1997. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*, (90); 2535-2540.

Schnittger, S., Bacher, U., Kern, W., Schröder, M., Haferlach, T., Schoch, C. 2006. *Leukemia*, (20); 2195-2197.

Scott, LM., Tong, W., Levine, RL., et al. 2007. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, (356); 459-468.

Seaman, V., Jumaan, A., Yanni, E., et al. 2009. Use of molecular testing to identify a cluster of patients with polycythemia vera in eastern Pennsylvania. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, (18); 534-540.

Siebolts, U., Lange, T., Niederwieser, D., Wickenhauser, C. 2010. Allele-specific wild-type blocker quantitative PCR for highly sensitive detection of rare JAK2 p.V617F point mutation in primary myelofibrosis as an appropriate tool for the monitoring of molecular remission following therapy. *J Clin Pathol*, (63); 370-372.

Swerdlow, SH., Campo, E., Harris, NL., Jatte, ES., Pileri, SA., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, JW. 4th edition, 2008. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue (IARC). WHO, 441p, USA.

Tefferi, A. 2008. The History of Myeloproliferative Disorders: Before and After Dameshek. *Leukemia*, (22); 3-13.

Tefferi A. 2010. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 24, 1128–1138.

Tefferi, A., Pardanani, A. 2011. JAK Inhibitors in Myeloproliferative Neoplasms: Rationale, Current Data and Perspective. *Blood Reviews*, (25); 229-237.

Theocharides, A., Boissinot, M., Girodon, F. et al. 2007. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood*, (110); 375-379.

Thiele, J., Kvasnicka, HM., Orazi, A., Tefferi, A., Gisslinger, H. 2008. Essential thrombocythaemia. In: Swerdlow, SH., Campo, E., Harris, NL. et al. 2008. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. (4th. Ed.) IARC : Lyon, France. pp; 48-50.

Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M.A., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J. et al. 2008. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*, (111); 3931-3940.

Tsiakalou, V., Petropoulou, M., Ionnou, P., Christopoulos, T., Kanavakis, E., Anagnostopoulos, N., Savvidou, I., Traeger, Synodinos, J., 2009. Bioluminometric Assay for Relative Quantification of Mutant Allele Burden: Application to the Oncogenic Somatic Point Mutation JAK2 V617F. *Anal. Chem.*, (81); 8596–8602.

Türk Hematoloji Derneği. 2011.Ulusal Tedavi Kılavuzu 2011 BCR-ABL Negatif Klasik Kronik Miyeloproliferatif neoplaziler <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/69/bolum-ii-bcr-abl-negatif-klasik-kronik-miyeloproliferatif-neoplaziler.pdf>, 2012.

Vakil, E., Tefferi, A. 2011. BCR-ABL1-Negative Myeloproliferative Neoplasms: A Review of Molecular Biology, Diagnosis and Treatment. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, Vol. 11 (No.S1); 37-45.

Vannucchi, AM. and Guglielmelli, P. 2008. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations. *Haematologica*, (93); 972-976.

Vannucchi, AM., Pieri, L., Guglielmelli, P. 2011. JAK2 allele burden in the myeloproliferative neoplasms: effects on phenotype, prognosis and change with treatment. *Ther Adv Hematol*, 2(1); 21-32.

Vardiman, JW., Thiele, J., Arber, DA., Brunning, RD., Borowitz, MJ., Porwit, A., Harris, NL., Le Beau, MM., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., Boomfield, CD. 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, (114); 937-951.

Varicchio, L., Mancini, A., Migliaccio, AR. 2009. Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis. *Expert Rev Hematol*, (2); 315-334.

Veneri, D., Capuzzo, E., Matteis, G., Franchini, M., Baritono, E., Benati, M., Solero, GP., Ambrosetti, A., Quaresmini, G., Pizzolo, G. 2009. Comparison of JAK2V617F mutation assessment employing different molecular diagnostic techniques. *Blood Transfus*, (7); 204-9.

Verstovsek, S., Tefferi, A. 2010. *Myeloproliferative Neoplasms Biology and Therapy*. Humana Press, 237, USA.

Vladareanu, AM., Müller-Tidow, C., Bumbea, H., Radesi, S. 2010. Molecular Markers Guide Diagnosis and Treatment in Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Disorders. *Oncology Reports*, (23); 595-604.

Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, SB., Zhao, ZJ. 2005. Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera. *The Journal of Biological Chemistry*, (24); 22788-22792.

