

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Yrd.Doç.Dr. HİLMİ TOZKIR

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HEMATOLOJİ BİLİM DALINA BAŞVURAN
HASTALARDA JAK 2 GENİ NOKTA MUTASYONU VE
HASTALIK İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLEREK
FENOTİP-GENOTİP İLİŞKİSİNİN KURULMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Bio. Sefa ÇETİNKAYA

Referans no: 426309

EDİRNE-2012

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Yrd.Doç.Dr. HİLMİ TOZKIR

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HEMATOLOJİ BİLİM DALINA BAŞVURAN
HASTALARDA JAK 2 GENİ NOKTA MUTASYONU VE
HASTALIK İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLEREK
FENOTİP-GENOTİP İLİŞKİSİNİN KURULMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Bio. Sefa ÇETİNKAYA

Tez No:

EDİRNE-2012

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Yrd. Doç. Dr Hilmi TOZKIR danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Bio. Sefa ÇETİNKAYA tarafından tez başlığı “Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalına Başvuran Hastalarda Jak 2 Geni Nokta Mutasyonu Ve Hastalık İlişkisinin Değerlendirilerek Fenotip-Genotip İlişkisinin Kurulması” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **08/03/2012** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.



Ünvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI
Doç. Dr. Necdet SÜT



Ünvanı Adı Soyadı
ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Funda S. PALA



Ünvanı Adı Soyadı
ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜRLER

Çalışmamın her aşamasında bana verdikleri destekten ve gösterdikleri sabırdan dolayı danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR, T.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. Başkanı Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA, Tıbbi Genetik A.D. Başkanı Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim A.D. Başkanı Doç.Dr. Necdet SÜT, Hematoloji A.D. Başkanı Prof.Dr. Muzaffer DEMİR'e, Tıbbi Biyoloji A.D. Araş. Gör. Dr. Kıymet TABAKÇIOĞLU'na, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına ve değerli arkadaşlarım Bio. Öğrt. Ayten Doğan, Bio. Damla EKER ve Bio. Selin TAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bio. Sefa ÇETİNKAYA

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
RESEPTÖR KİNAZLARIN YAPISI	3
STAT.....	7
JAK/STAT SİNYAL İLETİM.....	12
STAT DNA BAĞLANMA BÖLGELERİ	14
NONRESEPTÖR TİROZİN KİNAZ DÜZENLENMESİ.....	15
JAK2V617F MUTASYONU.....	18
KÖK HÜCRE BİYOLOJİSİ VE V617F HOMOZİGOTLUĞU	19
MİYELOPROLİFERATİF HASTALIKLAR.....	20
GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	35
BULGULAR	37
TARTIŞMA.....	42
SONUÇLAR.....	47
ÖZET	49
SUMMARY	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ	67
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AML	: Acute Miyeloid Leukemia (Akut Miyeloid Lösemi)
CPTK	: Cytoplasmic Protein Tyrosine Kinase (Sitoplazmik Protein Tirozin Kinaz)
EGF	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
EGFR	: Epidermal Growth Factor Reseptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
EPO	: Eritropoetin
ET	: Esansiyel Trombositemi
ET	: Esansiyel Trombositoz
FGF	: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
FGFR	: Fibroblast Growth Factor Receptor (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü)
MPL	: Trombopoetin reseptör
GAS	: Gamma Activated Site (Gamma Aktive edici Alanlar)
G-CSF	: Granulocyte Coloni Stimulating Factor (Granülosit Koloni Stimülan Faktör)
GM-CSF	: Granulocyte-Monocyte Coloni Stimulating Factor (Granülosit-Monosit Koloni Stimülan Faktör)

HCT	: Hematokrit
Hg	: Hemoglobin
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
İSRE	: IFN Stimulating Regülatory Factor (IFN Uyarıcı yanıt elemanları)
İMF	: İdiyopatik Miyelofibroz
JAK	: Janus Kinaz
JH	: JAK Homoloji domaini
KML	: Chronic Myeloid Leukemia (Kronik Miyeloid Lösemi)
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
MPH	: Miyeloproliferatif Hastalık
NRTK	: Non-Reseptör Tyrosine Kinase (Reseptör olmayan Tirozin Kinaz)
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor (Trombosit Türevi Büyüme Faktörü)
PDGFR	: Platelet Derived Growth Factor Receptor (Trombosit Türevi Büyüme Faktörü Reseptörü)
PIAS	: Protein İnhibitors of Signal Transducer (Aktive STAT'ların Protein İnhibitörleri Ailesi)
Plt	: Trombosit
PV	: Polisitemia Vera
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SOCS	: Suppressor of Cytokine Signaling (Sitokin Sinyal Supresör Ailesi)

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription (Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörleri)

SUMO : Small Ubiquitin-Related Modifier (Küçük Ubikitin Bağlı Düzenleyici Proteinler)

TPO : Trombopoetin

Tyk 2 : Tirozin kinaz 2

WBC : White Blood Cell (Beyaz Kan Hücresi)

WHO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü, DSÖ)

GİRİŞ VE AMAÇ

Miyeloproliferatif hastalıklar (MPH) farklılaşma ve olgunlaşma kusuru olmayan hematopoetik kök hücre hastalıklarıdır. Bu hastalıkların klinikte temel özelliği olgun ve fonksiyonları kaybolmamış kan hücrelerinin aşırı üretimidir (1,2).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre; kronik myeloid lösemi (KML), polisitemia vera (PV), idiyopatik miyelofibroz (İMF) ve esansiyel trombositoz (ET) MPH grubunda bulunan hastalıklardır. William Damashek bu tanımlamayı patolojik benzerliklerin olduğunu ifade etmek için kullanmıştır. Tanımlamadan sonra bu hastalıkların miyeloid lenfoid hücre serilerini kapsayan birbirleriyle ilişkili hastalıklar olduğu fark edilmiştir (3, 4). KML'nin patalojisine philadelphia (Ph) kromozomunu meydana getiren t(9;22) translokasyonunun neden olduğu bulunduktan sonra diğerlerinden farklı olarak üç hastalık (ET, PV, İMF) bcr/abl negatif kronik MPH'lar olarak sınıflandırılmıştır (5,6).

Reseptör olmayan tirozin kinazlardan JAK familyasının, sitokin reseptörlerinin sitoplazmik domaini ile kovalent olmayan ilişkisi vardır. Ligand reseptöre bağlandığı zaman aktive olan JAK, STAT molekülleri için bağlanma yeri yapar. Aktive olan JAK, STAT dimerizasyonuna yol açarak STAT'ların spesifik genlerin transkripsiyonu için nukleusa geçmesine neden olmaktadır (7).

JAK2 (sitoplazmik tirozin kinaz) granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), granülosit stimüle faktör (G-CSF), interlökin-3 (IL-3), trombopoietin (TpoR) ve eritropoietin (EpoR) reseptörleri tarafından interaselüler sinyallerin teşviki için önemli rol oynamaktadır (8,9).

JAK2 geninin 14.eksonu, 1849. nükleotidindeki G-T değişimi JAK2 proteinin 617.pozisyonundaki valin ile fenialanin yer değiştirmesine neden (V617F) olmaktadır. Bu değişim JAK kinazda negatif regülas-yondan sorumlu olan psödokinaz bölgesinde gerçekteşmektedir. Böylelikle JAK-STAT sinyal yolağındaki negatif geri bildirim mekanizmasının bozulmasıyla kontrolsüz çoğalım görölür. (10).

Yapılan dikkatli analizler sonucu PV hastalarının %95'inde, ET ve İMF hastalarının %50-60'ında JAK2 mutasyonu tespit edilmiştir (11).

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte bilimdeki olanakların artması aynı grupta incelenen hastalıkların günümüzde keskin sınırlarla ayrılmasına neden olmaktadır. Her geçen gün bu sayı daha da artmaktadır. Bu artış ile birlikte tanı kriterleri net bir şekilde kullanıldığı zaman hastalıkların erken tanısı ve tedavisi mümkün olacaktır.

Dolayısıyla tanı kriterlerinin belirli standartlar içerisinde olması zorunlu hale gelmiştir. Çalışmamız bu standartın gerekliliğine temas etmekle birlikte JAK2V617F mutasyon varlığının olgularda fenotip-genotip ilişkisi ile miyeloproliferatif hastalıkların ayırıcı tanısındaki öneminin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

RESEPTÖR KİNAZLARIN YAPISI

Hücrede ekstrasellüler ve intrasellüler sinyal ileti sistemlerinde polipeptid moleküllerinin hücre yüzeyi reseptörleri tarafından algılanması sonucu oluşan tirozin kinaz aktivitesi önemlidir. Çünkü tirozin kinaz aktivitesi, hücre içinde bir çok sinyal yolağını aktive ederek hücre büyümesine, farklılaşmasına, hücre göçlerine ve metabolik değişikliklere yol açar (12). Hücre içi farklılaşma ve proliferasyon (çoğalma), interferonlar (IFN), interleokin (IL)'ler ve koloni uyarıcı olarak bilinen bir grup polipeptid yapılı sitokinler tarafından kontrol edilir. Bu nedenle sinyal yolağının aktive olması için polipeptid yapıların, reseptörlerine bağlanması gerekir. Membran reseptörleri sınıflandırmaya dayalı olarak farklı gruplara ayrılmıştır. Bu ayrım, biyolojik yanıtlar ve daha çok birincil yapılarına (ligand bağlanmadan önce) göre yapılmıştır. Bu reseptörler tirozin kinaz aktivitesi göstererek gerekli gen ekspresyonunu sağlamak için sinyal yolaklarını aktive eder (13,14). Böylece hücre metabolizmasında önemli rol ya da roller alırlar. (15)

Tirozin kinaz aktivitesini protein kinaz (PK) adı verilen enzim sağlar. Protein kinazlar protein fosforilasyonunu sağlayan enzimlerdir. Protein kinazların aktivasyonunu, proteinin defosforilasyonunu gerçekleştirerek yapan enzim grubu da protein fosfotazlardır (PP). Hücrelerde bu iki enzim grubu antagonize çalışarak sinyal iletiminde rol alırlar. Bu enzimlerin herhangi bir nedenle görevini yerine getirememesi hücre metabolizmasında aksaklıklara neden olmaktadır (16).

Regülasyonu sağlayan bu iki enzim grubu katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan amino asite göre) tirozin ve serin/treonin olarak kategorize edilir. Bu kategorizasyon membran yerleşimli ve sitoplazma yerleşimli olarak ikiye ayrılır. Membran boyunca yerleşim gösteren; polipeptid ligand bağlayan bir ekstra sellüler kısım (Reseptör Tirozin Kinaz (RTK)) bir transmembran heliks, tirozin kinaz katalitik aktivitesine bağlı bir sitoplazmik (Protein Tirozin Kinaz (PTK), (CPTK)) kısımdan oluşur (17,18,19,20,21)

RTK'lar CPTK'ların aktivasyonundan sorumludurlar. RTK ailesi içinde 58 transmembran protein bulunmaktadır (19). Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGF), trombosit türevi büyüme faktörü reseptörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü, sinir büyüme faktörü reseptörü gibi çeşitli domain varyasyonlarına sahip üyeler içermektedir. (12,13,14,19).

CPTK'lar reseptör olmayan tirozin kinaz (NRTK) olarak da adlandırılır. Bu ailede Src (proto onkojenik tirozin kinaz), Janus Kinaz (Jak), Abl (reseptör olmayan tirozin kinaz) ve fokal adezyon kinaz (FAK) bulunmaktadır (22).

Janus Kinaz'ın Karakteristik Yapısal Özellikleri

Janus Kinaz (JAK) tirozin gen ailesinin yeni üyesidir. Memelilerde JAK ailesinin JAK1, JAK2, JAK3 ve Tirozin kinaz 2 (Tyk2) olmak üzere 4 üyesi bulunmaktadır. İnsanlarda, Tyk2 geni kromozom üzerinde 19p13.1, JAK3 geni 19p13.2, JAK2 ve JAK1 geni ise sırasıyla 9p24 ve 1p31.3'dedir (23). Şekil 1'de JAK2'nin 9. kromozom üzerindeki konumu görülmektedir.



Şekil 1. JAK2'nin 9.kromozom üzerindeki konumu (13)

JAK'ın üç boyutlu yapısı tam olarak çözümlenememiştir. 120-140 kDa'luk molekül ağırlığına sahiptirler ve 11.000'den fazla amino asit içerirler. Amino ucundan karboksil ucuna kadar 7 JAK homoloji domaini (JH) isimlendirilmiştir (25).

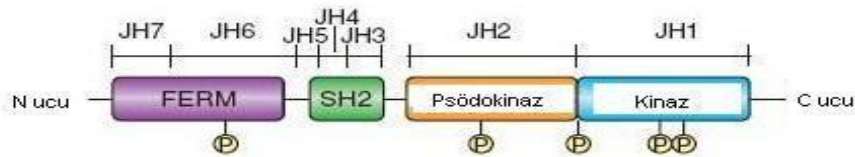
Karbon (C) ucunda kinaz aktivite gösteren alan ile ona bitişik psödokinaz alan vardır. Bu iki alan arasında yüksek derecede dizi benzerliği tespit edilmiştir. Kinaz (JH1) -C ucu- etki alanına bitişik psödokinaz (JH2) alanı katalitik yönden inaktif olmasına rağmen JH1 domainin katalitik etkisini düzenler (25). Bu domainlerin varlığı nedeniyle Roma'da kapıların ve başlangıçların tanrısı olan iki suratlı Janus'dan esinlenilerek bu ismi almışlardır (Şekil 2.) (26,27,28).



Şekil 2. Roma Tanrısı Janus (29)

NRTK'ların yapısında bulunan ve protein-protein etkileşimleriyle ilgili olan Src homoloji 2 (SH2) ve 3 (SH3) domainlerinin birinin etkinliği diğerinin etkinliği ile belirlenir (30). JAK'lar fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamış bir SH2 alanına sahiptir (31).

JAK'ların amino terminalinde, JH3 ve JH4 (SH2 alanında) domain vardır. Bunlara ek olarak FERM (4.1, ezrin, radixin ve moesin) homoloji domainleri -N ucu- bulunmaktadır. Bunlar JH6 ve JH7 olarak isimlendirilmiştir. FERM 300 aminoasitlik bir dizi içerir. JAK'ların sitokin reseptörleri ve diğer kinazlar ile olan ilişkilerinde rol alır (31). Şekil 3'de JAK2 homoloji alanları gösterilmiştir.



Şekil 3. JAK2 homoloji alanları ve yapısal gösterimi (25)

Janus Kinaz Bölgeleri

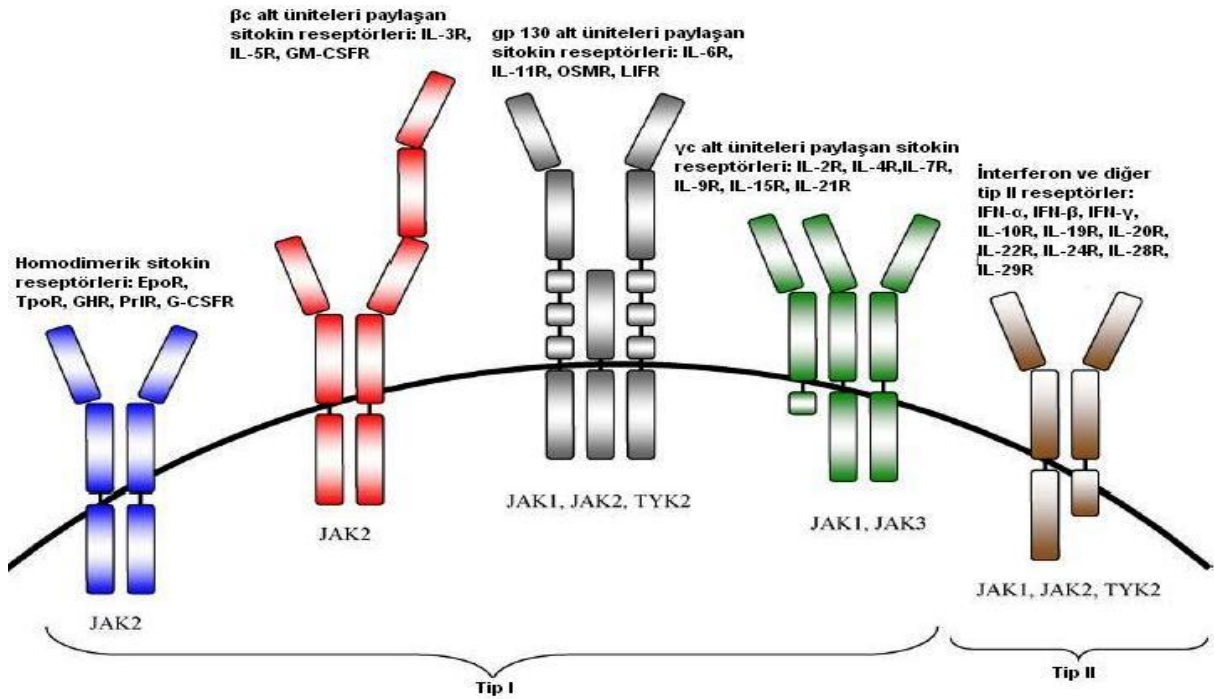
N-Terminal Bölge: Bu bölge 550 amino asit içerir. Bölgenin içerdiği amino asit sayısı JAK üyeleri arasında farklılıklar gösterir. N-terminal bölge reseptör bağlanmasından sorumludur. (9,32). IFN- γ reseptörü için JAK 1’de tüm N- terminal uç gereklidir (33). Yapısal modellemelerle JH3-JH4 bölgelerinin SH2 bölgesiyle bazı benzerlikler gösterdiği ve JH4-JH7 bölgesinde protein-protein etkileşimini sağlayan FERM bölgesinin JH4-JH7 ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (34).

Psödökinaz Bölge: Psödökinaz bölgesinin varlığı JAK’ları diğer protein kinazlardan ayırır (31). Bu bölgenin rolü açık olmamakla birlikte kinaz bölgesinin aktivasyon regülasyonunda görev aldığı ile ilgili kanıtlar artmaktadır. Örneğin; KL (kinase-like domain, kinaz benzeri domain) bölgesinin herhangi bir sebepten dolayı delesyona uğraması JAK2’de yüksek aktiviteye neden olur (34,35).

Tirozin kinaz bölge: Tirozin kinaz bölgesi aktivasyon döngüsünde korunmuş tirozinleri kapsar. Bunlar; JAK1’de Y1038/Y1039, JAK2’de Y1007/1008, JAK3’de Y980/981, Tyk2’de Y1054/Y1055’dir (37). Bu ikili tirozin fosforilasyona uğrayarak konformasyonel değişikliğe neden olur. Bu değişim substratın bağlanmasını kolaylaştırır (12). Şekil 3’de JAK2’nin yapısı gösterilmiştir.

Mutant hücre serilerinin kullanılması sonucu JAK’ların çeşitli sitokin reseptörlerinin membran proksimal bölgeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir Bu ilişki, ligand reseptöre bağlandıktan sonra JAK’ın kinaz domainindeki tirozin rezidülerinin fosforilenmesiyle artar (14).

Sitokinlerin sitozolik domainlerinde enzimatik aktivite yoktur. İlgili gen ekspresyonunu sağlamak için (hücre içinde sinyal yollarını aktive ederek) ya doğrudan enzimatik aktiviteye sahip ya da kendisi kinaz aktiviteye sahip olmayan sitoplazmik uzantılarıyla bağlantılı katalitik proteinlerle etkileşen reseptörlere bağlanmaları gerekmektedir. Sitoplazmik bağlantıları katalitik proteinlerle etkileşen reseptörler tip I ve tip II reseptörlerdir. Bu reseptörler JAK/STAT sinyal yolağını kullanmaktadırlar Tip I hematopoetin reseptörleridir. Tip II ise interferon reseptörleridir (38,39). Şekil 4’te JAK’lar için farklı sitoplazmik uzantılar içeren sitokin reseptörleri gösterilmiştir.



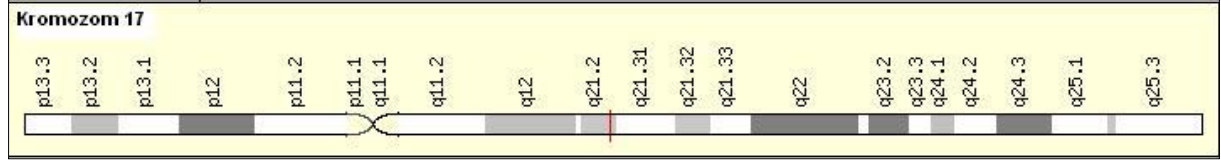
Şekil 4. JAK'lar için farklı tercihlere sahip sitokin reseptörleri (38)

Tyk2 IFN sinyalizasyonunda görev aldığı için tespit edilen ilk JAK olmuştur. Yapılan çalışmalar IL-12 için Tyk2 'nin olması gerektiğini göstermektedir (40,41). Ty2 ^{-/-} farelerin lipopolisakkaritlere (LPS, gram-negatif bakterilerin dış membran bileşeni) kusurlu cevaplar verdiği gösterilmiştir. JAK1 ^{-/-} farelerde perinatal dönemde letal fenotip görülmektedir. Yapılan çalışmalara göre bu durumun nörolojik kusurlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (42). Çalışmaların devamında JAK1 ^{-/-} farelerde JAK1 ve sitokinler ile gerçekleşen sinyalizasyonun kusurlu olması, lenfoid gelişimi ve fonksiyonlarının kusurlu olduğunu düşündürmektedir. JAK2 ^{-/-} farelerde eritropoezde hasar olduğunu ve bu hasarın embriyonik dönemin 12. gününde ölümlere neden olduğunu göstermektedir (43,44).

STAT

STAT (Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörleri)'lar promotör bölgeye bağlı protein kompleksidir. Sitoplazma içinde başlatılan bir sinyal iletimi ile çekirdekteki hedef genlerin hızlıca transkripsiyona başladığı tespit edilmiş ve bu şekilde STAT molekülleri keşfedilmiştir (7,45). Hücre içi sinyal iletim yollarında transkripsiyon aktivatörü ve sinyal dönüştürücü olarak görev alırlar (46).

STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT 6 olmak üzere 7 üye klonlanmıştır (47). Şekil 5'te STAT5'in 17. Kromozom üzerindeki konumu gösterilmiştir.



Şekil 5. STAT5 (STAT5a*)'in 17. kromozom üzerindeki konumu (49)

*Stat5a ve Stat 5b benzer sekanslara sahip iki yakın akrabadır. Stat5a ve Stat5b'nin her ikisinde olmadığı fareler sadece birinin olmadığı fenotipi göstermektedir (50,51)

Elliden fazla hematopoetin ailesinin üyeleri sınırlı sayıda STAT ile sinyal sağlasa da sinyal iletiminde önemli derecede özgünlük sağlanmaktadır (7). Tablo 1'de STAT'ların, sinyal iletimi için sitokinlerin büyük alt grupları ve bağlandıkları korunmuş reseptör aileleri gösterilmiştir.

STAT5 genleri kusurlu farede eritropoez, granulopoez ve lenfopoezinde hematopoietik gelişim kusurları görülmüştür (51). Miyeloid serinin gelişiminin GM-CSF (Granülosit-Monosit Koloni Stimülan Faktör)'nin indükleyici etkisiyle ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda serinin gelişimi için STAT5 proteinin hücrelerin transkripsiyonu için uyarıcı etkide bulunduğu gösterilmiştir (52).

STAT'ların korunmuş ortak yapısal bölgeleri vardır (7,9). Bu bölgeler; amino terminal bölge (NH₂), burgulu burğu domain (coiled-coiled domain, CCD), DNA bağlanan bölge, DNA bağlayıcı domain (DBD) ve SH2 / tirozin aktivasyon domainleridir (9, 43). Buna karşılık STAT moleküllerinin her birinde farklılık gösteren karboksi terminal (COOH)'de transkripsiyonel aktivasyon domain (TAD) vardır. Bu bölge STAT özgünlüğünden sorumludur (9,53). Şekil 6'da STAT5'in yapısal bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 6. STAT5'in yapısal bölgeleri (54)

Tablo 1. JAK ve STAT aktivasyonunda spesifik sitokinler (9)

Ligand	JAK	STAT
IFN- γ (IFN ailesi) *	Jak1, <i>Jak2</i>	Stat1, <i>Stat5</i>
IL-10 (IFN ailesi)	Tyk2, Jak1	Stat3
IL-22 (IFN ailesi)	?	Stat3, <i>Stat5</i>
IL-6 (gp130 ailesi)	Jak1, <i>Jak2</i>	Stat3, Stat1
IL-11 (gp130 ailesi)	Jak1	Stat3, Stat1
OSM (gp130 ailesi)	Jak1, <i>Jak2</i>	Stat3, Stat1
G-CSF (gp130 ailesi)	Jak1, <i>Jak2</i>	Stat3
IL-7 (γ C ailesi)	Jak1, Jak3	<i>Stat5</i> , Stat3
IL-9 (γ C ailesi)	Jak1, Jak3	<i>Stat5</i> , Stat3
IL-15 (γ C ailesi)	Jak1, Jak3	<i>Stat5</i> , Stat3
IL-21 (γ C ailesi)	Jak1, Jak3	<i>Stat5</i> , Stat3, Stat1
IL-4 (γ C ailesi)	Jak1, Jak3	Stat6
IL-3 (IL-3 ailesi) *	<i>Jak2</i>	<i>Stat5</i>
IL-5 (IL-3 ailesi) *	<i>Jak2</i>	<i>Stat5</i>
GM-CSF (IL-3 ailesi) *	<i>Jak2</i>	<i>Stat5</i>
EPO (Tek zincir ailesi) *	<i>Jak2</i>	<i>Stat5</i>
GH (Tek zincir ailesi) *	<i>Jak2</i>	<i>Stat5</i> , Stat3
PRL (Tek zincir ailesi) *	<i>Jak2</i>	<i>Stat5</i>
TPO (Tek zincir ailesi) *	<i>Jak2</i>	<i>Stat5</i>
EGF (RTK ailesi) *	Jak1, <i>Jak2</i>	Stat1, Stat3, <i>Stat5</i>
PDGF (RTK ailesi)	Jak1, <i>Jak2</i>	Stat1, Stat3
CSF-1 (RTK ailesi)	Tyk2, Jak1	Stat1, Stat3, <i>Stat5</i>
HGF (RTK ailesi)	?	Stat1, Stat3
AT1 (G protein ailesi)	<i>Jak2</i>	Stat1, Stat2

OSM: Onkostatın M; **G-CSF:** Granülosit koloni stimulan faktör; **GM-CSF:** Granülosit –makrofaj koloni stimulan faktör; **EPO:** Eritropoetin; **GH:** Büyüme (growth) hormon; **TPO:** Trombopoetin; **EGF:** Epidermal büyüme faktörü; **PDGF:** Platelet (PLT) büyüme faktörü; **CSF-1:** Koloni stimulan faktör; **HGF:** Hepatosit büyüme faktörü; **AT1:** Anjiyotensin.

STAT Kısımları

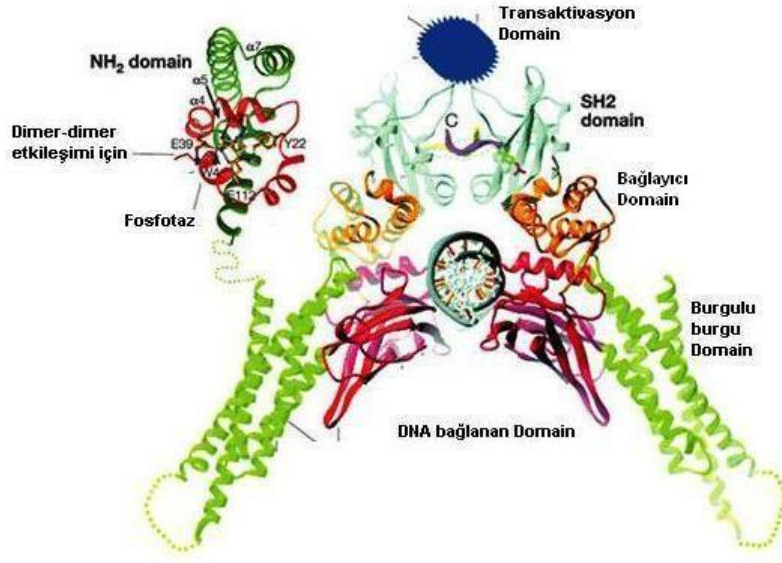
STAT üyelerinin bölgeleri yapısal ve fonksiyonel analizlerle belirlenmiştir. Bir domaindeki yapısal değişim diğer domainleri de etkileyebilmektedir (9).

N terminal bölge: N terminal domain 130 aminoasit içermektedir. Bu korunmuş alan STAT1 ve STAT4 arasında %51, STAT5 ve STAT6 arasında %20 benzerlik göstermektedir (55). STAT4'ün N terminal yapısı 1-124 aminoasitlik bir dimer içermektedir. Bu dimer, halka şeklinde beş kısa heliksten oluşmaktadır (Şekil 7.). Yapılan çalışmalarla N terminal dimerizasyonun STAT'ların GAS (Gamma Aktivated Site, gamma aktive edici alanlar) elementlerine bağlanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (55,56).

Burgulu-burgu bölge: Bu domain STAT1 için 24 amino asit ve STAT3 için 18 amino asitten oluşmaktadır. Esnek polipeptid zinciri ile N terminal domainle ilişkilidir. Bu domain yaklaşık 135-315 aminoasit içeren 4 α heliksten ibarettir. Bu polipeptid, alfa helikslerle N terminal bölgeyi burgulu-burgu domainine bağlar (Şekil 7.) (53). Yapılan çalışmalarda burgulu-burgu domainin, nüklear taşınım (nükleus dışına) ve tirozin fosforilasyonunda rol oynadığı tespit edilmiştir (58,59).

DNA Bağlanma bölgesi: Bu bölge yaklaşık olarak 320-480 aminoasit içermektedir. DNA bağlanma bölgesi burgulu burgu bölgesinin uç (terminal) tarafındadır (Şekil 7.) (53). DNA bağlayıcı bölge transkripsiyonel etkide önemli rol üstlenir. Bu alan ligand uyarısında özgül sinyal oluşumu sağlayarak DNA'ya özgün bağlanma sağlar. Bunun yanı sıra ek işlevleri olabileceği düşünülmektedir (60,22).

Bağlayıcı bölge: Bağlayıcı domain STAT1 için 488-576 amino asit, STAT3 için 465-585 amino asit ihtiva eder. Bu bölge DNA bağlama bölgesi ile SH2 dimerizasyon domain arasında yer almaktadır. STAT1'in yapısına bakıldığında SH2 domain ile bağlayıcı bölgenin heliks yaptığı gösterilmiştir (Şekil 7.) (53). SH2 domaindeki yapısal değişiklikler DNA bağlama kapasitesiyle düzenlenebilmektedir (61).



Şekil 7. STAT moleküllerinin kristal yapısı (57)

SH2 domain ve tirozin aktivasyon motif: SH2 domain spesifik fosfotirozin motifler için bağlanma kapasitesiyle sinyalizasyonda önemli rol oynar. SH2 domain yaklaşık 580-680 rezidüye sahiptir ve bu yapı oldukça korunmuştur. Yapı iki alfa heliks tarafından anti paralel beta tabakalarından oluşmaktadır (Şekil 7.). Bu yapının oyuk olması ve yapısında arginin olması fosfat ile etkileşime aracılık eder. SH2 domain spesifik fosfotirozin motiflerini tanımaktadır. Bu sebeple STAT sinyal iletiminde önemli üç rol üstlenmektedir. 1: Spesifik fosfotirozin motifleri için sitokin reseptörlerini tanımak. 2: Aktifleşen JAK ile birleşme 3: STAT homodimerizasyonunu ya da heterodimerizasyonunu sağlamak (62).

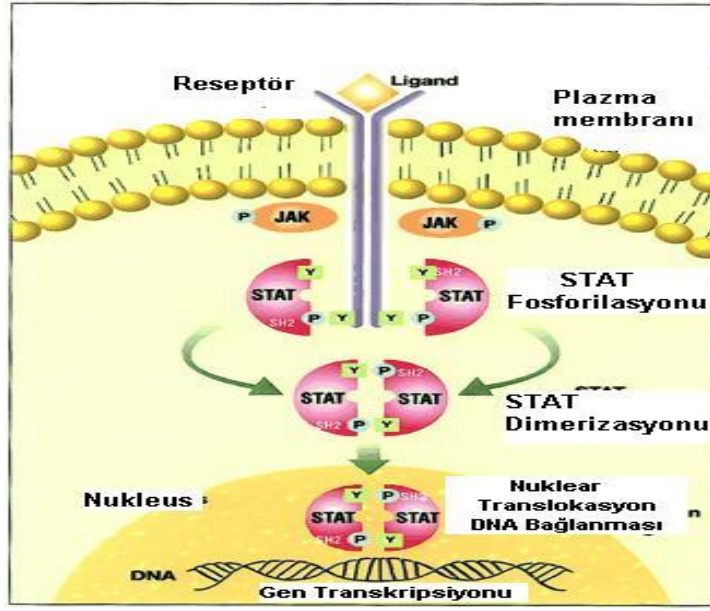
Transkripsiyonel aktivasyon domain (TAD): Ekstrasellüler sinyaller, promotör-spesifik cevaplar, DNA veya diğer bölgeler için arabulucu proteinler ile etkileşim kurar (64). TAD'lar STAT üyelerinin C terminallerinde lokalize olmuştur (64) (Şekil 7.). Bu bölge spesifik transkripsiyonel cevapları düzenleyebilme yeteneğindedir. Bu durum karboksi terminal bölgede son 38 amino asiti eksik olan STAT2 β izoformları ve STAT1'in tam boyutu arasında yapılan karşılaştırmalı analizlerle kanıtlanmıştır (47).

JAK/STAT SİNYAL İLETİM

Birçok hücre, intrasellüler sinyal iletimde fosfotransfer kaskatları kullanmaktadır. İnsanlarda bu iletimde, tipik olarak serin, treonin ve tirozin rezidülerini fosforile eden birçok (500'den fazla) kinaz vardır. Janus Kinaz, sinyal dönüştürücü iletimde transkripsiyonu aktive ederek gelişim ve homeostazı sağlamakla görevlidir. Memelilerde başlıca sinyal mekanizmaları sitokinler ve büyüme faktörleridir. JAK aktivasyonu hücre profilerasyonunu, farklılaşmayı, hücre göçünü ve apoptozu stimüle eder. Bu hücre olayları homeostazda immün gelişim, meme gland gelişimi, laktasyon, yağ oluşumu ve seksüel dimorfik büyüme gibi süreçlerde kritik rol oynar (65,66).

Sinyal iletiminde ligandın reseptöre bağlanması reseptör alt ailelerinin multimerizasyonunu teşvik eder. Epo ve GH gibi ligandlar reseptör alt üyelerinin homodimerizasyonuna neden olurken, interferon ve interlökinler gibi ligandlar ise heterodimerizasyona neden olurlar. Sinyal yayılımı için, reseptörlerin sitoplazmik bölge ile JAK2 etkileşimi gerekmektedir. Sinyal iletimde birden çok JAK üyesi görev almaktadır. Bazı büyüme faktörlerinde (Epo ve Tpo gibi) sadece JAK2 rol oynamaktadır (Tablo 1.) (67).

Spesifik reseptörler kendi sitokinleriyle bağlandığında JAK/STAT sinyal iletimi aktif hale gelir. Bağlanma ile, reseptörler üzerindeki tirozin rezidüleri kendi üzerlerinden (otofosforilasyon) fosforile olurlar. Bu fosforillenme CPTK'ları da aktive eder. Aktive olan CPTK'lar hedef proteinler STAT'ları aktive ederler. Böylece STAT'ların dimerizasyonu sağlanır (69). Aktive olan STAT'lar ilgili gen ekspresyonunu gerçekleştirmek için nukleusa taşınarak enhancer (hızlandırıcı) dizisi ailesinin GAS üyelerine bağlanır (7,17,44,69). Şekil 7'de JAK/STAT sinyal yolağı gösterilmiştir.



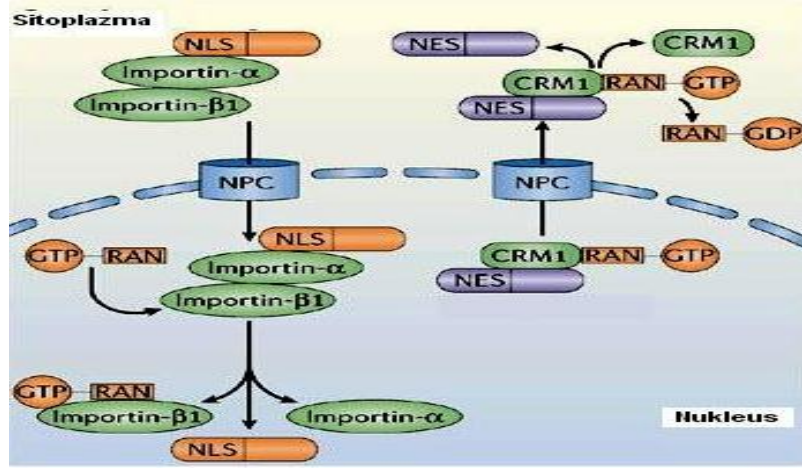
Şekil 8. JAK/STAT sinyal yolağı (69)

STAT'ların Nükleositoplazmik Transportu

Uyarılmamış hücrelerde STAT'lar sitoplazmada lokalize olmuştur. Stimüle edildikleri zaman gen ekspresyonunu uyarmak için nukleusa geçiş yaparlar. Sinyal sona erdiği zaman sitoplazmaya geri dönerler. Bu mobilizasyon NPC (Nükleer Por Kompleks) aracılığıyla sağlanır. Bu kompleks sinyal iletiminde arabuluculuk ve iletimin düzenlenmesinde önemli roller üstlenir (70). Her iki taşınımında Ran-GTP (Ras bağımlı nükleer protein-Guanozin tri fosfat) bağımlı yer değişim vardır. Yer değişimde NPC'nin iki yönlü taşınım özelliği vardır.

Nükleer import (Nükleusdan içe taşınım): Aktif nükleer taşınım kısa amino asit sekanslarından oluşan NLS (Nükleer Lokalizasyon Sinyal) tarafından gerçekleşir. STAT'lar NLS nükleer reseptör ailesi proteinleri (importin α , importin β) tarafından tanınır (71).

Nükleer eksport (Nükleusdan dışa taşınım): Nükleer eksport NES (Nükleer Eksport Sinyal)'ler tarafından sağlanmaktadır. Bunlar lökin ile zengin amino asit sekanslarıyla karakterizedir. Eksport reseptörü, CRM-1 (Chromosome Region Maintenance, Kromozomda Korunan Bölge)'dir. STAT molekülünün taşınımı NES sinyalinin CRM-1'e bağlanmasıyla sağlanmaktadır (72). Şekil 9'da STAT proteinlerinin Ran-GTP bağımlı nukleus içine/nukleus taşınımı gösterilmiştir.



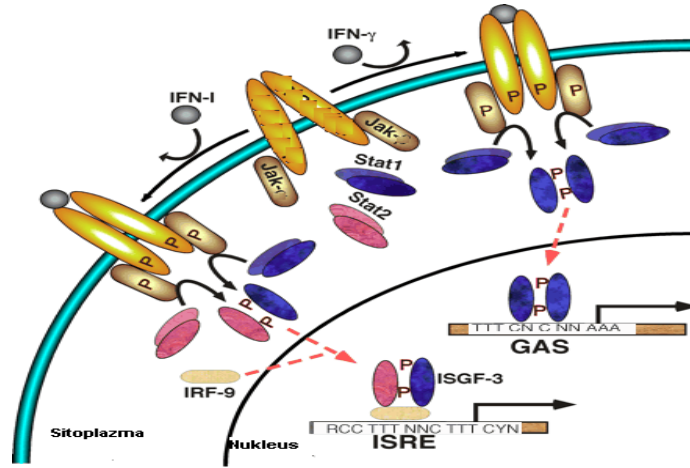
Şekil 9. STAT proteinlerinin Ran-GTP bağımlı taşınımı (73)

STAT DNA BAĞLANMA BÖLGELERİ

IFN yanıtları araştırıldığında, STAT hedef genlerinin iki farklı transkripsiyonel “ enhancer (Hızlandırıcı) “ dizisi olduğu tespit edilmiştir (74).

Tip I IFN’lar (alfa, beta, epsilon, Limitin) ISGF-3 (Interferon Stimulating Gene Factor, IFN uyarıcı gen faktörü) oluşturarak sinyal iletirler. Bunu IRF-9, P48 gibi bağlayıcı arabirimlerle, ISRE (IFN Stimulating Regulatory Factor, IFN Uyarıcı yanıt elemanları) elemanlarına bağlanarak yaparlar. Böylece gen transkripsiyonunu başlatmış olmaktadır (75).

IFN tip II sinyaller (gama), GAS elemanlarına bağlanarak STAT1 homodimerleri ile sinyal iletirler (76). Bu elemanlar ortak bir diziye (TTTCCNGGAAA) sahiptir. Biyokimyasal çalışmalarda bütün STAT’lar için TTCN₂₋₄GAA dizisinin en iyi bağlanma bölgesi olduğu tespit edilmiştir (76,77). Şekil 10’da IFN tip I ile IFN tip II sinyallerinin iletimi gösterilmektedir.



Şekil 10. IFN sinyallerinin (Tip I ve Tip II) ISRE ve GAS ile iletimi (69,77)

NONRESEPTÖR TİROZİN KİNAZ DÜZENLENMESİ

NRTK'ların aktivasyonu enzimatik aktivitede artışa yol açar. Aktivasyon döngüsü dışında tirozinin fosforilasyonu ve protein tirozin fosfataz aktivitesi NRTK'ların kinaz aktivitesini düzenler. (12).

Sinyal Sisteminin Düzenlenmesi

JAK/STAT sinyal yolu savunma, farklılaşma, proliferasyon ve karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. JAK/STAT sinyal yolu negatif ve pozitif regülasyon ile düzenlenmektedir (9). Sinyal ileti sisteminde düzenleyici rolü olan, sitokin sinyal supresör ailesi (SOCS), protein tirozin fosfotazlar (PTP)(SHP1 ve SHP2 gibi) ve aktive STAT'ların protein inhibitörleri ailesi (PIAS) şeklinde üç regülatör sınıf bulunmaktadır (78).

STAT Sinyalinde Negatif Regülasyon

SOCS protein ailesi: JAK'ları bağlayabilmek için reseptör bağlanma bölgelerine STAT'lardan önce giderek fosforilasyonu inhibe ederler (79).

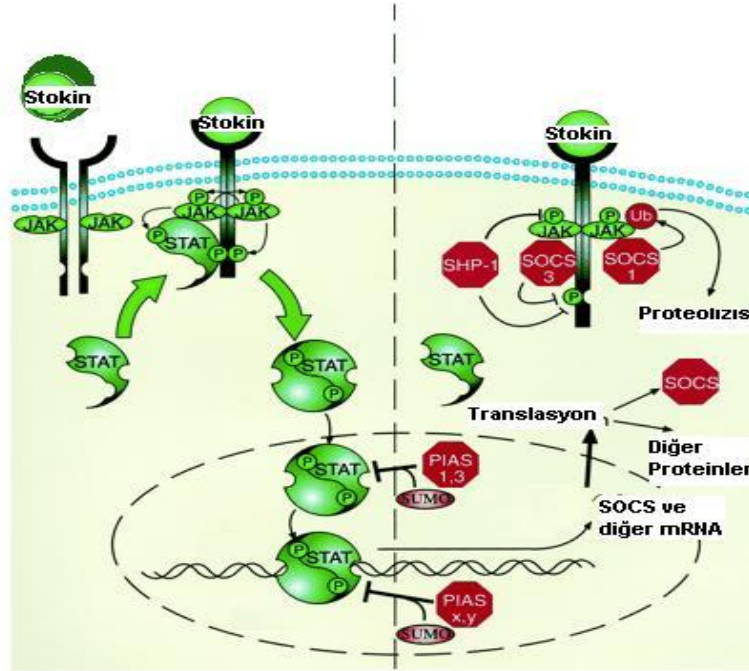
PIAS protein ailesi: Transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma aktivasyonunu inhibe ederler. PIAS'lar aynı zamanda histon deasetillenmesi gibi diğer koregülasyon tarafından transkripsiyonu bastırırlar (80,81). Bu proteinler hücre çekirdeği içinde de inhibisyon gerçekleştirebilirler (82).

Negatif Geribildirim Döngüsü

SOCS proteinleri inhibisyonu üç aşamada gerçekleştirirler.

1. Reseptör üzerindeki fosfotirozinlere bağlanarak transkripsiyonel aktivatörlerin (STAT) bu noktalara yoğunlaşmasını engelleyerek,
 2. JAK kinaz etkinliğini baskılamak için JAK'lara ya da reseptörlere bağlanarak,
 3. JAK'ların ve reseptörlerin ubiquitinleşmesi gerçekleşerek
- Böylece JAK'lar kararsız hale gelirler ve proteozomal yıkım için hedef olurlar (Şekil 11.) (83,84,85).

Bir diğer negatif regülatör sınıfı PIAS proteinleridir. JAK aktivasyonunu inhibe eden SHP1 ve SHP2 adlı protein fosfotazlarla beraber çalışırlar. Negatif regülasyonda görev alan PIAS proteinlerine bağımlı SUMO proteinleri (küçük ubiquitin bağlı düzenleyici proteinler) vardır. Bu proteinler hedef proteinlere bağlanarak ya da onlardan ayrılarak ilgili proteinin etkinliğini düzenlerler (Şekil 11) (87,88).



Şekil 11. JAK/STAT sinyal yolunda PIAS ve SOCS mekanizması (86)

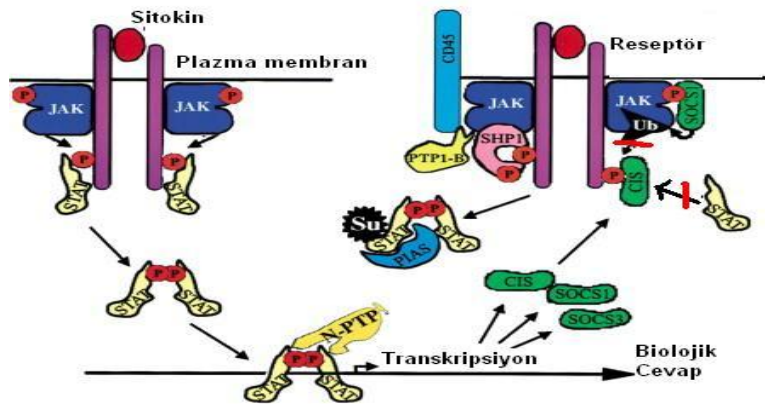
SOCS1: JAK için süprösör; **SOCS3:** Reseptör için süprösör

Pozitif Geribildirim Döngüsü

Serin fosforilasyonu: Serin fosforilasyonu ile STAT'lar yapısal değişime uğramaktadır. STAT1 ve STAT3 fosforilasyonunda farklı serin kinazların olduğu tespit edilmiştir (89). STAT1, STAT3 ve STAT4'ün serin fosforilasyonu hızlandırıcı dizinin transkripsiyonel aktivitesinde görev almaktadır (89,90). STAT5 ve STAT6 serin fosforilasyonunun transkripsiyonel hızlandırıcı etki yaptığı yeteri kadar ikna edici olmamıştır. Daha sonra hızlandırıcı protein stabilitesi için STAT5'de serin fosforilasyonunun gerekli olduğu tespit edilmiştir (56,91).

JAK defosforilasyonu: JAK aktivasyonu tirozin kinaz bağımlıdır. SHP1 ve SHP2 olmak üzere iki tane fosfotaz içerir. Bunlar JAK aktivitesinin negatif regülasyonundan sorumludur.

Hematopoetik dokularda SHP1 ekspresyonu daha azdır (92). Tirozin reseptör motiflerinin kaybı ilgili reseptörde SHP1 düzenlemesine neden olarak sinyali ve JAK aktivitesini uzatmaktadır (93). Yapılan çalışmalarda SHP1 ve SHP2 direk etkileşimi STAT5 ve JAK defosforilasyonunda gösterilmiştir (92,94). CD45 ile yapılan çalışmalarda IL-3, IL-4, EPO ve IFN gama tarafından uyarılan JAK/STAT sinyalizasyonunda membrana özel fosfotazların negatif regülasyona neden olduğu gösterilmiştir N-PTP (Nuclear STAT Phosphatase, nükleer STAT fosfotaz) ile inhibitör etkili elemanların transkripsiyonu engellenir. Böylelikle JAK defosforilasyonu sonrası ubiquitinasyon gerçekleşerek aktivasyon döngüsü devam eder (Şekil 12.) (95).



Şekil 12. JAK/STAT sinyal yolunda pozitif regülasyon (96)

CD45: Hematopoetik spesifik fosfotaz; CIS: SOCS aile üyesi; Su: SUMO

JAK2V617F MUTASYONU

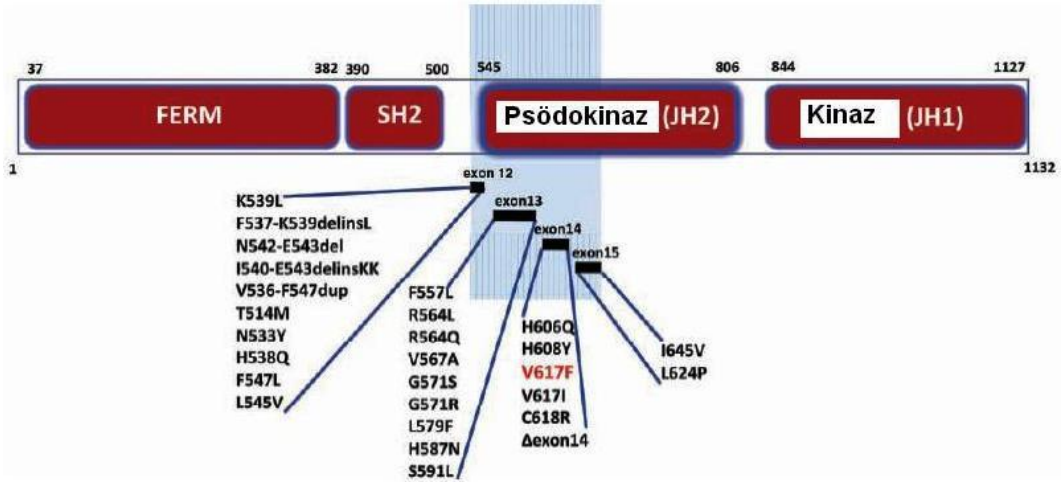
JAK2 GM-CSF, G-CSF, IL-3, Tpo ve Epo reseptörleri (TpoR, EpoR) tarafından intrasellüler sinyallerin teşviki için önemli rol oynamaktadır (8,9). JAK2 proteinin 617.pozisyonundaki valinin fenilalanine (Ekzon 14) dönüşümü sonucu kronik miyeloproliferatif hastalık grubu ortaya çıkmaktadır. Dönüşüm JH2 ya da psödokinaz domain adı verilen bölgede gerçekleşir (97, 98, 99, 100).

JH2 domain reseptör inaktivasyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu bilgi sitokin reseptörlerine JAK2 V617F (+) hücelerin aşırı duyarlılığı ve mutasyonun malignitelere gerçekleştirdiği hasarın çeşitliliği hakkında aydınlatıcı bilgi vermektedir (5,11,48,101,102).

JAK2 eritropoetin reseptörüne bağlanarak fosforillenir ve aktive olur. Aktive olduktan sonra reseptörde yapısal değişiklik meydana gelir. Aktif hale gelmiş olan JAK2 reseptörün sitoplazmik kısmını fosforiller ve intrasellüler sinyal yolağını başlatır. (103,104). JAK2V617F EpoR'ünün sitosolik domaini üzerinde yapı oluşturmakta ve Epo bağımlı sinyali uymaktadır. Bu uyarımı EpoR üzerinde sitosolik tirozin rezüdülerinde fosforilasyon (Stat5 aktivasyonunu sağlayarak) ile gerçekleştirmektedir (97).

Biyokimyasal çalışmalarda JAK2 V617F mutasyonunun; ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), mitojen etkili protein kinazlar (MAPK) ve AKT (protein kinaz B)'de JAK-STAT'ın sitokinden bağımsız aktivasyonuna neden olduğunu göstermektedir (5,6,105). Valin yerine triptofan, metionin, isolösin gibi değişimler meydana gelerek farklı mutasyonlar ortaya çıkabilmektedir. (106). Yapılan çalışmalarda bu aktivasyon Polisitemia Vera (PV) hastalarında %95-97 oranında, Esansiyel Trombositoz (ET) hastalarında %23-27 oranında, İdiyopatik Miyelofibrozu (İMF) hastalarında %43-47 oranında görülmüştür (2,10-107). Diğer klonal miyeloid hastalıklarda mutasyonun görülme sıklığı çok daha düşüktür (102,108).

JAK2 gen bölgesindeki translokasyonlar, delesyonlar, nokta mutasyonları ve insersiyonlar genin aktivitesindeki artışa neden olmaktadır. JAK2 mutasyonu miyeloproliferatif hastalıkların ana hatlarını anlamamızı sağlarken diğer mutasyonların JAK2 V617F negatif miyeloproliferatif hastalıklarda görülmesi olasıdır. Bu mutasyonlar V617F'ye göre daha nadir görülmektedir (109, 110, 111). Şekil 13'de miyeloproliferatif hastalıkların kliniğinde JAK2 V617F mutasyonunun haricinde görülen genetik kusurlar gösterilmiştir.



Şekil 13. JAK2 geninde V617F mutasyonu ve klinik yansıması olan diğer genetik kusurlar (112)

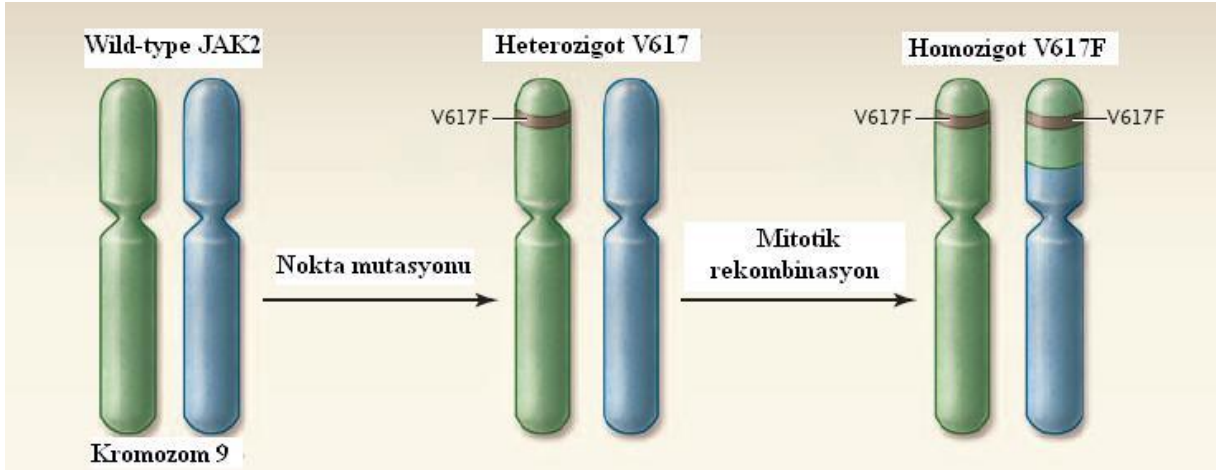
KÖK HÜCRE BİYOLOJİSİ VE V617F HOMOZİGOTLUĞU

MPH, farklılaşma yeteneği olan kök hücrelerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. X-inaktivasyon analizi kullanılarak yapılan çalışmalarda myeloid serinin ve eritrosit serinin klonal popülasyonuna rastlanılmıştır (3,113,114).

Klonal hematolojik hastalıklar V617F homozigotluğu önemli rol oynamaktadır. Homozigotluk, 9p kromozomundaki nokta mutasyonu sonrası JAK2 lokusu ile sentromeri arasında gerçekleşen mitotik rekombinasyon sonucu oluşur (Şekil 14) (10).

V617F homozigotluğu JAK2 heterozigotluğuna göre hedef gen ifadesinde belirgin şekilde değişikliğe neden olmaktadır (115). Bu durum mutasyonsuz allelin gen ifadesindeki inhibisyon etkisinin kalkması ve V617F mutasyonunun sinyal yolunda daha fazla etkili olmasından kaynaklanmaktadır (5).

PV'lı hastaların hematopoetik progenitör hücrelerinde homozigotluk oranı ~ %90'dır. ET hastalarında ise homozigot hematopoetik progenitör hücre kolonilerine rastlanmamıştır. Bu fark V617F homozigotluğunun PV gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir (116). Mutant progenitör hücrelerin proliferasyon ve hayatta kalma mücadelesi bakımından daha avantajlı olması PV'lı hastalarda homozigot kan hücrelerinin sayısının zamanla artmasına neden olmaktadır (116,117).



Şekil 14. V617F mutasyonunda homozigotluk gelişimi (10)

MİYELOPROLİFERATİF HASTALIKLAR

Miyeloproliferatif hastalık (MPH) terimi 1951 yılında Damashek tarafından tanımlanmıştır. Bu tanımlama ET, PV, İdiyopatik Miyelofibroz (İMF) ile *bcr/abl* translokasyonu taşıyan KML (Kronik Miyeloid Lösemi) tanılarındaki klinikopatolojik ortak noktaların olduğunu belirtmek amacıyla yapılmıştır (Tablo 2). Yapılan çalışmalarla tanımlanan hastalıkların pluripotent kök hücreden gelişen miyeloid ve lenfoid öncü serilerin klonal çoğalmasıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir (4,119,120). Bu hastalıkların patogenezleri incelendiğinde klinik ve laboratuvar bulguları birbirine benzer özellikler göstermektedir (118) Tablo 3’de 1951 yılı sonrası MPH tarihi gelişimi gösterilmektedir.

KML tanılı hastalarda 9;22 (*bcr/abl*) translokasyonunun tespit edilmesi tanımlamada karışıklık meydana getirmemesi için PV, ET, İMF tanıları 9;22 (*bcr/abl*) negatif kronik MPH’lar olarak sınıflandırılmaya alınmıştır (2,5,6,101,102,108). Böylelikle kronik MPH (KMPH) hastalıkları, *bcr/abl* mutasyon varlığıyla tespit edilen KML’den ve hepatopoezde myeloid, granülosit ve megakaryositlerin üretimlerinin durmasıyla ilişkili olan MDS (Miyelodisplastik Sendrom) ve atipik klinikopatolojik ortaklık taşımayan atipik MPH’tan ayrılmıştır (Tablo 4) (121).

Tablo 2. Miyeloproliferatif Hastalıkların Ortak Özellikleri (118)

Benzer klinik bulgular	Semptomsuz olmaları veya halsizlik, kanamabelirtileri, splenomegali bulunması
Çevre kanı	Genellikle ilk tanı sırasında aneminin belirgin olması Lökositöz ile beraber genç miyeloid hücrelerin çevre kanında görülmesi Eozinofili ve bazofili Trombosit sayısının normal ya da yüksek bulunabilmesi Trombosit işlev bozukluklarının olması
Kemik iliği	Miyeloid hiperplazili hipersellüler kemik iliği, değişen derecede miyelofibroz
Dalak	Ekstramedüller hematopoiezin saptanması ve splenomegali

Tablo 3. MPH tarihi gelişimi (10)

<ol style="list-style-type: none">1. 1976 yılında PV'nin kök hücre orjini bulunmuş ve hematopoetik kök hücreler ve multipotent progenitörlerde mutasyon tespit edilmiştir.2. Keşfedilen mutasyonun JAK2'nin aktivasyonunu etkileyerek tirozin kinaz fonksiyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.3. 2002 yılında PV'da sitogenetik kusurların 9p'de görülmesine mitotik rekombinasyonun neden olduğu bulunmuştur.4. 9p kromozomunun mitotik rekombinasyonunun, mutasyonunun homozigot olmasına neden olduğu tespit edilmiştir.5. 2001-2004 yılları arasında polisitemia veranın JAK/STAT sinyalizasyonuna bağımlı olduğu bunun yanı sıra Epo bağımsız gelişimine neden olduğu gösterilmiştir.6. Mutasyonun STAT proteinlerini aktive ettiği tespit edilmiştir. <p>2005 yılında JAK2 V617F mutasyonu tanımlanmıştır.</p>

Tablo 4. Kronik Miyeloid Hastalıkların yarı moleküler sınıflandırılması (122)

1. Miyelodisplastik sendrom
2. Miyeloproliferatif hastalıklar

Klasik tanımlama

I. Moleküler tanımlaması yapılmış

Kronik Miyeloid Lösemi

II. Klinik patolojik olarak belirlenmiş (bcr/abl (-) olarak belirlenmiş ve sıklıkla JAK2 V617F mutasyonu ile ilişkilendirilmesi yapılmış)

1. Esansiyel trombositemi
2. Polisitemia vera
3. İdiyopatik miyelofibroz

Atipik tanımlama

I. Moleküler tanımlaması yapılmış

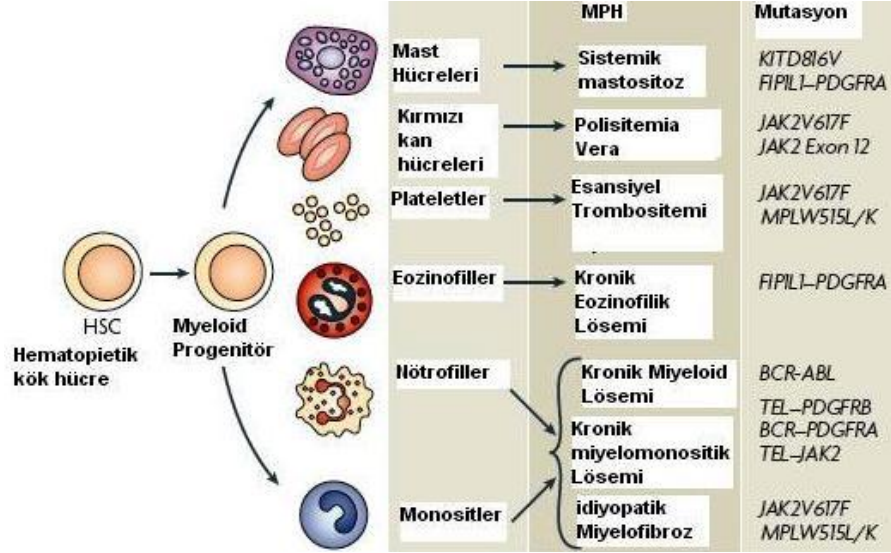
1. PDGFRA- tekrar düzenlenmiş eozinofilik/mast hücre hastalıkları
2. PDGFRB- tekrar düzenlenmiş eozinofilik hastalıklar
3. c-kit mutasyonu ile ilişkilendirilmiş sistemik mastositoz
4. 8p11 miyeloproliferatif sendrom

II. Klinik patolojik olarak tespit edilmiş (az sıklıkla JAK2 V617F mutasyonu görülen)

1. Kronik nötrofilik lösemi
2. Kronik eozinofilik lösemi
3. Hipereozinofilik sendrom
4. Kronik bazofilik sendrom
5. Kronik miyelomonositik sendrom
6. Juvenil miyelomonositik lösemi
7. Sistemik mastositoz
8. Sınıflandırılmamış miyeloproliferatif hastalıklar
(PDGFR: Trombosit türevi büyüme faktörü)

Miyeloproliferatif Hastalıklarda Kalıtsal ve Sonradan Kazanılan Alleller

JAK2 V617F mutasyonu ile ilgili eldeki mevcut bilgiler PV, ET, İMF patogenezinin aydınlanması için katkıda bulunmaktadır. Klinik patolojik olarak tespit edilmiş tanımlamalarda V617F mutasyonu haricinde ilişkilendirilen mutasyonlar vardır. Bunlar kalıtsal ve sonradan kazanılan allellerin tespiti için yol gösterici olmaktadır (Şekil 15.) (79).



Şekil 15. MPH'nin moleküler patogenezi ve sınıflandırılması (79)

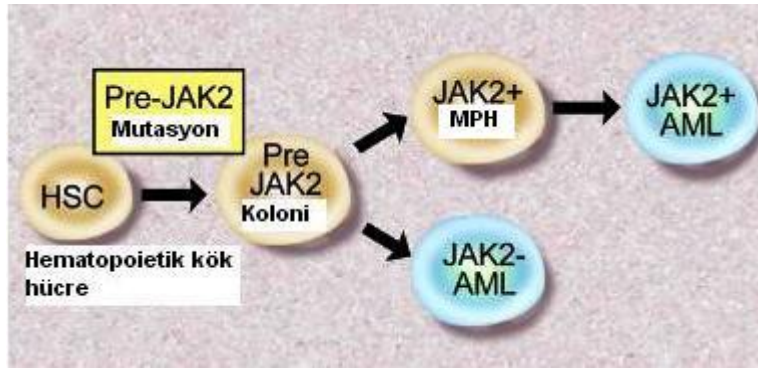
FIPIL1: FH etkileşim protein-1; PDGFRA: Plakellet büyüme faktörü α polipeptid reseptör; PDGFRB: Plakellet büyüme faktör β polipeptid reseptör; FGFR: Fibroblast büyüme faktör reseptörü; BCL-XL: B hücre lösemi/lenfoma-2; NFE2: Nükleer faktör eritoid -2; PRV1: Polisitemia rubra vera-1; MPL:Trombopoetinreseptör.

Genetik bilgiler, MPH gelişiminin ailesel yatkınlık ile desteklendiğini göstermektedir. Ailesel MPH'da, JAK2 V617F mutasyonunun analizi eşey öncül hücrelerde yapılamamıştır Bunun yanı sıra bazı akrabalar arasında geçiş gösteren somatik JAK2 V617F mutasyonu tanımlanmıştır. PV, ET ve İMF gelişimi ve JAK2V617F mutasyonlarının kazanımı için kalıtsal allellere yatkın kişi bu bilgilerle uyumludur. Yatkınlık allelleri JAK2 sinyalini modüle eder hücrelerin seçici avantaj kazanmasını sağlar. Fakat yakınlığa neden olan allelin konumu bilinmemektedir (123,124).

Allelerin varlığı PV ve ET'nin moleküler mekanizmasının birbirleriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Allelin varlığı ile kan hücrelerindeki değişimler ile bu bağlantı tespit edilebilmektedir (125).

V617F pozitif trombositemi tipik olarak yüksek hemoglobin (Hg), tromboz riski ve artan beyaz kan hücreleri (WBC) ile hücrel kemik iliği nedeniyle PV'ya dönüşüm göstermektedir. JAK2 V617F pozitif ET, kanda V617F için düşük eritropoetin seviyeleri, cinsiyet ve homozigotluk gibi faktörler tarafından etkilenmiş eritrositoz düzeyi ile PV'nin öncül formu olduğu düşünülmektedir (126).

Kanıtlar "pre-JAK2 V617F" dönüştürücü hematopoetik progenitör hücrelerin olabileceğini göstermiştir. PV, ET veya İMF'li hastalarda Akut Myeloid Lösemi (AML) gelişimi için yüksek risk vardır. JAK2 V617F mutasyonları relaps AML'de (MPH sonrası) oldukça nadirdir (101). Ayrıca JAK2 V617F pozitif MPH'lı hastaların öyküleri incelendiğinde JAK2 V617F negatif AML'nin gelişmiş olduğu tespit edilmiştir. Sitogenetik ve klonal analizler sonucu JAK2 V617F pozitif MPH ve JAK2V617F negatif AML'nin az sayıda vakada aynı klondan kaynaklandığı gösterilmiştir (127,128). MPH hastalığı süresince JAK2V617F negatifliği, pozitifliğe dönebilmektedir (Şekil 16.).

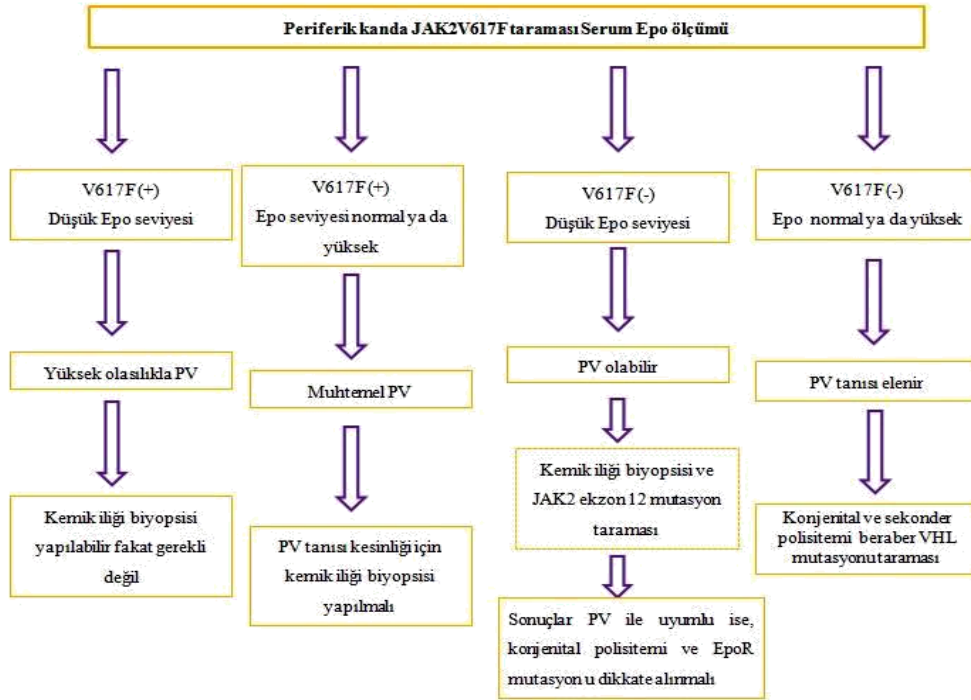


Şekil 16. MPH'da lösemik transformasyon modeli (129)

Polisitemia Vera

Eritrositoz ile eş anlamlı olarak kullanılan, plazmada hacmindeki azalış nedeniyle kanın şekilli elemanlarının birlikte artışı ile karakterize klonal bir hematopoietik kök hücre hastalığıdır. PV'li hastalardan izole edilen eritroid öncüllerinin (BFU-E ve CFU-E) kültür ortamında Epo'ya bağımlı olmayan proliferasyonları tespit edilmiştir. (1)

2008 WHO'ya göre erkeklerde 18,5 g/dl, kadınlarda 16,5 g/dl'den yüksek Hg değerleri veya erkeklerde 17 g/dl kadınlarda 15 g/dl'den büyük Hg değerleri ile 2g/dl şeklinde Hg seviyelerinde devamlı artış olan bireylere PV şüphesi ile yaklaşılır. Tanı değerlendirmesi JAK2V617F mutasyonu taraması ve serum Epo değeri ölçümü ile başlar. Çünkü hastaların %90'dan fazlasında düşük Epo seviyesi görülmektedir (Tablo 5.) (130,131). Şekil 17'de PV tanı algoritması gösterilmiştir.



Şekil 17. PV tanı algoritması (132)

VHL mutasyonları böbrek tümörlü hastalarda görülmektedir. Epo'nun esas üretim yeri olan böbrekte tümör gelişimi Epo'nun fazla üretilmesine neden olur.

Tablo 5. 2008 WHO PV tanı kriterleri (132)

Polisitemia Vera (Herhangi bir majör kriterle birlikte iki minör kriter olmak zorunda)
<u>Majör Kriterler:</u> <ol style="list-style-type: none">1. Hg > 18.5 g/dl⁻¹ (erkek), Hg > 16.5 g/dl⁻¹ (kadın)2. Yaş, cinsiyet ve yaşanan yere göre hesaplanmış referans aralığının %99'undan büyük Hg ve HCT (Hematokrit) değeri3. Hg > 17 g/ dl⁻¹ (erkek), Hg > 15 g/ dl⁻¹ (kadın) ile ilişkili demir eksikliği ile ilişkili olmayan temel değerden tekrarlayan 2 g/dl büyük Hg artışı4. Ortalama değerden % 25'lik artış gösteren kırmızı hücre kitlesi5. JAK2 mutasyonu ya da fonksiyonel başka mutasyonların varlığı
<u>Minör Kriterler:</u> <ol style="list-style-type: none">1. Kemik iliği biyopsisinde farklı 3 hücre serisinde (eritrosit, granülosit, megakaryosit) profilerasyon2. Serum Epo değerinin normal değerinin altında olması3. Endojen eritrosit koloni oluşumu

Serum Epo dikkate alınmadan şüphelenilen PV'da JAK2 mutasyonunun varlığı tanıyı destekleyicidir (Tablo 6 ve 7).

Tablo 6. JAK2 mutasyonu ile beraber PV tanı kriterleri (10)

JAK2 mutasyonu pozitif PV
<ol style="list-style-type: none">1. Yüksek hematokrit (erkeklerde >%52, kadınlarda > %48) veya tahmin edilen değer üzerinde > %25'lik artmış kırmızı hücre hacmi (MCH).2. JAK2 mutasyonu (+)3. Radyografide tespit edilen dalak büyümesi4. Endojen eritrosit kolonisi veya düşük serum Epo değeri

Tablo 7. JAK2 mutasyonu olmadığı durumda PV tanı kriterleri (10)

JAK2 mutasyonu negatif PV (A1, A2, A3 ve diğer A kriterleriyle birlikte herhangi iki B kriteri olmalı)
A1. Artmış kırmızı hücre kütlesi (bu artış normal değerler üzerinden % 25'lik ve daha fazla artışlarla olmalı) veya hematokrit erkeklerde \geq %60 kadınlarda $>$ %56.
A2. JAK2 mutasyonu negatif
A3. Sekonder eritositozun olmaması (normal oksijen saturasyonu, normal serum Epo değeri, tümöre bağlı Epo yüksekliği, Epo reseptör anormalliği)
A4. Elle hissedilen dalak büyümesi
A5. Hematopoetik hücrelerde BCR-ABL hariç herhangi bir genetik anormallik
B1. Trombositoz (Platetlet sayısı $>450 \times 10^9/L$)
B2. Nötrofili (Nötrofil $> 10 \times 10^9/L$; sigara içenlerde $12.5 \times 10^9/L$)
B3. Radyografide tespit edilen dalak büyümesi
B4. Endojen eritrosit kolonisi veya düşük serum Epo değeri

JAK2 mutasyonu negatif ve normal ya da yüksek serum Epo değeri görüldüğünde diğer eritositozlar dikkate alınmalıdır (133). Plazma hacminin azalmasına bağlı olarak eritrosit sayısı, Hg Ve Hct'in arttığı nisbi (rölatif) eritositoz –geçici hemokonsantrasyonlar ve stres eritositoz nedeniyle– ve eritrosit yapımını uyaran yüksek derecede Epo salgılanan –hipoksiye bağlı Epo artışı ve hipoksiye bağlı olmayan Epo artışı nedeniyle– sekonder eritositoz dikkate alınmalıdır (118,132). Tablo 8'de ayırıcı tanı kriterleri gösterilmektedir. Kemik iliğinde belirgin fibroz ve çevresel kanda lökoeritroblastik reaksiyon İMF'u, belirgin trombositoz ise ET'u çağrıştırmaktadır (1).

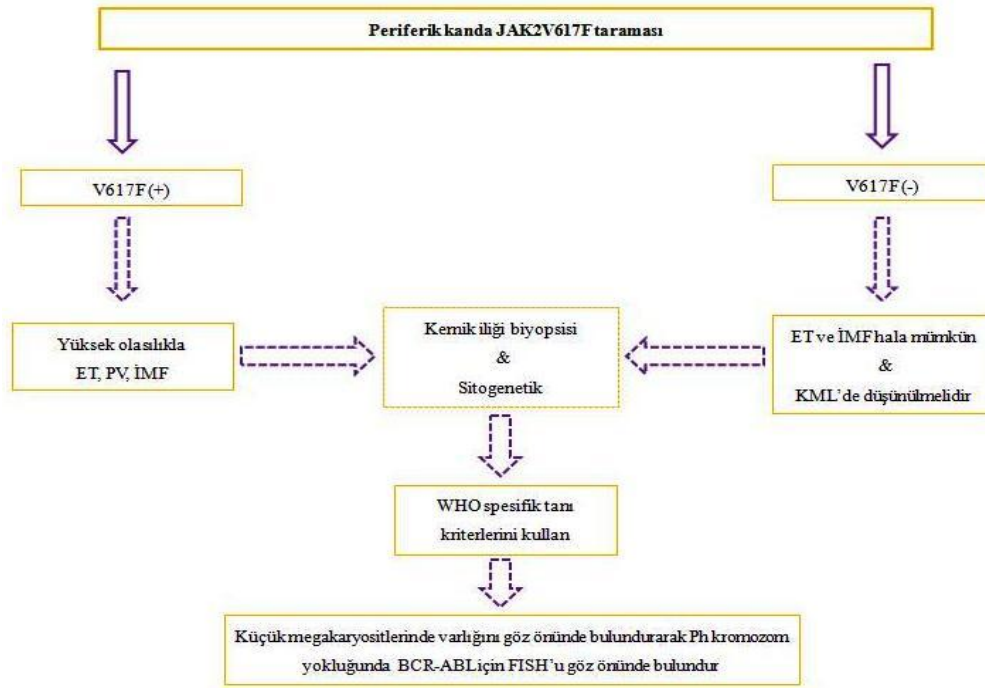
Tablo 8. Nisbi Eritrositoz, Sekonder Eritrositoz ve PV'nın ayırıcı Tanısı (118)

Bulgular	Polisitemia Vera	Sekonder Eritrositoz	Nisbi Eritrositoz
Total Eritrosit Hacmi	Artmış	Artmış	Normal
Total Plazma Hacmi	Normal	Normal	Azalmış
Trombosit, Lökosit Sayısı	Artmış	Normal	Normal
Kemik iliği	Total hiperplazi	Eritoid hiperplazi	Normal
Arter Oksijen Satürasyonu	Normal	Azalmış veya normal	Normal
EritropoetinDüzeyi	Azalmış	Artmış	Normal
Lökosit Alkalen Fosfataz	Artmış	Normal	Normal
Serum B₁₂ Vitamin düzeyi	Artmış	Normal	Normal
Splenomegali	Var	Yok	Yok

Esansiyel Trombositemi (ET)

Trombositlerin sayısal artışının haricinde niteliklerinin bozukluklarından kaynaklanan hematopoietik bir kök hücre hastalığıdır. Hastalık trombosit sayılarındaki belirgin artışla karakterizedir. Hastalığın laboratuvar bulguları dikate alındığında serum TPO'nun normal veya hafif yüksek oluşu TPO'dan bağımsız trombosit üretimini ifade etmektedir (118).

WHO'nun revize edilmiş tanı kriterine göre önceden Plt eşik değeri $600 \times 10^9/L$ iken şimdi $450 \times 10^9/L$ 'dir. Trombositozu olan bir hastaya yaklaşımda öncelikle reaktif trombositozun belli semptomları dışlanmalıdır. Daha sonra periferel kandan JAK2V617F mutasyon taramasının yapılması yararlı olmaktadır (Şekil 18.). Tablo 8, 9 ve 10'da JAK2V617F mutasyonu ile ilişkilendirilmiş tanı kriterleri bulunmaktadır.



Şekil 18. ET tanı algoritması (132)

Tablo 9. Trombositozların nedenleri (134)

Primer Trombositoz	Reaktif Trombositoz
Esansiyel Trombositemi	Enfeksiyon
Polisitemia Vera	Doku Hasarı ve Tümör varlığı
İdiyopatik Miyelofibroz (belirgin)	Kronik enflamasyon
KML	Renal hastalıklar
Miyelodisplastik Sendrom	Kan kaybı
Akut Lösemi	Hemolitik anemi

Tablo 10. JAK2 mutasyonu ile beraber ET tanı kriterleri (10)

JAK2 mutasyonu pozitif ET
<ol style="list-style-type: none"> 1. Platetelet sayısı > 450x10⁹/L 2. JAK2 mutasyonu (+) 3. Başka myeloid kanseri olmayan (özellikle JAK2 pozitif PV, miyelofibroz veya miyodisplazi)

Tablo 11. JAK2 mutasyonu olmadığı durumda ET tanı kriterleri (10)

JAK2 mutasyonu negatif ET
(Tanılama için beş kriterin olması gerekli), (Trombosit eşiğinin JAK2 mutasyonu olmayan hastalarda değerlendirmesi uygundur.Reaktif trombositoz tanılmasının zorluğu ile birlikte MPH bozukluğu olmayan hastaların %2.5'inin trombosit sayısı normal değerinin üstünde olduğu unutulmamalıdır.)
A1. Trombosit sayısı bir ay arayla yapılan takipte en az $600 \times 10^9/L$
A2. JAK2 mutasyonu (-)
A3. BCR-ABL füzyon geninin olmaması
A4. Normal ferritin değeri ($20 \mu g/L$)
A5. Başka myeloid kanseri olmayan (özellikle JAK2 pozitif PV, miyelofibroz veya miyodisplazia)

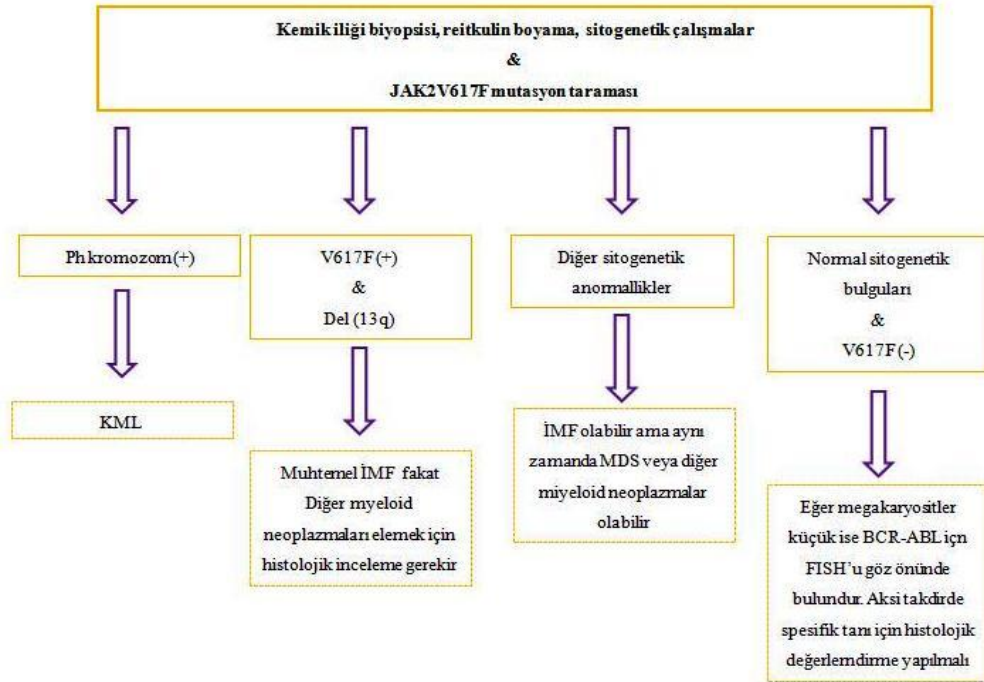
ET tanısının doğrulanması içi periferik yayma, kemik iliği histolojisi ve sitogenetik tarama gereklidir. Periferal kanda belirgin trombositosis ile karakterize olan prefibrotik İMF ile ET'yi ayırmak için periferal kanda ve kemik iliğinde proliferatif olmuş megakaryosit ve olgun megakaryositlerin artmış olması –fibroz oluşumu iliğin üçte birinden fazladır– gerekmektedir. JAK2 V617F mutasyonunun olmaması ET'yi elememektedir. ET'li hastalarının %4'ü MPL geninde mutasyon taşımaktadır (Tablo 12) (135, 136, 137, 138).

Tablo 12. 2008 WHO ET tanı kriterleri (132)

Esansiyel Trombositemi
(Bütün majör kriterler olmak zorunda)
<u>Majör Kriterler:</u>
1. PLT sayısının $450 \times 10^9/l^{-1}$'den yüksek olması ve devamlı yüksek seyretmesi, olgun ve büyük morfolojide megakaryosit profilerasyonu. Küçük granülosit ve eritrosit profilerasyonu ya da bu profilerasyonun olmaması
2. Olgun ve büyük morfolojide megakaryosit profilerasyonu. Küçük granülosit ve eritrosit profilerasyonu ya da bu profilerasyonun olmaması
3. WHO kriterlerine uymayan KML, PV, İMF veya diğer myeloid neoplazmalar
4. JAK2V617F mutasyonu ve diğer klonal belirteçlerin bulunmaması durumunda reaktif trombositozun olmaması

İdiyopatik Miyelofibrosis (İMF)

İMF miyeloid hücrelerin artmış klonal profilyasyonu – megakaryosit ve değişken maturasyonu ile karakterize MPH'dır (139). Diğer MPH'lardan görülen artmış hücre sayılarına karşın sitopenilerin görülmesiyle ayrılır (1). Hastalığın patogenezinde MPL mutasyon veya JAK2V617F mutasyon varlığı ET ile benzerdir. Fakat bu belirteçlerin yokluğu bir MPH'ı dışlamaz. (Tablo 13 ve Tablo 14.). Şekil 19'da İMF tanısı için takip edilen basamaklar verilmiştir.



Şekil 19. İMF tanı algoritması (132)

Tablo 13. JAK2 mutasyonu ile beraber İMF tanı kriterleri (10)

JAK2 mutasyonu pozitif İMF 1 ve 2. madde ile birlikte herhangi bir kriter (A,B,C,D,E,F) olmalı
1. Retikülin sınıf 3 veya sınıf 3 seviyesinden yüksek
2. JAK2 mutasyonu (+)
A. Elle hissedilen dalak büyümesi
B. Açıklanamayan anemi Hg < 11,5 g/L (kadın), < 10 g/L (erkek)
C. Periferik kan slaytında göz yaşı şeklinde kırmızı hücrelerin varlığı
D. Lökoeitroblastoz (Dolaşım kanında yüksek lökosit ve eritosiz varlığı), en az 2 çekirdekli kırmızı hücrelerin veya immatür myeloid hücrelerin varlığı
E. Sistemik semptomlar (gece terlemeleleri, %10'dan fazla kilo kaybı, yaygın kemik ağrıları)
F. Ekstramedüller hematopezde histolojik kanıt*

* Karaciğerde, lenf düğümlerinde, dalak ve kemik iliğinde miyeloid, eritroid ve megakaryositik serilerin ekstramedüller hematopoezi (miyeloid metaplazi) histopatolojik etkiler yapmaktadır. (118)

Tablo 14. JAK2 mutasyonu olmadığı durumda ET tanı kriterleri (10)

JAK2 mutasyonu negatif İMF (A1, A2, A3 ve diğer A kriterleriyle birlikte herhangi iki B kriteri olmalı)
A1. Retikulin sınıf 3 derecesi veya daha yükseği
A2. JAK2 mutasyonu (-)
A3. BCR-ABL füzyon geninin olmaması
B1. Elle hissedilen dalak büyümesi
B2. Açıklanamayan anemi Hg < 11,5 g/L (kadın), < 10 g/L (erkek)
B3. Periferik kan slaytında göz yaşı şeklinde kırmızı hücrelerin varlığı
B4. Lökoeitroblastoz (Dolaşım kanında yüksek lökosit ve eritosit varlığı), en az 2 çekirdekli kırmızı hücrelerin veya immatür myeloid hücrelerin varlığı
B5. Sistemik semptomlar (gece terlemeleleri, %10'dan fazla kilo kaybı, yaygın kemik ağrıları)
B6. Ekstramedüller hematopezde histolojik kanıt

Atipik İMF’de büyük megakaryositlerden daha küçük megakaryositler tarif edilir. Bunlar anormal nukleer/sitoplazmik oranı, hiperkromatik ve düzensiz nukleik katlanmalar gösterir. Bu katlanmalar retikülin ve kollajen – neoplastik megakaryositler ve monositlerden stimüle edilen fibroblastlar tarafından salgılanır (TGF β ve PDGF sitokinleri ile) – fibrosisi ile birlikte gerçekleşmektedir. Eritropoesiste sık sık azalma, granülositik proliferasyon, ilik selülaritesinde artma ile birlikte megakaryosit değişimleri ve retikulin fibrosisi olduğu zaman prefibrotik İMF’den şüphelenilir. Hastalığın ayırıcı tanısında miyelofibrozun nedenleri önemlidir (Tablo 15). Başka bir myeloid neoplazm için kriter ve KML’nin varlığını dışlamak için BCR-ABL olması gerekmektedir. İMF’nin tanısı için hissedilebilir dalak büyümesi, anemi, artmış serum LDH, lökoeritroblastosis minör kriterler olarak kullanılmaktadır (Tablo 16.) (1,134).

Tablo 15. Kemik İliğinde Fibroza Yol Açan Nedenler (1,134)

Habis Hastalıklar	Selim Hastalıklar
Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar (PV,ET, İMF)	Granümatöz Hastalıklar (Mikobakteri ve fungal infeksiyonlar, sarkaidoz)
Akut megakaryositik lösemi	Kemiğin Paget Hastalığı
Miyelofibroza giden miyedisplazi	Hipoparatiroidizm
Saçaklı hücreli lösemi	Hiper paratiroidizm
Akut lenfoblastik lösemi	Renal osteodistrofi
Multipl miyelom	Osteoporoz
Metastik karsinom	Vitamin D eksikliği
Sistemik mastositoz	Otoimmün hastalıklar (Sistemik lupus (SLE), sistemik skleroz)

Tablo 16. 2008 WHO ET tanı kriterleri (132)

İdiyopatik Miyelofibroz (Üç majör ve iki minör kriterin olması gerekli)
<u>Majör Kriterler:</u> <ol style="list-style-type: none">1. Megakaryosit proliferasyonunda artış ve retikülin kolajen fibroz beraberinde megakaryosit morfolojisinin değişikliğinin varlığı. Retikülün fibrozunun yokluğunda megakaryosit morfolojisindeki değişiklikle birlikte granülosit sayısının arttığı kemik iliği hücre sayısının gözlemlenmesi2. WHO kriterlerine uymayan KML, PV, İMF, MDS veya diğer myeloid neoplazmalar3. JAK2V617F mutasyonu ve diğer klonal belirteçlerin bulunmaması ile birlikte reaktif kemik iliği fibrozunun bulunmaması
<u>Minör Kriterler:</u> <ol style="list-style-type: none">1. Lökoeritroblastoz2. Artmış serum LDH (laktat dehidrogenaz)3. Anemi4. Elle hissedilen dalak büyümesi

GEREÇ ve YÖNTEMLER

ÖRNEKLEM GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Bu çalışmada 23.12.2009 – 11.02.2011 tarihleri arasında T.Ü.T.F Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran hastalarda tanısı Ph (-) MPH olan ve JAK2V617F mutasyonu bakılmış 44'ü kadın, 74'ü erkek olmak üzere 114 olgu seçildi. Çalışmaya dahil edilen olguların, belirtilen tarihler arasında başvurularının olması ve Ph (-) MPH tanısı almış olması dışında herhangi bir dışlama ölçütü kullanılmadı.

YÖNTEM

DNA İZOLASYONU

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D'ında QIAGEN EZ1 Advanced markalı cihaz ve EZ1[®] DNA Blood Kit markalı kitlerle 100 µl DNA izole edilmiştir.

MUTASYON TARAMASI

İzole edilen DNA'lar Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D'ında Corbett Research RG-6000 markalı real time cihazında FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) yöntemiyle İPSOGEN JAK2 MutaScreen[™] KİT Reference Scale markalı kitlerle mutasyon taraması yapılmıştır.

TAM KAN SAYIMI

Wbc, Hct, Hg, Plt düzeyleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda Beckman Coulter Analyzer LH 780 markalı cihaz ile orijinal kitleri kullanılarak ölçüldü.

Çalışmaya dahil edilen olgularımızın Wbc, Hct, Hg ve Plt değerleri ile JAK2 mutasyonu sonuçları retrospektif olarak tarandı. Olguların ortalama yaş, ortalama Wbc, Hct, Hg, ve Plt değerleri hesaplandı. Mutasyon taşıyanlar ve taşımayanlar olarak iki gruba ayrıldı.

Etik kurul onayı

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu tarafından, araştırmanın amacı, gerekçesi, gereç ve yöntemleri incelendikten sonra 09.03.2011 tarih ve 050.04.04-2231 sayılı belge (TÜBADK 2011-52 protokol kodlu, 06/20 nolu karar) ile onaylanmıştır. (Ek-1)

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirme için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim A.D'nda lisanslı SPSS 19.0 (seri no: 10240642) programı ile yapıldı. Olgularımıza ait değerlerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogrov Simirov ve Shapiro Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Çalışmada normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin analizinde non parametrik testlerden Mann-Whitney testi, kategorik değişkenlerin analizinde Ki-kare testi ve normal dağılım gösteren değerlerde ortalamaların karşılaştırılması için T-test uygulanmıştır. Testler %95'lik güven aralığında hesaplanmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada 44 ET, 64 PV, 6 İMF ön tanılı toplam 114 olgu incelenmiştir. Olgulara ait demografik bilgiler Tablo 17’de verilmiştir. Tüm olgular tarandığında mutasyon taşıyan olgular ile taşımayan olgular arasında Wbc (p:0,412), Hg (p:0,237), Hct (p:0,865) değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememişken, Plt değerinin mutasyonu pozitif olan olgularda yüksek seyrettiği bulundu (p:0,002). Hg değerinde ise ortalama olarak yüksek seyretmekte fakat istatistiksel olarak anlamlı ilişki kurulamamaktadır.

V617F mutasyonu taşıyan PV ön tanılı olgularda, mutasyon taşımayan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek Plt ve Wbc gözlemlenmiştir (p:0,000, p:0,008). V617F mutasyonu taşıyan ET ön tanılı olgularda, mutasyon taşımayan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek Hg ve Hct bulundu (p: 0,006, p: 0,001). İMF ön tanılı olguların sayısal yetersizliği nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. Tablo 17’de V617F mutasyonu pozitif olgularımıza ait taranan parametrelerin ortalamaları ile Tablo 18’de V617F mutasyonu negatif olgularımıza ait taranan parametrelerin ortalamaları sunulmaktadır.

Tablo 17 Olgulara ait yaş ve cinsiyet dağılımı

	Kişi Sayısı	Yaş aralığı (V617F(+)/-)	Cinsiyet Dağılımı (K/E)
Polisititemia Vera	64	17-85/43-82	19/45
Esansiyel Trombositoz	44	22-92/43-88	22/22
İdiyopatik Miyelofibroz	6	32-38/55-81	3/3

Tablo 18. V617F mutasyonu pozitif olgularımıza ait taranan parametrelerin ortalamaları

	Wbc	Hg	Plt	Hct	Yaş
Tüm olgular 53/114	12,64± 11,2 10 ³ /µl* (3,9–77,3)†	14,1 ± 3,01 gr/dl (4,41–19,20)	547,95 ± 311,43 10 ³ /µl (107,5–1876)	44,54 ± 9,3 % (21,3–77,3)	1947 ± 11 (1924–1969)
PV 23/64	13,57 ± 7,19 10 ³ /µl (6,1–39,2)	14,85 ± 3 gr/dl (6,8–19,2)	537,13 ± 374,7310 ³ / µl (182–1876)	47,61 ± 11,22 % (21,3–77,3)	1948 ± 11 (1930–1969)
ET 26/44	12,65 ± 14,27 10 ³ / µl (4,10–77,3)	13,72 ± 2,62 gr/dl (4,41–17,30)	6612,3 ± 230,1 10 ³ / µl (230–1270)	42,96 ± 4,85 % (30–51,1)	1946±12 (1924–1969)
İMF 4/6	7,25 ± 4,05 10 ³ / µl (3,9–13,9)	12,20 ± 4,83 gr/dl (8,30–19,10)	191,62 ± 60,74 10 ³ / µl (107,5–240)	37,15 ± 14,81 % (24,50–58,20)	1944 ± 11 (1931–1957)

* Ortalama değerler standart sapma ile birlikte verilmiştir.

† Parantez içerisindeki rakamlar (minimum değer- maksimum değer) olarak verilmiştir.

Tablo 19. V617F mutasyonu negatif olgularımıza ait taranan parametrelerin ortalamaları

	Wbc	Hg	Plt	Hct	Yaş
Tüm olgular 61/114	10,15± 4,66 10 ³ /µl* (2,40–29,20) †	14,82 ± 3,49 gr/dl (5,10–22,5)	469,92 ± 293,7 10 ³ /µl (18–100)	44,84± 12,18 % (18–100,2)	1961 ± 17 (1920-1995)
PV 41/64	9,57 ± 3,86 10 ³ / µl (2,4–22,8)	16,17 ± 3,18 gr/dl (5,1–22,5)	278,82 ± 154,48 10 ³ / µl (38–837)	48,95 ± 12,23 % (18–100,2)	1965± 15 (1927-1995)
ET 18/44	11,88 ± 5,89 10 ³ / µl (4,8–29,2)	12,11 ± 2,36 gr/dl (7,70–17,40)	697,53 ± 337,46 10 ³ / µl (8,7–1212)	36,55 ± 6,82 % (23,80–52,20)	1951± 18 (1920–1990)
İMF 2/6	64,5 ± 45,96 10 ³ / µl (32–97)	114 ± 12,72 gr/dl (105–123)	2345 ± 1873,83 10 ³ / µl (1020–3670)	351,5 ± 24,74 % (334–369)	1977 ± 42 (1974-1980)

* Ortalama değerler standart sapma ile birlikte verilmiştir.

† Parantez içerisindeki rakamlar (minimum değer- maksimum değer) olarak verilmiştir.

Olguların %46,5 (53/114)'inde V617F mutasyonu pozitif iken % 53,5 (61/114)'inde mutasyon negatif olarak saptandı. PV ön tanılı V617F mutasyonu taşıyan kadın olgular, V617F mutasyonu taşıyan erkek olgulardan istatistiksel olarak farklı tespit edildi. Buna göre PV ön tanılı mutasyon taşıyan kadın olgular PV ön tanılı mutasyon taşıyan erkek olgulardan istatistiksel olarak fazla olduğu tespit edilmiştir (p:0,036). ET ön tanısı alan ve V617F mutasyonu taşıyan kadın olgular, V617F mutasyonu taşıyan erkek olgulardan istatistiksel olarak farklı çıkmasada mutasyon sıklığı bakımından mutasyon taşıyan ET ön tanılı kadın olgular mutasyon taşıyan ET ön tanılı erkek olgulardan fazla çıkmıştır (p:0,125). İMF ön tanılı olgular sayısal yetersizliği nedeniyle değerlendirmeye alınmadı. Tablo 20, Tablo 21 ve Tablo 22'de olgularımızın tanı ve mutasyona göre cinsiyet dağılımları verilmiştir.

Tablo 20. PV tanılı olguların cinsiyet- mutasyon dağılımı

Polisititemia Vera	V617F (+)	V617F (-)
Kadın	11 (%57,9)	8 (%42,1)
Erkek	12 (%26,7)	33 (%73,3)

Tablo 21. ET ön tanılı olguların cinsiyet-mutasyon dağılımı

Esansiyel Trombositoz	V617F (+)	V617F (-)
Kadın	16 (%72,7)	6 (%27,3)
Erkek	10 (%45,5)	12 (%54,5)

Tablo 22. İMF ön tanılı olguların cinsiyet-mutasyon dağılımı

İdiyopatik Miyelofibroz	V617F (+)	V617F (-)
Kadın	3 (%100)	0
Erkek	1 (%33,3)	2 (%66,7)

Tüm olgular tanısal ve mutasyon sonuçlarına göre tarandığında ET ön tanısı almış olguların %40,9 (18/44)'unda mutasyon olmadığı, % 59,1 (26/44)'inde mutasyon olduğu, İMF ön tanısı almış olguların %33,3 (2/6)'ünde mutasyon olmadığı, %66,7 (4/6) mutasyon olduğu, PV ön tanısı almış olguların %64,1 (41/64)'inde mutasyon olmadığı, %35,9 (23/64)'unda mutasyon olduğu tespit edilmiştir. Tablo 23'de çalışmaya dahil edilen olgulardaki mutasyon sıklığı verilmiştir. Mutasyona sahip olma ile bu hastalıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p: 0,036). İMF ön tanısı almış olguların sayısının azlığı nedeniyle değerlendirmenin dışına çıkarıldığında, ET ön tanısı alan olgularda diğer olgulara göre daha sık mutasyon olduğu tespit edildi (p:0,018).

Tablo 23. Çalışmaya dahil edilen olgulardaki mutasyon sıklığı

	V617F (+)	V617F (-)
Tüm olgular	%46,5 (53/114)	% 53,5 (61/114)
PV	%64,1 (41/64)	%35,9 (23/64)
ET	% 59,1 (26/44)	%40,9 (18/44)
İMF	%66,7 (4/6)	%33,3 (2/6)

TARTIŞMA

Kronik miyeloproliferatif hastalıklar hematopoetik kök hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla ortaya çıkan klonal hastalıklardır (1). Bu hastalıklar, birbirleriyle fenotipik olarak ilişkili olan PV, ET, İMF (bcr/ abl negatif) olarak tanımlanmışlardır (140).

Yapısal olarak aktif tirozin kinaz olan JAK2, ligand varlığında (Epo,Tpo v.b) JAK-STAT sinyal yolağını kullanarak EpoR veya MPL'ye bağlanarak hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonunu sağlamaktadır (125).

2005 yılında MPH tanılı hastalarda JAK2 V617F mutasyonunun tespit edilmesi bu hastalıkların genetik temellerine ait bilgilerin artmasına neden olmuştur (141). Mutasyon JAK-STAT sinyal yolunun sürekli aktivasyonuna neden olur. Böylece hematopoetik hücrelerinin uyarın gelmeden klonal proliferasyonuna neden olur. PV'lı hastaların tamamına yakınında, ET ve İMF'li olguların ise yaklaşık yarısında bu mutasyonun tespiti kronik MPH hastalıklarının tanı kriterlerinin tekrar gözden geçirilmesine neden olmaktadır. Tablo 20'de 2005 yılından itibaren mutasyon sıklığını araştıran çalışmalardan örnekler gösterilmektedir.

Tablo 24. Miyeloproliferatif hastalıklarda mutasyon sıklığı

Çalışma grubu	PV	ET	İMF
Baxter ve ark. (2) (İngiltere)	73 PV %97	51 ET %57	16 İMF %50
Levine ve ark. (11) (Boston)	164 PV %74	115 ET %32	46 İMF %35
James ve ark. (5) (Fransa)	45 PV %89	21 ET %43	7 İMF %43
Knalovics ve ark. (6) (İsviçre- İtalya)	128 PV %65	93 ET %23	23 İMF %57
Changchun- Nashville (7) (Changchun)	24 PV %80	-	-
Jones ve ark. (108)	72 PV %81	59 ET %41	35 İMF %43
Jelinek ve ark. (142)	%86 PV	%95 ET	% 30 İMF
Maliterno ve ark. (143) (2006)	92 PV %92	84 ET %45	19 İMF %42
Zhang ve ark. (144) (Çin-2007)	23 PV %70	40 ET %45	8 İMF %37
2007'de Çin (145) (Başka bir çalışma)	57 PV %73,7	68 ET %58,8	12 İMF %66,7

PV hastalarında V617F mutasyonunun görülme sıklığı ~ %95'dir (145). Yapılan çalışmalarda V617F mutasyonu negatif olan PV hastalarında (\geq %5) JAK2 ekson 12 mutasyonu ile Pikman ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada 45 JAK2 V617F negatif İMF hastasının 4'ünde MPL geninde mutasyon tespit edilmiştir. 2006 yılında JAK2 V617F negatif İMF hastalarında 2 yeni MPL somatik mutasyon (MPL W515L (%5), MPL W515L (%1) bulunmuştur (146). Çalışmaların hassaslaşması ile birlikte bu oranın %83'e kadar arttığı bildirilmiştir (137). Bu bilgilere göre PV hastalarında bir JAK2 mutasyonu mevcut olmakla birlikte V617F negatif olgularda tespit edilememiş mutasyonların olduğu açıktır. Konan ve arkadaşlarının PV'lı hastalarla yaptığı bir çalışmada sekonder eritrositozlu hastalarda mutasyon tespit edilememiş olmaları V617F mutasyonunun ayırıcı tanındaki rolünü göstermektedir. Bu sebeplerle 2008 yılında mutasyon varlığı DSÖ tarafından majör tanı kriterlerine alınmıştır. (147)

Çalışmamızda ön tanısı PV olan 64 olgunun 23'ünde (%35,9) V617F mutasyonu tespit edildi. Bu bilgiler ışığında çalışmamızdaki mutasyon sıklığının literatürle paralel olmamasını, PV'lı olgularının yeterli sayıda olmamasına ve V617F mutasyonu negatif olan olgularda ekson 12 mutasyonlarının var olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca 169 PV hastasında yapılan bir çalışmada V617F mutasyon oranının % 32 çıkması bu durumu destekler niteliktedir (134). PV ile kliniği benzer olan hastalıklar karşısında hekim eğer diğer hastalık olasılıklarını indirmek yerine PV tanısını güçlendirmek için mutasyon taramasını istemişse PV ön tanılı hastalarımızdaki mutasyon sıklığı bundan kaynaklanıyor olabilir. Fakat bu durum sonuçlarımızdaki farkı açıklamak için yeterli gözükmemektedir.

ET'lu hastalarda yapılan çalışmalarda mutasyon sıklığının %23 ile % 75 arasında değiştiği tespit edilmiştir (135–148, 6–107, 149). Çalışmamızda ön tanısı ET olan 44 olgunun 26'sında (%59,1) V617F mutasyonu tespit edildi. Sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur.

İMF'de mutasyonun varlığı ile yokluğu PV ve ET ile ayırıcı tanısında dikkate değer katkı sağlamasada tedavi sonrasında hastalığın tekrarının kontrolünde yarar sağlamaktadır (150). İMF ön tanısıyla çalışmaya alınan 6 hastanın 4'ünde (%66,7) mutasyon saptandı. Literatürle karşılaştırdığımızda 2007'de Çin'de yapılan bir çalışmayla (145) örtüşmekte fakat olgu sayımızın yeterli olmaması anlamlı değerlendirmeler yapmamız için yeterli görülmemektedir.

Yapılan çalışmalarda JAK2 V617F mutasyonu görülen hastalarda yüksek oranda Hct, Hg, Wbc değerleri görülmüştür (138, 151, 149). Bizim çalışmamızda mutasyonu olan olgular ile olmayan olguların değerleri karşılaştırıldığında Wbc (p:0,412), Hg (0,237), Hct (0,865) değerlerinde mutasyon olan grupla olmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir. Ortalama değerlerine baktığımızda mutasyon taşıyan olgularda Wbc değeri yüksektir. Ortalama Hg değeri ise mutasyon olmayan grupta daha yüksek saptandı. Plt değeri bakımından karşılaştırdığımızda mutasyonu pozitif olan hastalarda Plt değeri istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek çıkmıştır (0,002).

PV hastalarında JAK2 V617F mutasyonunun çalışmaya katılan hastalar üzerindeki klinik durumlarını inceleyen Vanucci ve arkadaşları mutasyon olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek Hct ve Wbc tespit etmişlerdir (152). Çalışmamızda V617F mutasyonu taşıyan PV ön tanılı olgularımızda literatürle uyumlu istatistiksel olarak anlamlı Wbc (p:0,008) tespit edilmişken Hct değeri açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

ET hastalarında JAK2 V617F mutasyonunun klinik özelliklere etkisini araştıran Antonioli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Hg ve Wbc seviyelerinin daha yüksek ve Plt değerinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir (153,154). Yapılan diğer çalışmalarda V617F mutasyonu pozitif olan ET hastalarında yüksek Hg ve Hct bulunmuştur (126, 155, 156). Çalışmamızda V617F mutasyonu pozitif olan ET ön tanılı olgularda ortalama olarak yüksek Hg (p:0.006) bulundu. Hg yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Hct değeri ortalama olarak yüksek bulunmuş olsa da istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır (p:0,121). Benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında çalışmamızdaki verilerin literatürle uyumlu çıkmaması olgu sayısının az olması, yeterli klinik endikasyonların kullanılamaması, mutasyon taşıyan olguların taşımayanlara göre daha az olması gibi nedenleri düşündürmektedir.

2005 yılında yapılan bir çalışmada histolojik değerlendirmeler ve yüksek Hg varlığı ile V617F mutasyonu olan ET hastalarının PV fenotipi sergiledikleri bulunmuştur (127). Ayrıca 9.kromozomun mitotik rekombinasyonu ile homozigot V617F kazanımı PV fenotipine yol açmaktadır (5, 115, 116). Bir diğer çalışmada V617F mutasyonu olan ET hastalarına göre Epo, ferritin değerlerinde V617F negatif hastalara göre daha düşük değerler tespit edilmiştir (126).

Bizim çalışmamızda V617F mutasyonu olan ET ön tanılı olgularda istatistiksel olarak anlamlı yüksek Hg bulunmuştur. Çalışmamızda V617F mutasyonu taşıyan yeterli ET olgusu sağlanamaması, çalışmaya katılan olguların histolojik değerlendirmelerinin alınmaması ve sadece mutasyon var ya da yok şeklinde değerlendirme yapılması nedeniyle yüksek Hg seviyesi V617F mutasyonu olan ET'li olgularımızın PV fenotipi sergilediği yönünde yeterli kanıt olmamaktadır.

Yapılan çalışmalarda kadın ve erkek hastalar arasında JAK2 mutasyonu varlığı açısından bir ilişki tespit edilmemiştir (76–148,149–152,157). PV ön tanılı V617F mutasyonu taşıyan kadın olgular, V617F mutasyonu taşıyan erkek olgulardan istatistiksel olarak farklı tespit edildi. Buna göre PV ön tanılı mutasyon taşıyan kadın olgular PV ön tanılı mutasyon taşıyan erkek olgulardan istatistiksel olarak fazla olduğu tespit edilmiştir. ET ön tanısı alan ve V617F mutasyonu taşıyan kadın olgular, V617F mutasyonu taşıyan erkek olgulardan istatistiksel olarak farklı çıkmasada mutasyon sıklığı bakımından mutasyon taşıyan ET ön tanılı kadın olgular mutasyon taşıyan ET ön tanılı erkek olgulardan fazla çıkmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı çıkmaması olgu sayısının yeterli olmamasından kaynaklandığını düşündürmektedir. İMF ön tanılı olgular sayısal yetersizliği nedeniyle değerlendirmeye alınmadı.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran hastalarda yaptığımız çalışmada JAK2 V617F nokta mutasyonunu tarayarak PV, ET ve İMF ön tanılı olgularda mutasyonun ön tanıya katkısı, etiyojisi, nokta mutasyonla hastalık ilişkisinin değerlendirilip fenotip-genotip ilişkisinin retrospektif bir değerlendirme ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda bu araştırmada elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir;

1. Çalışmamızda mutasyon taşıyan ve taşımayan olguların Wbc, Hg, Plt ve Hct değerleri karşılaştırıldığında Wbc (p:0,412), Hg (0,237), Hct (0,865) değerleri mutasyon taşıyan grupla taşımayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir. Plt değeri bakımından karşılaştığımızda mutasyon taşıyan olgularda Plt değeri istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek çıkmıştır (0,002).
2. V617F mutasyonu pozitif olan PV ön tanılı olgularda mutasyonu taşımayan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek Plt ve Wbc gözlemlenmiştir (p:0,000, p:0,008).
3. V617F mutasyonu pozitif olan ET ön tanılı olgularda negatif olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek Hg ve Hct bulundu (p: 0,006, p: 0,001).
4. Çalışmamızda 64 PV ön tanılı hastaların 23'ünde (%35,9), 44 ET ön tanılı hastaların 26'sında (%59,1), 6 İMF ön tanılı hastaların 4'ünde %66,7 JAK2 V617F mutasyonu saptanmıştır.

5. Çalışmamızda olgularımıza ait değerlerin ve mutasyon sıklığının literatürle paralel olmamasını;

- a. Keşfedilmemiş başka mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.
- b. MPH tanısında kullanılan kriterlerin hekime göre şekillenmesi ve sınırlı olması
- c. Mutasyonu saptamak için kullanılan yöntemlerin farklı olması
- d. Mutasyon taşıyan olgularımızın çalışmamız genelinde sayılarının az olması
- e. Endikasyon kriterlerinin zayıf kalması
- f. DSÖ'nün koyduğu kriterlerin takip edilememesi
- g. Hastaların kısa izlem sürelerine sahip olması
- h. Retrospektif çalışma olması
- i. Hasta sayısının yeterli olmaması şeklindeki nedenlerle açıklayabiliriz.

6. Hekimin MPH şüpheli olguları mutasyon yokluğunu kanıtlayarak elemeye çalışması ve bunu yaparak diğer olası tanıları dikkatten kaçırması hastalık seçeneklerini indirgemektedir. PV gibi mutasyonla ilişki olguları elemek için mutasyon yokluğunu tespit etmeye çalışmaktadır. Bu durumda hastanın ön tanısı PV olmaktadır. Fakat netleşmeyen kriterler kalmaktadır. Bu olgular çalışmaya alındığı zaman yüksek oranda negatif çıkmaktadır. Bu da mutasyona sahip olmayan PV ön tanılı hastaların sayısını artırmakta ve mutasyonu var olan hastaların toplam hasta sayısı içerisindeki sıklığını düşürmektedir. Bu da PV'li hastalarımızda JAK2 V617F pozitif sıklığının toplam hastalara oranla ve literatürle uyumlu olmamasını açıklayabilmektedir.

7. Literatürde 9.kromozomda ilgili gen bölgelerinde farklı mutasyonların varlığına değinilmiştir. Ekson 12 mutasyonu JAK2 V617F negatif PV mutasyonlarında gösterilmiştir. Bu açıklamaya göre bizim çalışmamızda negatif PV olgularında farklı bir mutasyonun olabileceği ve hemen hemen tüm PV'li hastalarda mutasyon tespit edilebileceğini düşündürmüştür. Klonal hematopoezin görülmesi farklı mutasyonların varlığını düşündürmektedir. Bu yüzden etiyolojik açıdan değerlendirme yapmak doğru olmayacaktır. Daha net bir netice almak için izlem süresinin daha uzun olması ve daha fazla hasta sayısına sahip olan çok merkezli çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu yüzden daha geniş bir çalışma yapılması gerekmektedir.

ÖZET

BCR/ABL negatif Kronik Miyeloproliferatif hastalıklar (KMPH), fenotipik kusur ve herhangi bir uyarıcı olmadan mutant multipotent kök hücrelerin proliferasyonunun artışıyla tanımlanır.

Sitoplazmik tirozin kinaz kodlayan JAK2 geninde, V617F nokta mutasyonunun bulunmasıyla hastalıkların patogeneğinde sitokinden bağımsız JAK2 aktivasyonu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu aktivasyon Polisitemia Vera hastalarında %95-97 oranında, Esansiyel Trombositoz hastalarında %23-27 oranında, İdiyopatik Miyelofibroz hastalarında %43-47 oranında rapor edilmiştir. Mutasyonun tespiti MPH'ın patogeneğinin merkezinde bir kriter olarak ileri düzeyde anlaşılmasına önemli bir katkıda bulunmaktadır.

Bu amaçla, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran PV, ET, İMF ön tanısı almış hastalarda retrospektif değerlendirme ile JAK2 geni V617F nokta mutasyonunun fenotip-genotip ilişkisi ile ayırıcı tanıdaki rolünün tespiti amaçlandı.

Çalışmada Polisitemia Vera ön tanılı 64, Esansiyel Trombositoz ön tanılı 44 ve İdiyopatik Miyelofibroz ön tanılı 6 hasta olmak üzere toplam 114 olguda yaş, lökosit, hematokrit, hemoglobin ve trombosit değerleri ile JAK2 mutasyonu sonuçları retrospektif olarak tarandı. Olgular, mutasyon taşıyanlar ve taşımayanlar olarak iki gruba ayrıldı. Mutasyon sıklığı ve tam kan sayım parametreleri açısından SPSS 19.0 programı ile değerlendirildi.

Mutasyon sıklığı Polisitemia Vera ön tanılı olgularda % 35,9, Esansiyel Trombositoz ön tanılı olgularda %59,1 ve İdiyopatik Miyelofibroz ön tanılı olgularda %66,7 olarak bulundu.

PV ön tanılı olgularda mutasyon taşıyan kadın olgular, mutasyon taşıyan pozitif olgulardan anlamlı olarak yüksek çıktı (p: 0,036). ET ön tanılı olgularda sayısal yetersizlik nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı çıkmasada mutasyon taşıyan kadın olgular mutasyon taşıyan erkek olgulardan fazladır (p: 0,125).

Mutasyon taşıyan olgular ile taşımayan olgular arasında lökosit (p:0,412), hemoglobin (0,237), hematokrit (0,865) değerleri arasında anlamlı fark çıkmadı. V617F mutasyonu taşıyan Polisitemia Vera ön tanılı olgularda V617F mutasyonu yüksek lökosit (p:0,008) ile ilişkili olduğu saptandı. Hematokrit değeri açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir. V617F mutasyonu pozitif olan Esansiyel Trombositoz ön tanılı olgularda anlamlı yüksek hemoglobin (p:0.006) bulundu. İMF ön tanılı olgular sayısal yetersizlik nedeniyle değerlendirilmeye alınmadı.

Sonuç olarak, endikasyon kriterlerinin daha dikkatli kullanımı ile Polisitemia Vera için JAK2 V617F mutasyonu ayırıcı tanıda etkin rol oynamaktadır. Esansiyel Trombositoz ve İdiyopatik Miyelofibroz tanıları için JAK2 V617F mutasyonu değerlendirme kriterlerinin içerisinde yer almalıdır. Yaş, cinsiyet gibi demografik kriterler ve hastalık hikayesi gibi etkenlerinde dahil edildiği daha geniş bir çalışma yapılması zorunlu hale gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: JAK2V617F mutasyon, Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar, Polisitemia Vera, İdiyopatik Miyelofibroz, Esansiyel Trombositemi

**CORELATING THE PHENOTYPE-GENOTYPE RELATION OF THE
PATIENTS WHICH HAVE APPLIED TO TÜTF HEMATOLOGY
DEPARTMENT BY COURTESY OF THE JAK2 MUTATION ANALYSIS**

SUMMARY

BCR/ABL negative Chronic Myeloproliferative Diseases are identified by increasing of proliferation of multipotent stem cells without phenotypic defects or any stimuli.

In the pathogenesis of the diseases, cytokine-independent JAK2 activation was detected by the identification of V617F mutation on cytoplasmic tyrosine kinase coding JAK2 gene. According to recent studies, this activation is reported as 95-97% in Polycythemia Vera, 23-27% in Essential Thrombocytosis, 43-47% in Idiopathic Myelofibrosis. Identification of V617F mutation, provides an advanced level for understanding the pathogenesis of Chronic Myeloproliferative Disease why because it's in the central of the pathway.

The aim of the present work is researching the incidence of V617F mutation on JAK2 gene of clinically Polycythemia Vera, Essential Thrombocytosis or Idiopathic Myelofibrosis diagnosed patients which applied to Trakya University, Hematology Department. Also, the study aims defining the genotype-phenotype relation of V617F mutation of JAK2 gene.

64 patients with Polycythemia Vera pre-diagnosis, 44 patients with Essential Thrombocytosis pre-diagnosis and 6 patients with Idiopathic Myelofibrosis pre-diagnosis were included to the present work.

Age, leukocyte, hematocrit, hemoglobin and thrombocyte values of whole 114 patients were scanned retrospectively and compared with the JAK2 mutation incidence. Two distinct groups were defined; as the first patients with JAK2 mutation and the second patients without JAK2 mutation. The frequency of JAK2 mutation and complete blood count parameters were statistically studied with using SPSS 19.0 software. The frequency of JAK2 mutation is detected as; 35.9% in the Polycythemia Vera prediagnosed patients, 59.1% in the Essential Thrombocytosis prediagnosed patients and 66.7% in the Idiopathic Myelofibrosis prediagnosed patients.

The mutation incidence in the female patients which are prediagnosed with PV is detected significantly higher than the whole mutation positive male patients (p: 0,036). Even the results are not statistically significant due to a quantitative insufficiency, in ET prediagnosed cases, number of female patients which have the mutation is higher than the male patients (p: 0.125)

Leukocyte (p:0,412), hemoglobin (p:0,237), hematocrit (p:0,865) values were not significantly different in the cases with/without the mutation. In Polycythemia Vera prediagnosed patients, V617F mutation is detected as high leukocyte-related (p:0,008). Hematocrit levels are not significantly different in both cases. Our data indicates that V617F positive Essential Thrombocytosis patients have high hemoglobin (p:0.006) levels. The analysis results of Idiopathic Myelofibrosis patients were not included in the evaluation due to quantitative insufficiency. Myelofibrosis patients are not significant because of not having enough pre-diagnosed patient.

In conclusion, JAK2 V617F mutation analysis can be used as a diagnosis indicator for Polycythemia Vera. JAK2 V617F mutation analysis should be included in the evaluation criterias for Essential Thrombocytosis and Idiopathic Myelofibrosis. A further study including anamnesis and demographic criterias such as gender, age, etc. should be done for more significant results

Keywords: JAK2V617F mutation, Chronic myeloproliferative disorders, Essential thrombocythemia, Idiopathic Myelofibrosis, Polycythemia vera

KAYNAKLAR

1. Kern WF. PDQ Hematoloji (çeviri: B. Ferhanoğlu). İstanbul Medikal Yayıncılık; 2004. s.255–78.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S ve ark. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative diseases. *Lancet* 2005;(9464):1054–61.
3. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1981;58(5):916–919
4. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: A clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 1978;51(2):189–194.
5. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C ve ark. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005. 434(7037):1144–1148
6. Kralovics R ve ark. A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779–90.
7. Darnell JE Jr. STATs and gen regulation. *Science* 1997;277:1630–35
8. Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, Vonderlinden D, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys* 2004;41:207–32.
9. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285:1–24.

10. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2006;355(23):2452–66.
11. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005;7:387–397.
12. Stevan R, Hubbard and Jeffrey H. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem* 2000;69:373–98.
13. Rodrigues GA, Park M. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1994;4:15–24
14. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997;88:333–46
15. Wilks A.F. Two putative protein tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86: 1603-1607
16. Sun H, Tonks NK. The coordinated action of protein tyrosine phosphates and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci.* 1994;303:1800–5.
17. Blume Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355–65.
18. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211–25.
19. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 2002;38(Suppl 5):3–10.
20. Flanagan JG, Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998;21:309–45
21. Holland SJ, Peles E, Pawson T, Schlessinger J. Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Curr. Opin. Neurobiol* 1998;8:117–27
22. Doğan A.L, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Derg.* 2004;35:34-42
23. Sushil G, Rane and E Premkumar. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Reddy Oncogene* 2000;19:5662–79.
24. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JAK2&search=JAK2> 22.09.2011
25. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, ET Holt V, Silvennoinen O, O’Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biology* 2004;5:253.
26. Candotti F, et al. Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 1997;90:3996–4003.

27. Chen M, et al. Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains. *Mol Cell Biol* 2000;20:947–56.
28. <http://clementsgen677s11.weebly.com/> 22.09.2011
29. Kuriyan J, Cowburn D. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1997;26:259–88.
30. Staerk J, Kallin A, Demoulin J.B, Vainchenker W and Constantinescu S. N. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. *J. Biol. Chem.* 2005;280:51:41893–41899.
31. Zhou YJ, Chen M, Cusack NA, Kimmel LH, Magnuson KS, Boyd JG, et al. Unexpected effects Of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. *Mol Cell* 2001;8:959–69.
32. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001;13:211–17.
33. Kohlhuber F, Rogers NC, Watling D, Feng J, Guschin D, Briscoe J, et al. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:695–706.
34. Girault JA, Labesse G, Mornon JP, Callebaut I. Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol. Med.* 1998;4:751–69.
35. Yeh TC, Dondi E, Uze G, Pellegrini S. A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:8991–96.
36. Velazquez L, Mogensen KE, Barbieri G, Fellous M, Uze G, Pellegrini S. Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of Interferon-a/b and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1995;270:3327–34.
37. Leonard W, O’Shea JJ. JAKS and STATS: Biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:293–322.
38. Vainchenker W, Dusa A, Stefan N. JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Constantinescu Seminars in Cell & Developmental Biology* 2008;19:385–93.
39. Yılmaz Ö, Turgay N. Sitokin ilişkili hücre içi sinyal iletimi ve parazitler. *Türkiye Parazitoloji Derg* 2009;33(4):301–6.
40. Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, et al. Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* 2000;13:561–71.

41. Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler H, Pircher H, et al. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity* 2000;13:549–60.
42. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, et al. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998;93:373–83.
43. Sternberg DW, Gilliland DG. The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. *Clin Oncol* 2004;22:361–71.
44. Levy D.E and Darnell JE. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature* 2002;3
45. Azam M, Erdjument Bromage H, Kreider BL, Xia M, Quelle F, Basu R, et al. Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *EMBO J* 1995;14(7):1402–11.
46. Fu XY, Schindler C, Improta T, Aebersold R. and Darnell JE. The proteins of ISGF-3: The interferon α -induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1992;89:7840–7843.
47. Schindler C, Shuai K, Prezioso V, Darnell JE. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 1992;257(5071):809–13.
48. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT5A&search=STAT5a>
26.09.2011
49. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 1997;11:167–78.
50. Teglund S, McKay C, Schuetz E, VanDeursen JM, Stravopodis D, Wang D, et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential roles and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998;93:841–50.
51. Stoecklin E, et al. Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:6708–16.
52. Piazza F, Valens J, Lagasse E, Schindler C. Myeloid differentiation of FdCP1 cells is dependent on Stat5 processing. *Blood* 2000;96:1358–65.
53. Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE and Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 1998;93:827–839.
54. http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n9/fig_tab/nrm909_F3.html#figure-title
26.09.2011

55. Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE. DNA binding of in vivo activated Stat1 a, Stat1 b and truncated Stat1: Interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J.* 1996;15:5616–26.
56. Yamashita H, Xu J, Erwin RA, Farrar WL, Kirken RA, Rui H. Differential control of the phosphorylation state of proline-juxtaposed serine residues Ser725 of Stat5a and Ser730 of Stat5b in prolactin-sensitive cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273:30218–24.
57. http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n9/fig_tab/nrm909_F3.html#figure-title
26.09.2011
58. Begitt A, Meyer T, Van Rossum M, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:10418–23.
59. Zhang T, Kee WH, Seow KT, Fung W, Cao X. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:7132–39.
60. McBride KM, McDonald C, Reich NC. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J.* 2000;19:6196–206.
61. Yang E, Wen Z, Haspel RL, Zhang JJ, Darnell Jr JE. The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19:5106–112.
62. Gupta S, Yan H, Wong LH, Ralph S, Krolewski J, Schindler C. The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals. *EMBO J.* 1996;15:1075–84.
63. Horvath CM. *STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals.* Elsevier. 2000;25
64. Azam M, et al. Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing. *Immunity* 1997;6:691–701.
65. O'Brien KB, O'Shea JJ, Carter Su C. SH2-B family members differentially regulate JAK family tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 2002;277:8673–81.
66. Zeidler MP, Bach EA, Perrimon N. The roles of the Drosophila JAK/STAT pathway. *Oncogene* 2000;19(21):2598–606.
67. Verstovsek S. Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. *Hematology Am Soc Hematol* .2009;636-42
68. *Receptor Tyrosine Kinases and Targeted Cancer Therapeutics* Takeuchi K and Ito F. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34(12):1774–1780

69. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003;101:2940–54.
70. Doye V, Hurt E. From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9:401–11.
71. Sekimoto T, Nakajima K, Tachibana T, Hirano T, Yoneda Y. Interferon-g-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J. Biol. Chem.* 1996;271:31017–20.
72. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997;90:1051–60.
73. http://www.nature.com/nri/journal/v6/n8/fig_tab/nri1885_F2.html 01.10.2011
74. Schindler C, Brutsaert S. Interferons as a paradigm for cytokine signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999;55:1509–22.
75. Kessler DS, Levy DE, Darnell J. Two interferon-induced nuclear factors bind a single promoter element in interferon-stimulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:8521–25.
76. Decker T, Kovarik P, Meinke A. GAS elements: A few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 1997;17:121–34.
77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK14010/> 01.10.2011
78. Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol.* 2001;70(3):348–56.
79. Krebs DL, Hilton D.J. SOCS Proteins: Negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 2001;19:378-387.
80. Liu B, Gross M, Ten Hoeve J, Shuai K. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3203-7.
81. Liu B, Yang R, Wong KA, et al. Negative regulation of NF-kappa B signaling by PIAS1. *Mol Cell Biol* 2005;25:1113–23.
82. Shuai K. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell* 2006;16:196-202
83. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 2004;117(Pt8):1281–83.
84. Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin Jr WG, Conaway RC, et al. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev.* 1998;12:3872–81.

85. Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:2071–6.
86. Wormald S and Hilton D.J. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(2):821–824.
87. Jackson PK. A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev* 2001;15(23):3053–58.
88. Rogers RS, Horvath CM, Matunis MJ. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem* 2003;278(32):30091–97.
89. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;19:2628–37.
90. Visconti R, Gadina M, Chiariello M, Chen EH, Stancato LF, Gutkind JS, et al. Importance of the MKK6/p38 path-way for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood* 2000;96:1844–52.
91. Beuvink I, Hess D, Flotow H, Hofsteenge J, Groner B, Hynes NE. Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland, and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated in vitro DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 2000;275:10247–55.
92. Yi T, Mui AL, Krystal G, Ihle JN. Hematopoietic cell phosphatase associates with the IL-3 receptor β chain and down-regulates IL-3 induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 1993;13:7577–86.
93. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish, H.F., Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995;80:729–38.
94. Yu CL, Jin YJ, Burakoff SJ. Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J. Biol. Chem.* 2000;275:599–604.
95. Irie Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 2001;409:349–54.
96. Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the Jak/Stat Pathway O’Shea, J. J, Gadina M, Schreiber R.D. *Cell* 2002;109:121–S131.
97. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20:3387–95.

98. Lucet IS, Fantino E, Styles M, et al. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood* 2006;107:176–83.
99. Boggon TJ, Li Y, Manley PW, Eck MJ. Crystal structure of the Jak3 kinase domain in complex with a staurosporine analog. *Blood* 2005;106:996–1002.
100. Lindauer K, Loerting T, Liedl KR, Kroemer RT. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng.* 2001;14:27–37.
101. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106:3377–79.
102. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106:1207–9.
103. Frohling S, Lipka DB, Kayser S, et al. Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. *Blood* 2006;107:1242–3.
104. Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Moller P. Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 2006;20:157–8.
105. Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005;280:22788–92.
106. Dusa A, Staerk J, Elliott J, et al. Substitution of pseudokinase domain residue V617 by large non-polar amino acids causes activation of JAK2. *J Biol Chem.* 2008;283:12941–8.
107. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 108:1865–7.
108. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106:2162–8.
109. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007;110:840–6.
110. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theoharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:1686–9.

111. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 2009;41:446–9.
112. Jatiani S.S, Baker S.J, Silverman L.R and E. Reddy P. JAK/STAT Pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer* 2011;1(10) 979-993
113. Adamson J.W, Fialkow P.J, Murphy S, Prchal F. and Steinmann L. Polycythemia Vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976; 295:913-916
114. Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:6848–52.
115. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005;106:3374–6.
116. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F JAK2 mutation occur in most patients with polycythemia vera but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006;108:2435–7.
117. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2002;30:229–36.
118. Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargın D, Nalçacı M, Aktan M, ve ark. *Klinik Hematoloji.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003. S.238-53.
119. Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58(4):1468–71.
120. Fialkow PJ, Denman AM, Jacobson RJ, Lowenthal MN. Chronic myelocytic leukemia: Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. *J Clin Invest* 1978;62(4):815–23.
121. Dickstein JI, Vardiman JW. Hematopathologic findings in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol* 1995;22:355–73.
122. Tefferı Y and Gilliland G. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders status report and immediate implications for disease Classification and Diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2005;80(7):947-958
123. Cario H, et al. The JAK2V617F mutation is acquired secondary to the predisposing alteration in familial polycythaemia vera. *Br. J. Haematol.* 2005;130:800–1.
124. Bellanne Chantelot C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:346–52.

125. Levine R.L., Pardanani A, Tefferi A and Gilliland D.G . Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature* 2007; 7
126. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366:1945–53.
127. Campbell PJ, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood* 2006;108:3548–55.
128. Theocharides A, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2 -V617F mutation. *Blood* 2007;110:375–9.
129. Levine R.L.and Gilliland D.G. Myeloproliferative disorders *Blood*. 2008;112:2190-2198
130. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *Blood* 2011;12;117(19):5019-32
131. Verstovsek S, Silver RT, Cross NC, Tefferi A. JAK2V617F mutational frequency in polycythemia vera: 100%, [90%, less? *Leukemia* 2006;20:2067.
132. Tefferi A and Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point of care diagnostic algorithms *Leukemia* 2008;22:14–22.
133. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and sec-ondary polycythaemia. *Br J Haematol*. 2005;131:166–71.
134. Yenmiş G. Jak2 mutasyonlarının kronik miyeloproliferatif hastalık ayırıcı tanısındaki önemi (tez). İstanbul: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2010.
135. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–6.
136. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, Burkle D, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2009;94:141–4.
137. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Gue-rini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 2008;112:844–7.

138. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* 2007;109:2279–84.
139. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000; 342:1255-1265
140. Mesa RA. Navigating the evolving paradigms in the diagnosis and treatment of myeloproliferative disorders. *Hematology* 2007;355–62.
141. Hsu HC. Pathogenetic role of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Chin Med Assoc.* 2007;70:89–93.
142. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prehal JT, Verstovsek S: JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005;06(10):3370–3.
143. Moliterno AR, Donna MW, Ophelia R, Spivak JL. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. *Blood* 2006;108(12):3913–15.
144. Zhang SJ, Li WD, Song JH, Xu W, Qiu HX, Li JY. The investigation of JAK2 V617F point mutation in myeloproliferative disorders by allele-specific polymerase chain reaction in combination with sequence analysis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007;87(30):2109–12.
145. Fei HR, Zhang R, Chen SN, Pan JL, Cen JN, Xue YQ. The clinical implication of JAK2 mutation expression in patients with myeloproliferative disorders. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2007;46(4):271-3.
146. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007;110:1092–7.
147. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, 2006;3(7):e270.
148. Kozan S, Güran Ş, Bahçe M, Kaplan K, ve ark. Kronik myeloproliferatif hastalık ve miyelodisplastik sendrom olgularında Jak 2 V617F mutasyonu. *Gülhane Tıp Derg* 2009;51:137–40.
149. Cheung B, Radia D, Pantelidis P, et al. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2006;132:244–45.

150. Speletas M, Katodritou E, Daiou C, et al. Correlations of JAK2–V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Res.* 2007;31:1053–62.
151. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006;107:4139–41.
152. Hsiao HH, Yang MY, Liu YC, Lee CP, Yang WC, Liu TC, et al. The association of JAK2V617F mutation and leukocytosis with thrombotic events in essential thrombocythemia. *Exp Hematol.* 2007;35(11):1704–7.
153. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* 2007;21:1952–9.
154. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005;19:1847–9.
155. Patriarca A, Pompetti F, Malizia R, et al. Is the absence of JAK2 mutation a risk factor for bleeding in essential thrombocythemia? An analysis of 106 patients. *Blood Transfus* 2010;8:21–7.
156. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, et al. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005;131:208–13.
157. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and JAK2 mutation status. *Blood* 2007;109:2310–13.
158. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 2006;106:631–35.
159. Ruggeri M, Rodeghiero F, Tosetto A, et al. Postsurgery outcomes in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: a retrospective survey. *Blood* 2008;111:666–71.

ŞEKİLLER VE TABLOLAR

ŞEKİLLER LİSTESİ	Sayfa
Şekil 1. JAK2'nin 9.kromozom üzerindeki konumu	4
Şekil 2.JAK2 homoloji alanları ve yapısal gösterimi	5
Şekil 3. JAK'lar için farklı tercihlere sahip sitokin reseptörleri	7
Şekil 4. JAK'lar için farklı tercihlere sahip sitokin reseptörleri	7
Şekil 5. STAT5 (STAT5a*)'in 17. kromozom üzerindeki konumu	8
Şekil 6. STAT5'in yapısal bölgeleri	8
Şekil 7. STAT moleküllerinin kristal yapısı	11
Şekil 8. JAK/STAT sinyal yolağı	13
Şekil 9. STAT proteinlerinin Ran-GTP bağımlı taşınımı	14
Şekil 10. IFN sinyallerinin (Tip I ve Tip II) ISRE ve GAS ile iletimi	15
Şekil 11. JAK/STAT sinyal yolunda PIAS ve SOCS mekanizması	16
Şekil 12. JAK/STAT sinyal yolunda pozitif regülasyon	17
Şekil 13. JAK2 geninde V617F mutasyonu ve klinik yansıması olan diğer genetik kusurlar	19
Şekil 14. V617F mutasyonunda homozigotluk gelişimi	20
Şekil 15. MPH'ın moleküler patogenezi ve sınıflandırılması	23
Şekil 16. MPH'da lösemik transformasyon modeli	24
Şekil 17. PV tanı algoritması	25
Şekil 18. ET tanı algoritması	29
Şekil 19. İMF tanı algoritması	31

TABLolar LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. JAK ve STAT aktivasyonunda spesifik sitokinler (9)	9
Tablo 2. Miyeloproliferatif Hastalıkların Ortak Özellikleri (118)	21
Tablo 3. MPH tarihi gelişimi (10)	21
Tablo 4. Kronik Miyeloid Hastalıkların yarı moleküler sınıflandırılması (122)	22
Tablo 5. 2008 WHO PV tanı kriterleri (132)	26
Tablo 6. JAK2 mutasyonu ile beraber PV tanı kriterleri (10)	26
Tablo 7. JAK2 mutasyonu olmadığı durumda PV tanı kriterleri (10)	27
Tablo 8. Nisbi Eritrositoz, Sekonder Eritrositoz ve PV'nin ayırıcı Tanısı (118)	28
Tablo 9. Trombositozların nedenleri (134)	29
Tablo 10. JAK2 mutasyonu ile beraber ET tanı kriterleri (10)	29
Tablo 11. JAK2 mutasyonu olmadığı durumda ET tanı kriterleri (10)	30
Tablo 12. 2008 WHO ET tanı kriterleri (132)	30
Tablo 13. JAK2 mutasyonu ile beraber İMF tanı kriterleri (10)	32
Tablo 14. JAK2 mutasyonu olmadığı durumda ET tanı kriterleri (10)	32
Tablo 15. Kemik İliğinde Fibroza Yol Açan Nedenler (1,134)	33
Tablo 16. 2008 WHO ET tanı kriterleri (132)	34
Tablo 17 Olgulara ait yaş ve cinsiyet dağılımı	37
Tablo 18. V617F mutasyonu pozitif olgularımıza ait taranan parametrelerin ortalamaları	38
Tablo 19. V617F mutasyonu negatif olgularımıza ait taranan parametrelerin ortalamaları	39
Tablo 20. PV tanılı olguların cinsiyet- mutasyon dağılımı	40
Tablo 21. ET ön tanılı olguların cinsiyet-mutasyon dağılımı	40
Tablo 22. İMF ön tanılı olguların cinsiyet-mutasyon dağılımı	40
Tablo 23. Çalışmaya dahil edilen olgulardaki mutasyon sıklığı	41
Tablo 24. Miyeloproliferatif hastalıklarda mutasyon sıklığı	43

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılı İstanbul'da doğdum. 2005 yılında İstanbul Bahçelievler Lisesinden mezun oldum. 2005 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2005-2009 yılları arasında lisans eğitimimi tamamlayarak 2009 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım.

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TUBADK 2011/52				
	PROTOKOL ADI	T.Ü.T.F. Hematoloji Bilim Dalına Başvuran Hastalarda JAK-2 Geni Nokta Mutasyonu ve Hastalık İlişkisinin Değerlendirilerek Fenotip-Genotip İlişkisinin Kurulması				
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez <input type="checkbox"/> Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkez <input type="checkbox"/> Uluslararası				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 06/ 20	Tarih: 09.03.2011				
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görevli Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Sefa ÇETİNKAYA'nın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin gıderlerin gönüllüye ve/veya bağılı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.					
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI Helsinki Bildirgesi, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyri Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TUBADK Yönergesi						
ÜYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Hakan KARADAĞ Başkan	Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıklar	T.Ü.T.F. İç Hastalıklar A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıklar A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıklar	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıklar A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Fiğen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıklar	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıklar A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıklar	T.Ü.T.F. İç Hastalıklar A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yener YÖRÜK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıklar	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Gülden ATİLLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENGLİ
Dekan