

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI LÖSEMİLERİNDE JAK 2V617F
MUTASYONU SIKLIĞININ BELİRLENMESİ VE PROGNOZ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Dr. Funda ERKASAR ÇITAK

**ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
PEDIATRİK HEMATOLOJİ BİLİM DALI
YAN DAL TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Leyla Zümrüt UYSAL**

**ANKARA
2010**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI LÖSEMİLERİNDE JAK 2V617F
MUTASYONU SIKLIĞININ BELİRLENMESİ VE PROGNOZ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Dr. Funda Erkasar ÇITAK

**ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
PEDIATRİK HEMATOLOJİ BİLİM DALI
YAN DAL TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Leyla Zümrüt UYSAL**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Komisyonu
tarafından 20070809042 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2010**

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 20070809042 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Tez çalışmasının her aşamasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren aynı zamanda bilimsel çalışmanın gereklerini öğreten, tecrübe ve bilgilerinden sonsuz yararlandığım, çok sevdiğim ve saygı duyduğum danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Leyla Zümrüt Uysal'a, tez konusunun saptanması ve tezin çalışılması sürecinde bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen sonsuz saygı duyduğum hocam Sayın Prof. Dr. Nejat Akar'a, yandal ihtisasım süresince her zaman destek ve güvenini hissettiğim, ayrıca hastaların temini konusunda da yardımlarını esirgemeyen Dr. Üstün Ezer'e ve ilgi ve bilgilerini esirgemeyen tüm değerli hocalarıma, yardımları ve özverileriyle çalışmama çok büyük katkıda bulunan Hmş. Nuray Cengiz, Dr. Bekir Koşan'a Bio. Yonca Egin'e, ayrıca Moleküler Genetik Laboratuvarın'da çalışan herkese, birlikte çalışmaktan her zaman büyük mutluluk duyduğum, sadece çalışma arkadaşları olarak değil hayatım boyunca yanımda olacaklarına inandığım tüm dostlarıma, her türlü desteği veren, hep yanımda olduklarını bildiğim aileme, gösterdiği sabır, anlayış ve destek için hayat arkadaşım Elvan Çağlar Çıtak'a ve kızım Tuana Umay Çıtak'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
4. BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	51
ÖZET	59
SUMMARY.....	61
KAYNAKLAR	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Miyeloblastik Lösemi
AUL	Akut Undiferansiye Lösemi
BFM	Berlin-Frankfurt-Munster
BK	Beyaz küre
CD	Cluster of Differentiation
clg	Sitoplazmik immnglobülin
C-KIT	Stem cell factor receptor
CNTF	Ciliary neurutrophic factor
COG	Children's Oncology Group
CT-1	Cardiotrophin-1
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGIL	European Group for the Immunological Classification of Leukemias
EPO	Eritropoetin
FAB	French-American-British
FERM	Dört-nokta-bir, ezrin, redixin ve moesin
FISP	IL-4-Induced Secreted Protein
FLT3	FMS like tyrosine kinase 3
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GH	Growth hormone
GM-CSF	Granülosit monosit koloni uyarıcı faktör
Hb	Hemoglobin
IFN	Interferon
IL	İnterlökin
Jak	Janus Kinase
JMML	Juvenil Miyelomonositer Lösemi

KMML	Kronik Miyelomonositer Lösemi
LIF	Leukemia inhibitory factor
Ly	Lenfoid
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
MSS	Merkezi sinir sistemi
My	Miyeloid
NNT	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
PCM1	Pericentriolar material 1
PCR	POlimerize zincir reaksiyonu
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
POG	Pediatric oncology group
PRL	Prolaktin
RAEB	Refractory anemia with excess blasts
RBC	Red blood cell
RNA	Ribonükleik asit
slg	Yüzey Immünglobülin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins
t	translokasyon
TPO	Trombopoetin
TSLPA	Transcription terminator sequence of slpA
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	MDS Tanı Kriterleri	5
Tablo 2.2.	JMML Tanı Kriterleri	6
Tablo 2.3.	KMML Tanı Kriterleri.....	6
Tablo 2.4.	Akut Lenfoblastik Lösemide FAB Sınıflaması	7
Tablo 2.5.	Akut Miyeloblastik Lösemide FAB Sınıflaması.....	8
Tablo 2.6.	Akut Lösemi WHO Sınıflaması	9
Tablo 2.7.	Bifenotipik Akut Lösemi Değerlendirme Sistemi	11
Tablo 2.8.	Çocukluk Çağı Miyelodisplastik Ve Miyeloproliferatif Hastalıklarının Tanısal Sınıflandırılması	11
Tablo 2.9.	Janus Kinazlar, İlişkili Olduğu Sitokinler Ve Mürin Knockout Modellerindeki Fenotipler	20
Tablo 2.10.	Sitokin Ve Büyüme Faktörleri Aracılığı İle Jak'ların Aktivasyonu	23
Tablo 4.1.	Çalışmaya Alınan Hastaların Tanılarına Göre Yaş Ve Cinsiyet Dağılımları	39
Tablo 4.2.	ALL'li Hastaların Tanısal Özellikleri	41
Tablo 4.3.	Prekürsör B ALL, My+ Prekürsör B ALL Ve Matür B ALL Tanılı Hastaların İmmünfenotiplendirme Sonuçları	42
Tablo 4.4.	T ALL Tanısı İle İzlenen Hastaların İmmünfenotiplendirme Sonuçları	43
Tablo 4.5.	ALL'li Hastaların Tedavi Ve İzlem Özellikleri	44
Tablo 4.6.	AML'li Hastaların Tanısal Özellikleri	46
Tablo 4.7.	AML Tanılı Hastaların İmmünfenotiplendirme Sonuçları	47
Tablo 4.8.	AML'li Hastaların Tedavi Ve İzlem Özellikleri	48
Tablo 4.9.	Bifenotipik Lösemi Hastalarının Tanısal Özellikleri	48
Tablo 4.10.	Bifenotipik Lösemili Hastaların Tedavi Ve İzlem Özellikleri	48

Tablo 4.11. Bifenotipik Lösemi Hastalarının İmmüfenotiplendirme Sonuçları	49
Tablo 4.12. KML, KMML, JMML Ve MDS Tanısı Alan Olguların Tanı, Tedavi Ve İzlem Özellikleri	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Hematopoyetik Öncül Hücrelerden Lösemi Gelişim Aşamaları.....	4
Şekil 2.2.	Hücreyel Sinyal İletim Mekanizmaları.....	17
Şekil 2.3.	STAT Molekülünün Yapısının Şematik Gösterimi.....	19
Şekil 2.4.	Janus Kinazın Yapısı.....	21
Şekil 2.5.	Jak, STAT Aktivasyonu İle Transkripsiyonun Oluşumu	24
Şekil 2.6.	JAK'ların Aktive Ettiği Hücreyel İletim Yolakları	27
Şekil 2.7.	Jak2'nin V617F Bölgesinin Şematik Görünümü.....	30

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağı kanserleri içinde dünyada ve ülkemizde birinci sırayı lösemiler almaktadır (1). Çocukluk çağı lösemilerinde geliştirilmiş risk değerlendirmeleri, yeni kemoterapotik ilaçların özellikle de hedefe yönelik ilaçların kullanımı ve destek tedavilerinin iyileştirilmesi sayesinde yaşam yüzdelerinde belirgin bir artış kaydedilmiştir. Günümüzde çocukluk çağı Akut Lenfoblastik Lösemisin (ALL)'de remisyon oranı %90, kür oranı ise %80'lere ulaşmıştır (2).

Lösemi gelişiminde tek bir faktör olmayıp, çevresel ve genetik etmenler birlikte rol oynamaktadırlar (3). Sitogenetik bozuklukların ve bu sitogenetik bozukluklar sonucunda oluşan moleküler değişimlerin lösemilerin patogenezinde ve prognozunda belirleyici olduğu bilinen bir gerçektir. Hatta bazı sitogenetik bozuklukların ve bunların meydana getirdiği moleküler değişimlerin bilinmesi bu basamaklara etki eden tedavi seçeneklerinin bulunmasına ve bu sayede kemoterapiye dirençli ve nüks gösteren lösemilerin tedavi edilmesine de olanak sağlamaktadır.

Özellikle miyeloproliferatif hastalıkların gelişiminde varlığı gösterilen ve diğer lösemilerin etyopatogenezinde de etkisinin araştırılmaya başlandığı Jak2V617F mutasyonu moleküler genetiğin son yıllardaki ilgi çeken konusunu oluşturmaktadır.

Kan hücrelerinin üretimi ve farklılaşmasında görev alan büyüme faktörleri ve sitokinlerin bazıları intrinsek katalitik aktivitesi bulunmadığından janus kinaz (Jak) ailesinden tirozin kinazlar ile yakın bağlantısı olan sitokin reseptör ailesine ait hücre yüzey reseptörlerine bağlanır (4). Ligandın sitokin reseptörüne bağlanması, sinyal kaskadının ilk basamağında, sinyal iletim sistemleri ve transkripsiyon aktivatörleri grubu (STAT) üyesi olan Jak'ları aktive eder. Bu aktivasyon sonucunda tirozinlerin otofosforilasyonu gerçekleşir. Aktive olan Jak'lar STAT proteinlerini fosforile ederek STAT'ların hücre nükleusuna ulaşmasını ve DNA transkripsiyonunu gerçekleştirmesine neden olur (4-6).

Jak2V617F mutasyonu, Jak 2'de gözlenen somatik bir mutasyondur. Bu mutasyonda pseudokinaz/JH2 bölgesinde 617. pozisyonda valinin yerine fenilalaninin geçmektedir (7). Jak2 kinazın JH2 bölgesinde oluşan bu somatik

mutasyon (Val⁶¹⁷Phe) pseudokinaz bölgesinin inhibitör fonksiyonunu bozarak, sitokin sinyaline abartılı bir cevabın oluşmasına ve sitokinden bağımsız büyümenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (8,9).

Jak2V617F mutasyonuna miyeloproliferatif hastalıklarda oldukça sık rastlanmaktadır. Polisitemia verada bu oran çeşitli serilerde %65-100 lere ulaşmaktadır (8-10). Daha az oranda olmak üzere esansiyel trombositemi ve miyelofibrozistede de bu mutasyona rastlanmaktadır (8,9,11-13). Son dönemlerde aynı somatik mutasyon, daha az oranlarda Akut Miyelositer Lösemi'de (AML-M7 ve miyeloprolifartif hastalıktan sonra gelişen AML), Kronik Miyelomonositer Lösemi (KMML)'de, Atipik Kronik Miyeloid Lösemi'de, İdiopatik Hipereozinofilik Sendrom'da, Sistemik Mastositoziste, Kronik Nötrofilik Lösemide ve nadiren de Miyelodisplastik Sendromda (MDS) tanımlanmıştır (11,14-16). ALL tanısı ile izlenen hastalara ait yapılan çalışmalarda Jak2 V617F mutasyonu henüz tanımlanmamıştır (15,17). Ancak, ALL'li çocuk yaş grubunda Jak2L611S ve Jak2 Delta IREED mutasyonlarının saptanması ALL'de de JAK2 pseudokinaz bölgesinin onkojenik bir bölge olduğunu düşündürmektedir (18,19) .

Aynı zamanda Jak2L611S mutasyonu saptanan hastanın remisyona girmesi ile mutasyonun kaybolması bu mutasyonun tanısal bir değerinin de olduğunu akla getirmektedir (19). Bu çalışmanın amacı; çocukluk çağı lösemilerinde Jak2V617F mutasyonu varlığını gösteren çalışmaların sınırlı sayıda olması nedeni ile çocuk yaş grubu lösemilerinde Jak 2V617F mutasyonunun çalışılması ve aşağıdaki sorulara yanıt aranmasıdır.

1. Tanı anında Jak2 V617F mutasyonu sıklığı nedir?
2. Jak2 V617F mutasyonu klinik ve prognostik bir öneme sahip midir?
3. Tanı sırasında Jak2 V617F mutasyonu saptanırsa, remisyon döneminde bu mutasyon kaybolmakta mıdır?
4. Bu mutasyon remisyon döneminde kaybolmaktaysa, tanısal bir değer veya minimal rezidüel hastalığın bir göstergesi olarak kullanılabilir mi?

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çocukluk Çağı Lösemileri

2.1.1. Epidemiyoloji

Lösemi çocukluk çağında en sık görülen kanser tipi olup, 15 yaş altındaki çocuk kanserlerinin %31'ini, 20 yaş altındaki kanserlerin ise %25'ini oluşturmaktadır (3). Yıllık insidans Amerika Birleşik Devletlerinde 4/100.000, Türkiye'de 1.5/100.000 (Sağlık Bakanlığı verilerine göre) olarak belirtilmektedir (2). Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 3250 çocuğa lösemi tanısı konmakta olup, bu hastaların % 75'ini ALL, %15-20'sini AML, ve %5'ini de KML oluşturmaktadır (3).

ALL en sık 2-3 yaşlarında görülmekte ve erkek/kız oranı 1.1/1 ve 1.3/1 olarak bildirilmektedir. AML insidansı ise bebeklik ve adolesan dönemdeki hafif bir artışın dışında genellikle tüm yaşlarda aynı oranda görülmekte ve belirgin bir cinsiyet farkı göstermemektedir (3).

KML'nin erişkin tipi sıklıkla 6 yaş üzerinde görülmekte iken Philadelphia negatif olan tip 2 yaş altı çocuklarda siktir. Erkek çocuklarda sıklığı kızlara oranla biraz daha yüksektir (20).

Kronik miyeloproliferatif hastalıklar başlığı altında toplanan MDS, KMML ve juvenil miyelomonositer lösemi (JMML) ise çocukluk çağının daha nadir görülen hematolojik malignitelerini oluşturmaktadır (3).

2.1.2. Etyoloji

Lösemi gelişiminde tek bir faktör olmayıp, genetik ve çevresel faktörlerin etyolojide birlikte rol aldığı üzerinde durulmaktadır(3).

Genetik değişimler her ne kadar etyolojide esas faktör olarak suçlanmışsa da monozigotik ikizlerdeki genetik değişimlerin ve dizigotik ikizlerdeki inutero faktörlerin incelenmesi ile bu faktörlerin tek başına lösemi gelişimine etkisi olmadığı ortaya konmuştur(3).

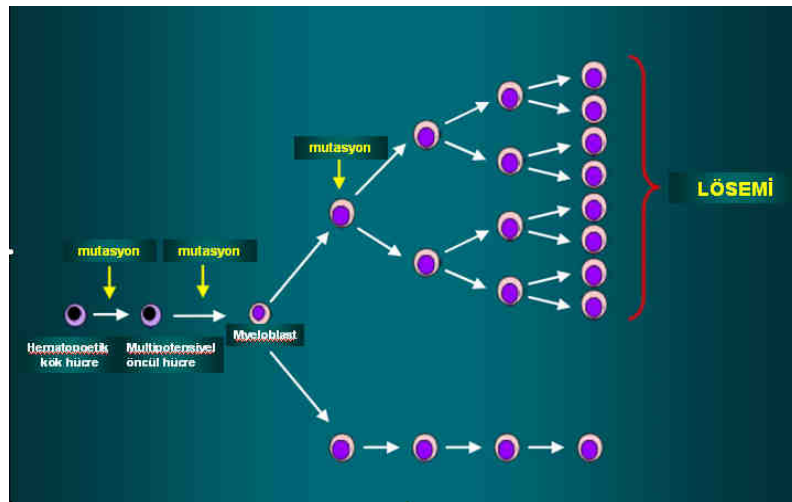
Down Sendromu, nörofibromatozis tip I gibi genetik bazı sendromlarda, ataxia telenjektazi, Bloom sendromu, Shwachman sendromu ve Fanconi

aplastik anemisi gibi kromozom kırılma sendromlarında lösemiye yatkınlık bulunmaktadır(3).

Çevresel etmenlerden, hamilelik döneminde geçirilen enfeksiyonlar, bebeklik döneminde geçirilen enfeksiyonlar, anne sütü ile beslenmeme, Hemofilus İnfluenza Tip b aşılmasının yapılmaması, kloramfenikol kullanımı, inutero radyasyona maruz kalma, pestisitler, hidrokarbonlar ve kimyasal çözücüler gibi pek çok etkenin varlığı da lösemi etyolojisinde araştırılmaktadır (3).

2.1.3 Patogenez

Lösemi gelişimindeki neden her ne olursa olsun, diğer kanser tiplerinde olduğu gibi programlanmış hücre ölümünde azalma ya da duraklama, farklılaşma aşamalarında duraklama, hücrenin büyüme uyarılarına karşı cevaplarındaki değişimler sonucunda kendi kendine çoğalan bir hücre popülasyonu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.1). Buradaki bu değişimlerin en önemli nedenlerinden bir tanesi de gerek çevresel etmenlerle ortaya çıkan gerekse de doğumdan itibaren var olan genetik mutasyonlardır. Genetik mutasyonlar, malignite gelişimine neden olan onkogenlerin oluşumuna neden olabildikleri gibi, tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkarak da tümör oluşumunu engelleyen fonksiyonların ortadan kalkmasına yol açarak malignite gelişimine yol açabilirler. Bir mutasyon tek başına malign hücre gelişimine katkıda bulunmazken tekrarlayan mutasyonların varlığı bu malign dönüşümün hızlanmasına katkıda bulunmaktadır.



Şekil 2.1. Hematopoietik Öncül Hücrelerden Lösemi Gelişim Aşamaları

2.1.4. Tanı

Akut lösemilerin kesin tanısı ancak kemik iliği aspirasyonu ile mümkün olabilmektedir. ALL tanısı için kemik iliğindeki blast sayısının %25'in üzerinde, AML tanısı için ise noneritroid kemik iliği elemanlarının %20'sinden fazlasının blast olması gerekmektedir (21,22).

KML $100.000/\text{mm}^3$ değerinin üzerinde hiperlökositoz ve trombositoz ile karakterli olup, periferik kanda olgun granülosit artışı ile birlikte dir. Kemik iliği incelendiğinde hipersellüler olduğu ve granülositer serinin arttığı gözlenir. Blastik kriz dışında blast hücrelerinin sayısı %5'i geçmez (20).

Klonal hematolojik hastalıkların heterojen bir grubunu oluşturan ve inefektif hematopoez, ilerleyici sitopeni, hematopoetik hücrelerde displastik değişiklikler ve AML'ye dönüşme yatkınlığı ile kendini belli eden kronik miyeloproliferatif hastalık grubunda bulunan MDS'un tanısı için tablo 2.1'de verilen kriterlerden en az ikisinin varlığı gerekmektedir (23).

Tablo 2.1. MDS Tanı Kriterleri

Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı gereklidir

1. Açıklanamayan uzamış sitopeni (nötropeni, trombositopeni veya anemi)
2. En az iki seride morfolojik miyelodisplazi
3. Hematopoetik hücrelerde akkiz klonal sitogenetik anomali
4. Blast sayısının %5'in üzerinde olması

Hepatosplenomegali ve organ infiltrasyonları ile karakterli granülositik ve monositik serinin hastalığı olan JMML, WHO (World Health Organisation) Sınıflamasında Kronik Miyeloproliferatif hastalıklar içerisinde yer almaktadır. Tanısı için Tablo 2.2'de verilen kriterlerin varlığı gerekmektedir (24).

Tablo 2.2. JMML Tanı Kriterleri

Kesin laboratuvar kriterleri (her üçünün birlikte olması gerekmektedir)	
1. Ph ⁺ kromozomu ve BCR/ABL negatifliği	
2. Periferik total monosit sayısı >1000/mm ³	
3. Kemik iliğinde blast sayısının %20 den az	
Klinik kriterler	
• Hepatomegali	
• Lenfadenopati	
• Solukluk	
• Ateş	
• Döküntü	
Diğer kriterler (en az ikisinin varlığı gerekir)	
1. Artmış fetal hemoglobin	
2. Periferik kanda miyeloid öncüller	
3. Beyaz küre > 10 000/mm ³	
4. Klonal anormallik (örn. monozomi 7)	
5. İn vitro ortamda miyeloid öncüllerin G-MCSF'e artmış duyarlılığı	

Önceleri FAB sınıflamasında MDS içinde sınıflandırılan ancak daha sonra WHO sınıflaması ile miyeloproliferatif hastalıklar içinde yer alan KMML'nin tanısı WHO'nun belirlediği kriterlere göre Tablo2.3'e uygun şekilde yapılmaktadır (25).

Tablo 2.3. KMML Tanı Kriterleri

WHO tanı kriterleri	1. Ph ⁺ kromozomu ve BCR/ABL negatifliği 2. Periferik total monosit sayısı >1000/mm ³ 3. Kemik iliği ve perifer blast sayısı < %20 4. En az bir miyeloid seride displazi varlığı
Displazi yok veya az ise alternatif tanı kriterleri	1. Kemik iliğinde akkiz sitogenetik anomali 2. Üç aydan uzun süren periferik monositoz 3. Monositozun diğer nedenlerinin olmaması
KMML alt grupları	KMML-1 periferde ≤ %5 ve kemik iliğinde <%10 blast KMML-2 periferde %5-19, kemik iliğinde %10-19 blast

2.1.5.Sınıflandırma

Çocukluk çağı lösemileri akut, kronik ve doğumsal olarak sınıflandırılmaktadır (22). Akut lösemi, immatür hematopoetik veya lenfoid öncül hücrelerin klonal olarak çoğalması, kronik lösemi ise; olgun kemik iliği elemanlarının artışı ile karakterizedir. Doğumsal lösemi ise; yaşamın ilk 4 haftasında ortaya çıkan lösemi tanımlamaktadır (22).

Akut lösemiler morfolojide baskın olan hücre serisine göre lenfoblastik ve miyeloblastik olarak 2 gruba ayrılırlar. Akut lösemilerin yaklaşık olarak %80'ini lenfoblastik (ALL), %15'ini ise miyeloblastik (AML) lösemi oluşturur. Geriye kalan grup ise; morfolojik özellikleri açısından, ALL veya AML'ye tam olarak benzemediğinden sınıflandırılmayan (AUL) bir grup olarak tanımlanır. Hücre yüzey antijenlerinin tanımlanması ve moleküler genetik bilimindeki ilerlemeler sayesinde, sınıflandırılmayan lösemi yüzdesinde anlamlı düşüşler kaydedilmektedir (22).

ALL morfolojik özellikleri göz önüne alınarak French-American-British (FAB) Ortak Çalışma Grubu'na göre L1,L2,L3 olarak sınıflandırılmaktadır (22). Tablo 2.4'de FAB sınıflamasına göre hücrelerin özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.4. Akut Lenfoblastik Lösemide FAB Sınıflaması

Sitoloji	L1	L2	L3
Hücre boyutu	Küçük, homojen	Büyük, heterojen	Büyük homojen
Nükleer kromatin	Homojen	Değişken, heterojen	Noktalı ve homojen
Nükleus şekli	Düzensiz konturlu, bazen çentikli	İrregüler, sıklıkla çentikli	Düzensiz konturlu, oval-yuvarlak
Nükleolus	Görülmez veya silik, küçük	≥1, sıklıkla belirgin	Belirgin, ≥1, vakuoler
Sitoplazma	Dar	Değişken, sıklıkla büyük	Orta derecede büyük
Bazofilik sitoplazma	Hafif veya orta, nadiren belirgin	Değişken, bazen koyu	Çok koyu
Sitoplazmik vakuol	Değişken	Değişken	Sıklıkla belirgin

AML ise, morfolojik ve sitokimyasal özellikleri göz önüne alınarak FAB grubu tarafından Tablo 2.5'de verildiği şekilde M0 dan M7 ye kadar 8 alt gruba ayrılarak incelenmektedir (24,26).

Tablo 2.5. Akut Miyeloblastik Lösemide FAB Sınıflaması

<ul style="list-style-type: none">• M0: Minimal farklılaşma gösteren AML• M1: Olgunlaşma göstermeyen AML• M2: Olgunlaşma gösteren AML• M3: Akut promiyelositer lösemi• M3V: Akut mikrogranüler varyant promiyelositer lösemi• M4: Akut miyelomonositer lösemi• M4Eo: Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi• M5a: Akut monoblastik lösemi• M5b: Akut monositer lösemi• M6: Akut eritrolösemi• M7: Akut megakaryoblastik lösemi	<ul style="list-style-type: none">• Büyük ve granülsüz blastlar, auer rod yok, Sudan black ve MPO ile boyanma yok, en az bir miyeloid antijen pozitifliği• Nadiren auer rod içeren ve MPO ve Sudan black boyanan miyeloblastlar noneritroid hücrelerin %90'dan fazlasıdır Noneritroid hücrelerin %10'dan azı matür miyeloid hücredir.• Auer rod içeren ve MPO ve Sudan black boyanan miyeloblastlar %30'dan fazladır. Matür miyeloid hücreler noneritroid hücrelerin en az %10'udur.• Hipergranüler sitoplazmalı, genelde anormal çekirdek yapısı ve Auer rod taşıyan, anormal promiyelositler• Çekirdek yapısı M3'e benzer ancak, granülleri ince yapılı ve nadiren Auer rod bulunur. MPO kuvvetle pozitifdir• Miyeloblastik ve monositik farklılaşma (noneritroid hücrelerin %20-80'i miyeloid, %20-79'u monositik)• Kemik iliğinde >%5 displastik eozinofilik öncü• Monositik farklılaşma (Kemik iliğinde \geq %80 monositik seri) Lösemik hücrelerin \geq %80 monoblast• Monositik öncüllerde maturasyon (lösemik hücrelerin <%80 monoblast, geri kalanı olgun monositer hücreler)• %50 den fazla eritroid öncü hücre var. Diseritropoez ve megaloblastik değişiklikler (M6a), eritroblastik değişiklikler (M6b)• İmmünotipik olarak megakaryoblastik farklılaşma
---	---

Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin bilinmesi ve bunların prognostik önem arz etmesi nedeniyle, yeni bir sınıflama ihtiyacı doğmuştur. WHO, 2001 yılında akut lösemiler de dahil olmak üzere

hematopoitik ve lenfoid neoplazmaları içeren yeni bir sınıflama hazırlamıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immüfenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler dikkate alınmış ve nadir lösemi tipleri de bu sınıflamaya dahil edilmiştir (Tablo 2.6) (26,27).

Tablo 2.6. Akut Lösemi WHO Sınıflaması

<p><u>Akut Miyeloid Lösemi</u></p> <p>1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML</p> <ul style="list-style-type: none">- t (8;21)(q22;q22), (AML 1/ETO)- inv (16)(p13q22) veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) ve kemik iliği anormal eozinofilisi- t (15;17)(q22;q22), (PML/RARα) ile akut promiyelositer lösemi ve varyantları- 11q23 (MLL) anomalisi ile AML <p>2. Çoğul Seri Displazisi ile Seyreden AML</p> <ul style="list-style-type: none">- Önceden miyelodisplastik sendromlu- Önceden miyelodisplastik sendrom olmadan <p>3. Tedaviye İkincil AML ve MDS</p> <ul style="list-style-type: none">- Alkilleyici ajan/radyasyon ilişkili- Topoisomera II inhibitör ile ilişkili <p>4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML</p> <ul style="list-style-type: none">- Minimal farklılaşma gösteren AML- Olgunlaşma göstermeyen AML- Olgunlaşma gösteren AML- Akut miyelomonositik lösemi- Akut monoblastik ve monositik lösemi- Akut eritrolösemi- Akut megakaryoblastik lösemi- Akut bazofilik lösemi- Akut miyelofibrosis ile panmiyelozis- Myeloid sarkom <p><u>Akut Lenfoblastik Lösemi</u></p> <ol style="list-style-type: none">1. Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma2. Prekürsör T-lenfoblastik lösemi/lenfoma3. Matür B lösemi <p><u>Serisi Belirsiz Akut Lösemi</u></p> <ol style="list-style-type: none">1. Bifenotipik akut lösemi2. Bilineal akut lösemi3. Farklılaşmamış akut lösemi

İnsan lökosit antijenleri “*Cluster of Differentiation*” (CD) adı altında standardize edilmektedir ve bu antijenlerin belirlenmesi için immünoflöresans, immünositokimya ve akım sitometresi yöntemleri kullanılmaktadır. Herhangi

bir işaretleyicinin %20'nin, CD34'ün ve MPO'nun ise %10'un üzerinde olması pozitif olarak kabul edilmektedir (28).

WHO sınıflamasına göre ALL tanısı ancak immünofenotiplendirme ile mümkün olabilmektedir. Bu sınıflamaya göre ALL 3 ana gruba ayrılmaktadır (28, 29).

1. Prekürsör B-lenfoblastik lösemi: L1, L2 veya karışık blastik hücre morfolojisini gösterebilir. B hücre yüzey antijenlerinin pozitifliği ile karakterizedir (CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+). Ayrıca, CD10, HLADR, TdT ve nadiren CD34 pozitifliği olabilir.

2. Prekürsör T-lenfoblastik lösemi: L1, L2 veya karışık blastik hücre morfolojisinde olabilir. T hücre yüzey antijen (CD2, CD3, CD5, CD7, cCD3) pozitifliği ile karakterizedir. Genellikle TdT pozitifliği ve HLA-DR negatifliği saptanır.

3. Matür B lösemi: Prekürsör lenfoid neoplazma grubundan değildir. FAB sınıflamasına göre L3 morfolojisini gösterir. immünojenik olarak; slg, CD19, CD20, CD22, HLA-DR pozitifliği vardır. TdT negatiftir. CD10 pozitif saptanabilir.

Matür B hücreli ALL tüm çocukluk çağı ALL'lerinin %1-2'sini, T hücreli ALL ise %10-15 ini oluşturmaktadır iken, geriye kalan büyük bir oranı ise prekürsör-B hücreli ALL oluşturmaktadır (22).

Bifenotipik Akut Lösemi: Miyeloid ve lenfoid hücre morfolojisi gösteren lösemi tipidir. Ancak çoğu zaman morfolojinin net ayırtılması mümkün değildir. Bifenotipik akut lösemi tanısı için miyeloid ve lenfoid hücre yüzey antijenlerine göre EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemias) değerlendirme sistemi kullanılır (Tablo 2.7). Bu skorlama sistemine göre hem miyeloid hem de T veya B lenfoid serisinden 2'nin üzerinde puan almak gerekmektedir (28,30).

Tablo 2.7. Bifenotipik Akut Lösemi Değerlendirme Sistemi

Puan	B-lenfoid serisi	T-lenfoid serisi	Miyeloid seri
2	CD79a cCD22 c IgM	C/sCD3 Anti-TCR	MPO
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CD65 CD117
0.5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64

C: sitoplazmik s: yüzey

KML farklılaşmanın tüm evrelerindeki miyeloid hücrelerin aşırı çoğalması ile karakterize klonal bir kök hücre hastalığıdır. KML kronik miyeloproliferatif hastalıklar başlığı altında incelenmekte olup çocuklarda iki tipte görülür (24).

1. Erişkin tip (Philadelphia +): Erişkinde görülen KML benzeri
2. Juvenil tip kronik miyeloid lösemi

MDS önceleri FAB tarafından 5 alt gruba ayrılmışken, daha sonra WHO tarafından çocukluk çağı miyelodisplastik ve miyeloproliferatif hastalıkları olarak Tablo 2.8’de verildiği gibi sınıflandırılmıştır (2).

Tablo 2.8. Çocukluk Çağı Miyelodisplastik ve Miyeloproliferatif Hastalıklarının Tanısal Sınıflandırılması

<p>I. Miyeloproliferatif Hastalıklar: MDS, JMML, KMML</p> <p>II. Down Sendromu</p> <p>Geçici miyeloproliferatif hastalık</p> <p>MDS/AML</p> <p>Miyelodisplastik sendrom (MDS)</p> <p>Refrakter sitopeni (<%5 blast)</p> <p>Artmış blast sayısı ile birlikte refrakter anemi (RAEB) : %10 blast</p> <p>Önceki olayların varlığı</p> <p>Önceki sitotoksik kemoterapi ve/veya radyoterapi alımı</p> <p>Önceki aplastik anemi</p> <p>Kemik iliği yetmezliği bulguları</p> <p>MDS için minimal tanı kriterleri</p> <p>A. t(8;21) t(15;17), inv(16), t(11;17) ve t(8;16) yokluğu</p> <p>B. Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı</p> <ol style="list-style-type: none">1. Açıklanamayan devam eden sitopeniler2. Akkiz klonal anormallik3. Displastik özellikler4. Artmış blast sayısı
--

2.1.6. Lösemilerde gözlenen kromozomal anomaliler

Hematolojik maligniteler içerisinde lösemiler sitogenetik anormalliklerin sıklıkla görüldüğü bir grubu oluşturmaktadır. Sitogenetik çalışmanın yapılması; lösemilerin tanısında, prognozun belirlenmesinde, tedavi seçeneğinin kararında ve hastalığın takibinde önem taşımaktadır. Lösemilerde ve diğer kanser tiplerinde görülen sitogenetik anomaliler sayısal ve yapısal değişiklikler olarak kabaca 2 grupta irdelenebilir. Gerek sayısal, gerekse yapısal kromozomal değişimler belirli genleri etkilemekte, bu etkilenimler sonucunda da genlerin fonksiyonlarında değişimler meydana gelmekte ve normal fonksiyonları dışında işlev görmeye başlamaktadırlar. Genlerde meydana gelen bir mutasyon bazen tek başına etkili olmayıp ek mutasyonların varlığı gerekebilmektedir. Örneğin BCR-ABL mRNA'nın normal bireylerde saptanması, AML1-ETO translokasyonlarının non-lösemik hücrelerde gösterilmesi bu mutasyonların lösemi gelişiminde tek başına etken olmadığına birer göstergesidir (2).

İlk olarak KML'de sitogenetik bir anormallik belirlenmiş olup, bundan sonra diğer lösemilerde de sitogenetik değişimler irdelenmeye başlanmıştır. Çocukluk çağı lösemilerinin %2-3'ünü oluşturan KML'de 9. ve 22 kromozom arasında bir translokasyon olduğu 1960 yılında gösterilmiştir. Oluşan bu translokasyon sonucunda 9. kromozomda yer alan ABL protoonkogeni ile 22. kromozomda yer alan sinyal iletiminde görev alan tirozin kinaz BCR arasında bir füzyon oluşmaktadır. Bu füzyon geni ile tirozin kinaz aktivasyonu artmakta ve malign proliferasyon gelişmektedir (2,20,24). Bu da bize lösemi gelişiminde meydana gelen sitogenetik değişimlerin moleküler düzeyde hücre çoğalması, hücre döngüsü, programlanmış hücre ölümü gibi farklı aşamalarda etki ettiğini göstermektedir. Bu moleküler değişimlerin hücre döngüsünde hangi basamakta etki ettiğinin belirlenmesi bu basamağa yönelik özgül moleküllerin bulunmasına, bu sayede yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine ve özellikle dirençli ve tekrar eden olgulardaki tedavi seçenekleri arasında bu ajanların kullanımı ile yaşam sürelerinde artışa neden olacaktır.

Hematolojik malignitelerde görülen sitogenetik anomaliler incelendiğinde her bir hastalık grubunda farklı tipte genetik bozuklukların

olduğu dikkati çekmekte ve bu sitogenetik anomalilerin kliniğe farklı düzeylerde yansıdığı gözlenmektedir.

İnefektif ve displastik hematopoez sonucunda periferel sitopeni ile kliniğe yansıyan ve sıklıkla yaşı hastalarda görülen MDS çocukluk çağı lösemilerinin %6'sının gelişiminden sorumludur (2,24). MDS'de sitogenetik anomaliler %55-80 oranında oldukça sık görülmektedir. Bu sitogenetik anomalilerden monozomi 7, trizomi 8, trizomi 21 özellikle daha fazla görülmekle birlikte aynı zamanda prognostik bir önem de taşımaktadırlar (2). İkinci Uluslararası Çocukluk Çağı Miyelodisplastik Sendromları Sempozyumunda yapılan MDS sınıflaması içerisinde yer alan JMML'de ise MDS'e oranla sitogenetik anomaliler daha az sıklıkta (%35) bildirilmektedir (2,24).

Primer AML'de kromozomal anomali görülme oranı %80 olup, görülen sitogenetik anomali tanıdaki klinik özellikler, FAB morfolojik tipi ve klinik gidiş ile sıkı bir bağlantı göstermektedir (2). AML gelişimine katkıda bulunan genetik değişimler ya hücre döngüsü ve hücre proliferasyonuna etki eden proteinleri etkilemek suretiyle (ABL, PDGFRb, FLT3, RAS, C-KIT) hücreye yaşam avantajı sağlamak ya da hücre farklılaşması ile ilgili proteinlerin (AML1, CBFb, MLL, HOX, GATA-1) yapısını etkileyerek farklılaşma aşamalarında bozulmaya neden olmaktadır. Bu değişik mekanizmalar neticesinde AML'deki heterojenite ortaya çıkmakta ve her bir mutasyon ya da oluşan füzyon proteinleri farklı prognostik değerler taşımaktadır (2). AML'de sayısal kromozomal anomalilerden trizomi 8, trizomi 21 ve monozomi 7 sık olarak görülmektedir. Yapısal kromozomal anomalilerden en sık görüleni ise; t(8;21) olup, özellikle AML M2'de fakat nadiren de olsa, AML M1, AML M4, AML M0, ve AML M6'da da görülebilmektedir. AML M3 ve KML'de promiyelositik blastik kriz için neredeyse spesifik olan kromozomal anomali ise t(15;17)'dir. İnversiyon 16 AMLM4 ve AML M4Eo'da görülen diğer bir kromozomal anomali olup, iyi prognoz göstergesi olarak bilinmektedir (2).

ALL'de sitogenetik anomalinin ve özel moleküler değişikliğin tanımlanması ile, lökomojenezisin biyolojisi ve hastalığın riskinin belirlenmesinde ilerlemeler kaydedilmiştir. Kromozom sayısının 50'nin

üzerinde olması durumu olan hiperdiploidi, remisyon ve yaşam süresinin uzunluğu ile direk orantılı iken, pseudodiploidi veya hipodiploidinin olması ve t(9;22), t(8;14), t(4;11) varlığı kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Altıncı kromozomun uzun kolundaki delesyon ve 47-50 kromozom arasında olan hiperdiploidi durumları ise prognozu orta derecede etkilemektedir (2).

Matür B hücreli ALL'de görülen t(8;14), t(2;8), t(8;22) translokasyonları Burkitt lenfomanın dissemine fazını yansıtmaktadır. Başvuruda Merkezi Sinir Sistemi (MSS) tutulumu ve abdominal tutulum ile birliktelik gösteren bu translokasyonların varlığı aynı zamanda prognozun da kötü olacağını birer göstergesidir. İyi prognoz göstergesi olan t(12;21) ise genellikle 1-10 yaşındaki hastalarda ve pre B hücreli lösemilerde görülmektedir (2).

ALL'de görülen diğer sitogenetik anormalliklerden t(9;22) genellikle ileri yaş ve erkek cinsiyette görülmekte, yüksek beyaz küre ile prezante olmakta ve kötü prognoz özelliği göstermektedir. Bunun dışında t(4;11) genellikle 1 yaş altında, kızlarda görülmekte ve tanıda yüksek lökosit sayısı, erken pre B hücreli lösemi immünofenotipi ile ve miyeloid antijen pozitifliği ile prezante olmaktadır. Prognoz bu translokasyonu taşıyan hastalarda oldukça kötüdür (2).

ALL'in %15 kadarını oluşturan T hücreli ALL hiperlökositoz, sıklıkla MSS tutulumu ve mediastinal genişleme ile karakterli olup, sitogenetik olarak hiperdiploidi göstermez ve kötü prognoza sahiptir. T-ALL'de özgül bir karyotipik anormallik bulunmamakla birlikte en sık olarak t(11;14), t(10;14) daha az sıklıkta da t(8;14) ve t(1;14) görülebilmektedir (2).

Çocukluk çağı ALL'lerinin %3-5'ini ve AML'lerinin ise %10'unu oluşturan infant lösemisi ise klinik ve biyolojik olarak farklı özellikler göstermektedir. Hastalık, saldırgan seyretme eğiliminde olup, başvuruda yüksek beyaz küre, hepatosplenomegali, MSS tutulumu ile karakterizedir. İnfant ALL'si immatür B hücre özelliğine sahip olup, genellikle miyeloid antijen taşır. İnfant AML'si ise genellikle miyelomonoblastik ve monoblastik karakterdedir. Sitogenetik olarak hem ALL hem de AML'de 11q23 anomalileri gözlenir. İnfant ALL'de daha az sıklıkta ise Xp11,t(5;15), t(12;21), ve t(9;22) de görülebilmektedir (2).

İnfant AML'de MLL geninde yeniden düzenlenme %30-60 oranında görülmekte olup, en sık görülen sitogenetik anormallikler ise; t(9;11), t(4;11), t(11;19) dur. Daha az sıklıkta görülen anormallikler ise; inv(16), t(15;17), t(8;21) ve t(1;22) dir (2).

2.1.7. Lösemilerin moleküler temeli

Hematolojik malignitelerin moleküler temeli halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir (31).

Bir hücre malign değişime uğradığında; 1- kendi kendine büyüebilme, 2- büyüme karşıtı sinyallere duyarsız kalma, 3- sınırsız çoğalabilme 4- hücre ölümünü sağlayan sinyallerden korunabilme, 5- dokuları invaze etme ve metastaz yapabilme, 6- anjiogenezisi uyarabilme yeteneği kazanır (32). Bunlar dışında varsayılan ancak kanıtlanmayan özellikleri ise; 1- hücrel farklılaşmayı durdurabilme ve 2- konakçı immün sisteminden kaçabilme yetenekleridir (31).

Normal şartlarda, çoğu hücreye büyüme sinyali geldiğinde, ligand reseptöre bağlanır, aktive hale geçer ve sinyal ileti sisteminin kaskadı çalışmaya başlar. Bu, hücre yüzey reseptörleri sıklıkla tirozin kinaz reseptörleridir (Trombosit kökenli büyüme faktör reseptörü [PDGFR] veya epidermal büyüme faktör reseptörü [EGFR] v.b). Ligandın reseptöre bağlanması sonucunda reseptör dimerizasyonu, kinaz aktivasyonu ve trans-tirozin fosforilasyonu gerçekleşir. Bu fosforile tirozin rezidüleri sinyal molekülleri serisinin uyan bölgesine özellikle de SCR homoloji (SH2) içeren proteinlerin olduğu bölgeye gelirler. Daha sonra akış yolu olarak çoğunlukla Ras-Raf-mitojen-aktive protein kinaz, kinaz-mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yolağı devreye girer. Bu yolla da bazı gen transkripsiyonlarının aktivasyonu gerçekleşir. Bazı durumlarda, normal büyümeyi sağlayan uyarı hücre yüzeyindeki reseptörlerde solubl ligandlar aracılığı ile iletilirken; bazı durumlarda ise, gelen uyarı stromal mikro çevre aracılığı ile bir hücreden diğer hücreye aktarılır. Bu son mekanizma tam olarak kanıtlanmasa da tümör büyümesindeki mikroçevrenin önemini doğrulamaktadır (31).

Reseptör tirozin kinazlarda olan mutasyonlar, hematolojik malignitelerde fizyolojik olarak büyüme uyarını yokluğunda bile malignitenin gelişiminde esas rolü oynamaktadır (31).

Hematolojik malignitelerin patogenezinde sitoplazmik nonreseptör tirozin kinaz aktivasyonu da önemli bir yer tutmaktadır (31).

Janus kinazlar sitoplazmik nonreseptör tirozin kinazlar olup, aktivasyonları ile STAT protein fosforilasyonuna, nükleer translokasyona, ve transkripsiyon aktivasyonuna yol açarlar (4,10).

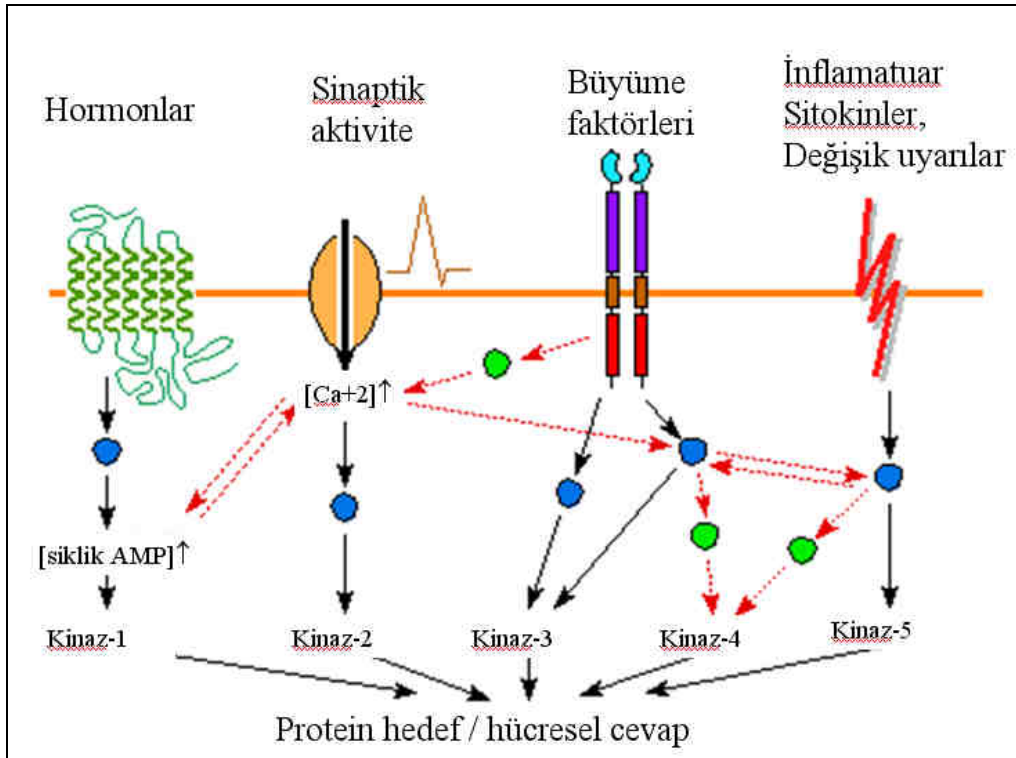
2.2. Sinyal ileti mekanizmaları

Normal ve malign hücrelerin büyümesi, farklılaşması, çoğalması ve apoptozu çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Bu sitokinler ve büyüme faktörleri etkilerini özgül hücre yüzey algaçları ile etkileşime girerek gösterirler. Bu etkileşim sonucunda uyarıların hücre içine iletilmesi, değişik hücre içi moleküller ve bu moleküllerin görev aldığı kimyasal reaksiyonlar ile gerçekleşir. Bu kimyasal reaksiyonların amacı, bir hücreden diğer bir hücreye oluşması istenen hücrel değişimler için gerekli iletinin aktarılması, ya da ortamda bulunan moleküller aracılığı ile bir takım önemli hücrel olayların başlatılmasıdır. Bu olayların gerçekleşebilmesi ve hücrenin uyarılarına doğru olarak algılayabilmesi için hücreler arasındaki iletişimi sağlayan, çevresel değişikliklere yanıtı düzenleyen, hücreler arasında düzenleyici bir ağ oluşturan hücre içi sinyal ileti yollarına gereksinim vardır (4,32).

Zaman içerisinde sinyal ileti sistemleri içinde birçok sinyal ileti molekülü ve birbirinden farklı özellikleri olan birçok algaç tanımlanmıştır. Hücre yüzeyindeki algaç sayısı ve yerleşim yeri hücreden hücreye ve aynı zamanda, gerek hücrenin durumuna, gerekse çevresel etmenlere bağlı olarak da değişiklikler gösterebilmektedir. Dolayısı ile aynı uyarı farklı hücre tiplerinde farklı cevapların oluşmasına neden olabilmektedir.

Hücre yüzey algaçları iki farklı algaç sistemi üzerinden sinyal iletimini sağlarlar. Bunlar G-protein çifti ve tirozin kinaz algaçlarıdır. Sinyal ileti sistemleri genellikle fosforilasyon kaskadı üzerinden etki gösterir. Bazı sitokin

reseptörleri tirozin fosforilasyon kaskadını direkt olarak başlatan intrinsek tirozin kinaz aktivitesine sahipken; çoğu sitokin reseptörünün intrinsek tirozin kinaz bölgesi bulunmaz. Onun yerine kaskad içindeki proteinlerin fosforilasyonunu düzenlemek için hücresel tirozin kinazları kullanılır (4). Tüm tirozin kinaz ağaçları, G-protein çifti ağaçlarının aksine ortak bir yapıya sahiptirler. Polipeptid ligandın bağlanması için ekstrasellüler bölge, tek bir transmembran bölgesi, reseptör fonksiyonunu yönettiği tahmin edilen jukstamembran bölgesi ve tirozin kinaz katalitik bölgeleri ile sitoplazmik bölgeden oluşurlar. Bu yapısal özellikler özgül cevabın verilebilmesi için gereklidir. Ekstrasellüler bölge ve intrasellüler katalitik bölge bağlanacak olan molekülün belirlenmesinde önem taşır. Değişik uyarılar sonucunda ağaçların uyarılması sadece kendine ait tirozin kinazları değil aynı zamanda hücre içerisinde bulunan diğer ağaçlara ait yolları da tetikleyerek hücre içinde tirozin kinazların aktivasyonuna ve sonuçta farklı yollardan istenilen cevabın elde edilmesini sağlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hücresel Sinyal İletim Mekanizmaları

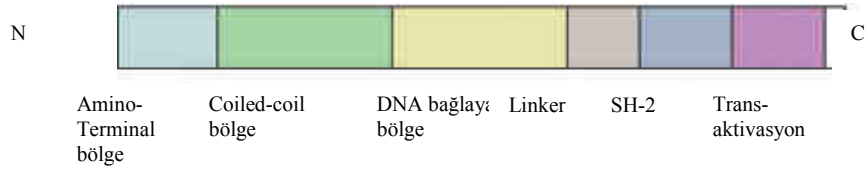
2.2.1. Sinyal İletimi ve Protein Kopyalama Uyarıcısı (STAT)

Bu güne kadar pek çok hücre içi sinyal ileti yolağı tanımlanmış olup, bunlardan bir tanesi de *Sinyal İletimi ve Protein Kopyalama Uyarıcısı (Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins-STAT)*'dir. STAT'lar sitoplazmada özgül hücre yüzey algaçlarına bağlanan sitokin ve büyüme faktörleri gibi çeşitli hücre dışı uyarılar ile aktive olan inaktif sitoplazmik kopyalama faktörleri olarak bilinmektedir (33). STAT'lar hücre büyümesi, farklılaşması, programlanmış hücre ölümü, fetal gelişim, transformasyon, inflamasyon ve immün cevap gibi değişik biyolojik olaylara aracılık eder (33).

STAT protein aktivasyonunun bir kısmı ligand aracılı reseptör uyarımı sonucunda Jak'lar aracılığı ile gerçekleşir (34).

2.2.1.1 STAT'ların yapısı

Bugüne kadar memeli hücrelerinde yedi farklı STAT proteini tanımlanmıştır. Bunlar, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6'dır (35). Son zamanlarda STAT6 homoloğu olarak bilinen ve alternatif bağlanma özelliği gösteren STAT 6b de bu aileye dahil edilmiştir (36). STAT'lar farklı uyarılarla aktive olup, farklı biyolojik olayların gelişmesini sağlayan gen transkripsiyonlarını uyarır. STAT homologları basit ökaryotlarda da bulunduğu için bunların tek bir gen tarafından yönetildikleri düşünülmektedir (37). Tüm STAT proteinleri aynı yapıya sahiptir. (Şekil 2.3) Bir STAT molekülü N-terminal bölge, sarmal bölge, DNA bağlayan bölge, bağlayıcı bölge, SRC homoloji 2 (SH2) bölgesi, aktivasyonu takiben fosforilasyonu sağlayan tirozin rezidüsü içeren bölge ve transkripsiyonu sağlayan karboksi terminal bölgeden oluşur (38). STAT'lar transaktivasyon bölgelerinde sakladıkları tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile aktive olurlar. Bu aktivasyon sonucunda gelişen moleküler değişim ile yapılarında farklılaşma oluşur. Bu yapısal değişim, resiprokal tirozin fosforilasyonu ile dimer formasyonlarını kuvvetlendirir. Tirozin fosforile dimerlerin özgül biçimlendirilmeleri ile STAT'lar hedef genlerine bağlanırlar (39-43).



Şekil 2.3. STAT Molekülünün Yapısının Şematik Gösterimi

2.2.1.2 STAT Fosforilasyonu

STAT'larda tirozin fosforilasyonu esas olarak hücre yüzey sitokin algaçlarına sitokinlerin bağlanması ile gerçekleşir. Birçok sitokin algacı gibi STAT'lar da temel olarak Jak'lar aracılığı ile fosforile olabildikleri gibi prostaglandinler, anjiyotensin 2, CC kemokin ligand, viral orjinli ya da kromozomal translokasyon sonucu gelişen nonreseptör tirozin kinazlar gibi alternatif aktivasyon yollarını da kullanabilirler (35).

Bazı STAT'lar, C-terminal bölgesinde fosforile olan serin rezidülerini içerir (44). Bu sayede, STAT'ların transkripsiyonel aktivitesinin düzenlendiği gösterilmiştir. STAT1 ve STAT3'de serin fosforilasyonu en üst düzeyde olup, STAT'ın transkripsiyonel aktiviteleri için gereklidir ve sinyal özgüllüğüne katkıda bulunmaktadır (45,46).

STAT'ların fonksiyonları için nükleer translokasyon hayati önem taşır. Büyük moleküllerin sitoplazmadan nükleusa geçişi, nükleustaki transkripsiyonel faktörlerin kontrolünde olup, bu geçişin sınırlandırılması oldukça önemlidir. STAT'lar nükleusta sitokin uyarımına cevap olarak gen ekspresyonlarını aktive eder ve ardından sitoplazmaya geri verilirler. Bu nükleus içine alım ve dışarı verim STAT için asıl düzenleyici kısmı oluşturur (35).

STAT'lar, algaç-Jak kompleksi olmadan diğer tirozin kinazlar tarafından da aktive edilebilmektedirler (47) Bu kinazlardan bazıları; Src ailesinin kinazları, kemik iliği tirozin kinazları, fokal adezyon kinaz, trombosit kökenli büyüme faktörü, kök hücre faktörü, hepatosit büyüme faktörü ve damar endotelyal büyüme faktörü gibi algaçların kinazlarıdır (48). STAT'lar aynı zamanda hematolojik malignitelerden sorumlu tutulan FLT3 ve BCR-ABL gibi aberran tirozin kinazlar ile de fosforile olabilmektedirler (49).

Fosforile olan STAT'lar hücre çekirdeğine gelerek DNA'nın transkripsiyonunu gerçekleştirir (4-6).

2.2.2 Janus Kinaz Ailesi

Hücresel tirozin kinazlardan son yıllarda üzerinde sıklıkla durulanlardan bir tanesi de Jak ailesidir. Jak'lar JH1 ve JH2 olarak isimlendirilen ve birbirlerine yapısal olarak oldukça benzeyen 2 farklı bölgeden oluşmaktadır. JH1 bölgesi, fonksiyonel kinaz aktivitesine sahipken JH2 bölgesi daha çok düzenleyici bir rol üstlenmektedir (50,51). Birbirine benzeyen iki yapının fonksiyonel olarak farklı özelliklerinin olması nedeni ile mitolojide 2 yüzlü Roma dönemi tanrılarında Janus'tan esinlenilerek bu moleküle Janus Kinaz ismi verilmiştir (52).

Jak ailesinin bu güne kadar memelilerde bilinen 4 farklı üyesi (Tyk2, Jak1, Jak2 ve Jak3) tanımlanmıştır (4). Jak ailesinin, Jak3 dışındaki diğer üyeleri, birçok farklı hücre tipinde belirlenmekteyken, Jak3 seçici olarak sadece hematopoetik hücrelerde eksprese olmaktadır (53).

Jak'ların hangi sitokinler ile etkileştikleri ve yokluklarında oluşabilecek olan fenotipler Tablo 2.9' de verilmiştir (10).

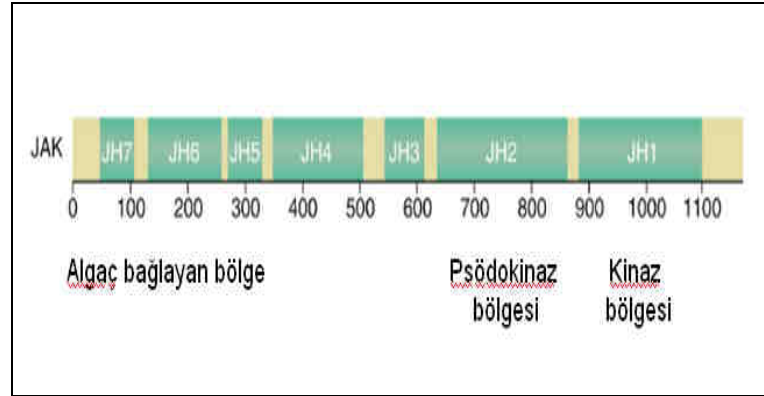
Tablo 2.9. Janus Kinazlar, İlişkili Olduğu Sitokinler ve Mürin Knockout Modellerindeki Fenotipler

Jak	Etkileştiği sitokin	Knockout fenotip
Jak1	IFN (α, β, γ) γ zincir ailesi (IL-2, 4, 7, 9, 13, 15) GP 130 ailesi (IL-6, LIF, OSM, IL-11)	Lenfoid ve nöral gelişim defekti IFN, γ zincir ailesi ve GP 130 ailesine bozulmuş yanıt
Jak2	β zincir ailesi (GM-CSF, IL-3, IL-5), EPO, TPO, ve γ IFN	Eritropoezde defekt, β zincir sitokinlerine, TPO'ya ve γ IFN'a bozulmuş yanıt
Jak3	γ zincir ailesi (IL-2, 4, 7, 9, 13, 15, 21)	Ağır kombine immün yetmezlik α IFN cevabının suboptimal nası
TYK2	Interferonlar (α ve β)	α IFN cevabının suboptimal nası Lipopolisakkarid direnci

Yapılan çalışmalarda Jak'ların kromozomal lokalizasyonları ortaya konmuştur. İnsanlarda *Jak1* geni 1p31.3 kromozomunda ve *Jak2* geni ise

9p24. kromozomunda lokalizedir. *Jak3* ve *Tyk2* genleri ise, 19p13.1 ve 19p13.2 kromozomunda birlikte kümelenmiştir (54).

JAK'ların üç boyutlu yapısı halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Ancak moleküler kitlesi 120-140 kDa ağırlığında olan, 1100 aminoasitten daha fazlasını içeren büyük bir protein olduğu bilinmektedir (54). Jak'lar Jak homology (JH) olarak isimlendirilen ve karboksi terminalinden amino terminaline kadar numaralandırılan, birbirine bitişik 7 bölgeden oluşur (Şekil 2.4) (54,55).



Şekil 2.4. Janus Kinazın Yapısı

Karboksi terminalinde yer alan ve tipik bir ökaryotik tirozin kinaz bölgesi olan, katalitik fosfotirozin kinaz bölgesi, aktif bölgeyi oluşturmaktadır ve JH1 olarak isimlendirilmektedir (53-55). Bu bölgenin epidermal büyüme faktörü algaç ailesinin kinaz bölgesi ile yakından ilişkili olması nedeni ile Jak ailesinin büyük protein kinaz ailesinden gelişebileceği fikri ortaya atılmıştır (54,55)

JH1 bölgesine komşu, katalitik olarak inaktif özellikte ve kinaz benzeri bölge olarak tanımlanan JH2 bölgesi ise, aktif bir görev üstlenmemekle birlikte, JAK kinazın bazal aktivitesinin düzenlenmesinde önem taşımaktadır (55).

JH3 ile JH7 arasında kalan bölge, sitokin algaçlarının bağlandığı aminoterminal bölgeyi oluşturur. Jak'ların N-terminal bölgesini oluşturan bu alt birimler belirgin bir dizilim benzerliği gösterirler. Bu bölge dört-nokta-bir, ezrin, redixin ve moesin (FERM) bölgesi olarak bilinir. Bu bölgenin en önemli

özelliği, Jak'lar arasında farklılık göstermesidir. FERM bölgesi yapısal olarak tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte 300 aminoasit uzunluğunda, sitokin algaçları gibi transmembran proteinlerle olan ilişkinin sağlandığı önemli bir bölgedir. Bu sitokin algaçları sadece belli sitokinler için fonksiyon görür. Bunun yanında, FERM bölgesi, kinaz bölgesini bağlayarak katalitik aktiviteyi de pozitif yönde etkilemektedir (56). FERM bölgesinin yapısının daha iyi anlaşılması ile gelecekte Jak'ların moleküler yapısının daha iyi anlaşılacağı gibi intramoleküler etkileşimleri hakkında da daha kesin bilgiler elde edilebilecektir (57).

Jak3 memelilerde esas olarak hematopoetik hücrelerde bulunur ve hematopoetik hücrenin gelişimini ve aktivasyonunu sağlar. Jak1, Jak2 ve Tyk2 ise, hemen her hücrede belirlenebilmektedir (58,59). Sitokin algaçlarının bulunmadığı hücrelerde yapılan deneysel çalışmalarda Jak'ların hücre düzeyinde sitoplazmada bulunduğu saptanmıştır. Ancak normal şartlarda sitokin algacı ile etkileşimde olduklarından endozomda ve sitokin algaçları boyunca plazma membranında yerleştikleri bilinmektedir (60).

Jak'larla sitokin sinyali arasındaki ilişki ilk kez, mutant hücre dizinleri kullanılarak interferona olan cevapsızlığın gösterilmesi ile ortaya konmuştur. Tyk2'nin eksik olduğu hücre dizinlerine bu algaçı içeren hücrelerin eklenmesi ile interferon sinyalinin düzeldiği gösterilmiştir (61). Bu çalışmadan kısa bir süre sonra diğer Jak'ların da çeşitli sitokin algaçları ile etkileşime girdikleri gösterilmiş ve Jak'ları olmayan farelerde yapılan çalışmalarla Jak'ların temel ve özgün fonksiyonları tanımlanabilmiştir (62-65). Sitokin ve büyüme faktörleri aracılığı ile Jak'ların aktivasyonu Tablo 2.10' da verilmiştir (50).

İnterlökin (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ve IL-21 gibi çok sayıda sitokin Jak1 ve Jak3 ile ilişkili olup, algaçtaki gama zincirini kullanmaktadır. Jak1 algacın gama zinciri dışında, gp130 alt birimine de bağlanabildiğinden IL-6, IL-11, onkostatin, lösemi inhibitör faktör, silier nötrofilik faktör, granülosit koloni uyarıcı faktör ve interferonların fonksiyonları için de gereklidir. Jak2, büyüme hormonu, prolaktin, eritropoetin, trombopoetin gibi hormon benzeri sitokinler ve IL-3 algacı ile sinyal üreten sitokin ailesi (IL-3, IL-5 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör) için öneme sahiptir. Jak2 aynı zamanda gp130

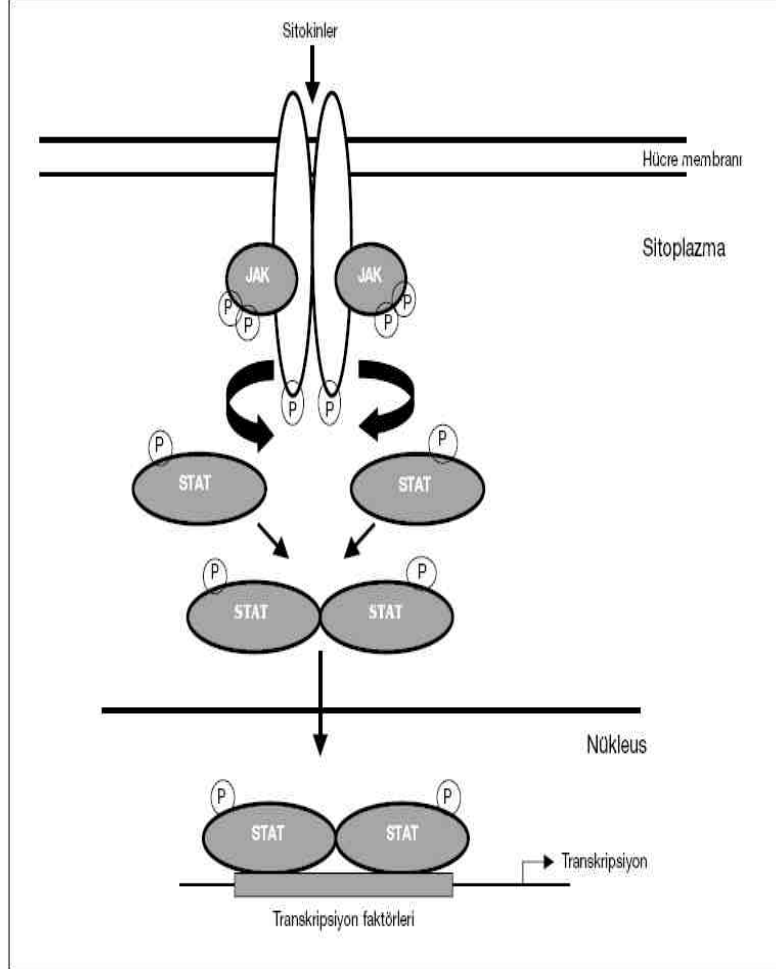
reseptörünü kullanan sitokinler ve bazı interferonlar için de önemli işleve sahiptir. Tyk2 ise, Jak ile ilişkili interferon sinyalinde ilk bulunan kinazdır. IL-12 için önemli olduğu ancak, interferon alfa/beta sinyali ya da gp130'u kullanan sitokinler için bir önem taşımadığı anlaşılmıştır (54).

Tablo 2.10. Sitokin ve Büyüme Faktörleri Aracılığı ile Jak'ların Aktivasyonu

Ligand	Jak'lar	STAT'lar
Tek-zincir ailesi <ul style="list-style-type: none"> • EPO • GH • Prl • Tpo 	<ul style="list-style-type: none"> • Jak2 • Jak2 • Jak2 • Jak2 	<ul style="list-style-type: none"> • STAT5 • STAT5 STAT3? • STAT5 • STAT5
IL-3 ailesi <ul style="list-style-type: none"> • IL-3 • IL-5 • GM-CSF 	<ul style="list-style-type: none"> • Jak2 • Jak2 • Jak2 	<ul style="list-style-type: none"> • STAT5 • STAT5 • STAT5
γC ailesi <ul style="list-style-type: none"> • IL-2 • IL-7 • TSLP^A • IL-9 • IL-15 • IL-21 • IL-4 • IL-13^A 	<ul style="list-style-type: none"> • Jak1, Jak3 • Jak1, Jak3 • ? • Jak1, Jak3 • Jak1, Jak3 • Jak3, Jak1 • Jak1, Jak3 • Jak1, Jak2 	<ul style="list-style-type: none"> • STAT5, STAT3? • STAT5, STAT3? • STAT5, • STAT5, STAT3 • STAT5, STAT3? • STAT3, STAT5, STAT1? • STAT6 • STAT6, STAT3?
Gp 130 ailesi <ul style="list-style-type: none"> • IL-6 • IL-11 • OSM • LIF • CNTF • NNT-1/BSF-3 • G-CSF • CT-1 • Leptin • IL-12 • IL-23 	<ul style="list-style-type: none"> • Jak1, Jak2? • Jak1 • Jak1, Jak2? • Jak1, Jak2? • Jak1, Jak2? • Jak1, Jak2? • Jak1, Jak2? • Jak1, Jak2? • Jak1, Jak2? • Jak2 • Tyk2, Jak2? • ? 	<ul style="list-style-type: none"> • STAT3, STAT1 • STAT3, STAT1 • STAT3, STAT1 • STAT3, STAT1 • STAT3, STAT1 • STAT3, STAT1 • STAT3 • STAT3 • STAT3 • STAT4 • STAT4
IFN ailesi <ul style="list-style-type: none"> • IFN tip IB • IFN-γ TipII • IL-10^C • IL-19 • IL-20 • IL-22 • IL-24 • FISP 	<ul style="list-style-type: none"> • Jak1, Tyk2 • Jak1, Tyk2 • Jak1, Tyk2 • ? • ? • ? • ? • ? 	<ul style="list-style-type: none"> • STAT1, STAT2, STAT3-6? • STAT1, STAT5? • STAT3 • ? • STAT3 • STAT3, STAT5 • STAT3 • ?

2.2.2.1. Jak-STAT Yolu

Sitokin aracılı STAT aktivasyonu belli bir düzen içinde işlemektedir. Jak-STAT yolu şematik olarak Şekil 2.5’de verilmiştir (66).



Şekil 2.5. Jak, STAT Aktivasyonu ile Transkripsiyonun Oluşumu

Sinyal iletimi, sitokin algacına ligandın bağlanması ile başlar. Bu bağlanma ile algaç alt biriminde ya homodimerizasyon/ heterodimerizasyon/ oligomerizasyon gerçekleşir ya da, yapısında değişiklikler oluşur. Bu olaylar sonrasında, Jak’lar FERM bölgesi aracılığıyla sitokin algacının Box1 membran proksimal intrasitoplazmik bölgesi ile etkileşime girer. Ardından algaç ile ilişkili olan Jak proteinleri tirozinlerdeki otofosforilasyon (çapraz fosforilasyon) sonucu aktive olur. Aktive Jak proteinleri algacı da fosforile ederek özgül sinyal proteinlerinin ve sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin algaç ile etkileşimini sağlar. STAT proteinleri daha sonra

homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılarak hücre çekirdeğine gelir ve DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır (67-69).

2.2.2.2. Jak2 kinaz aktivitesinin düzenlenmesi

Çoğu tirozin kinazlarda olduğu gibi, Jak kinazların aktivitesi de sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Günümüze kadar sadece Jak2 ve Jak3'e ait JH1 bölgesinin kristal yapısı aydınlatılabilmiş olup tam olarak yapısı ancak teorik modeller üzerinde ve tüm kinazlardan yola çıkılarak geliştirilmiştir. Böylelikle, Jak2 kinaz aktivitesinin düzenlenmesindeki kontrol mekanizmasının basamaklarından bir kısmı tanımlanabilmiş, bir kısmı da tahminlerden yola çıkılarak kurgulanabilmiştir (70-72)

Diğer tirozin kinazlarda olduğu gibi Jak kinazların da belli bir aktivite gösterebilmesi için aktivasyon halkasının transfosforilasyon ile fosforile olması gerekmektedir. Ancak, çeşitli sitokin algaçları iki farklı Jak kinaz içerdiğinden transfosforilasyon olayında bu her iki kinazın da transfosforilasyonunun gerekip gerekmediği henüz bilinmemektedir (73).

Jak2 kinaz aktivitesinin düzenlenmesindeki diğer bir basamak da pseudokinaz (JH2) bölgesi ile ilgili olan düzenlemedir. JH1 bölgesi olarak bilinen aktivasyon bölgesinde gelişen fosforilasyon JH2 bölgesi ile iletişimin kesilmesine ve kinaz aktivitesini inhibe eden JH2 bölgesinin inhibisyon etkisinin açığa çıkmasına neden olur. Bu nedenle, JH2 bölgesindeki delesyonlar Jak2 nin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda, delesyon analizleri ile Jak2 nin JH2 bölgesinde bulunan ve inhibisyondan sorumlu olduğu bilinen üç bölge tanımlanmıştır (74). JH2 bölgesinin inhibitör etkisi özellikle bu bölgede ortaya çıkan mutasyonların gösterilmesi ile daha da iyi anlaşılabilmiştir.

Fonksiyonu düzenleyen üçüncü basamak; özgül sitokin algacı ile Jak'ın etkileşime girmesini sağlayan bölge olarak bilinen FERM bölgesindeki düzenlemedir. Jak2'nin FERM bölgesinin otofosforilasyonu, algaç aracılı kinaz aktivasyonunun down-regülasyonunda esas rolü üstlenmektedir (75). Reseptör agregasyonu ile aktivasyon gerçekleştiğinde FERM bölgesinin

Y11a bölümünde fosforilasyon gerçekleşir ve reseptör bağlanması inhibe olur, reseptör kompleksinde ayrılma ve degradasyon gerçekleşir.

FERM bölgesi ile pseudokinaz ve kinaz bölgeleri arasında da karşılıklı bir etkileşim bulunmaktadır. FERM bölgesinin algaca bağlanması, yapısal bir değişikliğe yol açarak, birinci basamakta bir gevşemeye ve kinazın aktive olmasına yol açar. Ancak tam bu dönemde JH2 bölgesi kinaz aktivasyonunu inhibe eden esas rolü üstlenmeye başlar. Ligand aracılı algaç kümelenmesi, JH2 bölgesinin inhibisyonunu etkisiz kılar ve transfosforilasyon gerçekleşir. Kinaz aktive olduktan sonra ise, substrat bağlanan bölge açılır ve JH2 bölgesinin inhibitör etkisi tekrar ortaya çıkar. Bu olaylar dizini de göstermektedir ki; aktivasyon sadece algaç ligand ile bağlı durumda iken sürdürülebilmektedir (73).

2.2.2.3. Jak Kinazlar, malign hücre büyümesi ve hücrenin yaşamını sürdürmesi

Jak/STAT yolunun proliferatif ve anti-apoptotik etkilerinin olması nedeniyle, bu yolda meydana gelen değişikliklerin insanlarda çeşitli hastalıkların nedeni olduğu düşünülmektedir (50).

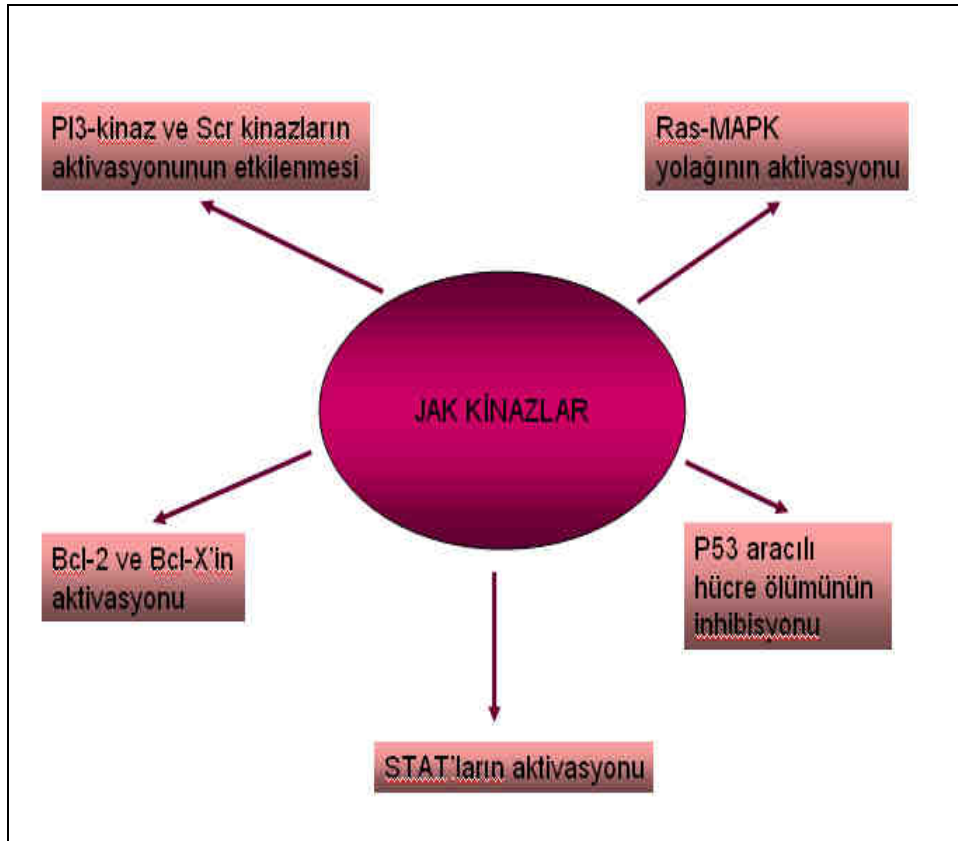
STAT'ların bazı hematolojik malignite ve solid tümörlerin patogeneğinde aşırı derecede aktive oldukları ve normal dışı aktivite gösterdikleri bilgisinden ve STAT'ların aktivasyonu için genellikle Jak'lara ihtiyaç duymalarından yola çıkılarak, hematolojik malignensi ve solid tümörlerin patogeneğinde Jak kinazların önemli bir rol oynadığı kuvvetle düşünülmüştür (76,77). Bu varsayımın doğruluğu, bu ailenin diğer mitojenik yollarda da aktivite göstermesi ile kuvvet kazanmaktadır. Öyle ki; malign dönüşüm ve neoplastik hücre büyümesinde görev alan Ras-Raf-Map kinaz yolunun düzenlenmesinde Jak kinazlar görev almaktadırlar (78-80).

Jak kinazlar aynı zamanda ABL gibi onkogenler ile normal hücrelerin malign dönüşümünde de görev almaktadırlar (81). Pre-B hücrelerinden olgun B hücrelerine dönüşümü engelleyerek onkogen olarak etki eden V-abl'nin etkinliğini gösterebilmesi için STAT5 ve STAT6 ya ihtiyacı olduğu

gösterilmiştir. STAT'ların aktivasyonu için de Jak1, Jak2 ve Jak3' ün aktif olması gerektiğinden Jak'lar malign süreçte etkin görünmektedirler (81).

Jak kinazların malign süreçte etkin olduğunu gösteren diğer bir mekanizma ise; Bcl-2 ailesinin aktivasyonu sonucunda, apoptozun ve malign hücre yaşamının düzenlenmesine dayanır. Jak kinazlar, STAT ve diğer reseptör bağımlı yollardan bağımsız bir yol izleyerek, Bcl-XL (82), bcl-2 (83,84), Bax (84) ekspresyonlarını düzenlemektedir. Jak kinazlar aynı zamanda p53 bağımlı hücre ölümü ve apoptozda da görev almaktadırlar (85).

Farklı sinyal kaskadları ile aktive olan Jak kinazların malign hücre yaşamı ve büyümesini nasıl etkilediği şematik olarak Şekil 2.6'da gösterilmiştir (4).



Şekil 2.6. JAK'ların Aktive Ettiği Hücresel İletim Yolakları

2.2.2.4 Lösemilerde Janus Kinaz yolu

İnsanlarda lösemilerin ve diğer hematolojik malignitelerin patogeneğinde bazı Jak kinaz genlerini içeren anormal translokasyonlar suçlanmaktadır. Bu translokasyonlar etkilediği Jak'ın yapısal aktivasyonuna neden olduğu gibi dolaylı olarak STAT ve diğer proteinlerin aktivasyonuna da yol açmaktadır. Miyeloid ve lenfoid malignitelerde eksprese edilen anormal Tel-Jak2 füzyon proteininin tanımlanması, anormal Jak proteinleri ile onların kinaz bölgelerindeki yapısal aktivasyonunun farelerde lösemi benzeri sendromları indüklediğini göstermiştir. Bu bilgiden yola çıkılarak, insanlarda da lösemi fenotipinin gelişiminde Jak aktivasyonunun önemli olabileceği görüşü ortaya atılmıştır. Tel-Jak2 füzyon proteini t(9:12) (p24; p13) veya t(9:15:12) (p24; q15; p13) translokasyonları sonucunda ortaya çıkar. t(9:12) (p24; p13) translokasyonu, erken preB akut lenfoblastik lösemi (ALL), t(9:15:12) (p24; q15; p13) translokasyonu ise atipik kronik miyeloid lösemi (KML) olgularında bulunmaktadır (86-88). Tel'in heliks-loop-heliks dimerizasyon bölgesinin, Jak'ın katalitik bölgesine füzyonu ile Jak2'de yapısal fosforilasyon/aktivasyon olayı başlamakta ve bundan sonra gelişecek olan basamakların aktivasyonu sağlanmaktadır.

Kemik iliği transplantasyonu aracılığıyla nakledilen Tel/Jak2 füzyon geninin farelerde fatal, miks miyeloproliferatif ve T-hücreli lenfoproliferatif sendroma neden olduğu gösterilmiştir (89). Tel/Jak2 füzyon proteininin lökomogenez etkisi Jak2 füzyon proteininin yapısal aktivasyonu ile Stat proteinlerinin (STAT1, STAT3 ve STAT5) fosforilasyonu ve aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (90). Farelerde miyeloproliferatif ve lenfoproliferatif sendromun gelişmesinde esas rolü STAT 5 üstlenmektedir. Öyle ki; STAT5a/b eksikliği olan kobaylardan kemik iliği nakli yapıldığında bu malign hastalıkların gelişmediği görülmüştür (91). Bu durum insanlarda görülen Tel/Jak2 ile indüklenen sendromlarda da STAT5 in esas rolü üstlendiğini düşündürmektedir (4). Sonuç olarak anormal STAT aktivasyonunun apoptoza dirençli, büyüme faktörlerinden bağımsız hareket eden, düzensiz hücre proliferasyonu ile giden miyeloid lösemi gelişimindeki olaylar zincirine katkıda bulunduğu bilinmektedir (92). AML'deki STAT aktivasyonlarının

moleküler temeli tam olarak bilinmemektedir, ancak lökomojenik füzyon protein tirozin kinazların (Tel-Jak2 ve Tel-ABL-1) ve mutant tirozin kinazların (FLT3 ve c-Kit) STAT3 ve STAT5'i veya her ikisini birlikte aktive ederek lösemi gelişimine etki ettikleri düşünülmektedir (92).

Tel-Jak2 füzyon proteini yanında diğer mekanizmaların da Jak-bağımlı lökomogeneziste etkili olduğu bilinmektedir.

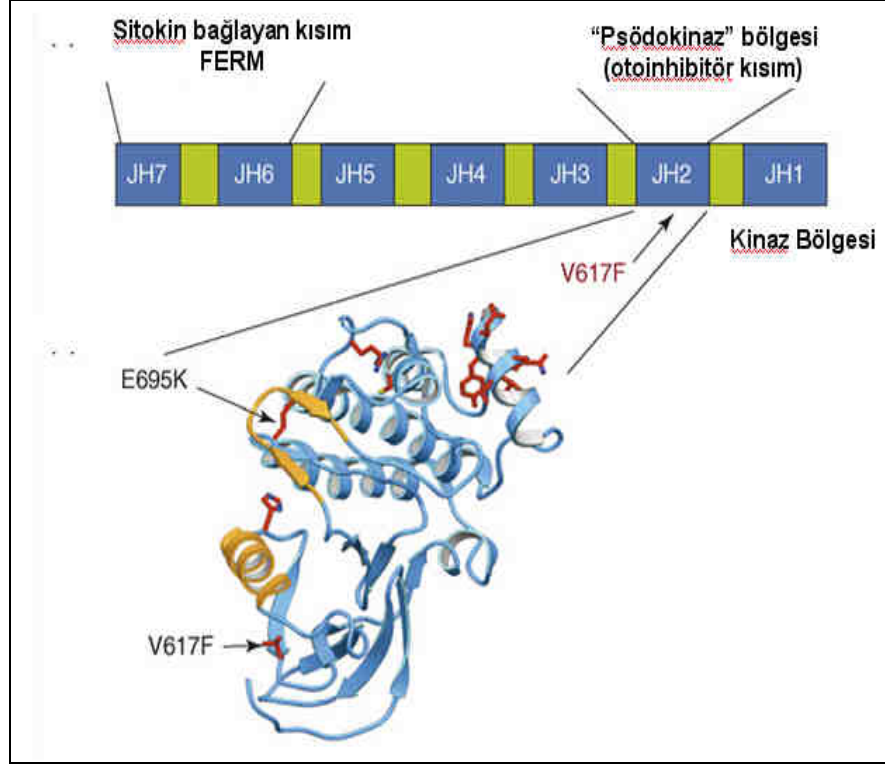
Bu mekanizmalardan bir diğeri de; insan Jak'larında gelişebilecek olan mutasyonlardır. Bu mutasyonların, Drosophila Jak'larında Jak/STAT yolunun hiperaktivasyonuna, sonuç olarak da hematopoetik neoplazilerin ve gelişimsel defektlerin gelişimini sağladığı gösterilmiştir (93,94).

Lösemik transformasyonlarda Jak'ların rolünü destekleyen diğeri bir çalışma da; özgül Jak-kinaz inhibitörü olan AG490'nun primer B hücre lösemilerinde Jak fosforilasyonunu ve dolayısıyla hücre proliferasyonunu engellediğinin gösterilmesi ile desteklenmiştir (95). Bu çalışmada relaps gösteren akut lenfoblastik lösemi hastalarının lösemi hücrelerinde Jak2'nin yapısal olarak aşırı aktif olduğu ve AG490 inhibitörü kullanılarak apoptozu engellemek suretiyle lösemik hücrelerin büyümesinin seçici olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (95). Ayrıca, bu çalışma ile AG490'nun normal hematopoez üzerine bir etkisinin olmadığı da kanıtlanmıştır (95). Bu bulgular, relaps ALL'de Jak2'nin patogeneze önemli bir rolü olduğunu ve gelecekte Jak-kinaz aktivasyonunun engellenmesi ile akut lösemi tedavisinde ilerlemeler kaydedileceğini kuvvetle düşündürmektedir.

Lösemi etyopatogenezinde Jak2'nin varlığı bu şekilde gösterilmişken, Jak2 aktivasyonuna yol açan Jak2 mutasyonları da son yıllarda sıkça araştırılmaya başlanmıştır.

2.3. Jak 2 V617 F Mutasyonu

Jak2V617F mutasyonu, Jak 2 kinazın JH2 bölgesinde gelişen somatik bir nokta mutasyonudur. Jak2 üzerindeki V617 F bölgesinin şematik görünümü Şekil 2.7'de verilmiştir (7).



Şekil 2.7. Jak2'nin V617F Bölgesinin Şematik Görünümü

Bu mutasyon sonucunda kinaz aktivitesinin inhibisyonundan sorumlu bölge olan JH2 bölgesinde valin 617 nin yerine fenilalanin geçer (7). JH1 bölgesinin yapısı ve Jak2'nin tüm yapısı tam olarak aydınlatılmadığından, Jak2V617F mutant allellerinin yapısı ve fonksiyonel sonucu tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Bununla birlikte, JH2 bölgesinin otoinhibitör bölge olarak düzenleyici bir görev üstlendiği bilindiğinden, bu bölgede oluşacak delesyonların yapısal kinaz aktivasyonuna neden olacağı açıktır (7).

JH2 bölgesindeki nokta mutasyonunun önemi, *Drosophila* Jak homologlarında deneysel olarak yapılan delesyon çalışmaları ile gösterilmiştir. Sineklerde yapılan bu delesyon çalışmaları sonucunda hiperaktif kinaz yapısı geliştirilerek, hematopoetik malignansi gelişiminde etkili olduğu ortaya çıkartılmıştır (93,96).

Jak aktivasyonuna bağlı STAT'larda oluşan aktivasyon, sitokinden bağımsız olarak döngünün devamına ve antiapoptotik etkinin gelişimine neden olmaktadır (50). Jak2V617F mutasyonu olan hücre serileri ile yapılan çalışmalarda da sitokinden bağımsız olarak büyüme ve sitokine karşı artmış bir yanıt olduğu saptanmıştır (12).

İnsan kan ve kemik iliği kullanılarak yapılan çok sayıda laboratuvar çalışmalarında Jak2V617F mutasyonunun çeşitli kronik miyeloid hastalıklarda bulunduğu gösterilmiştir (8,9,12,13, 16, 89-91) Bu mutasyon algaç- ligand etkileşimi olmadan aberran sinyallerle miyeloid hücrelerde aşırı proliferasyona neden olmaktadır (7). Jak2V617F mutasyonu polisitemia veralı, hastaların hemen hemen tamamında (8,89,97-99), esansiyal trombositemili, miyeloid metaplazili ve miyelofibrozisli hastaların ise %35-50'sinde bulunmaktadır. Bu mutasyonun varlığı aynı zamanda miyelodisplastik sendromlu veya atipik miyeloproliferatif/miyelodisplastik hastalığı olanların da %10'undan azında da gösterilmiştir (9,11,12,13,99,100).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (A.Ü.T.F.) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı, Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı ve LÖSANTE Lösemili Çocuklar Hastanesi'nin katılımı ile A.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonunundan destek alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışma grubu

Kasım 2002-Temmuz 2007 tarihleri arasında, yaşları 8 ay ile 15 yaş arasında olan, yeni / relaps lösemi tanısı almış 53 hasta çalışmaya alınmıştır. Hastaların 31'i Ankara Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalından, ikisi Ankara Üniversitesi Pediatrik Onkoloji Bilim Dalından 20'si LÖSANTE Lösemili Çocuklar Hastanesinden çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ailelerinden (anne ve/veya baba) bilgilendirilmiş onam formu alınmış ve çalışma etik kurul izniyle gerçekleştirilmiştir.

3.2. Çalışma Planı

1. Çalışmaya alınan hastaların dosyaları aşağıda verilen bilgiler yönünden taranmıştır.

- a. Hastanın yaşı, cinsiyeti
- b. Tanı anında bakılan hemoglobin (Hb), beyaz küre (BK) ve trombosit değerleri
- c. Tanı kemik iliği immünofenotiplendirme sonuçları
- d. Tanı kemik iliği konvansiyonel sitogenetik ve FISH sonuçları
- e. Lösemi tipi
- f. Hastaların risk değerlendirmesi ve almış olduğu tedavi protokolleri
- g. İndüksiyon tedavisine yanıt
- h. Hastalığın tekrarlaması (relaps) durumu
- i. Tedaviye yanıtızsızlık (refrakterlik)

- j. Hastanın son durumu
 - k. Ölüm varsa ölüm nedeni
 - l. Genel sağ kalım süresi (Tanı tarihinden ölüm tarihine ve yaşayan olgularda Mart 2010 tarihine kadar hesaplanmıştır)
2. Çocukluk çağı lösemilerinde Jak2V617F mutasyonunun varlığı ve hastalık prognozu ile ilişkisinin gösterilmesi ileriye yönelik bir çalışma olarak planlanmıştır.

3.2.1 Lösemi Tanısında ve Risk Saptamasında Kullanılan Kriterler

Lösemi tanısı ve risk grubu tayini tanı aşamasında tam kan sayımı, periferik yayma, kemik iliği aspirasyon incelemeleri (morfolojik değerlendirme, immünofenotiplendirme ve sitogenetik inceleme) ile yapılmıştır.

Akut Lösemilerde FAB sınıflaması kemik iliği aspirasyonu ile alınan örneklerden yapılan yaymaların morfolojik olarak değerlendirilmesi ile yapılmıştır. İmmünofenotiplendirme, akımsitometri yöntemi kullanılarak lökosit yüzey antijenlerine yönelik monoklonal antikolar ile yüzey belirleyicilerine bakılarak yapılmış ve blastik hücre popülasyonu içerisindeki yüzde oranları tespit edilmiştir. ALL ve AML tanılı hastalar, FAB klasifikasyonuna göre ve immünofenotipleme göre alt gruplara ayrılmıştır. İmmünofenotiplendirme çalışmasında CD34 ve MPO için %10'un, diğer CD yüzey antijenlerinde ise % 20'nin üzerinde olan değerler pozitif olarak kabul edilmiştir.

ALL'li hastalar tanı kemik iliğinin akım sitometri yöntemi ile immünofenotiplendirmesi neticesinde WHO sınıflaması esas alınarak Prekürsör B, matür B ve T ALL olarak üç alt gruba ayrılmıştır (28,29). HLA-DR, TdT, CD10, CD19, CD 20, CD22, CD 79a, CD34, sitoplazmik IgM antijeni taşıyan hastalar prekürsör B ALL, yüzey Ig taşıyan hastalar matür B ALL, CD1, CD2, TdT, sitoplazmik CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 yüzey antijeni taşıyan hastalar ise T ALL olarak sınıflandırılmıştır.

EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemias)'a göre hem miyeloid hem de lenfoid yüzey antijeni puanlamasında ikiden fazla puan alan hastalar bifenotipik lösemi olarak sınıflandırılmıştır (28,30).

ALL olup miyeloid yüzey antijeni bulunduran ancak puanlamada 2 den az puan hastalar My(+) ALL, AML olup lenfoid yüzey antijeni bulunduran ancak puanlamada 2 den az puan hastalar ise Ly(+) AML olarak sınıflandırılmıştır.

Prognozda ve risk gruplamasında önem taşıyan kromozomal anomaliler kemik iliği örneğinin konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemi ile çalışılması neticesinde saptanmıştır. Kemik iliği FISH çalışmasında hastaların farklı merkezlerden çalışmaya alınmasına bağlı olarak merkezin olanaklarına göre değişmekle birlikte ALL'li hastalar için t(9;22), t(4;11), ve 11q23 anormalliği, AML için ise t(15;17), inv(16), t(12;21), monozomi7, t(9;22) çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1.1. ALL'li hastaların almış oldukları tedavi protokollerine göre risk grubu tayini

Hastaların almış oldukları tedavi protokolleri tedavi gördükleri merkezlere göre farklılık gösterdiğinden hastalar her tedavi protokolünün öngördüğü şekilde risk gruplarına ayrılmıştır.

CCG protokolü uygulanan hastalar protokolün belirttiği şekilde standart ve yüksek riskli olarak 2 gruba ayrılmıştır.

- Yaşları 1-9 olup, T hücre lösemisi olmayan, ekstramedüller tutulum saptanmayan ve tanı BK $<50.00/\text{mm}^3$ olan hastalar standart risk grubuna alınmıştır
- Bir yaşın altı, 9 yaşın üzeri, T hücre lösemisi, tanıda ekstramedüller tutulumun olması ve tanı BK $>50.00/\text{mm}^3$ olması gibi özelliklerden birisini taşıyan hastalar yüksek risk grubuna alınmıştır.

BFM 95 protokolü uygulanan hastalar ise protokolün belirttiği şekilde standart, orta ve yüksek riskli olarak 3 gruba ayrılmıştır.

- Yaşları 1-6, tanı BK $20.000/\text{mm}^3$ den düşük, 8. gün perifer kanında blast sayısı $1000/\text{mm}^3$ altında ayrıca T fenotipine sahip olmayan ve 33. gün blast sayısı $<5\%$ olup, t(4;11) ve t(9;22) translokasyonlarını taşımayan hastalar standart risk grubuna alınmıştır.

- Bir yaş altı, 6 yaş üstü, tanı BK 20 000/mm³ ve üzeri olan, 8. gün perifer kanında blast sayısı 1000/mm³ altında, 33. gün kemik iliği remisyonda saptanan ve t(4;11) ve t(9;22) translokasyonlarını taşımayan hastalar orta risk grubuna alınmıştır.
- Tanıda t(4;11) ve t(9;22) bulunan, sekizinci gün perifer kanında blast sayısı 1000/mm³ üstünde ve 33. gün kemik iliği blast sayısı %5'in üzerinde olan hastalar yüksek risk grubuna alınmıştır

3.2.1.2. AML'li hastaların almış oldukları tedavi protokollerine göre risk grubu tayini

CCG ve BFM tedavi protokolü alan tüm hastalar genel prognostik kriterler esas alınarak risk gruplarına ayrılmıştır.

Yüksek riske alınma kriterleri:

1. Tanı BK>100 000/mm³ olması
2. Ekstramedüller tutulum varlığı
3. Sekonder gelişen AML olması
4. AML FAB M0, AML FAB M1/2 (auer rod yok), AML FAB M4, AML FAB M5, AML FAB M6, AML FAB M7 fenotipini taşıması
5. İndüksiyonun 15. gününde blast sayısının %5 den fazla olması

Standart riske alınma kriterleri

1. AML FAB M3 ve AML M4Eo fenotipini taşıması
2. t(8;21), inv(16), t(15;17) pozitifliği
3. Down sendromu ile birliktelik

3.2.2. Jak2V617F mutasyon çalışması

Lösemi tanısı alan çocuk hastalarda tedavi öncesinde alınan perifer kan örneklerinde Jak2V617F mutasyonu çalışılmıştır.

Jak2V617F mutasyonu, spontan nokta mutasyonu olduğundan ve sağlıklı bireylerde görülmesi beklenmediğinden çalışmada kontrol grubu oluşturulmamıştır. Mutasyon saptanması durumunda, hastanın remisyon

döneminde alınması uygun görülen kan örneğinden çalışılacak Jak2V617F mutasyonunun hastanın kendi kontrol grubunu oluşturması kararlaştırılmıştır.

3.2.2.1. Kan örneklerinin toplanması ve yöntem

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1ml 0,5 M Etilendiamintetraasetikası (EDTA, Sigma, ABD) steril tüp içersine 9 ml kan örneği alınmıştır. Standard proteinaz K, fenol/Kloroform yöntemi ile DNA ayrıştırma işlemine tabi tutulmuş, ardından Jak2V617F mutasyonu çalışılmıştır. Bu çalışmaların tümü, Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Laboratuvarları'nda Light Cycler Cihazı (Roche Applied Science, Germany) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2. DNA ayrıştırımı

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan alınan kan örneği falkon tüp içersinde 25 ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu (155 mM Amonyum Klorid, AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya) ile çalkalanarak 20 dakika buzda bekletilmiştir. Soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek, pellet üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu eklenmiştir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanmıştır. Dipte kalan lökositler üzerine 1000 µl. RBC Lizis solüsyonu eklenerek, bu karışımın 800 µl'si ependorf tüpüne alınarak stok olarak saklanmıştır. Geriye kalan 200 µl'lik karışım ependorf tüpüne alınarak, üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Merck, Almanya), lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu (10 mM Trisklorid, Amresco, ABD) pH:8; 100 mM Sodyum Klorid, 1 mM EDTA (pH: 8) ve 5 µl internal kontrol (Roche Diagnostics, ABD) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilmiştir.

İkinci gün 1:1 oranında Fenol/Kloroform (Merck, Almanya), İzoamilalkol (Merck, Almanya) eklenerek 10 dakika çalkalanmıştır. Buz içersinde 20 dk

bekletilerek +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenmiştir. Ependorf tüpü alt-üst edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilmiştir.

Üçüncü gün +4°C 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Süpernatant dökülerek tüpe 500 µl %70'lik alkol eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda alkol dökülmüş ve tüp, kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanmıştır. İzole edilen DNA +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2.3 Jak2V617F mutasyon analizi:

Jak2V617F mutasyon analizi için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu uygulamasında erime eğrisine göre analiz temeline dayanan, Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Çalışma iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada elde edilen DNA materyalinin kalite ve kantite açısından değerlendirmesi yapılmıştır. Bu amaçla Genomik DNA uygun PCR primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. Her PCR reaksiyonu, 5 µL DNA örneğine toplam volüm 20µL olacak şekilde, 7.4µL DNA-RNA free su, 1.6µL Mg⁺² solüsyonu, 4.0 µL bölgeye özgü primer ve prob karışımı, 2.0 µL Fast Start PCR karışımı eklenerek hazırlanmıştır.

CR siklusları, 95 °Cde 10 dakika denaturasyon ile başlatılmıştır. Ardından kırk döngüden oluşan 95 °Cde 10 saniye, 53 °Cde 10 saniye ve 72 °Cde 20 saniye ile cycling fazı gerçekleştirilmiştir. DNA melting curve analizi (erime eğrisi analizi) 95°C'de 10 saniye denatürasyon, 40 °C'de 20 saniye analiz ve 85 °C'de 0 sn ile tamamlanmıştır. Erime eğrileri her bir örnek için elektronik olarak kaydedilmiş ve gözle analiz edilmiştir. Bu aşamada yapılan değerlendirmede örneklerin kaçınıcı basamakta PCR'a girdiği denetlenmiş, 18-25 basamakta PCR'a giren örnekler çalışmaya alınmıştır.

İkinci aşamada; JAK-2 Mutasyonu açısından, tekrar farklı primer ve problar kullanılarak çalışma gerçekleştirilmiş ve erime eğrisi analizine göre değerlendirme yapılmıştır. 18-25 cycllerden daha geç PCR'a giren örnekler çalışmaya alınmamıştır. Her iki çalışma için aynı reaksiyon hacimleri ve PCR koşulları kullanılmıştır. Bu amaçla Genomik DNA uygun PCR primerleri kullanılarak PCR ile amplifiye edilmiş, her PCR reaksiyonu, 5 µL DNA örneğine toplam volüm 20µL olacak şekilde, 7.4µL DNA-RNA free su, 1.6µL Mg^{+2} solusyonu, 4.0 µL bölgeye özgü primer ve prob karışımı, 2.0 µL Fast Start PCR karışımı eklenerek hazırlanmıştır.

Analiz PCR esnasında diziye özel, mutasyonun olduğu bölgeye bağlanan probun, normal ve mutasyon olan diziden kopma sıcaklığı farkından kaynaklanan değişime bakılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz 56⁰C' de normal diziden ve 60⁰C' de değişime uğrayan diziden kopan problemlerin verdiği eğrilere göre yapılmıştır. Homozigot mutant ve heterozigot olan allel için 60⁰C' pik varlığına, homozigot normal allel için ise 56⁰C 'de pik varlığına bakılmıştır "Klamping Assay " tekniğinin kullanıldığı bu çalışmada amaç sık görülen normal allelin baskılanması olduğundan, normal allel çok zayıf bir pik olarak görünür ya da hiç görünmez halde sistemde değerlendirilirken, amaç mutant allel varlığının gösterilebilmesini hedeflemektedir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Özellikleri:

Çalışmaya dahil edilen 53 hastanın yaş ortalaması 6.94 ± 3.90 (8 ay-15 yıl) olup hastaların 27'si (% 50,94) kız, 26'sı (% 49,05) erkekti. Hasta grubunda 32 ALL, 11 AML, 5 KML, 2 bifenotipik lösemi, 1 JMML, 1 KMML, 1 MDS tanılı hasta vardı.

Hastaların hastalık gruplarına göre yaş dağılımları ve cinsiyetleri tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya Alınan Hastaların Tanılarına Göre Yaş ve Cinsiyet Dağılımları

GRUPLAR	(n)	Yaş Dağılımı (yıl)	Cinsiyet Dağılımı	
			Kız (n)	Erkek (n)
ALL	32	1.2-15	16	16
Yeni tanı	27	1.2-15	15	12
Relaps	5	2.1-4.1	1	4
AML	11	3.8- 12.1	5	6
Yeni Tanı	8	3.8- 11.5	4	4
Relaps	3	5-12,1	1	2
Bifenotipik lösemi	2	12.1-13.1	2	0
KML	5	7.1-10.8	2	3
JMML	1	0.8	0	1
KMML	1	6.7	1	0
MDS	1	8.1	1	0
Toplam	53	0.8-15	27	26

4.2. Lösemi Tipleri ve Özellikleri

4.2.1 ALL'li Hastaların Tanısal Özellikleri

ALL'li hastaların tanıya ait özellikleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Toplam 32 ALL hastasının beşi relaps, 27'si yeni tanı ALL'ydi. Relaps ALL hastalarından 29 numaralı hasta izole SSS relapsı iken diğer 4 hasta kemik iliği relapsı tanısı ile izleniyordu.

Yeni tanı 27 ALL hastasının 17'si prekürsör B ALL, 3'ü My(+) prekürsör B ALL, biri matür B ALL, 7'si T-ALL idi. Relaps ALL grubunda ise iki My(+) prekürsör B ALL, üç Prekürsör B ALL'li hasta vardı. Prekürsör B ALL, My+ Prekürsör B ALL ve matür B ALL tanısı ile izlenen hastaların immüfenotiplendirme sonuçları Tablo 4.3'de T ALL tanısı ile izlenen hastaların immüfenotiplendirme sonuçları ise Tablo 4.4'de verilmiştir.

Yeni tanı ALL'li hastalardan 15 numaralı matür B ALL'li hastanın tanıda over ve akciğer tutulumu, 7 numaralı prekürsör B ALL tanılı hastanın böbrek tutulumu, T ALL'li 8 ve 16 numaralı 2 hastanın da mediasten tutulumu vardı.

Tablo 4.2. ALL'li Hastaların Tanısal Özellikleri

Hasta No	Ad Soyad	Yaş	Cinsiyet	Hb (g/dl)	BK (10 ⁹ /L)	Tromb (10 ⁹ /L)	Tanı alt grubu	K. Sitogenetik FISH
1	MEK	2.8	E	6.0	17.9	13	Prekürsör B ALL	Metafaz yok
2	AÇ	1.9	E	7.9	5.7	96	Prekürsör B ALL	Trizomi 17
3	NKÖ	4.10	K	12.3	29.3	169	Prekürsör B ALL	Metafaz yok
4	FB	5.10	E	9.8	1.51	137	Prekürsör B ALL	Metafaz yok
5	MA (İ)	1.2	E	12.8	5.1	20	My+ Prekürsör B-ALL	MLL gen bölgesinde yeniden yapılanma
6	HS	4.7	E	11.1	60.6	10	Prekürsör B ALL	46 XY
7	FK (E)	13.8	K	6.5	24.6	31	Prekürsör B ALL	46 XX
8	AY (E)	5.10	E	9.8	161	279	T ALL	Metafaz yok
9	EY	2.3	E	10.7	34.6	37	Prekürsör B ALL	Metafaz yok
10	ZB	6.2	K	6.2	4.2	63	T-ALL	Metafaz yok
11	MK	12.8	E	14.2	34.4	31	T-ALL	Metafaz yok
12	MÖ	11.10	K	12.3	127	10	Prekürsör B ALL	Metafaz yok
13	HA	7.9	K	8.0	289.5	16	T-ALL	Metafaz yok
14	TB	9.3	K	8.8	174.1	42	Prekürsör B ALL	Monozomi 10, t(4;11)
15	SA (E)	5	K	10.8	7.2	44	Matür B ALL	Trizomi7, t(4;11)
16	YEİ (E)	15	E	10.7	210.4	27	T ALL	Metafaz yok
17	EY	1.8	E	9.1	2.4	153	Prekürsör B ALL	46 XY
18	RY	1.7	K	12.1	5.23	21	Prekürsör B ALL	46 XX
19	HS	4.3	K	5.4	4.5	12	Prekürsör B ALL	46XX
20	ÖŞÇ	4.3	K	9.7	2.2	69	Prekürsör B-ALL	46 XX
21	SF	3	K	12.9	17.4	121	My+Prekürsör B-ALL	Metafaz yok
22	EG	11.2	E	10.8	11	62	T-ALL	Tetraploidi
23	BA	9.4	E	8.6	2.1	82	Prekürsör B ALL	46 XY
24	MY	9.5	K	6.0	160.6	48	My+Prekürsör B-ALL	46 XX
25	EB	133	K	7.5	50.2	37	Prekürsör B-ALL	Hiperdiploidi
26	ŞK	125	K	5.2	1.7	57	T-ALL	46 XX
27	EB	4.3	K	10.4	36.4	80	Prekürsör B-ALL	46 XX
28	CA ®	3.8	E	13.0	5.6	95	My+ prekürsör B ALL	46 XY, Trizomi 10
29	MEK ® (E)	3.2	E	11.2	6.2	326	Prekürsör B ALL	46 XY
30	İİ ®	3.4	E	9.6	6.8	31	My+ prekürsör B ALL	Multipl anomali
31	HA ®	2.10	K	10.1	0.7	13	Prekürsör B ALL	11q23
32	EA ®	4.10	E	10.2	1.5	168	Prekürsör B ALL	46 XY

®:Relaps ALL, (İ): İnfant ALL, (E): Ekstramedüller tutulum

Tablo 4.3. Prekürsör B ALL, My+ Prekürsör B ALL ve Matür B ALL Tanılı Hastaların İmmünofenotiplendirme Sonuçları

Hasta No	Ad Soyad	CD 10	CD 19	CD20	CD22	CD79a	Cy IgM	CD34	HLADR	TdT	CD13	CD 33	CD15	CD117
1	MEK	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)			(+)				
2	AÇ		(+)		(+)					(+)				
3	NKÖ	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)				(+)				
4	FB		(+)					(+)	(+)	(+)				
5	MA		(+)		(+)	(+)			(+)			(+)		
6	HS		(+)		(+)	(+)			(+)	(+)				
7	FK	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)					(+)
9	EY	(+)	(+)		(+)				(+)	(+)				
12	MÖ	(+)	(+)		(+)			(+)	(+)	(+)				
14	TB		(+)		(+)				(+)	(+)				
15	SA (E)		(+)	(+)	(+)	(+)								
17	EY	(+)	(+)	(+)	(+)			(+)	(+)					
18	RY	(+)	(+)	(+)	(+)			(+)	(+)	(+)				
19	HS	(+)	(+)	(+)	(+)				(+)					
20	ÖŞÇ	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)	(+)						
21	SF	(+)	(+)		(+)			(+)	(+)		(+)			
23	BA	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)		(+)	(+)				
24	MY	(+)	(+)		(+)			(+)				(+)		
25	EB	(+)	(+)	(+)	(+)			(+)	(+)					
27	EB	(+)	(+)		(+)				(+)					
28	CA ®	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)			(+)				(+)	(+)
29	MEK ® (E)													
30	İl ®	(+)	(+)		(+)	(+)			(+)		(+)			
31	HA ®		(+)		(+)	(+)			(+)					
32	EA ®	(+)	(+)		(+)			(+)	(+)					

Relaps ALL, (İ): Infant ALL, (E): Ekstramedüller tutulum

Tablo 4.4. T ALL Tanısı ile İzlenen Hastaların İmmünofenotiplendirme Sonuçları

Hasta No	Ad Soyad	CD2	CD 3	CD5	CD 7	CD4	CD8	TdT
8	AY (E)		(+)		(+)			
10	ZB	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
11	MK	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
13	HA		(+)	(+)	(+)	(+)		(+)
16	YEİ (E)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
22	EG		(+)	(+)	(+)			
26	ŞK	(+)	(+)	(+)	(+)			

(E): Ekstramedüller tutulum

4.2.2 ALL'li Hastaların Tedavi ve İzlem Özellikleri:

A.Ü.T.F. Pediatrik Hematoloji Kliniğinde 15 yeni tanı ALL'li hasta izlenmiştir. Bu hastalardan 5 numaralı hastaya infant ALL olması nedeni ile CCG 1953 tedavisi, 15 numaralı hastaya matür B ALL olması sebebi ile POG 9317 kemoterapi protokolü başlanmıştır. Bu 2 hasta dışındaki diğer hastalar CCG protokolüne göre risk gruplarına ayrılmış; dört hasta standart risk grubu olarak kabul edilerek CCG 1952 tedavi protokolü ile 9 hasta ise yüksek risk grubu kabul edilerek CCG 1961 tedavi protokolü ile tedavi edilmiştir. Hastaların tamamında indüksiyon sonu remisyon sağlanmıştır. Hastaların son durumları Tablo 4.5' de verilmiştir.

A.Ü.T.F Çocuk Onkoloji Kliniğinde izlenen bir hastaya lenfomatöz lösemi tanısı nedeni ile CCG 106 Rejim B tedavisi başlanmıştır. İndüksiyon sonu remisyon sağlanan bu hastanın halen idame tedavisi devam etmektedir.

Lösante Lösemili Çocuklar Hastanesinden çalışmaya alınan 11 yeni tanı ALL'li hasta BFM95 kemoterapi protokolüne göre risk gruplarına ayrılmış olup hastalardan beşi standart, altısı orta riskli olarak kabul edilmiştir. Yeni tanı ALL'li hastalar içinde yüksek risk grubuna alınan hasta olmamıştır.

Lösante Lösemili Çocuklar Hastanesinde izlenen ve kemik iliği relapsı olan iki hasta REZ BFM 2002 protokolü, A.Ü.T.F. Pediatrik Hematoloji Kliniğinde izlenen kemik iliği relapsı olan 2 hasta CCG 1941 tedavi protokolü, izole SSS relapsı olan bir hasta ise POG 9412 tedavi protokolü ile tedavi edilmiştir. Hastalardan hepsi indüksiyon sonu remisyona girmiş olup, hastaların son durumları Tablo 4.5 de verilmiştir.

Tablo 4.5. ALL'li Hastaların Tedavi ve İzlem Özellikleri

Hasta No	Ad Soyad	Risk grubu	Tedavi Protokolü	İndüksiyon Remisyon	Son durum	GSKS (ay)
1	MEK	Standart	CCG 1952	Var	SSS Relapsı (16.ay)- Ex	38
2	AÇ	Standart	CCG 1952	Var	Yaşıyor	41
3	NKÖ	Standart	CCG 1952	Var	Yaşıyor	46
4	FB	Standart	CCG 1952	Var	Yaşıyor	75
5	MA (İ)	İnfant tip	CCG 1952-1953	Var	Yaşıyor	35
6	HS	Yüksek	CCG 1961	Var	Yaşıyor	42
7	FK (E)	Yüksek	CCG 1961	Var	Yaşıyor	41
8	AY (E)	Yüksek	CCG 1961	Var	Yaşıyor	46
9	EY	Yüksek	CCG 1961	Var	Testis Relapsı –yaşıyor	70
10	ZB	Yüksek	CCG 1961	Var	Yaşıyor	59
	MK	Yüksek	CCG 1961	Var	Yaşıyor	57
12	MÖ	Yüksek	CCG 1961	Var	Kemik iliği Relapsı -Ex (Sepsis)	53
13	HA	Yüksek	CCG 1961	Var	Yaşıyor	72
14	TB	Yüksek	CCG 1961	Var	Yaşıyor	35
15	SA (E)	Yüksek	POG 9317	Var	Kemik iliği relapsı (4.ay)-Ex (Akciğer enf)	5
16	YEİ (E)	Yüksek	COG 106 Rejim B	Var	Yaşıyor	33
17	EY	Standart	BFM 95	Var	Yaşıyor	31
18	RY	Standart	BFM 95	Var	Yaşıyor	36
19	HS	Standart	BFM 95	Var	Yaşıyor	36
20	ÖŞÇ	Standart	BFM 95	Var	Yaşıyor	35
21	SF	Standart	BFM 95	Var	Yaşıyor	34
22	EG	Orta	BFM 95	Var	Yaşıyor	34
23	BA	Orta	BFM 95	Var	Yaşıyor	33
24	MY	Orta	BFM 95	Var	Relaps-HKHT yapıldı- Yaşıyor	31
25	EB	Orta	BFM 95	Var	Relaps (16.ay)-Ex	18
26	ŞK	Orta	BFM 95	Var	Ex (Sepsis)	8
27	EB	Orta	BFM 95	Var	Yaşıyor	35
28	CA ®	Yüksek	CCG 1941	Var	Yaşıyor	37
29	MEK ® (E)	Yüksek	POG 9412	Var	KI Relaps-Ex	22
30	İİ ®	Yüksek	CCG 1941	Var	Refrakter –Ex	3
31	HA ®	Yüksek	ALL REZ BFM 2002	Var	HKHT yapıldı –Yaşıyor	32
32	EA ®	Yüksek	ALL REZ BFM 2002	Var	Relaps (2.ay)-Ex (Refrakter)	7

®: Relaps

(E):Ekstramedüller tutulum

(İ): İnfant ALL

HKHT: Hematopoetik kök hücre transplantasyonu

GSKS: Genel sağ kalım süresi

4.2.3. AML'li Hastaların Tanısal Özellikleri

Hastalardan sekizi A.Ü.T.F. Hematoloji Kliniğinde diğer 3 tanesi ise Lössante Lösemili Çocuklar Hastanesinde takip edilmekteydi. Onbir AML'li hastanın 3'ü relaps 8'i yeni tanı ile izlenmekteydi. AML'li hastaların tanıya ait özellikleri Tablo 4.6'da immünfenotiplendirme sonuçları Tablo 4.7'de verilmiştir

Yeni tanı alan hastaların ikisi MDS'e ikincil gelişmiş olup, bu hastalardan birinde monozomi 7, diğer hastanın 6. kromozomunda ring anomali vardı. Ekstramedüller tutulum iki hastada mevcuttu. Altı numaralı hastada dişeti hiperplazisi, AML M5 tanılı 11 numaralı diğer hastada ise orbital granülositik sarkom vardı.

4.2.4. AML'li Hastaların Tedavi ve izlem Özellikleri

Yeni tanı AML'li hastalardan 7 numaralı hasta standart risk, diğer 7 hasta ise yüksek risk olarak kabul edilmiştir. Hastalardan biri AML BFM 2004 tedavi protokolü diğer 7 hasta ise CCG 2961 tedavi protokolü ile tedavi edilmiştir. AML' li hastaların tedavi ve izlem özellikleri Tablo 4.8 de verilmiştir.

Tablo 4.6. AML'li Hastaların Tanısal Özellikleri

Hasta No	Ad Soyad	Yaş	Cinsiyet	Hb (g/dl)	WBC (10 ⁹ /L)	Trombosit (10 ⁹ /L)	Tanı alt grubu	K. Sitogenetik/ FISH
1	SB (MDS)	11.5	K	9.0	2.4	24	AML M1-M2 Ly+	Çoklu kromozom kırığı, monozomi 7
2	DAÖ (MDS)	4	E	7.7	32	32	AML M4-M5	Ring 6
3	EÖ	11.11	E	10.0	280	39	AML M0 Ly +	Metafaz yok
4	HA®	8.5	E	12.3	1.3	224	AML M4 Ly+	46 XY
5	EB	4.5	E	5.9	1.7	28	AML M4-M5	Metafaz yok
6	BG (E)	3.8	K	7.6	8.7	24	AML M4 LY+	46 XX
7	BB	7.11	K	13.6	43.6	140	AML M2 Ly +	t(8;21)
8	KDŞ (DS)	6	E	8.4	1.6	66	AML-M7 Ly+	Metafaz yok
9	MİY®	5	E	10.7	15.5	47	AML M2	t(9;22)
10	ZK®	12.11	K	9.0	3.4	95	AML M3	t(15;17)
11	RA (E)	6.5	K	9.8	7.1	36	AML M5 Ly+	t(8;21)

®: Relaps

MDS: MDS'e ikincil gelişen AML

E: Ekstramedüller tutulum

DS: Down Sendromu

Tablo 4.7. AML Tanılı Hastaların İmmünofenotiplendirme Sonuçları

Hasta No	Ad Soyad	CD13	CD15	CD33	MPO	CD34	CD41	CD61	CD117	CD 64	CD10	CD 19	CD22	CD24	HLADR	TdT	CD2	CD7
1	SB (MDS)	(+)		(+)		(+)			(+)				(+)					
2	DAÖ (MDS)		(+)	(+)	(+)					(+)					(+)	(+)		
3	EÖ	(+)		(+)		(+)			(+)						(+)			
4	HA®	(+)	(+)	(+)	(+)				(+)	(+)							(+)	
5	EB		(+)		(+)					(+)					(+)			
6	BG (E)	(+)	(+)		(+)					(+)				(+)	(+)		(+)	
7	BB		(+)	(+)	(+)	(+)			(+)			(+)			(+)			
8	KDŞ (DS)			(+)		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)			(+)		(+)			(+)
9	MİY®		(+)	(+)	(+)	(+)						(+)			(+)			
10	ZK®	(+)		(+)											(+)			
11	RA (E)	(+)		(+)		(+)						(+)			(+)			

®: Relaps

MDS: MDS'e ikincil gelişen AML

E: Ekstramedüller tutulum

DS: Down Sendromu

Tablo 4.8. AML li hastaların Tedavi ve İzlem Özellikleri

Hasta No	Ad Soyadı	Risk grubu	Tedavi Protokolü	İndüksiyon remisyon	Son durum	GSKS (ay)
1	SB	Yüksek	CCG 2961	Yok	Refrakter- Ex	4
2	DAÖ	Yüksek	CCG 2961	Var	HKHT-Ex	14
3	EÖ	Yüksek	CCG 2961	Yok	Refrakter- aspergillus enf-Ex	10
4	HA ®	Yüksek	CCG 2961	Var	HKHT-26. ayında relaps- enfex ex	35
5	EB	Yüksek	CCG 2961	Var	SSS ve KI relapsı –Ex	4
6	BG	Yüksek	CCG 2961	Var	Yaşıyor	57
7	BB	Standart	CCG 2961	Var	Aspergillus enf-Ex	3
8	KDŞ	Yüksek	CCG 2961	Var	Relaps-Ex (Sepsis)	11
9	MİY ®	Yüksek	IDA-FLAG	Yok	Refrakter-Akciğer enf-Ex	1
10	ZK ®	Yüksek	Modifiye APL 93	Yok	Refrakter-Akciğer enf-Ex	3
11	RA	Yüksek	AML BFM 2004	Var	Relaps ()- yaşıyor	31

® Relaps

GSKS: Genel sağ kalım süresi

4.2.5. Bifenotipik Lösemi Tanısı ile İzlenen Hastaların Tanı, Tedavi ve İzlem Özellikleri

Bifenotipik Lösemi tanılı 2 hasta vardı. Hastalardan birisi A.Ü.T.F Pediatrik Hematoloji, diğeri ise A.Ü.T.F Pediatrik Onkoloji B.D'nin hastasıydı. Hastaların tanıya ait özellikleri Tablo 4.9'da immünfenotip sonuçları ise Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Bifenotipik Lösemi Hastalarının Tanısal Özellikleri

Hasta No	Ad Soyad	Yaş	Cinsiyet	Hb (g/dl)	BK (10 ⁹ /L)	Tromb (10 ⁹ /L)	K. Sitogenetik FISH
1	SE ®	12.1	K	12.6	4.6	111	-17,-18,
2	ŞA	13.1	K	11.2	6.2	109	İnv(16), monozomi 10

® Relaps

Tablo 4.10. Bifenotipik Lösemi Hastalarının Tedavi ve İzlem Özellikleri

Hasta No	Ad Soyad	Risk grubu	Tedavi Protokolü	Son durumu	GSK (ay)
1	SE ®	Yüksek	CCG 2961	Relaps-Aspergillus enf-Ex	2
2	ŞA	Yüksek	CCG 1961	İdame tedavisi alıyor	32

® Relaps

GSK: Genel sağ kalım süresi

Tablo 4.11. Bifenotipik Lösemi Hastalarının İmmünofenotip Sonuçları

Hasta No	Ad Soyad	CD10	CD19	CD22	CD79 a	CD3	CD7	CD13	CD15	CD33	CD34	CD64	CD117
1	SE (R)				(+)	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)		
2	ŞA	(+)	(+)	(+)	(+)			(+)		(+)	(+)	(+)	(+)

® Relaps

Tablo 4.12. KML, KMML, JMML ve MDS Tanısı Alan Olguların Tanı, tedavi ve izlem Özellikleri

Hasta No	Ad Soyad	Yaş	Cinsiyet	WBC (10 ⁹ /L)	Hb (g/dl)	Trombosit (10 ⁹ /L)	Kl. Sitogenetik FISH	Tanı	Tedavi	Son Durumu	GSKS (ay)
1	EÖ	10.8	K	436	10.8	597	t(9;22)	KML	İmatinib mesilat	Yaşıyor	72
2	FÇ	10.6	E	52.5	14.4	563	t(9;22)	KML	HKHT	HKHT- yaşıyor	76
3	MI	7.10	E	30.6	8.8	214	t(9;22)	KML	Hidrosiüre	Yaşıyor	96
4	HA	8.11	E	51.5	10.4	302	t(9;22)	KML	İmatinib mesilat	Yaşıyor	43
5	İS	10.2	K	167	9.4	449	t(9;22)	KML	Dasatinib	Yaşıyor	73
6	EB	0.8	E	28	6.0	44	Monozomi 7	JMML		Refrakter -Ex (akciğer enf)	3
7	BK	6.7	K	5.9	11.9	64	Monozomi 7, 5q31 delesyonu	KMML	CCG 2961	Refrakter-Ex	7
8	TK	8.11	K	7	9.0	427	Monozomi X	MDS	HKHT	HKHT sonrası 4 yıl, 5ay	58

GSKS: Genel sağ kalım süresi

4.2.6. Kronik Miyeloproliferatif Hastalık ile İzlenen Hastaların Tanı Özellikleri

Kronik miyeloproliferatif hastalık grubunda 5 hasta KML, 1 hasta JMML, 1 hasta KMML ve 1 hasta MDS tanısı ile izlenmekteydi.

KML'li hastaların hepsi erişkin tip KML olup, hepsinin t(9;22) pozitif saptanmıştır. Hastalardan birisinde hidrokşiüre, ikisinde imatinib mesilat tedavisi ile remisyona sağlanmış olup, bir hastaya ise imatinib direnci nedeni ile dasatinib tedavisi uygulanmıştır. Hastalardan birine akselere fazda HKHT yapılmıştır.

JMMLve KMML tanısı ile izlenen 2 hasta tedaviye refrakter olup, enfeksiyonla kaybedilmişlerdir.

Refrakter anemi ile izlenen MDS'lu hastaya tedavi verilmeden HKHT uygulanmış olup hasta halen remisyonda izlenmektedir. Hastaların özellikleri Tablo 4.12. de verilmiştir.

4.3. Jak2V617F Mutasyon Analiz Sonuçları

Çocuk yaş grubu ALL, AML, Bifenotipik lösemi, KML, KMML, JMML ve MDS'lu olgular JAK2V617F mutasyonu varlığı yönünden tarandı. Çalışmaya alınan hastaların hiçbirinde Jak2V617F mutasyonuna rastlanılmadı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Hematopoietik hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve işlevsel hale gelmesi, sitokin ve hormon olarak sınıflandırılabilen bir dizi hücre dışı molekül tarafından kontrol edilmektedir. Normal hematopoez, sıkı bir şekilde kontrol edilen, sitokinlerin ve reseptörlerin önemli rol oynadığı bir dizi sinyal ileti yolağına sahiptir. Bu yolakların normal çalışması, normal hematopoezin devamı için büyük bir öneme sahiptir. Bu yolaklarda ortaya çıkabilecek anormallikler, azalmış apoptoza, kontrol dışı çoğalmaya ve malign dönüşüme yol açabilmektedir.

Sinyal ileti sistemlerinden Jak/STAT sinyal ileti sistemi üzerinde son yıllarda geniş çapta araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Jak kinazlara bağlı olarak malign hücre büyümesi, yaşam süresi ve ölüm son yılların ilgi çekici konularını oluşturmaktadır. Jak/ STAT yolunun belli bazı durumlarda, interferon aktivasyonu aracılığı ile neoplastik hücre büyümesini kontrol ettiği ve malign dönüşümü tetiklediği belirlenmiştir. Bu malign sürecin gelişiminde de protein tirozin kinazlarda oluşan mutasyonlar önemli bir yer tutmaktadır.

Jak2 V617 F mutasyonu Jak2 geninin aktivasyonu ile sonuçlanan ve malign dönüşümde önemli görev alan bir somatik mutasyondur.

Yapılan ilk klinik çalışmalar sonucunda Jak2V617F mutasyonunun Polisitemia vera tanılı 434 hastanın 335'inde (%77), 280 esansiyel trombositemili hastanın 96'sında (%35), idiopatik miyelofibrozisli 92 hastanın 40'ında (%43) bulunduğu saptanmıştır. Sonraki çalışmalarda daha duyarlı yöntemler kullanılarak bu mutasyon oranlarının, polisitemia veralı hastaların yaklaşık %99'unda, esansiyel trombositemili ve miyelofibrozisli hastaların ise %50'sinde bulunduğu gösterilmiştir (100-105). Jak2V617F mutasyonunun miyeloproliferatif hastalıklardaki yerinin anlaşılmasından sonra WHO 2008 erişkin miyeloproliferatif malinite tanı ve sınıflama kriterleri içerisine Jak2V617F mutasyonu da dahil edilmiştir (106). Miyeloid seriyi etkileyen bu tek hastalık allelinin anlaşılması, Jak2V617F mutasyonunun diğer hematopoietik malignitelerin patogenezinde de rol oynayabileceği fikrinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Ayrıca, miyeloproliferatif hastalıkta,

AML'de, ve ALL'de TEL-JAK2 ve PCM1-JAK2 füzyonlarının varlığının saptanması (87,88,107) ve hematopoetik ve nonhematopoetik malignitelerde JAK-STAT yolunun aktivasyonunun gösterilmesi de bu fikrin desteklenmesini sağlamıştır (108).

Bu bilgilere dayanarak KMML, atipik KML (BCR-ABL negatif), AML, MDS, ALL ve kronik lenfositler lösemili erişkin hasta gruplarında Jak2V617F mutasyonu araştırılmıştır. Levine ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; 222 AML'li hastanın sadece 4 ünde Jak2V617F mutasyonu olduğu belirlenmiştir. Mutasyon olan olguların öyküleri detaylı olarak irdelendiğinde olguların üçünde AML gelişiminden önce miyeloproliferatif hastalık öyküsü olduğu saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığında miyeloproliferatif hastalıktan AML'ye transforme olan olgularda Jak2V617F mutasyonunun sıklıkla görülebileceği buna karşın de-novo gelişen AML'de ise Jak2V617F mutasyonu varlığının nadir bir durum olduğu belirtilmiş ve de-novo AML'de Jak2V617F mutasyonunun görülme sıklığı % 0.5 olarak bildirilmiştir (15).

AML'de alt gruplara göre de Jak2V617F mutasyonu sıklığı belirlenmeye çalışılmıştır. Jelinek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; AML M0-M5 li 20 ve AML M6'lı 8 hastanın hiçbirinde Jak2V617F mutasyonu saptanmazken, AML M7'li 11 hastanın 2 sinde Jak2V617F mutasyonu olduğu gösterilmiştir (14). Yüzelliiki AML'li hasta serisini içeren başka bir çalışmada ise, 85 AML M5'li hastanın ve 14 AML M7 hastanın hiçbirinde Jak2V617F mutasyonu saptanmazken, 53 AML M6'lı hastanın ise sadece 1'inde JAK2V617F mutasyonu varlığı gösterilmiştir (109). Sonuç olarak Jak2 V617F mutasyonunun AML M5, M6 ve M7 patogenezinde önemli bir role sahip olmadığı kararına varılmıştır. Ayrıca yine bu çalışmada daha öncesinde miyeloproliferatif hastalığı olduğu bilinen 7 hastanın 5'inde Jak2V617F mutasyonu saptanmış ve miyeloproliferatif hastalık sonrasında gelişen AML'de Jak2V617F mutasyonuna sıklıkla rastlanıldığı sonucuna varılmıştır (109).

Daha geniş hasta serisini içeren bir başka çalışmada 339 erişkin AML'li hastada tanı anındaki kan örneklerinden Jak2V617F mutasyonu çalışılmış, hastaların 11'inde (%3.2) mutasyon varlığı saptanmıştır. Olguların tamamı

daha az differansiye olan AML M1 veya M2 alt tiplerinde görülmüş olup, ikincil AML'de mutasyon oranı %8.3, de-novo AML'de ise %2.7 olarak bildirilmiştir. Jelinek ve arkadaşlarının aksine bu çalışmada AML M7li 4 hastanın hiçbirinde mutasyon gösterilememiştir (110). Yine aynı çalışmada, 3 olgu hariç genel olarak mutasyonun komplet remisyonda kaybolduğu ve relapsta tekrar görüldüğü saptanmış ve tüm olgularda saptanmaması sebebi ile de Jak2V617F mutasyonunun izlemde kullanmak için iyi bir gösterge olmadığı kanaatine varılmıştır. Aynı çalışmada mutasyon varlığının hastanın genel sağkalımı üzerine de etkili olmadığı gösterilmiştir (110).

Bizim çalışmamızda yer alan 8 yeni tanı, 3 relaps AML'li hastanın hiçbirisinde Jak2V617F mutasyonu saptanmadı ve öyküleri irdelendiğinde AML gelişiminden önce hiçbir olguda miyeloproliferatif hastalık öyküsü bulunmadığı belirlendi. Ayrıca; AML'li hastaların alt gruplarına göre dağılımlarına bakıldığında alt gruplar arasında da bir fark olmadığı sonucuna varıldı. Literatürde de-novo gelişen AML olgularında Jak2 V617F mutasyon varlığı çok nadir olarak bildirilmektedir. Bizim çalışmamızın sonuçları da literatür ile uyumlu olmakla birlikte daha fazla sayıda AML'li olgunun irdelendiği çalışmalar ile bu sonuçların desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca yapılacak olan çalışmalarda olguların miyeloproliferatif hastalık sonrası gelişen olgular ve de-novo AML olarak 2 grup halinde çalışılmasının sonuçların daha iyi yorumlanmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

AML'li olgularda hücre alt tipine göre yapılan sınıflama ile Jak2V617F mutasyonu arasında bir ilinti olmadığına saptanması üzerine, AML'de mevcut sitogenetik bozukluklar ile Jak2V617F mutasyonu arasındaki ilişki irdelenmiştir. AML'de t(8;21) varlığında Jak2V617F mutasyonu görülme oranına bakıldığında 64 olgunun 4'ünde Jak2V617F mutasyonu saptanmış ve 2 sitogenetik anormalliğin birlikte görülme oranı %6 olarak verilmiştir. Inv (16) pozitifliği olan 99 olguluk bir seride hastaların hiçbirinde Jak2V617F mutasyonu saptanmamıştır (111). Bu çalışmada sitogenetik anomaliler ile Jak2V617F mutasyonu arasında kesin bir ilinti olup olmadığı gösterilememiş ve ileride yapılacak olan metaanalizlerin özellikle farmakolojik inhibisyonlara ışık tutacağı vurgulanmıştır. Bir diğer erişkin t(8;21) pozitif AML'li 78 olguluk

bir seride 6 olguda (%7.7) Jak2V617F mutasyonu saptanmış ve bu mutasyonu taşıyan olguların tanı anındaki beyaz küre sayılarının yüksek olduğu, ayrıca kötü prognozla ilintili olduğu belirtilmiştir (112). Benzer bir başka çalışmada 45 t(8;21) translokasyonu taşıyan AML'li olgunun 3'ünde (%6.7) Jak2V617F mutasyonu saptanmış, bu translokasyonu göstermeyen 137 olgunun ise sadece birinde mutasyon varlığı gösterilmiştir(113). Bu çalışma ve daha önce yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde Jak2V617F mutasyonunun prognozu kötü etkilediği ve erken relapsla ilintili olduğu üzerinde durulmuştur (113,114). Olgularımıza sitogenetik bozukluklar açısından baktığımızda; t (8;21) pozitifliği gösteren 2 AML'li olgu bulunmakta olup, bu olguların hiçbirinde de Jak2V617F mutasyonu belirlenememiştir. Hasta sayımız az olmakla birlikte bizim çalışmamız sonucunda sitogenetik anomali ile Jak2V617F mutasyonu arasında bir ilinti olmadığı düşünülmüştür. Daha fazla sayıda sitogenetik anormalliği olan çocukluk çağı AML'li olgularla yapılacak olan çalışmalar ile sitogenetik anomali ile JAK2V617F mutasyonu arasındaki ilintinin daha da iyi anlaşılabilceğini düşünmekteyiz.

KML'de Philadelphia kromozomu pozitif olan 99 hastalık bir seride Jak2V617F mutasyonu saptanmazken, Philadelphia kromozomu negatif 16 hastanın ise 3'ünde (%19) Jak2 V617F mutasyonu varlığı gösterilmiştir (14). Bizim çalışmamızda KML'li 5 hastanın hepsinde de Philadelphia kromozomu pozitif saptanmış ve hiçbirinde Jak2V617F mutasyon pozitifliğine rastlanmamıştır. Hasta sayımız az olmasına karşın bulgularımız literatür ile uyumlu bulunmuştur. Ancak daha geniş hasta serileri ile yapılan çalışmalar ile daha kesin sonuçlara ulaşılabileceğini düşünmekteyiz.

KMML'li 52 hastayı içeren bir çalışmada 7 hastada (%13) Jak2V617F mutasyonu saptanmıştır (14). Benzer bir çalışmada da 119 KMML'li hastanın üçünde Jak2V617F mutasyonu varlığı gösterilebilmiştir. Bu üç hastanın birinde daha önceden belirgin miyeloproliferatif hastalık özellikleri, birisinde miyelodisplazi bulguları ve diğerinde de 2 özelliğin birlikte bulunduğu ifade edilmiştir. Aynı zamanda üç hastanın ikisinde kemik iliğinde hafif-orta derecede retikülin fibrozisi bulunduğu da vurgulanmıştır (11). Çalışmamızda sadece bir KMML'li olgu bulunup, bu olguda da tanı öncesine ait

miyeloproliferatif hastalık öyküsü bulunmamaktaydı. Olgumuz daha önce dış bir merkezde KML tanısı konulup, ona yönelik tedavi başlanmış bir hastaydı. Hastamızda Jak2V617F mutasyonu saptanmadı. Ancak çalışma grubumuzda sadece bir hastada KMML olması çocukluk çağı KMML olgularında Jak2V617F mutasyon sıklığı hakkında kesin sonuçlara varmamızı engellemektedir.

İnvitro ve invivo lösemik hücre serilerinde programlanmış hücre serilerini uyarmak suretiyle yapılan çalışmalarda; lösemik hücre büyümesinin seçici olarak bloke edilmesinin inhibisyonu ile Jak2'nin yapısal aktivasyonu gösterilmiştir (95). ALL'de t(9;12)(p24;p13) kromozomal tranlokasyonu varlığında Jak2 kinaz aktivitesinin deregüle edilmesine bağlı olarak Tel-Jak2 füzyon proteini aracılığı ile sitokinden bağımsız olarak hücre çoğalması ve ALL gelişiminin ortaya çıktığı fare modellerinde gösterilmiştir (96). Bu durum nadiren görülmesine karşın araştırmacıları ALL'li çocuk hastalarda Jak2 V617F mutasyonu çalışmaya yönlendirmiştir.

Malinge'nin miyeloid ve B lenfoid akut lösemili 90 hasta üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada Jak2 mutasyonuna bakılmış ve Down sendromlu 4 yaşındaki bir PreB ALL olgusunda psudokinaz bölgesinde 5-aminoasit delesyonu neticesinde Jak-STAT yolu aktivasyonu ve büyüme faktörlerinden bağımsız hücre proliferasyonu ile giden Jak2ΔIREED mutasyonuna rastlanmıştır (18). Bu bulgu ile ve daha önceden Walters ve arkadaşlarının akut megakaryoblastik lösemilerde Jak3 allellerinin aktivasyonunun gösterilmesine de dayanarak, trizomi 21 yapısal değişikliği ile JAK/STAT aktivasyonu arasında bir bağlantının olabileceği fikri öne sürülmüştür (115). Bu varsayım Down Sendromu ve ALL tanılı daha geniş bir çalışmada 88 çocuk hastada Jak2 eksonunun taranması ve Jak2V617F mutasyonu dışında hastaların 16'sında (%18) eksonun diğer bölgelerinde başka mutasyonlara rastlanması ile desteklenmiştir (116). Yüksek performanslı likid-kromatografi ile pre-B ALL'li Down sendromlu olmayan hastaların Jak2 mutasyonu yönünden taranması ile Jak2 L611S olarak tanımlanan farklı bir mutasyon saptanmıştır (19). Bu çalışmalardan sonra ALL'li hastalarda Jak2V617 mutasyonu varlığının araştırılması ile ilgili

çalışmalar da hızlanarak devam etmiştir. Levine tarafından erişkin yaş grubunda yapılan bir çalışmada ise B ALL'li 83 hastanın ve 93 T hücreli ALL'li hastanın hiçbirinde Jak2 V617F mutasyonu varlığı gösterilememiştir (15). Çocukluk çağı lösemilerinde yapılan Sulong'un çalışmasında 128 ALL'li hastada (87 yeni tanı, 42 relaps) kemik iliğinden alınan örneklerde Jak2 V617 mutasyonuna rastlanmamıştır (17).

Testis ve SSS tutulumu, MLL yeniden düzenlenmesi, yaş, cins gibi yüksek risk özelliklerini taşıyan hastaların seçildiği ve BCR-ABL pozitifliği olan ve indüksiyon sonunda başarısız olan olguların dahil edilmediği Mullighan'ın çalışmasında 187 hastanın 16 sında Jak2 mutasyonu varlığı gösterilmiş. Bu mutasyonların 13'ü pseudokinaz domaininde, üçü ise kinaz domaininde saptanmış ancak bu mutasyonlar içinde Jak2 V617F mutasyonuna rastlanmamıştır (117).

Bizim çalışmamızda da 32 akut lenfoblastik lösemili hastanın hiçbirinde Jak2V617F mutasyonu varlığı saptanmamıştır. Sonuçlarımız literatür ile uyum göstermekte olup, Jak2V617F mutasyonunun ALL gelişimine katkısı olmadığını düşündürmektedir.

Hem lenfoid hem miyeloid yüzey antijenleri taşıyan ve hem ALL hem AML özelliklerini barındıran 2 bifenotipik lösemi olgusunda da Jak2V617F mutasyonuna rastlanmamıştır.

Myelodisplastik sendrom, inefektif hematopoez ile karakterli klonal bir kemik iliği hastalığı olup değişik derecelerde malignite gelişimi ile karakterizedir. Yapılan çalışmalar erişkin ve çocukluk çağı MDS'i arasında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Daha önceden çocukluk çağı MDS'li olguların sınıflaması erişkinlerinkine benzer şekilde yapılmakta iken çocukluk çağı ve erişkin MDS olguları arasındaki farklılıklar nedeniyle artık günümüzde çocukluk çağı myelodisplastik sendrom sınıflaması WHO'ya göre yapılmaktadır (25). Bu sınıflama ile JMML, KMML, Down sendromunda görülen AML MDS sınıflaması içine alınmıştır. Özellikle çocukluk çağı MDS'unda nörofibromatozis Tip 1, Noonan sendromu, trizomi 8 mozaizmi, Fanconi aplastik anemisi, Kostman sendromu, Diamond-Blackfan anemisi gibi doğumsal sendromların ve diğer genetik anomalilerin görülebilmesi ve

hastalarda AML gelişimine yatkınlık olması sebebi ile altta yatan başka genetik anomalilerin olabileceği ve bu zeminde lösemi gelişebileceği düşünülmüştür. Bu sebeple bu genetik anomaliler içerisinde Jak2V617F mutasyonu da araştırılmaya alınmıştır(118).

Literatür incelemeleri sonucunda MDS'de Jak2V617F mutasyonu sıklığının çok yüksek olmadığı dikkati çekmiştir. Yüzbir MDS'li hastanın dahil edildiği bir çalışmada 5 hastada mutasyon saptandığı bildirilmiştir (11). Bizim çalışmamızda bir MDS'li ve öncesinde MDS olduğu bilinen 2 AML'li hasta vardı. Bu 3 hastanın hiçbirinde Jak2V617F mutasyonu saptanmadı. Sonuçlarımız, literatür ile uyumlu olarak MDS'de ya da MDS'e ikincil AML olgularında Jak2V617F mutasyonunun düşük oranda olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ancak daha net sonuçlara varılabilmesi için çocukluk çağı MDS'li hasta sayısının fazla olduğu çalışmalar ile bu sonuçların desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

JMML, bebeklik ve erken çocukluk çağının agresif gidişli, oldukça kötü prognoza sahip, miyelodisplastik/miyeloproliferatif hastalığı olarak bilinmektedir. JMML'de GM-CSF 'e karşı monosit ve makrofajlar aşırı duyarlı hale gelmektedirler. JMML patogenezinde; GM-CSF/Ras sinyal iletim yolu üzerinde RAS (%15-20), Nörofibromatozis tip I (%25), protein-tirozin fosfataz nonreseptör tip 11(%34) genlerindeki anormallikler sorumludur. Hastaların %25'indeki genetik defekt ise tespit edilememiştir. Jak2'nin fiziksel olarak GM-CSFR β zinciri ile ilişkili olması sebebi ile JMML'de Jak2 mutasyonlarının varlığı araştırılmıştır (119,120). Tono ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 5 çocuk hastanın sadece birinde Jak2V617F mutasyonu saptanmıştır (120). Zecca ve arkadaşlarının 62 JMML'li çocuk hasta üzerinde yaptığı daha geniş kapsamlı bir çalışmada ise, hastaların hiçbirinde Jak2V617F mutasyonuna rastlanmamıştır (121).

Bizim hasta grubumuzda 1 JMML tanılı hasta olup, bu hastada da Jak2V617F mutasyonu saptanmamıştır. Sonuç olarak literatür bilgileri de dikkate alındığında hasta sayımızın çok az olmasına karşın JMML patogenezinde Jak2V617F mutasyonunun oldukça nadir yer aldığını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak; Çalışmamızda Jak2V617F mutasyonunun çocukluk çağında görülen lösemi tiplerindeki varlığını belirlemeyi, hastalığın klinikopatolojik özellikleri ve prognoz ile ilintisini saptamayı ve ayrıca minimal rezidüel hastalık göstergesi olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmayı hedeflemiştik. Çalışma verilerimiz değerlendirildiğinde, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerinde Jak2V617F mutasyonunu görülmediği ve bu mutasyonun hastalığın patogenezinde etkili olmadığı kanaatine varılmıştır. Çalışmaya dahil edilen diğer çocukluk çağı lösemilerinde ise hasta sayılarının yetersiz olması sebebi ile, bu gruplarda Jak2V617F mutasyonunun patogenezi ve prognoz üzerine katkısı olup olmadığı hakkında kesin bir sonuca varılamamıştır.

ÖZET

ÇOCUKLUK ÇAĞI LÖSEMİLERİNDE JAK2V617F MUTASYONU SIKLIĞININ BELİRLENMESİ VE PROGNOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Janus kinaz geninde fonksiyon kazanımına yol açan ve bir somatik mutasyon olan Jak2V617F mutasyonu polisitemia vera, esansiyel trombositemi ve kronik idyopatik miyelofibrozis gibi miyeloproliferatif hastalıklarda sıkça tanımlanmaktadır. Son zamanlarda Philadelphia negatif (Ph-) kronik miyeloid lösemi, akut miyeloid lösemi ve miyelodisplastik sendromda da varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı; Çocukluk çağı hematolojik malignitelerinde Jak2V617F mutasyonunun varlığını araştırmak ve bu mutasyonun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini belirlemektir.

Çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalları ve Lösev Lösemili Çocuklar Hastanesinden farklı tip hematolojik maligniteleri nedeni ile izlenen 53 hasta alındı. Hastaların yaş ortalaması 6.94 ± 3.90 yıl (0.8-15 yaş) bulundu. Hastaların 32'si akut lenfoblastik lösemi, 11'i akut miyeloblastik lösemi, 5'i kronik miyeloid lösemi, 2'si bifenotipik lösemi, 1'i juvenil miyelomonositer lösemi, 1'i kronik miyelomonositer lösemi ve 1'i miyelodisplastik sendromdu. Jak2V617F mutasyonunun genetik analizi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Light Cyler cihazında çalışıldı. Örneklerden 42'si yeni tanı, 11'i relaps dönemine aitti.

Hasta örneklerinin hiçbirinde Jak2V617F mutasyonuna rastlanmadı. Bu mutasyonun miyeloproliferatif hastalıklar ve erişkin lösemisinde görülmesine karşın çocukluk çağında yapılan az sayıdaki çalışmalar bu mutasyonun çocukluk çağı lösemilerinde saptanmadığını düşündürmüştür. Bu bilgilerin ve çalışma verilerimizin ışığı altında çocukluk çağı lösemilerinde Jak2V617F mutasyonunun gösterilebilmesi için daha geniş serilere ihtiyaç duyulduğunu ve çocukluk çağı lösemileri ile Jak2 mutasyonları arasındaki ilişkinin

saptanması için tüm Jak2 eksonun taranmasının daha faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Akut lösemi, çocukluk çağı, kronik miyeloproliferatif hastalık, Jak2V617F mutasyonu, Miyelodisplastik sendrom

SUMMARY

DETERMINING THE FREQUENCY MUTATION OF JAK2V617F IN CHILDHOOD LEUKEMIAS AND RESEARCHING ITS EFFECTS ON PROGNOSIS

The somatic gain-of-function mutation of the Janus kinase 2 (JAK2) gene is found in patients with chronic myeloproliferative disorders such as polycythemia vera, essential thrombocythemia, and chronic idiopathic myelofibrosis. It is also associated with Philadelphia negative (Ph -) chronic myeloid leukemia, acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. The aim of this study was to investigate the Jak2V617F mutation in different types of childhood hematologic malignancies and its correlation with clinicopathologic parameters.

A total of 53 children who were admitted to the pediatric hematology-oncology unit of Ankara University and LOSEV Foundation for Children with Leukemia with different types of hematologic malignancies were enrolled to this study. Their mean age was 6.94 ± 3.90 years (range: 0.8-15 years). Thirty-two of the patients had acute lymphoblastic leukemia, 11 had acute myeloid leukemia, 5 had chronic myeloid leukemia, 2 had bifenotypic leukemia, 1 had juvenile myelomonocytic leukemia, 1 had chronic myelomonocytic leukemia and 1 had myelodysplastic syndrome. The genetic analysis of the Jak2V617F mutation was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR) on a Light Cycler. Forty-two samples were analyzed at the diagnosis and 11 samples during relapse period.

There was no positivity of Jak2V617F mutation in whole samples. We could not find V617F mutation in childhood hematologic malignancies. Although the mutation was related with myeloproliferative diseases and leukemia in adults, the few studies which were done in leukemia of childhood period were not supported them. On the light of these studies, larger series are needed to determine the significance of Jak2V617F mutation in

childhood hemetologic malignancies. We concluded that whole exon of Jak2 will be detected for identifying the relation between this Jak2 mutations and childhood hematologic malignancies.

Key Words: Acute leukemia, childhood, chronic myeloproliferative diseases, Jak2V617F mutation, Myelodysplastic syndrome

KAYNAKLAR

1. Linet MS, Ries LA, Smith MA, Tarone RE, Devesa SS. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1051-1058
2. Olney HJ, Gozzetti A, Rowley JD. Chromosomal abnormalities in childhood hematologic malignant disease In:Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, Eds. *Hematology of infancy and childhood*, 6th ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 2003:1101-1134
3. Bhatia S, Leslie LR. Epidemiology of leukemia in childhood In:Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, Eds. *Hematology of infancy and childhood*, 6th ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 2003:1081-1100
4. Verma A, Kambhampati S, Parmar S, Plataniias LC. JAK family of kinases in cancer. *Cancer and metastasis Reviews*. 2003;22:423-434
5. Darnell JE Jr, STATs and gene regulation. *Science* 1997;227:1630-1635
6. Horvath CM, Darnell JE Jr, The state of the STAT's ;recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:233-239
7. Ihle NJ, Gilliland DG. Jak 2 normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr Opin Gen and Dev* 2007 ;17:8-14
8. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144-1148
9. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Eng J Med* 2005;352:1779-1790

10. Khwaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *British Journal of Haematology*. 2006;134:366-384
11. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland GW, Kaufmann SH. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent even in both 'atypical' myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005;106:1207-1209
12. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genomic Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase *Jak2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-1061
13. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase *Jak2* in polycythaemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387-397
14. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa JP. *JAK2* mutation 1849G >T is rare in acute leukemias but can be found in CMML Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005;106:3370-3373
15. Levine RL, Loriaux M, Huntly B.J.P, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland G, Druker B, Deininger MWN. The *JAK2*V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and

- acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*;106:3377-3379
16. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schuitheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC Widespread occurrence of the JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106:2162-2168
 17. Sulong S, Case M, Minto L, Wilkins B, Hall A, Irving J. The V617 F mutation in Jak2 is not found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2005;130:964-972
 18. Malinge S, Ben-Abdelali R, Settegrana C, Radford-Weiss I, Debre M, Beldjord K, Macintyre E.A, Villeval J-C, Vainchenker W, Berger R, Bernard O.A, Delabesse E, Penard-lacronique V. Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;109:2202-2204
 19. Kratz CP, Boll S, Konzny U, Schrappe M, Nimeyer CM, Stanulla M. Mutational screens reveals a novel Jak2 mutation L611S, in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2006;20:381-383
 20. Yıldız İ. Kronik Miyeloid Lösemi. Özkan A.eds, *Pediyatrik Onkoloji*. 1. baskı. Nobel Tıp Kitabevi. 2009;485-491
 21. Rubnitz J E, Razzouk BI, Ribeiro RC. Acute myeloid leukemia. In: Pui C-H. Eds. *Childhood Leukemias*. 2th ed. Cambridge University Press. 2006; 499-539
 22. Silverman LB, Sallan SE. Acute Lymphoblastic Leukemia. In:Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, Eds. *Hematology of infancy and childhood*, 6th ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 2003:1135-1166
 23. Hasle H. Myelodysplastic syndrome. In: Pui C-H. Eds. *Childhood Leukemias*. 2th ed. Cambridge University Press. 2006; 499-539
 24. Bennett C, Hsu K, Look AT. Myeloid leukemia, myelodysplasia, and myeloproliferative disease in children In:Nathan DG, Orkin SH,

- Ginsburg D, Look TA, Eds. Hematology of infancy and childhood, 6th ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 2003:1167-1209
25. Emanuel PD. Juvenile myelomonocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2008;22:1335-1342
 26. Onciu M, Pui C-H. Diagnosis and classification. In: Pui C-H. Eds. *Childhood Leukemias*. 2th ed. Cambridge University Pres. 2006; 21-47
 27. Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, Kiyoi H, Kinoshita T, Emi N, Saito H, Naoe T. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol* 2005;74:418-23.
 28. Behm FG. Immunophenotyping. In: Pui C-H. Eds. *Childhood Leukemias*. 2th ed. Cambridge University Pres. 2006; 150-209
 29. Head DR. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, Eds: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004, pp:2063-76.
 30. Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Nov;56(2):223-34.
 31. Golub TR. The molecular basis of hematologic malignancy in children In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, Eds. *Hematology of infancy and childhood*, 6th ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 2003:1219-1258
 32. Lowell C. Fundamentals of blood cell biology. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG Eds *Medical Immunology* 9th ed, 1997:9-25
 33. Kim SH, Lee MS. STAT 1 as a key modulator of cell death. *Cellular Signaling* 2007;19:454-465
 34. Benekli N, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003;101:2940-2954

35. Chen W, Hkhourana Signal transducer and activator of transcription signals in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:529-541
36. Tang X, Marciano DL, Leeman SE, Amar S. LPS induces the nteraction of a transcription factor, LPS-induced TNF-alpha factor, and STAT6bwith effectes of multipl cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5132-5137
37. Miyoski K, Cui Y, Riedlinger G, Robinson P, Lehoczky J, Zon L, Oka T, Dewar K, Hennighausen L. Structure of the Mouse Stat 3/5 locus: evolution from Drosophila to zebrafish to Mouse. *Genomics* 2001;71:150-155
38. Chen W, Daines MO, Khurana Hershey GK. Turning of signal transducer and activator of transcriptipn (STAT): the negative signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:476-489quiz 90
39. Becker S, Groner B, Muller CW. Three-dimensional structure of the Stat3 β homodimer bound to DNA. *Nature* 1998;394:145-151
40. Chen X, Winkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuruyan J. Crystal structure of a tyrosine phsphorileted STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 1998;93:827-839
41. Mao X, Ren Z, Parker GN, Sondermann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray JS, Demeler B, Darnell JE Jr, Chen X. Structural bases of unphosphorilated STAT1 association and receptor binding *Mol Cell* 2005;17:761-771
42. Neculai D, Neculai AM, Verrier S, Straub K, Klumpp K, Pfitzner E, Becker S. Structure of the unphosphorilated STAT5a dimer. *J Biol Chem* 2005;280:40782-40787
43. Stancato LF, David M, Carter-Su C, Lamer AC, Pratt WB. Preassociation of STAT1 with STAT2 and STAT3 in separate signalling complexes prior to cytokine stimulation. *J Biol Chem* 1996;27:4134-4137
44. Decker T, Kovarig P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;19:2628-2637

45. Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 1995;82:463-473
46. Kovarik P, Mangold M, Ramsauer K, Heidari H, Steinborn R, Zotter A, Levy DE, Müller M, Decker T. Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *Embo J* 2001;20:91-100
47. Yu H, Jove R The STAT's of cancer – new molecular targets come of age *Nature Reviews Cancer*; 2004; 4:97-105
48. Paukku K, Silvennoinen O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine end Growth Factor Reviews*. 2004;15:435-455
49. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumara I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Krats-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32 Dcells mediated by the Ras and Stat5 pathways. *Blood*.2000;96:3907-3914
50. Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 2002;109:1133-1137
51. Rane SG, Reddy EP Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000;19:5662-5679
52. Ihle JN The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol* 1995;6:1-35
53. Leonard WJ, O'shea JJ Jak's and STAT's. Biological implications. *Ann Rev Immunol* 1998;16:293-322
54. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt III VET, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janusu kinases (Jaks) *Genome Biology* 2004;5(12)253
55. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S, The protein kinase complement of the human genom. *Science*.2002;298:1912-1934

56. Zhou YJ, Chen M, Cusack NA, Kimmel LH, Magnuson KS, Boyd JG, Lin W, Roberts JL, Lengi A Buckley RH, Geahlen RL, Candotti F, Gadina M, Changelian PS, O'Shea JJ. Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: Structural implication for Janus kinases *Mol Cell* 2001;8:959-969
57. Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Hakoshima T, Structural bases of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *Eur Mol Biol Org J* 2000;19:4449-4462
58. Musso T, Johnston JA, Linnekin D, Varesio L, Rowe TK, O'Shea JJ, McVicar DW. Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2,4, and 7. *J Exp Med* 1995;181:1425-1431
59. Tortolani PJ, Lal BK, Riva A, Johnston JA, Chen YQ Reaman GH, Beckwith M, Longo D, Ortaldo JR, Bhatia K, McGrath I, Kehrl J, Tuscano J, McVicar DW, O'Shea JJ. Regulation of JAK3 expression and activation in human B cells and B cell malignancies. *J Immunol* 1995;155:5220-5226
60. Hofmann SR, Lam AQ, Frank S, Zhou YJ, Ramos HL, Kano Y, Agnello D, Youler J, O'Shea JJ. Jak3-independent trafficking of the common gamma chain reseptor subunit: Chaperone function of Jaks revisited. *Mol Cell Biol* 2004;24:5039-5049
61. Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 1992;70:313-322
62. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C. Identification of Jak2 as a growth hormone reseptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 1993;74:237-244
63. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. Jak2 associated with the erythropoetin reseptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoetin. *Cell* 1993;74:227-236

64. Muller M, briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur AG, Barbieri G, Witthuhn BA, Schindler C. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon alpha/beta and γ -signal transduction. *Nature* 1993;366:583-585
65. Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signaling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 1993;366:583-585
66. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19:2474-88.
67. Doğan L, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35:34-42
68. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;227:1630-1635
69. Horvath CM, Darnell JE, Jr. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol.*1997;9:233-239
70. Boggon TJ, Li Y, Manley PW, Eck MJ. Crystal structure of the Jak3 kinase domain in complex with a staturosporine analog. *Blood* 2005;106:996-1002
71. Lucet IS, Fantino E, Styles M, Bamert R, Patel O, Broughton SE, Walter M, Burns CJ, Treutlein H, Wilks AF, Rossjohn J. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood* 2006;107:176-183
72. 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
73. Ihle NJ. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell. Biol.* 2001;13:211-217
74. Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell* 2003;14:1448-1459

75. Funakoshi-Tago M, Pelletier S, Matsuda T, Parganas E, Ihle JN. Receptor specific downregulation of cytokine signaling by autophosphorylation in the FERM domain of Jak2. *EMBO J* 2006;25:4763-4772
76. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002;8:945-954
77. Turkson J, Jove R. STAT proteins: Novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*. 2000;19:6613-6626
78. Mizuguchi R, Noto S, Yamada M, Ashizawa S, Higashi H, Hatakeyama M. Ras and signal transducer and activator of transcription (STAT) are essential and sufficient downstream components of Janus kinases in cell proliferation. *Jap J Cancer Res* 2000;91: 527–533
79. Alam R, Pazdrak K, Stafford S, Forsythe P. The interleukin-5 /receptor interaction activates Lyn and Jak2 tyrosine kinases and propagates signals via the Ras-Raf-1- MAP kinase and the Jak-STAT pathways in eosinophils. *Int Arch All Immunol* 1995;107: 226–227
80. Kumar G, Gupta S, Wang S, Nel AE. Involvement of Janus kinases, p52shc, Raf-1, and MEK-1 in the IL-6-induced mitogen-activated protein kinase cascade of a growth responsive B cell line. *J Immunol* 1994;153: 4436–4447
81. Danial NN, Rothman P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 2000;19: 2523–2531
82. Packham G, White EL, Eischen CM, Yang H, Parganas E, Ihle JN, Grillot DA, Zambetti GP, Nunez G, Cleveland JL. Selective regulation of Bcl-XL by a Jakk inase dependent pathway is bypassed in murine hematopoietic malignancies. *Gen Dev* 1998;12: 2475–2487
83. Sakai I, Kraft AS. The kinase domain of Jak2 mediates induction of bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 12350–12358
84. Wen R, Wang D, McKay C, Bunting KD, Marine JC, Vanin EF, Zambetti GP, Korsmeyer SJ, Ihle JN, Cleveland J. Jak3 selectively

- regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol Cell Biol* 2001;21: 678–689
85. Quelle FW, Wang J, Feng J, Wang D, Cleveland JL, Ihle JN, Zambetti GP. Cytokine rescue of p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest is mediated by distinct Jak kinase signaling pathways. *Gen Development* 1998;12: 1099–1107
 86. Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000;95:19-29
 87. Lacronique V, Boureux A, Vale VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*. 1997;278: 1309-1312
 88. Peeters P, Raynaud Sd, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, Monpoux F, Van Rompaey L, Baens M, Van den Berghe H, Marynen p. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 1997;90:2535-2540
 89. Schwaller J, Frantsve J, Aster J, Williams JR, Tomasson MH, Ross TS, Peeters P, Van Rompaey L, Van Etten RA, Ilaria R JR, Marynen P, Gilliland DG. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *EMBO J* 1998;17:5321-5333
 90. Ho JM, Baettie BK, Squire JA, Frank DA, Barber DL. Fusion of ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling. *Blood* 1999;93:4354-4364
 91. Schwaller J, Parganas E, Wang D, Cain D, Aster JC, Williams JR, Lee CK, Gerthner R, Kitamura T, Franstve J, Anastasiadou E, Loh ML, Levy DE, Ihle JN, Gilliland DG. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by Tel/Jak2 *Mol Cell* 2000;6:693-704

92. Steensma DP, McClure RF, Karp JE, Tefferi A, Lasho TL, Powell HL, DeWald GW, Kaufmann SH. JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 2006;20:971-978
93. Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M, Perrimon N. Activation of drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J* 1995;14:2857-2865
94. Luo H, Rose P, Barber T, Hanratty WP, Lee S, Roberts TM, D'Andrea AD, Dearolf CR. Mutation in Jak kinase JH2 domain hiperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol.* 1997;17:1562-1571
95. Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder ZS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukemia by a Jak2 inhibitor. *Nature* 1996;379:645-648
96. Luo H, Hanratty WP, Dearolf CR. An amino acid substitution in the Drosophila hopTurn-I Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO J* 1995;14:1412-1420
97. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in Polycythaemia vera. *J Biol Chem* 2005;280:22788-22792
98. Nelson ME, Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: What do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 2006;47:177-194
99. Kozan S, Güran Ş, Bahçe M, Kaptan K, İrfan A, Atay AA, Kürekçi AE, Beyan C. Kronin miyeloproliferatif hastalık ve miyelodisplastik sendrom olgularında Jak2V617F mutasyonu. *Gülhane Tıp dergisi* 2009;51:137-140
100. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assesment 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;107:4139-4141
101. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 459-468.
 102. Wang YL, Vandris K, Jones A, Cross NC, Christos P, Adriano F, Silver RT. JAK2 mutations are present in all cases of polycythemia vera. *Leukemia* 2008; 22: 1289.
 103. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397
 104. Benmoussa A, Dehbi H, Fehri S, Quessar A, Nadifi S. JAK2-V617F mutation in Moroccan patients with myeloproliferative disorders: Contribution, diagnosis and therapeutic prospects. *Pathol.Biol.* 2009;23 Baskida
 105. Chao HY, Fan Z, Zhang R. Detection and clinical significance of JAK2 mutation in 412 patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2009;31:510-514
 106. Wadleigh M, Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol.* 2010;91:174-179
 107. Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, Berger U, Telford N, Aruliah S, Yin JA, Vanstraelen D, Barker HF, Taylor PC, O'Driscoll A, Benedetti F, Rudolph C, Kolb HJ, Hochhaus A, Hehlmann R, Chase A, Cross NC. The t(8;9) (p22;p24) is a

- recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to Jak2 *Cancer res.* 2005;65:2662-2667
108. Boudny V, Kovarik J. JAK/STAT signaling pathways and cancer. Janus kinases/signal transducer and activators of transcription. *Neoplasma.* 2002;49:349-355
 109. Fröhling S, Lipka DB, Kayser S, Scholl S, Schlenk RF, Döhner H, Gilliland DG, Levine RL, Döhner K. Rare occurrence of the JAK2V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. *Blood* 2006;107:1242-1243
 110. Vicente C, Vazquez I, Marcotegui N, Cochillo A, Carranza C, Rivell G, Bandres E, Cristobal I, Lahortiga I, Calasanz MJ, Odero MD. JAK2-V617F activating mutation in acute myeloid leukemia: prognostic impact and association with other molecular markers. *Leukemia* 2007; 21:2386-2390
 111. Döhner K, Du J, Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H. JAK2V617F mutations as cooperative genetic lesions in t(8;21)-positive acute myeloid leukemia *Haematologica* 2006;91:1571-1572
 112. Li WY, Sun AN, Wu DP. Analysis of c-kit and JAK2 gene mutations in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2008;29:797-801
 113. Iwanaga E, Nanri T, Matsuno T, Kawakita T, Mitsuya H, Asou N. A JAK2-V617F activating mutation in addition to KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21) (q22;q22) acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2009;94:433-435
 114. Illmer T, Schaich M, Ehninger G, Thiede C. Tyrosine kinase mutations of JAK2 are rare events in AML but influence prognosis of patients with CBF-leukemias. *Haematologica* 2007;92:137-138
 115. Walters DK, Mercher T, Gu TL, O'Hare T, Tyner JW, Loriaux M, Goss VL, Lee KA, Eide CA, Wong MJ, Stoffregen EP, McGreevey L, Nardone J, Moore SA, Crispino J, Boggon TJ, Heinrich MC, Deininger MW, Polakiewicz RD, Gilliland DG, Druker BJ. Activating alleles of JAK3 in acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2006;10:65-75

116. Dani Bercovich, Ithamar Ganmore, Linda M Scott, Gilad Wainreb, Yehudit Birger, Arava Elimelech, Chen Shochat, Giovanni Cazzaniga, Andrea Biondi, Giuseppe Basso, Gunnar Cario, Martin Schrappe, Martin Stanulla, Sabine Strehl, Oskar A Haas, Georg Mann, Vera Binder, Arndt Borkhardt, Helena Kempfski, Jan Trka, Bella Bielorei, Smadar Avigad, Batia Stark, Owen Smith, Nicole Dastugue, Jean-Pierre Bourquin, Nir Ben Tal, Anthony R Green, Shai Izraeli. Mutations of *JAK2* in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* 2008;372:1484-1492
117. Charles G. Mullighan, Jinghui Zhang, Richard C. Harvey, J. Racquel Collins-Underwood, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 9;106(23):9414-8
118. Halse H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kemdrup G, Head DR. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 2003;17:277-282
119. Niemeyer CM, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu Rajnoldi A, Creutzig U, Haas O, Harbott J, Hasle H, Kerndrup G, Locatelli F, Mann G, Stollmann-Gibbels B, van't Veer-Korthof ET, van Wering E, Zimmermann M. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). *Blood* 1997;89:3534-3543
120. Tono C, Xu G, Toki T, Takahashi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E. Jak2 Val617F activating tyrosine kinase mutation in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:1843-1844
121. Zecca M, Bergamaschi G, Kratz C, Bergstraber E, Danasino C, De Flippi P, Halse H, Lisini D, Locatelli F, Pession A, Sainati L, Stary J, Trebo M. JAK2 mutation is a rare event in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:367-369.