

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI BAŐKANLIĐI

MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE *CALR*, *MPL*
MUTASYONLARININ TANIYA, KLASİFİKASYONA,
LABORATUVAR SONUÇLARINA, FREKANS VE KLİNİK
DURUM ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Tbp. Yzb. Hatice AKAR

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesinin
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İçin Öngördüğü

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Yusuf TUNCA

Prof.Tbp. Kd. Alb.

ANKARA

2015

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığına:

“Myeloproliferatif Neoplazilerde CALR, MPL Mutasyonlarının Tanıya, Klasifikasyona, Laboratuvar Sonuçlarına, Frekansa Ve Klinik Durum Üzerine Olan Etkileri” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

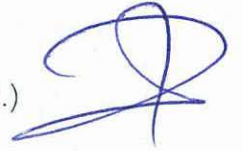
Tez Danışmanı : Prof. Tbp. Kd. Alb Yusuf TUNCA



Üye : Prof. Hv. Tbp. Kd. Alb Cengiz BEYAN

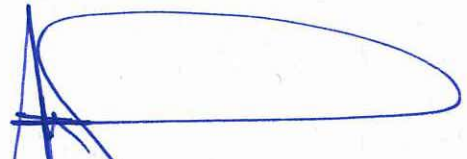


Üye : Prof. Dr. Zerrin YILMAZ ÇELİK (Başket Ü.)



ONAY:

Tbp. Yzb. Hatice AKAR (2008-11)'in 20/10/2015 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.



Hayati BİLGİÇ
Profesör Tabip Tümamiral
GATA Komutan Bilimsel Yardımcısı,
Askeri Tıp Fakóltesi Dekanı ve
Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin hazırlanmasında desteğini ve yol göstericiliğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan danışmanım ve değerli hocam Prof. Tbp.Kd.Alb Yusuf TUNCA'ya, tez konumun belirlenmesi ve çalışmanın yürütülmesinde yardım ve katkılarını esirgemeyen, saygıdeğer hocam Prof Tbp.Kd. Alb Cengiz BEYAN'a, şükran ve saygılarımı arz ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte birçok güzel anıyı paylaştığım, her zaman desteklerini hissettiğim, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren Yrd. Doç. Hv. Tbp. Bnb. Deniz TORUN'a, Yrd.Doç Tbp. Kd. Bnb. Salih KOZAN'a, Dr. Tbp. Bnb. Ali ÖZTUNA'ya, Tbp. Ütğm. Haluk Kavuş'a ve Tıbbi Genetik AD'nın tüm değerli personeline teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteği ile hep yanımda olan, destekleri ile bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem Cemile SALİFOĞLU'na ve babam Hüseyin SALİFOĞLU'na, sevgisi, desteği ve sonsuz sabrını hissettiğim her zaman yanımda olan sevgili eşim Enis AKAR'a ve canım oğlum Arda AKAR'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunuyorum.

Hatice AKAR

Tbp. Yzb.

Ankara, Ekim 2015

ÖZET

Giriş

Myeloproliferatif neoplazili (MPN) hastalardan oluşan bir kohortta Calretikülin (*CALR*), *Myeloproliferatif lösemi virus onkogeni (MPL)* ve *Janus kinase 2 (JAK2)* mutasyon profillerini ve bu mutasyonların klinik ve laboratuvar bulgularına etkilerini araştırdık.

Metodlar

Çalışmaya 168 MPN hastası [78 polistemia vera (PV), 79 esansiyel trombositoz (ET) ve 11 primer myelofibrozisli (PMF) olgu] dahil edilmiştir. *JAK2V617F* mutasyonu için Taqman problemleri kullanılarak real time polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile analiz edilirken *CALR* ve *MPL* mutasyonları için iki yönlü Sanger sekans yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular

JAK2V617F en yaygın mutasyondur (%70,8). Çalışılan grupta *MPL* W515K/L mutasyonu saptanmamıştır. *CALR* mutasyonu ET'luların %12,7'sinde ve PMF'lilerin %9,1 bulunmuş olup bu *JAK2V617F* ve *MPL* mutasyonu negatif ET ve PMF hastalarında sırasıyla %43,47 ve %25'e denk gelir. *CALR* ve *MPL* mutasyonları PV'da bulunmamıştır. Toplamda altı tip mutasyon saptanmış olup c.1092_1143del (%36,4), c.1100_1145del (%18,2) ve c.1154_1155insTTGTC (%18,2) en sık görülenlerdir. *CALR* mutant olanlar *JAK2V617F* mutantlara göre daha düşük hematokrit ve kırmızı küre sayısı ile daha yüksek platelet sayısına sahiptir.

Sonuç

Türkiye'de yapılan bu çalışmada saptanan *CALR* mutasyonları ve yüzdeleri dünya çapında yapılan çalışmalardakilere benzer bir moleküler profile sahiptir. *CALR* mutasyonlarının hastalığın fenotipi ve prognoz üzerindeki etkilerini değerlendirmek için daha geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler : **Myeloproliferatif neoplaziler,**
***JAK2V617F* mutasyonu , *CALR* mutasyonu ve *MPL* mutasyonu**

Destekleyen Kurumlar : **GATA Bilimsel Araştırma Kurulu**

Yazar Adı : **Tbp.Yzb. Hatice AKAR**

Danışman : **Prof. Tbp. Kd. Alb. Yusuf TUNCA**



SUMMARY

Introduction

We investigated the mutation profiles of *Calreticulin (CALR)*, *Janus kinase 2 (JAK2)* and *Myeloproliferative leukemia virus oncogenes (MPL)* and their clinical and laboratory characteristics in a cohort of Turkish MPN patients.

Methods

A total of 168 MPN patients (78 polycythemia vera [PV], 79 essential thrombocythemia [ET], and 11 primary myelofibrosis [PMF] cases) were included in the study. *JAK2V617F* mutation was analyzed by real time Taqman PCR; while *CALR* and *MPL* mutations were identified by bi-directional Sanger sequencing.

Results

JAK2V617F was the most frequent mutation (70,8%). None had *MPL W515K/L* mutations. *CALR* mutations were detected in 12,7% of ET and 9,1% of PMF patients, which accounted for 43,47% and 25% of ET and PMF patients without *JAK2* or *MPL* mutations, respectively. *CALR* and *MPL* mutations were not found in PV. A total of six types of mutation were detected, among which, c.1092_1143del (36,4%) and c.1100_1145del (18,2%) and c.1154_1155ins TTGTC (18,2%) were found to be the most common. *CALR* mutants were associated with lower hematocrit, lower red blood cell count and higher platelet counts than the *JAK2 V617F* mutants.

Conclusion

This study which held in Turkey have the same *CALR* mutations molecular profile with the other studies worldwide. Larger prospective studies need to be designed to establish the impact of the new mutations in contributing to disease phenotype and prognostic outcome of patients.

Keywords : Myeloproliferative neoplasms, *JAK2V617F* mutation, *CALR* mutation and *MPL* mutation

Supported by : GATA Scientific Research Committee

Author : Hatice AKAR, MD

Counsellor : Yusuf TUNCA, MD Prof.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik İliği.....	3
2.1.1. Hematopoez.....	3
2.2. Myeloproliferatif Neoplaziler	4
2.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)	8
2.2.2. Polisitemia Vera	9
2.2.3. Esansiyel Trombositoz	14
2.2.4. Primer Miyelofibrozis.....	17
2.3. JAK/STAT Sinyal Yolağı	22
2.3.1. Janus Kinaz Ailesi.....	22
2.3.2. STAT (Signal Transducer and Activating of Transcription) Ailesi.....	24
2.4. Janus Kinaz Ailesi.....	26
2.4.1. JAK2V617F Mutasyonu	27
2.4.2. JAK2 Ekzon 12 Mutasyonları	32
2.5. Calretikülin (CALR)	33
2.5.1. Calretikülin/Calneksin Siklusu ve ER Kalite Kontrolü	37
2.5.2. ER Lümeni, Calretikülin ve Ca ²⁺ sinyalizasyonu	37
2.5.3. CALR Mutasyonları	38
2.6. MPL (Myeloproliferatif lösemi virüs onkogen)	44
2.6.1. MPL Mutasyonları	45
GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Gereç	48

3.1.1. Hasta Grubu.....	48
3.1.2. Cihazlar	49
3.1.3. Ticari Kit, Kimyasallar Ve Laboratuvar Malzemeleri	49
3.2. Yöntem	50
3.2.1. DNA İzolasyonu	50
3.2.2. JAK2 V617F Mutasyon Analizi	51
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	51
3.2.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	53
3.3. Saflaştırılmış PZR Ürünlerine DNA Dizi Analizi (sekans) PZR Uygulanması	54
3.3.1. DNA Dizi Analizi (sekans) PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	54
3.3.2. PZR Ürünlerinin Otomatize DNA Dizi (Sekans) Analizi Cihazına Yüklenmesi	55
3.3.3. DNA Dizi (sekans) Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	55
3.3.4. İstatiksel Analizler	56
3.4. Bulgular.....	57
3.4.1. JAK2 V617F Mutasyonu ve CALR ekzon 9 ve MPL ekzon 10 mutasyon Değerlendirilmesi	61
TARTIŞMA.....	71
4.1. MPL	71
4.2. CALR	73
4.2.1. CALR Mutasyon Tipleri	77
4.2.2. CALR-mutant/JAK2V617F-mutant Değerlendirilmesi	88
4.2.1. JAK2V617F ve CALR mutasyon beraberliği	91
4.2.2. JAK2-mutant/JAK2-wt Değerlendirilmesi	95
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
AML	Akut Myeloid Lösemi
APMF	Myelofibrozisle Giden Akut Panmyelozis
ASXL1	Additional Sex Comb Like1
BCR	Breakpoint Cluster Region
BFU-E	Eritroid Burst-Forming Unit
BIP	Immunglobulin Bağlayan Protein
CALR	<i>Calreticulin</i>
CD	Cooperative Domain
c-MPL	Trombopoetin Reseptörü
COOH-	Karboksi Terminal
DAPK	Death-Associated Protein Kinase
DCR-NRD	Distal Sitokin Reseptör Domainin Negatif Regülatör Domaini
DIPPS	Dinamic International Prognostic Scoring System
DNA-BD	DNA Bağlayıcı Domain
DNMT	DNA Metiltransferazlar
EC	Ekstraselüler
EDTA	Etilen Daimin Tetra Asetik Asit
EMR	Erken Moleküler Yanıtı
EPO	Eritropoetin
EPOR	Eritropoetin Reseptörü
ET	Esansiyel Trombositoz
EZH2	Enhancer Of Zeste Homolog 2
FDA	Food And Drug Administration
FERM	Four-Point-One, Ezrin, Radixin, Moesin Domaini
FGF	Fibroblast Growth Factor
FISH	Florasana In Situ Hibridizasyon
G-CSF	Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör
GM-CSF	Granülosit- Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
gr	Gram
Hgb	Hemoglobin
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
Htc	Hematokrit
IC	Intraselüler
IDH	Isocitrate Dehidrogenase
IFN-	Interferon
IKZF	IKAROS Family Zinc Finger
IL	Interlökin

INF	Interferon
IP3R	Inozitol 1,4,5 Trifosfat Reseptörü
IPSS	International Prognostic Scoring System
IWG-MRT	International Working Group For Myeloproliferative Neoplasms Research And Treatment
JAB	JAK Binding Protein
JAK	Janus Kinaz
JMML	Juvenil Miyelomonositik Lösemi
kDa	Kilodalton
KEL/HES	Kronik Eozinofilik Lösemi/Hipereozinofilik Sendrom
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
KMML	Kronik Miyelomonositik Lösemi
KMPH	Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar
KNL	Kronik Nötrofilik Lösemi
LNK	Lymphocyte-Spesifik Adaptor Protein
MAPK	ERK/ Mitojen Aktive Protein Kinaz
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
MDS/MPN	Miyelodisplastik/Miyeloproliferatif Neoplaziler
MF	Myelofibrozis
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
MPL	Myeloproliferative leukemia virus
MPN	Myeloproliferatif Neoplaziler
mRNA	Messenger RNA
MSH-2	Muts Homolog 2
mTOR	Memeli Rapamisin Hedefi
Na	Sodyum
NaOH	Sodyum Hidroksit
NH ₂ -	Amino Terminal
NPM1	Nükleofosmin 1 Geni
PCR-LBR	Proksimal Sitokin Reseptör Domain Ligandının Bağlayıcı Bölgesi
PDI	Protein Disülfid İzomeraz
Ph	Philadelphia Kromozomu
PI3K	Fosfoinozid 3- Kinaz
PMF	Primer Miyelofibrozis
post-ET MF	Post-Esansiyel Trombositik Miyelofibrozis
post-PV MF	Post-Polisitemik Miyelofibrozis
PRV	Polistemia Rubra Vera
PTP	Fosfotirozin Fosfatazlar
PV	Polisitemia Vera
PVÇG	Polistemia Vera Çalışma Grubu

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RARB	Retinoik Asit Reseptör-B Geni
RASSF1A	Ras Association (Ralgs/AF-6) Domain Family Member
SF3B1	Splicing Factor 3b,.Subunit 1
SH2	Src Homoloji-2 Domaini
SHP	SH2 İçeren Fosfataz
STAT	Signal Transducer And Activating Of Transcription
TAD	Transcriptional Activation Domain
TET2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
TKI	Tirozin Kinaz Inhibitörü
TM	Transmembran
TP53	Tumor Protein P53
TPO	Trombopoetin
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı
WBC	White Blood Cell

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hematopoetik hücre gelişiminin şematik gösterimi (13).	4
Şekil 2.2. PV, ET ve PMF 'i içeren <i>BCR-ABL1</i> negatif neoplaziler için tanısal algoritma. Tefferi ve diğ.(24) alınmıştır.	8
Şekil 2.3. Janus Kinazların (JAK) yapısı.	23
Şekil 2.4. STAT moleküllerinin yapısal ve fonksiyonel domainleri.(üst) STATın gerçek uzun hali(alt panel).Benekli ve diğ.(112)'den alınmıştır.	24
Şekil 2.5. JAK-STAT sinyal iletim yolağı.	26
Şekil 2.6.- <i>JAK2</i> 'nin Yolak Sinyalizasyonunda ve Eritropoetin Bağlanmasında Rolü.	27
Şekil 2.7. V617F Mutasyonu İçin Homozigosite Oluşumu.....	30
Şekil 2.8. Klinikte karşılaşılan <i>JAK2</i> mutasyonları.....	32
Şekil 2.9. <i>CALR</i> domainleri ve mutasyonları.....	34
Şekil 2.10. ER lümenindeki calretikülin ile ER bağımlı sinyalizasyon yolları arasındaki ilişki.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 2.11. Farklı genotipik durumlarda klonal evrim ve fenotipik dönüşüm. .	40
Şekil 2.12. <i>Calretikülin</i> geninin intron-ekzon yapısının şematik gösterimi.	43
Şekil 2.13. <i>MPL/JAK2</i> sinyal yolağının geleneksel aktivasyon görünümünün şematik temsili (A dan B'ye).....	45
Şekil 2.14. <i>MPL</i> geni ve mutasyonlarının hot spot şematik gösterimi.	47
Şekil 3.1. <i>CALR</i> ekzon 9 ve <i>MPL</i> ekzon 10 için PZR Programı.	53
Şekil 3.2. EXO-SAP için PZR Programı.	53
Şekil 3.3. Bigdye sekans reaksiyonu için PZR Programı.	55
Şekil 3.4. <i>MPLW515K/L</i> Mutasyonu.Pikman ve diğ.(5)'den alınmıştır.	56
Şekil 3.5. Gruplara Göre Cinsiyet Dağılımı.	58
Şekil 3.6. Hastalık Grupları İçin Saptanan Mutasyon Frekansları.	63
Şekil 3.7. Bu çalışmada tanımlanmış <i>CALR</i> mutasyonları.	66
Şekil 3.8. c.995_1047dup53 + c.1092_1143del mutasyonu sekans görüntüsü	67
Şekil 3.9. <i>CALR</i> mutasyon tiplerinin pasta grafikte gösterimi.....	68

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün Myeloid Neoplazilerin Sınıflandırması. Tefferi ve diğ.(16)'nden alınmıştır.	5
Tablo 2.2. Polisitemia Vera tanısı için 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterleri.Thiele ve diğ.(36)'den alınmıştır.	10
Tablo 2.3. 2008 DSÖ esansiyel trombositemi tanı kriterleri.-Thiele ve diğ.(36)'den alınmıştır.	15
Tablo 2.4. 2008 DSÖ primer miyelofibrozis tanı kriterleri.Thiele ve diğ.(36)'den alınmıştır.	18
Tablo 3.1. <i>CALR</i> geni ekzon 9 ve <i>MPL</i> geni ekzon 10 bölgesi için tasarladığımız primerler.	52
Tablo 3.2. Çalışılan genlere ait beklenen PZR ürünlerinin uzunlukları.....	52
Tablo 3.3. <i>CALR</i> ekzon 9 ve <i>MPL</i> ekzon 10 için PZR'u bileşenleri.....	52
Tablo 3.4. EXO-SAP-IT Protokolü.....	53
Tablo 3.5. Bigdye Sekans Reaksiyonu İçin Gerekli Bileşenler.....	54
Tablo 3.6. Hastaların demografik ve laboratuvar verileri.....	58
Tablo 3.7. Hastalık Gruplarına Göre Laboratuvar Verilerinin Tanımlayıcı İstatistikleri.	59
Tablo 3.8. Cinsiyete Göre Laboratuvar Verilerinin Tanımlayıcı İstatistikleri 1.	60
Tablo 3.9. Cinsiyete Göre Laboratuvar Verilerinin Tanımlayıcı İstatistikleri 2.	61
Tablo 3.10.Gruplar arası <i>JAK2V617F</i> allel yük değişimine ait tanımlayıcı istatistikler.....	62
Tablo 3.11. Olgulara ait <i>JAK2V617F</i> mutasyon analizi, <i>CALR</i> ve <i>MPL</i> genlerinin sekans analiz sonuçları.	63
Tablo 3.12. <i>JAK2V617F</i> (+) ve <i>CALR</i> (+) Olguların Laboratuvar Verilerinin Kıyaslanması.	64
Tablo 3.13. Üç Mutasyon Negatif ve <i>CALR</i> -mutant Olguların Laboratuvar Verilerinin Kıyaslanması.	65
Tablo 3.14. <i>CALR</i> mutasyonu pozitif örnekler.....	67

Tablo 3.15. CARL Tip 1 mutant ve Tip 2 mutant olguların laboratuvar verilerinin kıyaslanması.....	68
Tablo 3.16. CALR Mutasyon Tiplerine Göre Laboratuvar ve Yaş Kıyaslaması.	70
Tablo 4.1. CALR Mutasyon Tipleri günümüze kadar myeloproliferatif neoplazi hastalarında raporlanmış CALR ekzon 9 mutasyonları ve frekansları Chi ve diğ.(152)'den uyarılama.	79
Tablo 4.2. Yapılan Çalışmalarda PV ve MPN Hastalarında JAK2, MPL ve CALR Mutasyon Frekansı.	84
Tablo 4.3. Yapılan Çalışmalarda ET Hastalarında JAK2, MPL ve CALR Mutasyon Frekansı.	85
Tablo 4.4. Yapılan Çalışmalarda PMF Hastalarında JAK2, MPL ve CALR Mutasyon Frekansı.	87
Tablo 4.5. ET hastalarında CALR mutasyonunun varlık veya yokluk durumuna göre fenotipe etkileri-1	92
Tablo 4.6. ET hastalarında CALR mutasyonunun varlık veya yokluk durumuna göre fenotipe etkileri-2	93
Tablo 4.7. PMF hastalarında CALR mutasyonunun varlık veya yokluk durumuna göre fenotipe etkileri.....	94
Tablo 4.8. ET hastalarında JAK2V617F allelinin varlık veya yokluk durumuna göre fenotipe etkileri.Vanucchi(121)'den uyarlanmıştır.	96

GİRİŞ

Myeloproliferatif neoplaziler (MPN) belirgin hematopoetik proliferasyon ve artmış lösemik dönüşüme eğilimi olan bir grup kök hücre bozukluğudur(1). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) myeloproliferatif neoplazilerle ilgili 2008 sınıflandırması: kronik myeloid lösemi (KML), polistemia vera (PV), esansiyel trombositoz (ET), primer myelofibrozis (PMF), prefibrotik PMF, kronik nötrofilik lösemi, mast hücre hastalığı, sınıflandırılmayan myeloproliferatif neoplazi ve başka türlü belirtilmemiş kronik eozinofilik lösemiye kapsar. Sekiz maligniteden KML, PV, ET, PMF aynı zamanda “klasik MPN” olarak adlandırılır (2-5).

KML, iki genin [BCR (22. kromozomda) ve ABL1 (9. kromozomda)] füzyonuyla oluşan spesifik genetik lezyonla ilişkili ilk hematolojik malignitedir (6). t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyon sonucu oluşan Philadelphia (Ph) kromozomu KML'yi diğer MPN'lerden ayıran bir özelliktir. Bu yeni kromozomdaki artmış tirozin kinaz aktivitesine karşı geliştirilen tirozin kinaz inhibitörleri de tedavide çığır açmış, bu gruptaki hastalıklar için moleküler markerların önemini arttırmıştır (7).

Moleküler testlerle ilgili; 2005'te *JAK2V617F* mutasyonunun tanınmasıyla başlayan süreci *JAK2* ekzon 12 ve *myeloproliferatif lösemi virus onkogeni (MPL)* takip etmiş; neredeyse tüm PV ve ET ve PMF'lerin % 50-60'ının doğru tanısı mümkün olmuştur, bu da JAK-STAT (Januse kinase-signal transducer and activator of transcription) yolağının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (2-5). *JAK2* ve *MPL* gen mutasyonlarının keşfi MPN moleküler temeli için yeni anlayışlar sağlamakla kalmayıp aynı zamanda, hastalıkların tanısında yeni moleküler yaklaşımlar sağlamıştır.

Bilim ve teknolojideki gelişmeler ve yeni tanı yöntemleriyle altta yatan genetik temellerin ortaya konulması; aynı grupta incelenen bu hastalıkların birbirlerinden daha net ayrımını sağlar. Böylece tanı kriterleri kesinleşerek hastalıkların erken tanısı ve buna yol açan nedenleri ortadan kaldırarak tedavisi mümkün olur. Tanı kriterlerine katkıda bulunacak olan yeni gen değişikliklerinin saptanması bu açıdan çok önemlidir.

Aralık 2013'te , *JAK2* ve *MPL* mutasyonu olmayan ET ve PMF hastalarının %50-80'inde, ekzom sekanslama çalışmaları ile ER'un Ca²⁺ bağlama şaperonu olarak görev yapan calretikülini kodlayan gende *CALR* somatik mutasyonları keşfedilmiştir (8, 9). *CALR* mutant hastalıkların moleküler temeli belirgin şekilde ortaya konamamış olmasına rağmen bcr-abl pozitif KML hastalarının tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavisi mutant *CALR* ve mutant *MPL*'nin terapötik bir hedef olarak değerlendirilerek hastalıkların klinik seyri ve tedavisi üzerinde etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür.

Mevcut perspektifte MPN'lerde tanıyı kolaylaştıran ve ileride tedaviyi değiştirebilecek *CALR* mutasyonu, *JAK2V617F* mutasyonu ve *MPL* mutasyonlarının sıklığını, laboratuvar ve klinik durum üzerine olan etkilerini, GATA Hematoloji BD. ve Tıbbi Genetik AD'a başvuran bcr-abl negatif MPN (PV, ET ve PMF) hastalarını retrospektif çalışmaya alarak belirlemeyi hedefledik. *CALR* ve *MPL* mutasyon tiplerinin myeloproliferatif neoplazilerde fenotipik ve prognostik farklılıklarını araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

1.1. Kemik İliği

Yetişkin memelilerde yapısal ve fonksiyonel farklılıkları olan matür kan hücreleri sabit olarak kemik iliğindeki az sayıda hematopoetik kök hücreden (HKH) gelişirler ve tüm matür kan hücrelerin nesillerinin devamından sorumludurlar. Primitif hematopoez, embriyolojik gelişimin erken safhalarında yolk salk'ta başlar (10) ve organogenez ortaya çıktıkça, fetal karaciğer, ardından da dalak bunun yerini alır. Gestasyonun ileri aşamalarında, kan hücreleri doğumdan hemen sonraki son ve ömür boyu yetişkin hematopoezin yeri olan kemik iliğine transfer olur (11).

1.1.1. Hematopoez

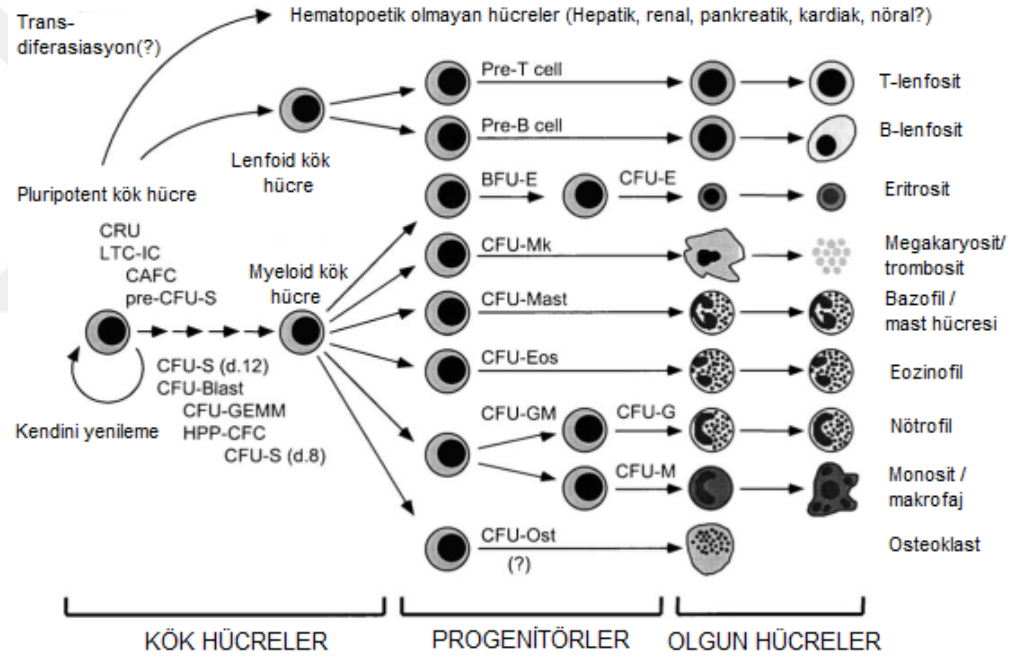
Hematopoez kan hücrelerinin kemik iliğinde oluşum, üretim ve özellik kazanmasıdır (12).

HKH'ler, kendini yenileme potansiyeline ve birçok farklı hücre serisine dönüşebilme kapasitesine sahip somatik hücre popülasyonlarıdır. Primordial HKH'ler embriyolojik gelişim esnasında kademeli olarak ve belli bir hiyerarşi içinde yetişkin HKH özellikleri kazanırlar (10). Yetişkin HKH'ler, matür kan hücrelerini oluşturma kadar progresif olarak pluripotent, multipotent ve unipotent hücresel araçlara differansiye olurlar (14).

Erken kök hücreler, kemik iliğinde çok az sayıda bulunan pluripotent hücrelerdir. Hem kanda hem kemik iliğinde bulunurlar ancak morfolojik olarak tanınamayan bu hücreler mitotik olarak çok aktif olmayıp kendini yenileme kapasitesine sahiptirler. Bu hücreler daha az kendini yenileme kapasitesi olan ve daha az aktif multipotent kök hücre yapımına öncülük ederler (myeloid multipotent kök hücre, lenfoid multipotent kök hücre...). Bu multipotent kök hücreler, morfolojik olarak tanınamayan ve düşük mitotik aktivitesi olup, yüksek kendini yenileme kapasitesinde ve kemik iliğinde az sayıda bulunurlar. Bunlar "colony forming-unit" (CFU) olarak bahsedilen hematopoetik hücre kolonilerinin oluşumuna öncülük etme kapasitesine sahiptirler.

Kemik iliğinde çok daha fazla sayıda olup da morfolojik olarak lenfositlerden ayırtılamayacak bir başka hücre grubu ise ‘Progenitör Hücreler’dir ki bunlar kendini yenileme kapasitesine sahip olmakla beraber yüksek mitotik aktiviteye sahiptirler. Tek bir seriyeye spesifik transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle progenitör hücreler tek bir hematopoetik hücre serisi yönünde farklılaşırlar. Alt koloniler oluşturarak granülositler, eritroid ve megakaryosit serilerine öncülük ederler. Bu prekürsör hücreler çeşitli sitokinler ve büyüme faktörlerinin etkisiyle yüksek mitotik aktivite göstererek kendilerinden sonra gelen, kendini yenileme kapasitesi ve mitotik aktivitesi bulunmayan, belirgin morfolojik özellikleri olan matür kan hücrelerine differansiye olurlar (13).

Şekil 2.1’de hematopoetik hücrelerin gelişimi görülmektedir.



Şekil 2.1. Hematopoetik hücre gelişiminin şematik gösterimi (13).

1.2. Myeloproliferatif Neoplaziler

Myeloproliferatif bozukluk” terimi ilk olarak 1951 yılında William Dameshek tarafından o zaman kadar bulunmamış bir stimulus tarafından kemik iliği hücrelerinin proliferasyon aktivitesinin değişken tezahürü olarak klinik ve biyolojik benzerliği olan PV, ET, PMF ve KML ve eritrolökemi (Di

Guglielmo sendromu) için kullanılmış (14), yıllar içinde dört antite myeloproliferatif bozukluk olarak adlandırılmaya devam ederken eritrolökemi, akut eritroid lösemi veya varyantları olarak tekrar tanımlanmıştır (15). Miyeloid neoplaziler için revize edilmiş 2008 DSÖ sınıflandırması Tablo 2.1. de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün Myeloid Neoplazilerin Sınıflandırması. Tefferi ve diğ(16)'nden alınmıştır.

DSÖ 2008 YILI MYELOİD NEOPLAZİLER SINIFLAMASI
1-MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER (MPN)
1.1- Kronik myeloid lösemi, BCR-ABL1 pozitif (KML)
1.2- BCR-ABL1 negatif MPN
1.2.1- Polistemia vera (PV)
1.2.2- Esansiyel trombositoz (ET)
1.2.3- Primer myelofibrozis (PMF)
1.2.4- Prefibrotik PMF
1.3- Diğer Myeloproliferatif neoplaziler
1.3.1- Kronik nötrofilik lösemi (KNL)
1.3.2- Kronik eozinofilik lösemi, başka türlü belirtilmemiş (KEL-BTB)
1.3.3- Mast hücre hastalığı (MHH)
1.3.4- Myeloproliferatif neoplazi, sınıflandırılmamış
2-Eozinofiliye PDGFRA, PDGFRB ve FGFR1 düzensizliklerinin eşlik ettiği myeloid ve lenfoid neoplaziler
2.1. PDGFRA yeniden düzenlemeleriyle birlikte myeloid ve lenfoid neoplaziler
2.2. PDGFRB yeniden düzenlemeleriyle birlikte myeloid ve lenfoid neoplaziler
2.3. FGFR1 anormalliği ile birlikte myeloid ve lenfoid neoplaziler
3- Myelodisplastik/Myeloproliferatif Neoplaziler (MDS/MPN)
3.1- Kronik myelomonositik lösemi (KMML)

3.2- Juvenil myelomonositik Lösemi (JMML)
3.3- Atipik kronik myeloid lösemi (BCR-ABL negatif)(a-KML)
3.4- MDS/MPN-sınıflandırılmayan
3.4.1- Belirgin trombositozun olduğu “ring” sideroblast ile ilişkili refrakter anemi (RARS-T)
4- Miyelodisplastik Sendrom (MDS)
4.1-Unilineage displazi ile beraber refrakter sitopeni
4.1.1. Refrakter anemi (ring sideroblastlar < eritroid prekürsörlerin 15%)
4.1.2. Refrakter nötropeni
4.1.3- Refrakter trombositopeni
4.2- Ring sideroblastlarla beraber refrakter anemi (RARS; displazi eritroid seriyile sınırlıdır ve ring sideroblastlar kemik iliği eritroid prekürsörlerin 15%'idir)
4.3- Multi-lineage displazi ile birlikte refrakter sitopeni (ring sideroblast sayısı önemli değil)
4.4. Fazla blastla beraber refrakter anemi
4.4.1. Fazla blastla beraber refrakter anemi-1 (dolaşımda 2-4% veya kemik iliğinde 5-9% blast)
4.4.2. Fazla blastla beraber refrakter anemi-2 (dolaşımda 5-19% veya kemik iliğinde 10-19% blast veya Auer rod mevcudiyeti)
4.5. İzole del (5q) ilişkili MDS
4.6. MDS, klasifiye edilemeyen
5- Akut Miyeloid Lösemi (AML) ve ilişkili prekürsör neoplaziler

Matür kan hücresi üretimi ve akut myeloid lösemi evriminin mümkün olması ile karakterize MPN'lerden KML, PV, ET, PMF aynı zamanda” klasik MPN” olarak adlandırılır (2-5).

Klasik bcl-abl negatif MPN'ler ise PV, ET ve PMF'i içeren klonal hematopoetik kök hücre bozukluklarıdır (17). Bu hastalıklar sadece trombotik

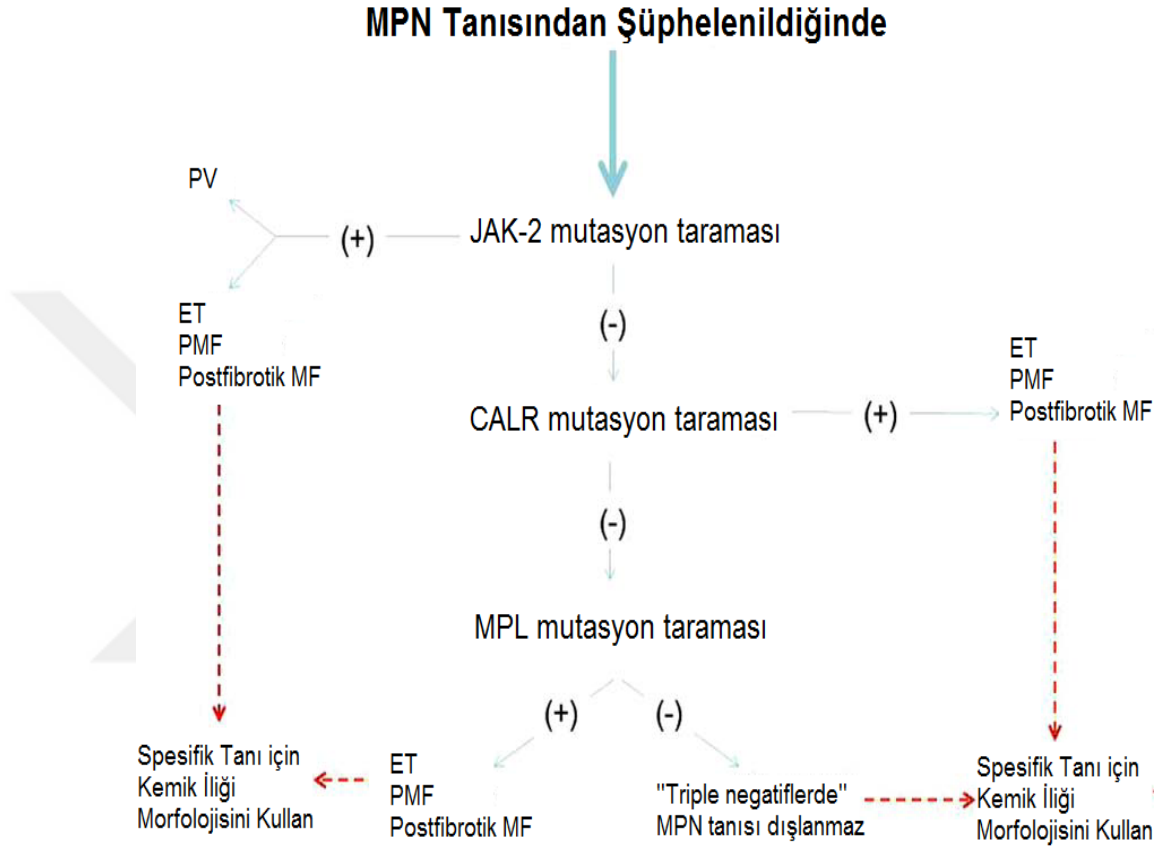
komplasyonların oluşumu ile değil, aynı zamanda post-polisitemik myelofibrozis (post-PV-MF) veya post-esansiyel trombositomik myelofibrozis (post-ET MF) ve akut lösemi veya blast faz hastalığını da içeren daha agresif hastalıklara dönme eğiliminde olması ile de karakterizedir. Hastalığın progresyonu tipik olarak subklonal evrimden sorumlu driver genlerde edinisel somatik mutasyon ile ilişkilidir. Ancak bu mutant genler *JAK2* ve *MPL* negatif ET veya PMF patogeneğinde primer role sahip değildir (9).

Tüm MPN'ler HKH'lerde bir vuruşla başlayan ve hipersensitiviteye bağlı veya normal sitokin regülasyonundan bağımsız olarak aşırı kan hücresi üretimi ile sonuçlanır. Bu myeloproliferasyon olgun hücrelerin sitokin seviyelerini düşüren feedback düzenlemelerinin olmamasına bağlıdır. MPN'ler üç ana myeloid seriyi de içermekle beraber PV'da eritroid, ET'de megakaryosit/platelet ve PMF'de megakaryosit/granülosit seri olacak şekilde sadece bir tanesinde dominanttır. MPN'ler PMF hariç normal mat rasyonla ilişkidir ancak olgun kan hücre sayısında artış vardır. PMF'de kemik iliği myelofibrozisinden anormal megakaryosit differansiasyonu sorumludur. Çoğu MPN, hematopoetik büyüme faktörleri tarafından uyarılmış intraselüler sinyal yolaklarını taklit eden tirozin kinaz aktivasyonuna neden olan genetik olaylar sonucu oluşur (18-20) KML'de BCR coil-coil domaini aracılığıyla BCR-ABL füzyon proteininin oligomerizasyonu birçok sinyal yolağını tetikleyen ve hastalığa neden olan ABL'nin yapısal aktivasyonu uyarır. ABL kinaz aktivitesinin inhibisyonu hastalıkta regresyonla sonuçlanır ki bu durum BCR-ABL'in hastalıktan sorumlu onkojenik olay olduğunu gösterir (18).

KML dışındaki klasik tip MPN'ler (PV, ET ve PMF) birçok ortak özelliğe sahiptir. Laboratuvar ve klinik bulgulardaki benzerlikler, hastalıklar arasındaki ayrımı güçleştirir. DSÖ myeloid neoplazileri sınıflandırmak için klinik kriterlerin yanında periferik kan sayımı, periferik yayma analizi, kemik iliği morfolojisi, karyotip ve moleküler genetik testleri kullanır (21, 22).

MPN sık karşılaşılan bir hematolojik hastalık grubu olup, özellikle yaşlı nüfusu etkilemektedirler. Hastalıkta görülen klinik bulguların çoğu zaman hafif seyrediyor olması birçok olguya tanı konulmasını güçleştirir.

Dünya genelinde MPN insidansı $0,44-5,87 \times 10^5$ olarak raporlanmıştır. Aradaki bu büyük fark ırksal ve coğrafik farkların yanısıra çalışma planlanmasından, raporlamadaki methodlar ve tanı kriterlerindeki farklılıklardan kaynaklı olabilir (23).



Şekil 2.2. PV, ET ve PMF ‘i içeren *BCR-ABL1* negatif neoplaziler için tanısal algoritma. Tefferi ve diğ.(24) alınmıştır.

1.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

KML, disregüle üretim ile normal differansiye olmakta olan matür ve olgunlaşmakta olan granülositlerin kontrolsüz çoğalmasıdır (25). Klonal hematopoetik kök hücre bozukluğudur ve tek bir pluripotent hematopoetik kök hücre Philadelphia (Ph) kromozomu kazandığında oluşan myeloroliferatif hastalıktır (26). Yıllık insidansı 1-2 olgu/100.000’dir (27).

KML, spesifik genetik lezyonla ilişkili ilk hematolojik malignitedir (6). BCR (breakpoint cluster region) geninin 22q11’de 5’ segmenti ve ABL

(Abelson Leukemia Virus) onkogeninin 9q34'te 3' segmentinin resiprokal translokasyon sonucu yan yana gelerek Ph kromozomu olarak bilinen anormal 22. kromozom artışına neden olur. Bu gen BCR-ABL1 füzyon proteinin oluşturur ki tirozin kinaz katalitik aktivitesiyle normal ABL1'in enzimatik domaini içerir ancak belli bir oranda BCR füzyonuna nedeniyle BCR-ABL1 kinaz aktivitesi artmıştır (28). Bu düzensiz tirozin kinaz KML patogenezinde etkilidir. Tanı Ph kromozomu, BCR-ABL1 füzyon geni veya füzyon mRNA ürününün konvansiyonel sitogenetik analiz (karyotipleme), FISH (florasan in situ hibridizasyon) veya RT-PZR (revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) gibi genetik testler yoluyla tespiti ile konur (29).

BCR-ABL proteini KML tedavisi için ideal bir ilaç hedefidir. Dizayn edilen en başarılı sentetik ATP inhibitörü imatinib mesilat [STI 571, Gleevec (Glivec), Novartis, Switzerland], ABD'de Mayıs 2001'de FDA (Food and Drug Administration)'dan onay almıştır (7, 30). KML tedavisinde hastalığın tüm dönemlerinde erişkin Ph+ KML hastaları için ilk seçenek altın standart tedavi olarak kabul görmüştür (31). KML biyolojik ajanla tedavi ile lösemik klonun süprese olduğu ve yaşam süresinin uzadığı bulunan ilk neoplastik hastalıktır (32).

1.2.2. Polisitemia Vera

Polistemia vera (PV) sinsi başlangıçlı klonal, kronik, ilerleyici bir myeloproliferatif neoplazmdır. Genellikle lökositoz, trombositoz, splenomegali ile birlikte olan mutlak kırmızı kan hücre kitlesinde artış ile karakterizedir. Hastalıkta kemik iliğinde eritroid, myeloid ve megakaryositer seri aşırı üretilmektedir (33).

Hastalığa neden olan mutasyon sonucu dönüşüme uğramış HKK zamanla baskın miyeloid öncül hücre haline gelmektedir (34).

PV, klinik olarak diğer MPN'lerden, kırmızı hücre kitlesindeki belirgin artış ile ayrılır. Ancak kırmızı kan hücre kitlesindeki artış tek başına PV tanısı için yeterli değildir, çünkü bu bulgu kronik hipoksi ile ilişkili olan birçok durum ve nadiren de eritropoetin (EPO) salgılayan tümörlerin varlığında da gözlenir (35).

Diagnostik Kriterler

DSÖ diagnostik kriterleri Tablo 2.2. de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Polisitemia Vera tanısı için 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterleri.Thiele ve diğ.(36)'den alınmıştır.

Majör: 1-Hb'in erkeklerde 18,5gr/dl nin, kadınlarda 16,5 gr/dl nin üstünde 2- JAK2V617F veya JAK2 ekzon 12 mutasyonunun saptanması
Minör: 1-Kemik iliği biyopsisinde her üç seride myeloproliferasyon, 2-Serum eritropoetin düzeyinin normalin altında 3-Endojen eritroid koloni oluşumu
Tüm majör kriterler + 1 minör kriter veya ilk majör kriter ile beraber iki minör kriterin varlığı PV tanısı için yeterlidir.

Hastalık İnsidansı

PV, primer polisiteminin en yaygın nedenidir ve tüm yaşlarda oluşabilir (37). Ortalama tanı yaşı DSÖ-tanımlı PV'larda 61 yaştır (38).

PV, 2.3-2.8/100.000 insidansı ile MPN'ler içinde en yaygın olanıdır ve erkeklerde kadınlardan daha yaygındır (yılda 2.8 olguya karşılık 1.3 olgu/100,000) (39).

Sağ kalım

Ortalama yaşam beklentisi tedavi edilmeyen olgularda 6-18 ay, tedavi ile 11-15 yıl olarak saptanmıştır (40).

Polistemia Vera Çalışma Grubu (PVÇG)-01 major protokolünde en yaygın ölüm nedenleri:

- Tromboz (% 29)
- Hematolojik maligniteler (AML veya MDS gibi % 23)
- Hematolojik olmayan maligniteler (%16)
- Hemoraji (% 7)
- PV sonrası myelofibrozis(% 3) 'i içerir.(41)

Bunlara ek olarak kalp yetmezliği, lösemi dışı progresif hastalıklar, enfeksiyon, solunum yetmezliği, kanama, son dönem karaciğer hastalığı ve kardiyopulmoner arreste bağlı ölümler de olabilir (38).

Etyoloji

Alta yatan neden çoğu durumda bilinmemektedir. Bazı ailelerde genetik yatkınlık olduğu rapor edilmiştir. İyonize radyasyon ve mesleki olarak toksinlere maruz kalma bazı hastalarda rapor edilmiştir (42).

Hastaların yaklaşık %20'sinde tanı anında sitogenetik anormallikler vardır. En sık kromozom 20'nin uzun kolunda delesyon görülür. Ayrıca trizomi 8 ve 9, del (13q) ve del (1p) de görülebilir (21).

PV 'nin 3 evresi tanımlanmıştır:

1.Prodromal polisitemik faz : Orta derecede eritrositozisle karakterizedir.

2. Aşkar polisitemik faz : Belirgin şekilde artan kırmızı kan hücreleri ile karakterizedir.

3.Post polisitemik myelofibrozis fazı : Sitopeni, anemi, efektif olmayan eritropoez, kemik iliğinde fibrozis, ekstramedüller hematopoez ve hipersplenizm ile karakterizedir. PV düşük bir insidansla MDS, prelösemik faz veya akut lösemiye progresyon gösterir. Tüm vakalarda sekonder eritrositoz, kalıtsal polisitemi ve diğer myeloproliferatif neoplaziler ekarte edilmelidir (21).

Klinik Durum

PV' de spesifik belirtilerin olmayışı çoğu zaman tanıyı geciktirmektedir.

Baş ağrısı, güçsüzlük, baş dönmesi ve aşırı terleme gibi spesifik olmayan şikayetler sırasıyla hastaların %48, %47, %43 ve %33'ünde görülür. Akut gut artriti %5-20'sinde tanımlıdır.

En yaygın şikayetlerden biri sıcak duş sonrası kaşıntıdır (43).

Nabızların palpe edilebildiği durumda eritem, solgunluk veya siyanozun eşlik ettiği el veya ayakların yanması durumu olan eritromelalji DSÖ-tanımlı PV'lerin %28'inde görülür. PV ve ET'nin patognomonik mikrovasküler trombotik komplikasyondur ve PLT>400,000/microL olduğu durumlarla ilişkilidir (44).

Trombositoya bağlı PV'de ortalama üç olgudan birinde gözlenen trombotik olaylar bu hastalar için major mortalite ve morbidite nedenidir (34).

Ölüm sebepleri arasında tromboz, hemoraji, hematolojik maligniteler, hematolojik olmayan maligniteler ve myelofibrozis gelişimi yer almaktadır (45). PVÇG çalışmalarına katılanların %15'inde öncesinde major trombotik komplikasyonlar (serebrovasküler olay, myokart infarktüsü, superfisyal tromboflebit, derin ven trombozu, pulmoner emboli gibi) görülmüştür. Trombotik olayların 2/3'ü arteryeldir.

Geçici iskemik atak en yaygın trombotik olaylardır. PV hastaları sıklıkla periferik vasküler hastalık semptomları ile kliniğe başvurur (40, 46).

Fizik Muayene

PVÇG protokolüne katılan PV hastalarında anormal fizik muayene bulguları: %70 splenomegali, %67 fasyal pletore ve %40 hepatomegalidir. DSÖ-tanımlılarda palpabl splenomegali sadece %36'sında not edilmiştir.

Laboratuvar Bulguları

DSÖ- tanımlı PV hastalarında aşağıdaki laboratuvar bulguları not edilmiştir (38).

- Hemoglobin >18.5 g/dL – % 73
- Toplam WBC >10,500/microL – % 49
- PLT >450,000/microL – % 53; PLT >1,000,000/microL – % 4
- Lökoeitroblastik periferik yayma –% 6
- Artmış serum LDH –% 50
- JAK2 mutasyon pozitifliği –% 98
- Anormal karyotip – % 12
- Subnormal serum eritropoetin seviyeleri –% 81
- Endojen eritroid koloni oluşumu – % 73

Eritrositozu olan hastanın ilk değerlendirilmesinde serum Epo düzey ölçümü önemli olsa da PV tanısını doğrulamada serum Epo düzeyinin normal veya düşük bulunması tek başına yeterli değildir. Bununla birlikte serum Epo düzeyinin yüksek saptanması halinde (Epo>5 IU/L), eritrositoz PV'ye değil sekonder bir nedene bağlıdır. Bu bağlamda serum Epo düzeyi ölçümü primer PV dışlanmasında önemlidir. Güncel tanısal sınıflamalar Epo düşüklüğünü minör kriter olarak tanımlar (47).

Kemik İliği fibrozis

Yapılan bir çalışmaya göre hastaların %14'ünde başlangıçtaki kemik iliği incelemesinde minör (grade1) fibrozis vardır (48).

JAK2 mutasyonları

PV hastaların %95'i *JAK2V617F*, %3'ü diğer *JAK2* mutasyonlarına sahiptir (38).

Ekzon 14 mutasyonu

Birçok çalışmada PV hastalarının %95-97'si normal olgularda ve sekonder polistemilerde bulunmayan *JAK2* genin ekzon 14'ünde V617F mutasyonuna sahiptirler. Bu nedenle bu mutasyon varlığı PV'lı hastaları sekonder polistemiden ayırt etmeyi sağlar (49-51). PV'ye özgü değildir, ET ve PMF'li hastalarda da görülür.

JAK2 mutasyonu yönünden heterozigot veya homozigot olma hastalığın seyri veya tromboz insidansı veya kanama üzerinde belirgin bir farklılık ortaya koymaz. Buna rağmen homozigotlar heterozigotlara göre daha yüksek hemoglobin seviyelerine, daha fazla kaşıntı insidansına, daha yüksek fibrotik dönüşüm insidansına ve daha yüksek PRV-1 transkript seviyesine sahiptir. Bu mutasyonun yüksek seviyeleri yüksek granülosit sayılarıyla korele bulunmuştur (52).

JAK2V617F mutasyonu testi periferik kan granülositleri yerine eritroid burst-forming unit (BFU-Es) ile yapıldığında daha yüksek oranda homozigot pozitifliği bulunabilir (53).

Ekzon 12 mutasyonları

Bir çalışmada klinik olarak PV tanısı konmuş ekzon 14 V617F mutasyonu negatif olan 11 hastanın 10'unda *JAK2* geninin 12. ekzonunda 4 farklı mutasyon bulunmuştur. BaF3/EpoR hücrelerine dönüştürüldüğünde, bu mutasyonlarının dördünün de büyüme faktörü hipersensitivitesine ve eritropoetin sinyalizasyonu ile ilişkili biyokimyasal yolların aktivasyonuna neden olduğu görülmüştür (54).

114 PVÇG kriterlerini karşılayan hastada yapılan çalışmada %97'sinin ekzon 14 V617F mutasyonu pozitifken %3'ünde ekzon 12 mutasyonu olduğu tespit edilmiş ki bu gerçekte tüm PV'lı hastalarda ekzon 14 veya 12 'de *JAK2* mutasyonunun mevcut olduğunu düşündürmüştür (55-57).

Prognoz

İleri yaş ve diğer risk faktörlerine rağmen tedavi ile ortalama yaşam sürelerinin 10 yılın üzerinde olduğu rapor edilmiştir. Çoğu hasta ölümleri kanama veya trombozise bağlıdır, %20 kadar hasta myelodisplazi veya akut myeloid lösemiye (AML) yenik düşer (58).

Sağkalım için risk faktörleri: ileri yaş, lökositoz , venöz tromboz ve anormal karyotip olarak bulunmuştur. Ortalama yaşam süresi ileri yaş ve lökositoz yokluğunda 23 yıl iken her ikisinin de olması halinde 9 yıl olarak saptanmıştır (38).

PV'da tedavide semptomların ortadan kaldırılması veya geriletilmesi ve uzun dönem komplikasyonların (tromboz, kanama, maligniteler, myelofibrozis) önlenmesi amaçlanmaktadır. Flebotomi hipervizkoziteyi azaltmak amacı ile kullanılmaktadır (59). PVÇG 'na göre flebotomiyle erkeklerde Hct %45 in, kadınlarda ise %42 'nin altında tutulmalıdır ve tedavinin temeli buna dayanır (60).

1.2.3. Esansiyel Trombositoz

Esansiyel trombositoz/trombositemi (ET), periferik kanda trombositoz ve kemik iliğinin belirgin fibrozis olmayan proliferatif bir hastalıdır (61). Klonal kök hücre bozukluğudur (20).

Özgün klinik ve laboratuvar belirtilerinin olmaması nedeniyle ET tanısında DSÖ tanı kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 2.4.)

KML, PV, PMF kabul görmüş klinik ve laboratuvar bulguları yoluyla tanı alırken; ET bunların içinde tek başına reaktif trombositoz nedenlerini ve diğer MPN oluşumlarını dışlayarak tanı alır(62). Hali hazırda ET sitogenetik veya morfolojik tanımlı hastalık değildir, ET tanısı diğer MPN'lerden birinin olmadığı kronik non-reaktif trombositemik durum varlığında konur (63).

Tablo 2.3. 2008 DSÖ esansiyel trombositemi tanı kriterleri.-Thiele ve diğ.(36)'den alınmıştır.

Majör:

1- Trombosit değerlerinin devamlı olarak $\geq 450 \times 10^9/L$ olması.

2- Kemik iliği biyopsisi örneklerinde geniş ve matür megakaryositlerle birlikte megakaryositik hücre serisinde artış. Nötrofilik granülopoez ve eritropoezde ise belirgin artış olmaması

3- DSÖ tanı kriterlerinin PV, PMF, KML, MDS veya diğer miyeloid neoplaziler yönünden negatif olması

4- *JAK2V617F* mutasyonu veya diğer klonal belirteçlerin varlığı ve reaktif trombositozis nedenlerinin dışlanması

Esansiyel trombositoz tanısı için 4 kriterin de pozitif olması gerekmektedir.

Patogenez

ET'de endojen megakaryosit koloni büyümesi trombopoetin (TPO) içeren otokrin stimülasyona bağlı olarak ortaya çıkmamaktadır (64). Bu TPO veya TPO reseptörü (*c-MPL*) geninde aktive mutasyonlar veya diğer proteinlerin genlerindeki mutasyonların TPO bağımlı trombositozu neden olduğu otozomal dominant familial esansiyel trombositemilerin tersidir. ET'deki serum TPO seviyeleri uygunsuz şekilde normal yada artmıştır (65).

Epidemiyoloji

ET'nin yıllık insidans hızı 2,5/100.000'tur (66).

ET'de kadın üstünlüğü vardır (kadın erkek oranı yaklaşık 2:1) (67). Tanı sırasındaki ortalama yaş 60'tır ve hastaların %20 kadarı 40 yaşından genç olabilir (67). ET'de 5 yıllık ve 10 yıllık sağ kalım sırasıyla %74-%93 ve %61-%84 olarak not edilmiştir (68).

Klinik Durum

ET'li hastaların nerdeyse yarısı başlangıçta asemptomatiktir. Geri kalan hastalarda vazomotor semptomlar raporlanabilir veya trombohemorajik komplikasyonlar ortaya çıkabilir.

Vazomotor semptomlar

ET'li hastalarda baş ağrısı, sersemlik, senkop, atipik göğüs ağrısı, akral parestezi, livedo reticularis ve eritromelalji gibi vazomotor semptomlar %40 olarak görülür (69, 70).

Tromboz ve Hemoraji

Kalitatif ve kantitatif platelet değişikliklerine bağlı olarak ET'de tromboz ve hemoraji yaygın komplikasyonlardandır (59). Tanı sırasındaki tromboz ve hemoraji insidansı sırasıyla %9-22 ve %3-37 olarak raporlanmıştır (67, 68).

Tanı sonrası, ortalama 3-7 yıllık takip sonrası tromboz ve hemoraji oranları sırasıyla %7-17 ile %8-14 arasındadır (68, 71).

Hastalık transformasyonu

74 genç ET'li bayan hastada ortalama 9,2 yıllık (0,2-26 yıl arası) takip sonrası PV, PMF veya AML transforme olanlar sırasıyla %2,7, %4 ve %1,4'tür (69). 20 yıl sonunda beklenen lösemi transformasyon oranı PV için <%10 ve ET için <%5 iken, fibrotik dönüşüm oranları daha yüksektir (72).

Sağ kalım

ET'li hastaların ortalama sağ kalımı 20 yıl olarak bulunmuştur (72). *JAK2/CALR* mutasyonlarının varlığı veya yokluğu ET'de sağ kalımı etkilememektedir (73). ET ve PV'da sağ kalım için risk faktörleri ileri yaş, lökositoz ve trombositozdur (38).

ET veya prefibrotik PMF hastalarda yapılan çalışmada lösemi olmadan yaşamı etkileyen risk faktörleri: PMF morfolojisi, tromboz ve aşırı trombositoz (platelet sayısı>1 million/L) olarak bulunmuştur (74). Aynı çalışmada fibrotik dönüşüm risk faktörleri: prefibrotik PMF morfolojisi, ileri yaş ve anemi olarak değerlendirilmişken, *JAK2V617F* fibrotik dönüşümde düşük riskle ilişkili bulunmuştur (74).

Fizik Muayene ve Laboratuvar Sonuçları

Hastaların yaklaşık %25-48'inde palpabl splenomegali görülürken çoğunlukla aşırı büyük değildir (69).

Genel olarak sürekli ve başka yolla açıklanamayan platelet yüksekliği olan hastada dalak sağlam ve serum ferritin ve C-reaktif protein seviyeleri normalse tanı ET olarak düşünülebilir (75).

Kemik iliği

ET'nin başlangıcında yaşla eşleşen selülarite ve belirgin eritroid veya nötrofilik myeloproliferasyon olmaksızın predominant megakaryopoez mevcuttur(76).

JAK2 mutasyonu

ET'li hastaların %50-64 kadarı *JAK2V617F* mutasyon varlığı gösterir (50, 77, 78). Bu mutasyonun varlığı myeloproliferatif neoplazi ilişkili trombositozun reaktif trombositozdan ayrımını sağlar. Buna rağmen ET, PV ve PMF arasında ayırma izin vermediği gibi, ET'li hastalarla klonal veya poliklonal hastalık arasında ayırma da izin vermez (79).

Calretikülin mutasyonları

CALR gen mutasyonları hastaların %15-25'inde raporlanmıştır (8, 50).

MPL mutasyonları

5 büyük çalışmada *MPL* mutasyonları ET'li hastalarda %4'e kadar bulunmuştur (50, 80-83). *MPL* mutasyonları tromboz, major hemoraji, myelofibrotik transformasyon veya yaşam süresi gibi prognostik önemden bağımsızdır (81).

Diğer Testler

- Kemik iliğinin incelemesi yoluyla yapılan sitogenetik çalışmalar ET'yi taklit eden farklı bir kronik myeloid bozukluğun dışlanmasında önemlidir (84).
- Periferik kan granülositlerinde PRV-1 geni overekspresyonu hem ET de hem PV gözlenmiştir ancak sekonder trombositoz veya sekonder eritrositoz hastalarında görülmez (85).

1.2.4. Primer Miyelofibrozis

Primer myelofibrozis (PMF, 2001 DSÖ sınıflandırmasında kronik idyopatik myelofibrozis, agnojenik myeloid metaplazi) topluca değişken morfolojik olgunluk ve hematopoetik etki ile myeloid hücrelerin klonal çoğalmasıyla karakterize kronik myeloproliferatif neoplazilerden biridir (86).

PMF olgularının tanısında da PV ve ET olgularının tanısında olduğu gibi DSÖ tanı kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 2.4.).

PMF’de primer hastalık süreci kronik myeloproliferasyon ve atipik megakaryositik hiperplazi ile sonuçlanan klonal hematopoetik kök hücre bozukluğudur (87). Sekonder süreç olan kemik iliği fibrozisi ise nonklonal fibroblastik proliferasyonun ve klonal olarak genişlemiş megakayositlerden anormal şekilde dökülmüş büyüme faktörleriyle tetiklenen hiperaktivitenin sonucudur. Kemik iliği fibrozisi PMF’nin ayırt edici özelliğidir ve ciddi anemiye yol açan bozulmuş hematopoezde katkısı vardır. Bu hastalar aynı zamanda belirgin splenomegali, ekstramedüller hematopoez ve ciddi yapısal semptomlardan muzdariptirler (88).

Tablo 2.4. 2008 DSÖ primer miyelofibrozis tanı kriterleri.Thiele ve diğ.(36)’den alınmıştır.

Majör:
1- Retikülin veya kollajen fibrozisinin eşlik ettiği megakaryosit proliferasyonu ve atipisi veya; retikülin fibrozisinin olmadığı durumlarda megakaryositik değişikliklere granülosit proliferasyonu ile karakterize, kemik iliği hücre miktarında artış ve sıklıkla da eritropoeziste azalma eşlik etmelidir
2- DSÖ tanı kriterlerinin PV, KML, MDS veya diğer miyeloid neoplaziler yönünden negatif olması
3- <i>JAK2V617F</i> mutasyonu veya diğer klonal belirteçlerin varlığı veya; reaktif kemik iliği fibrozisine yol açan nedenlerin yokluğu
Minör:
1- Lökoeритроblastozis
2- Serum LDH değerinde artış
3- Anemi
4- Splenomegali
3 majör kriterler ile beraber 2 minör kriterin varlığı primer miyelofibrozis tanısı için yeterlidir.

Epidemiyoloji

PMF myeloproliferatif neoplaziler içinde en nadir görünendir. Beklenen insidans 1,5/100.000 olarak raporlanmıştır. PMF en çok orta yaş ve yaşlı hastalarda oluşur. Ortalama görülme yaşı 67’dir (66).

Etyoloji

PMF'nin esas nedeni bilinmemekte olup pluripotent hematopoetik progenitör hücrenin somatik mutasyonundan ortaya çıktığı düşünülmektedir (89).

a) Klinik Tezahür

Semptom ve Bulgular

PMF'de en sık olan yakınma hastaların %50-70'inde görülen ciddi halsizliktir (66, 90). Küçük sayıda hasta kilo kaybı ve %5-20'si düşük gradeli ateş, kemik ağrısı ve gece terlemesi gibi hipermetabolik durumun diğer bulgularını deneyimlerken büyümüş dalakla ilişkili semptomlar hastaların %25-50'sinde tanımlanmıştır (90). Tanı splenomegali (%90), hepatomegali (%40-70) veya anormal kan bulgularının araştırılması sırasında konulurken %15-30'u asemptomatiktir. PMF'de büyümüş dalak ve karaciğer ekstramedüller hematopoezle ilişkilidir (90).

PMF'de arterial ve venöz trombotik olay insidansı yılda 2/100 hastadır (91).

Portal ven trombozu PMF'nin ve diğer kronik myeloproliferatif bozuklukların tanınan komplikasyonudur (92).

b) Laboratuvar Bulguları

Anemi

PMF'li hastaların %50'sinde hemoglobin 10g/dl altında iken %20'sinde 8g/dl'nin altındadır (90). Anemi başlangıcından sonra, birçok hastada geçici eritrosit süspansiyon transfüzyonu ihtiyacına neden olan hemoglobin konsantrasyonunda progresif düşüş gözlenir. Periferik yayma anizositoz, poikilositoz, teardrop eritrositler (dakrosit), çekirdekli kırmızı küre hücreleri ve değişen seviyelerde polikromazi gösteren oldukça karakteristik görünümündedir (93).

Platelet ve beyaz kan hücresi anormallikleri

PMF'de platelet ve beyaz kan hücresi sayısı değişkendir. Tanı sırasında oluşan belirgin lökositoz (WBC >30,000/microL) ve trombositoz (platelet sayısı >500,000/microL) hastaların sırasıyla %11 ve %13'ünde oluşurken lökopeni ve trombopeni sırasıyla %8 ve %26'sında oluşur (90).

Anormal laboratuvar testleri

Serum alkalin fosfataz, laktat dehidrogenaz, ürik asit, lökosit alkalin fosfataz ve vitamin B12 artmıştır (94).

Kemik iliği incelemesi

Erken veya prefibrotik PMF kemik iliği biyopsi örneğinin histopatolojisi: fibrozis yokluğunda belirgin granülosit ve megakaryosit proliferasyonu ile ortaya çıkan hiperselülaritedir. Bu nedenle retikülin fibrozisi karakteristik olmasına rağmen PMF tanısı için gerekli kriter değildir. PMF’de megakaryositler ET ve PV ile kıyaslandığında daha belirgin derecede sitolojik atipi ile karakterizedir (76).

Aşağıdaki özellikler PMF’nin patogenezinde sorumludur:

- Kromozom anormallikleri
- Anormal megakaryosit büyümesi
- JAK/STATyolağı anormallikleri ve *MPL* mutasyonları
- Sitokinler
- Trombopoetin overekspresyonu

c) Hücresel Anormallikler

Kromozomal ve diğer genetik anomaliler

Neredeyse PMF’li hastaların %50-60’ ının tanı sırasında klonal karyotipik anormalliği vardır (88). Buna rağmen bu anormalliklerin hiçbirisi bu bozukluğa spesifik değildir. En yaygın bulgular, karyotip değişimlerinin % 55-65’lik kısmından sorumlu retinablastom genini (13q-) içeren kromozom segmentinde delesyon, 20q- ve parsiyel trizomi 1q’dur. Bu sitogenetik anormalliklerle raporlanan hastalar kötü prognoza sahiptir (95).

PMF’de kromozom 9 ve 9p’de kazanım şeklindeki mutasyonların varlığı patogenezinde önemli bir rolü olduğunu düşündürür ve *JAK2* gen mutasyonlarının burada oluşu bunu destekler (96).

Kısaca, *JAK2* başta olmak üzere *MPL*, *LNK*, *CBL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *IKZF1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TP53*, *SF3B1* ve *SFSR2* gibi mutasyonlar PMF’te görülür. Ancak hiçbirisi ata klona kadar gitmez ve hastalık başlatıcı potansiyelleri belli değildir. *JAK2* ve *SF3B1* mutasyonları spesifik bir fenotip gösterebilir (sırasıyla eritrositoz ve ring sideroblastlar). Çalışmalar

incelendiğinde sağ kalımın düşük olduğu durumlar: *JAK2* 46/1 haplotipi için nullizigote, düşük *JAK2V617F* allel yükü ve *IDH*, *ASXL1*, *SRSF2* veya *EZH2* mutasyon varlığıdır. *JAK2V617F*, *MPL* veya *TET2* mutasyon yokluğu sağ kalımla ilişkili değildir. *JAK2* yüksek Hgb, lökositoz, Kİ fibrozisi ile *MPL* de trombositoz ve düşük Hgb ile ilişkilidir (97).

***JAK2* mutasyonları**

PMF’de intrinsik büyüme faktörü hipersensitivitesinde önerilen bir mekanizma PV’lı, ET’li ve PMF’li hastalarda *JAK2* mutasyonu aktivasyonun keşfiyle *JAK2/STAT5* aktivasyonu ile ilişkili megakaryositlerde FKBP51 overekspresyonunu içerir (88). *JAK/STAT* yolağının yapısal aktivasyonu myeloproliferatif bozukluğu olan hastalarda önemli bir patojenik olay olarak ortaya çıkar. Buna rağmen PMF’li hastaların yaklaşık %50’si *JAK2* mutasyonuna sahiptir ki bu *JAK/STAT* aktivasyonunun hematopoetik spesifik sitokin reseptörlerini aktiveleme gibi farklı modlarının olabileceğini düşündürür (98).

***Calretikülin* gen mutasyonları**

CALR gen mutasyonları *JAK2* ve *MPL* negatif PMF hastalarının yaklaşık %88’inde raporlanmıştır (9).

***MPL* mutasyonları**

Trombopoetin reseptörleri (*MPL*) de PMF’li hastalarda *JAK/STAT* sinyalizasyonunun aktive edebilir (5). Trombopoetin reseptöründe (*MPL* mutasyonları W515L ve W515K) yeni somatik aktive edici mutasyonun PMF’li hastaların yaklaşık %5’inde, ET’lilerin %1’inde ve PV’lılarda hiç bulunmaması *JAK2* mutasyonlarının eritroid seri lehine *MPL* mutasyonlarının megakaryositer seri lehine olduğunu düşündürür (5, 80).

Akut Lösemi Transformasyonu

Lösemik dönüşüm aşaması özellikle MPN’li hastalarda kötü prognoza neden olup önemli bir klinik problem olarak kalır. Hastalığın kronik fazında *TET2*, *TP53* ve *IDH* transformasyon riskini artırır (99).

Klasik Ph kromozomu negatif MPN’ler arasında PMF kötü prognozla ilişkilendirilenlerden biridir çünkü hastaların hayat beklentisinde belirgin bir azalmayı içerir (73). PMF’de beklenen ortalama yaşam süresi 6 yıldır (100).

Ölüm nedenleri lösemi dönüşümü, kemik iliği yetmezliğine bağlı hastalığın progresyon göstermesi ve tromboz, kanama, portal hipertansiyon veya infeksiyonlara bağlı komplikasyonları içerir. PMF’de konvansiyonel ilaç tedavisinin sağ kalımı uzattığı gösterilememiştir. Allojenik kök hücre transplantasyonu kür için tek şanstır ancak o da mevcut mortalite ve morbidite ile ilişkili olabilir (101).

PMF için tedavi kararı allojenik kök hücre transplantasyonu zamanına karar vermek zordur. Bu nedenle sağ kalım ve lösemi dönüşümü yönünden doğru risk yönetimi için hastayı tanı sırasında The International Prognostic Scoring System (IPSS) ile değerlendirip Dinamik IPSS (DIPSS) modeli ile sağ kalıma dair hastalık seyrinin herhangi bir zamanında tahminde bulunulabilmektedir (102).

ET ile kıyaslandığında erken PMF’de belirgin düşük hemoglobin seviyeleri ve yüksek WBC ve platelet sayısı ,daha sık splenomegali ve daha yüksek myelofibrozis (ET sonrası MF), akut lösemi dönüşüm oranı ve yüksek mortalite oranı görülür (74).

1.3. JAK/STAT Sinyal Yolağı

1.3.1. Janus Kinaz Ailesi

Sitokinler, aynı kökenden gelen reseptörlere bağlanan ve gen ekspresyonu modülasyonu ile sonuçlanan intraselüler sinyalizasyon olaylarını tetikleyen büyüme faktörü olarak tanımlanan bir gruptur. Çoğu sitokin reseptörü spesifik ligand bağlayıcı subunit ve diğer sitokin reseptör süper ailesi üyelerine yapısal olarak benzeyen sinyal iletilici subunitin birleşmesiyle oluşur (103, 104).

Hücre içinde birçok sinyal yolağını aktive eden tirozin kinaz aktivitesi hücre büyümesine, farklılaşmasına, hücre göçlerine ve metabolik değişikliklere yol açar (105). Tirozin kinaz aktivitesini protein fosforilasyonunu yapan protein kinaz adı verilen enzim sağlar. Protein kinazların aktivasyonunu, proteinin defosforilasyonunu gerçekleştirerek yapan enzim grubu da protein fosfotazlardır. Hücrelerde bu iki enzim grubu antagonize çalışarak sinyal iletiminde rol alırlar. Bu enzimlerin herhangi bir nedenle

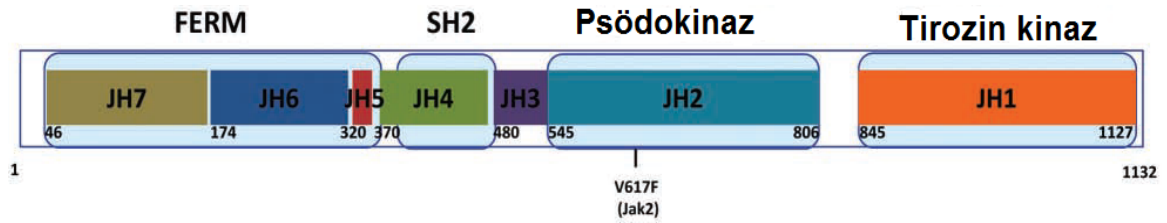
görevini yerine getirememesi hücre metabolizmasında aksaklıklara neden olmaktadır (106).

Çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinden gelen sinyallere aracılık eden JAK ailesi, JAK-STAT yolağı ile sitokin ve büyüme faktörlerinin hücre içi sinyallerinin iletimini sağlayan bir tirozin kinaz grubudur. JAK ailesi; sitokin reseptör sitozolik domainine bağlı JAK1, JAK2, JAK3 ve Tirozin kinaz 2 (TYK2) olmak üzere dört üyeden oluşur. JAK1, JAK2 ve Tyk2 çeşitli dokularda görev yaparken, JAK3 sadece hematopoetik sistemde fonksiyon göstermektedir (18).

JAK1 ve JAK2 tip II interferon (IFN- γ) sinyal yolunda rol alırken, JAK1 ve TYK2 tip I IFN sinyallenmesi ile ilişkilidir. TYK2 “natural killer” fonksiyonlarına aracılık eder.

İnsanlarda, TYK2 geni kromozom üzerinde 19p13.1, JAK3 geni 19p13.2, JAK2 ve JAK1 geni ise sırasıyla 9p24 ve 1p31.3 bölgesindedir (107).

JAK’lar , 120-140 kDa’luk molekül ağırlığına sahiptir ve 11.000’den fazla amino asit içerirler (108). JAK kinazların benzersiz yapısı, onları diğer protein kinaz ailesinin üyelerinden rahatça ayırır.(bkz. Şekil 2.7.)



Şekil 2.3. Janus Kinazların (JAK) yapısı.

Jatiani ve diğ.(109)’den alınmıştır.

JAK’lar FERM domaini, SH2 domaini, psödokinaz domaini ve C-terminal kısmında bulunan katalitik aktif tirozin kinaz domaini (JH1) olmak üzere 4 fonksiyonel domainden oluşurlar. JH2 bölgesi fonksiyonel tirozin kinaz olmadığı halde (psödokinazdır), STAT molekülleri için bağlanma bölgesi oluşturur ve JAK proteinlerinin aktivitesini negatif olarak düzenler.

Myeloproliferatif neoplazilerde bulunan JAK2V617F mutasyonu bu domainde meydana gelmektedir. N-terminal kısımda bulunan FERM; reseptör ilişkisinde yani sitokin reseptörlerini sitozolik domaine bağlama görevi görür (18). SH2 domaini fosfotirozin bağlama bölgesi olarak görev alır. JH3–7 ise molekülün sitokin reseptörleri ile olan ilişkisini düzenlemektedir.

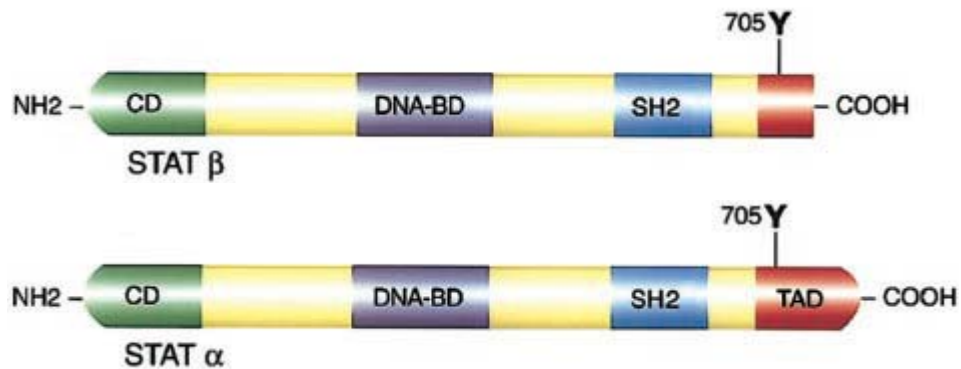
1.3.2. STAT (Signal Transducer and Activating of Transcription)

Ailesi

Proliferasyon, büyüme, hematopoez ve immün yanıt gibi bir dizi hücrel fonksiyonlarının yerine getirilmesinde rol alan JAK-STAT yolağındaki yardımcı transkripsiyon faktörleri de STAT'lar olarak bilinir. STAT ailesi ise, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olmak üzere 7 üyeden oluşur.

STAT 1, 2, 4 ve 6 oldukça sınırlı fonksiyona sahiptir, hastalığın çevresinde konumlanır (110). Buna rağmen STAT3 ve STAT5, daha geniş fonksiyonlara sahiptir. STAT'lar, spesifik negatif regülasyon davranışı olan bir çok diğer sellüler proteinle etkileşim içindedir (110). Memeli STAT proteinleri bir DNA bağlama bölgesi, bir SH2 domaini ve bir tirozin fosforilasyon bölgesi olmak üzere 3 korunmuş domain içerir (şekil 2.8).

Amino terminalin proksimal bölgesi diğer selüler proteinlerle etkileşimdedir ve sitoplazmadan nükleusa geçişte rol alır. Aminoterminal uca çok yakın bölgede STAT dimerlerinin oligomerizasyonunu yöneten zayıf korunan bir bölge vardır (111).



Şekil 2.4. STAT moleküllerinin yapısal ve fonksiyonel domainleri.(üst) STATın gerçek uzun hali(alt panel).Benekli ve diğ.(112)'den alınmıştır.

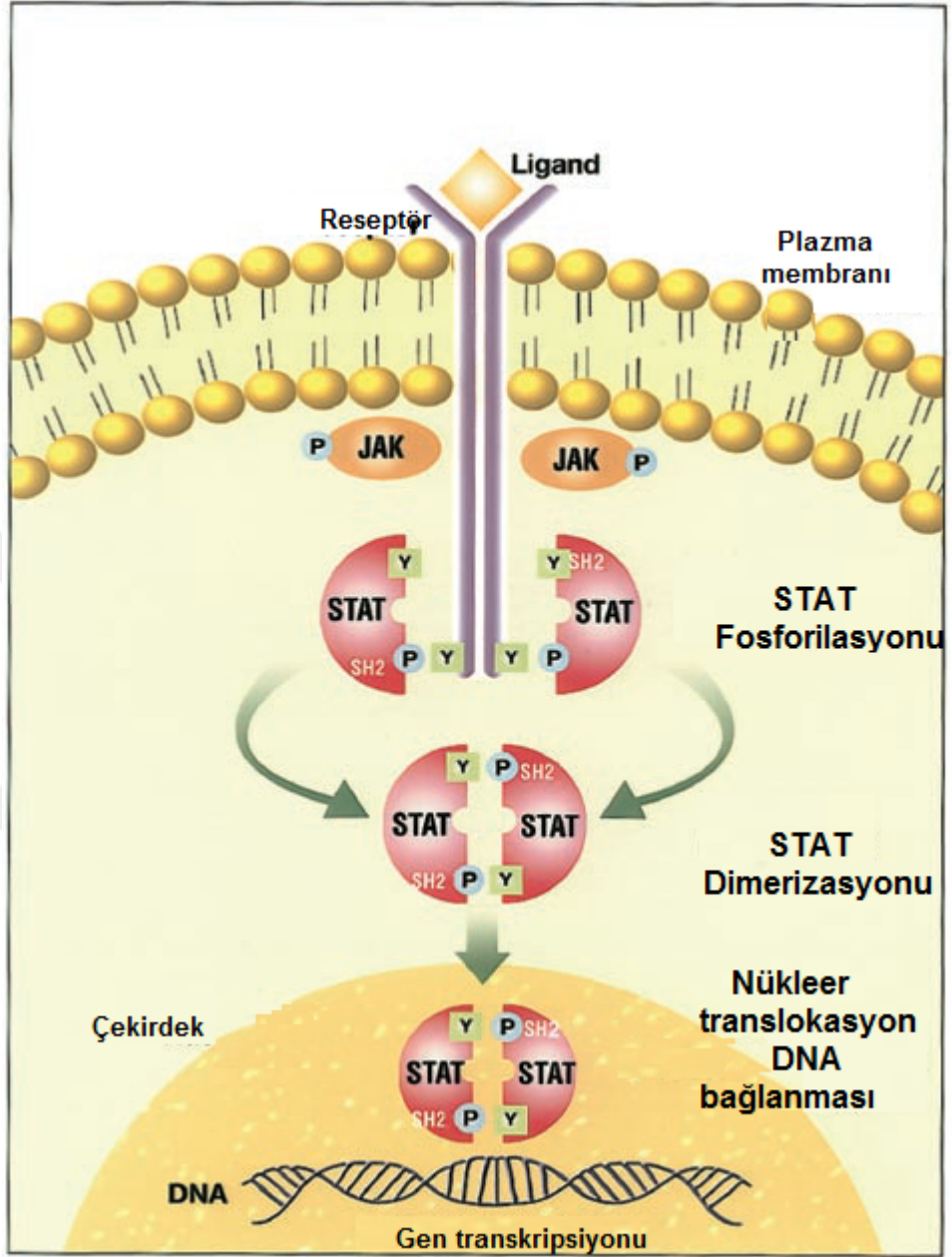
c-terminal transaktivasyon bölgesinin (TAD) kesimi STAT izoformlarıyla sonuçlanır.

Sitokinle ligand bağlayıcı reseptör subuniti arasındaki etkileşim sinyalizasyon oluşumunda etkin reseptör kompleksi için ilk basamaktır. Bu süreç ligand bağlı subunitin başka bir subunitle veya ayrı sinyal ileten subunit ile oligomerizasyonunu içerir (113).

Bu oligomerizasyon reseptör ilişkili JAK'ların çapraz fosforilasyon yoluyla aktivasyonu yoluyla sinyal iletimi sürecini başlatır (Şekil 2.9). Aktive JAK'ların hızlı hedefleri reseptörlerin sitoplazmik bölümleri ve reseptör ilişkili proteinlerdir. Fosforile tirozin bölgesi Src homology-2 (SH2) ve membranda veya sitoplazmik kompartmanda bulunan proteinleri içeren fosfotirozil bağlayıcı domain için bağlayıcı bölge olur. Bunlar arasında belirgin olan STAT'lardır. Reseptör bağlı STAT'lar karboksi terminal bölgesinde tek tirozin rezidüsü üzerinden fosforiledir. Modifiye STAT'lar reseptör subunitinin sitoplazmik bölgesinden STAT'lardan birinin fosfotirozini ve diğerinin SH2 domaini arasında resiprokal etkileşim yoluyla homodimer veya heterodimer oluşturmak üzere salınır. STAT'lar reseptöre bağlanır ve bivalent SH2-fosfotirozin etkileşimi ile dimerize olur. STAT dimerizasyonu için korunmuş tirozinin fosforilasyonu gereklidir. N-terminal bölgesi STAT dimerlerinin oligomerizasyonuna aracılık eder (114). Dimerizasyonu takiben, STAT'lar hızlı bir şekilde çekirdeğe transloke olur ve hedef gen transkripsiyonunu uyarmak için spesifik regülatör elamanlarla etkileşime geçer (112)(bkz Şekil 2.5).

Genel olarak ligand bağlanması nedeniyle reseptör dimerizasyonu/oligomerizasyonu JAK'ların homodimerik veya heterodimerik etkileşimlerle jukstapozisyonlanması ile sonuçlanır. JAK'ların güçlenmesi diğer JAK'lar veya diğer tirozin kinaz ailelerinin otofosforilasyonu ve/veya transfosforilasyonu yoluyla fosforillenmesi ile sonuçlanır. Bu aktivasyon JAK kinaz aktivitesinin artması ile sonuçlanır. Aktive JAK'lar STAT'lar, Src kinazlar, protein fosfotazlar ve Shc, Grb2 ve PI-3 kinaz gibi diğer adaptör sinyalleme proteinleri gibi diğer SH2 domainini bağlamaya izin veren

yerleştirme bölgesi olarak hedef tirozin rezidülerindeki reseptörleri fosforiller (115).



Şekil 2.5. JAK-STAT sinyal iletim yolağı.

Benekli ve diğ.(112)'den alınmıştır.

1.4. Janus Kinaz Ailesi

JAK2, eritropoetin, trombopoetin, interlökin-3, granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) için

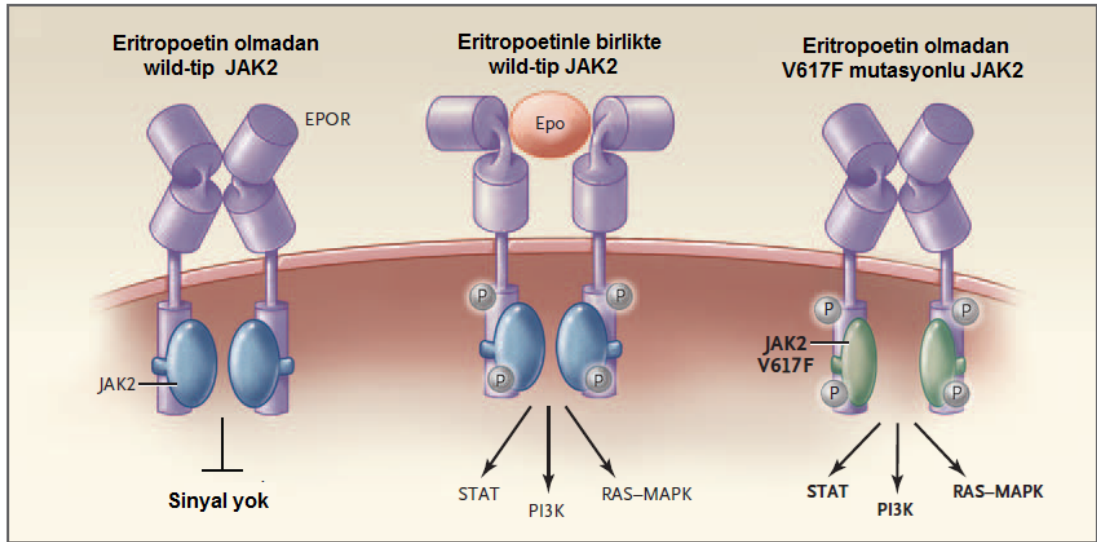
olan reseptörler tarafından intraselüler sinyalizasyonu ayarlama da kritik öneme sahiptir (116).

JAK2 endoplazmik retikulumda eritropoetin reseptörlerine bağlanır ve bu kendisinin hücre-yüzey ekspresyonu için gereklidir. Eritropoetin reseptörüne bağlandıktan sonra reseptörde fosforilasyon ve JAK2 aktivasyonu ile konformasyonel değişikliği uyarır. Aktive JAK2 reseptörün sitoplazmik domainini fosforilleyerek intrasellüler sinyal kaskatını başlatır. Böylece downstream efektör proteinlerin bağlanma bölgesini ve hücre içi sinyal kaskatlarının başlamasını düzenler (117).

Sitoplazmik tirozin kinaz olan JAK2 hasarlı fareler 12,5. embriyonik günde eritropoetinin reseptörüne bağlanmasıyla uyarılan sinyal dönüştürücü olarak JAK2'nin yaşamsal rolü destekler şekilde belirgin eritropoez kaybıyla ölürlere (118).

1.4.1. JAK2 V617F Mutasyonu

2005'te çeşitli gruplar tarafından Ph negatif MPN'lerin büyük çoğunluğunda Janus kinaz (JAK2) geninde tek, kazanılmış nokta mutasyonu kodlanmıştır (3, 119).



Şekil 2.6.- JAK2'nin Yolak Sinyalizasyonunda ve Eritropoetin Bağlanmasında Rolü.

Campbell ve diğ.(20)'den alınmıştır.

Dokuzuncu kromozomun kısa kolunda (9p) bulunan sitoplazmik tirozin kinaz Janus kinaz 2 (*JAK2*) geninin 14. ekzon 1849. nükleotidinde meydana gelen bir nokta mutasyon sonucu *JAK2* psödokinaz domaini (JH2) içinde 617. kodonda yer alan guanin timine dönerek valinin yerini fenilalanin alır (*JAK2V617F*). (2) JH2 domaini, *JAK2* kinaz (JH1) domainin homologudur ancak katalitik aktiviteden yoksundur. JH2, *JAK2* kinaz aktivitesi üzerine inhibitör etkiye sahiptir ve V617F mutasyonu ile bu otoinhibisyonun ortadan kalkmasına yol açar ve böylece sürekli kinaz aktivitesi oluşur. Aynı zamanda valin-fenilalanin değişimi (V617F) *JAK2*'yi aktifler, bu da substratlarında fosforilasyonun artışıyla sonuçlanır ve myeloid hücrelerin sitokin cevabında artışa yol açar (9, 18).

Biyokimyasal kanıtlar da *JAK2V617F*'nin sürekli aktif bir tirozin kinaz olduğunu göstermiştir. T hücrelerinde *JAK2V617F*'in düşük miktarda eksprese edildiğinde bile, güçlü şekilde otofosforilasyona neden olarak, sürekli kinaz aktivitesine neden olduğu gösterilmiştir. İn vitro değerlendirmeler sonucunda *JAK2V617F*'nin wild tipe göre çok daha güçlü kinaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (20).

Yani *JAK2V617F* mutasyonu downstream sinyalizasyonla sonlanan kinazların esas aktifleyicisidir. *JAK2* histon H3'ü veya arjinin metiltransferazı PRMT5 fosforilleyerek epigenetik modifiye edici gibi görev alır ve mutant *JAK2* wild tip *JAK2*'ye nazaran PRMT2'ye PRMT5'e daha fazla affinite ile bağlandığı gösterilmiştir (bu da PRMT5'in fonksiyon kaybıyla sonuçlanır). PRMT5'in downregülasyonu; eritroid differansiasyonla sonuçlandığı gösterilmiştir ki bu *JAK2V617F* mutasyonunun MPN fenotipine birden fazla mekanizmayla katkıda bulunabileceğini düşündürür (99).

Hematopoietik hücreler içinde *JAK2V617F*'nin ekspresyonu STAT'lar (STAT5, STAT3, ve STAT1), ERK/mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ve fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K)/AKT/memeli rapamisin hedefi (mTOR) gibi downstream sinyal yollarının aktivasyonuna aracılık eder. STAT5 normalde sitokin reseptör *JAK2*-kompleksi ile fosforilize edilir. Fosforilize STAT5

nükleusa geçip hedef genleri aktive eder. Bunlardan biri PV eritroblastlarında artmış düzeyde ekprese olan antiapoptotik protein Bcl-X'tir. Bcl-X'in STAT5 aracılı aktivasyonu PV patogenezinde önemlidir.

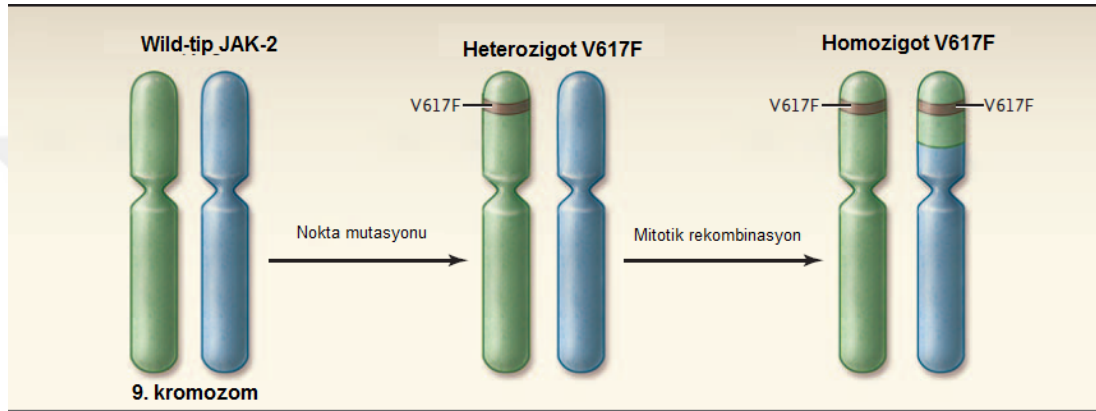
Florasan aktive hücre ayrıştırma yöntemiyle izole edilen hematopoetik progenitör hücre (in vitro büyüyen) kolonilerinde ve HKH'lerde JAK2 mutasyon varlığı multipotent progenitör veya kök hücrede artan polistemia vera ve ilişkili myeloproliferatif bozukluklar için direkt kanıt sağlar (57, 120). KML'de normal büyüklükte myeloid kök hücre kompartmanlarına zıt olarak (20), polistemia verada kök hücre kompartmanları genişlemiş ve öncelikli olarak eritroid differansiasyonla karakterizedir (120). Beraber düşünüldüğünde JAK2 mutasyonları hematopoetik kök hücre davranışlarını etkiler ama muhtemelen eritroid, granülositik ve megakaryositik serilerde differansiasyonun geç evrelerinde de rol alır.

Mutasyon yükünün hastalık fenotipine katkısına dönük çalışmalarda mutasyon durumu; heterozigot için çalışılan hücre popülasyonunda (çoğu zaman periferik kandaki pürifiye granülosit için) mutasyon yükünün semikantitatif olarak %50'nin altında; homozigot içinse %50'nin üzerinde oluşu olarak tanımlanır. Bu çoğunlukla allel spesifik PCR sonrası restriksiyon enzim kesimine dayalı bir yöntemle bağlı bir değerlendirmedir (119, 121). (bkz şekil 2.7)

JAK2V617F-mutant ET PV'ya dönebilir ve daha sonra sekonder myelofibroze ilerleyebilir. JAK2V617F-mutant ET ve PV fizyolojik veya genetik modifiye ediciler tarafından belirlenen eritrositoz derecesi ile biyolojik devamlılık gösterir. JAK2V617F mutant allel yükü farklı fenotiplere yol açan major faktördür. Kromozom 9p'de heterozigosite kaybının kazanılmış nötral kopyası JAK2V617F mutasyonunun heterozigottan homozigota geçişinden ve sonuç olarak daha yüksek allel yükünden sorumludur. JAK2V617F mutant allel yükü PV'da ET'den daha yüksektir ve PV'dan myelofibroze ilerleyen durumlarda daha da yüksektir (50).

V617F mutasyonu homozigotluğu, kırık noktaları 9p kromozomu boyunca JAK2 lokusu ve sentromer arasında yayılan myeloproliferatif bozukluklarda önemli bir rol oynar ki bu da rekombinasyona meyilli sadece

tek fragil bölge olmadığını gösterir (50). Polistemia verada *JAK2* mutasyonu homozigot olan kan hücreleri prevalansı, mutant progenitör hücrelere çoğalma ve yaşam avantajı sağlayacak şekilde zamanla artar (57). V617F homozigotluğu, V617F heterozigotluğuna nazaran downstream hedef genlerde belirgin değişikliklerle ilişkilidir (20). Bu muhtemelen wild-tip allel tarafından inhibisyon kaybıyla birleşmiş V617F çift dozuyla ilişkili artmış sinyalizasyonu yansıtır (2).



Şekil 2.7. V617F Mutasyonu İçin Homozigosite Oluşumu.
Campbell ve diğ.(20)'den alınmıştır.

Polistemia veralıların granüositlerinde %30 saptanan homozigotluk (3, 122) bu hastalardan alınan hematopoetik progenitör hücre çalışmalarında yaklaşık %90 V617F mutasyon homozigotluğu olarak karşımıza çıkar. Ancak ET'de homozigot progenitör hücre bulunamamıştır. Bu fark V617F homozigotluğunun PV gelişimine neden olduğunu düşündürür (57).

Farklı *JAK2V617F* fare modellerinde insandakine benzer durum ortaya çıkar ki bu da *JAK2V617F*'nin myeloproliferatif fenotipten sorumlu asıl mutasyon olduğunu ortaya koyar (123). Fare transplant modelinde *JAK2V617F* ekspresyonu transplant fareda trombositoz olmadan eritrositoz ile sonuçlanmıştır ve bu modelde myelofibrozis de tanımlanmıştır (99).

JAK2V617F PV'lıların %90-96'sında (124), ET'lilerin %50-%70'inde, ve PMF'lilerin %40-60'ında ve %30-%50 splanknik ven trombozu ve trombositozla ilişkili sideroblastik anemi gibi bazı atipik MPN'lerde bulunur (18). Ana soru tek bir mutasyonun farklı fenotipleri nasıl ortaya çıkardığıdır.

Mutant *JAK2* allel yükü; ET'de en düşük ve PMF'de orta seviyede iken PV'da en yüksek allel yükünü içerir. Güçlü kanıt, çoğu PV'da homozigot *JAK2V617F* klonu belirgin ve *JAK2* lokusunda uniparental dizomi sonrası oluşurken; ET'de heterozigot *JAK2V617F* klonunun genişlemesiyle ilişkili olduğunu düşündürmüştür (57). *JAK2V617F* alleli için homozigot olan hastalarda heterozigot olanlarla karşılaştırıldığında farklı transkripsiyonel işaret olduğu ortaya çıkmıştır (99). V617F-pozitif BFU-Es ET'li hastalarla kıyaslandığında PV'lılarda daha yaygındır ve V617F-homozigot BFU-Es PV'lılarda tespit edilirken ET hastalarında görülmemiştir. Polistemik transformasyon sonrası ET'de de mutasyon homozigot hücrelerin görülmesi nadirde olsa ET'de görülebileceğini göstermiştir (57).

ET ve PV hastalarında homozigosite birçok önemli klinik etkiyle ortaya çıkar. Bunlar; ileri yaş, yüksek hemoglobin düzeyi, lökositöz, düşük platelet sayısı, yüksek splenomegali frekansı ve artmış myelofibrozis dönüşüm frekansı ile ilişkili olmasıdır (125).

ET'de *JAK2V617F* varlığı artmış arteriyel tromboz ve düşük post-ET MF riski ile ilişkilendirilmiştir (126). Homozigosite ET'lu hastalarda trombotik riskle ilişkiliyken, PV'da değildir (125).

PMF'li hastalarda düşük *JAK2V617F* allel yükü kötü sağ kalımla ilişkilidir (99).

JAK2V617F varlığı veya artmış allel yükünün hayatta kalma veya PV da lösemi transformasyonu üzerinde etkileri görülmemiştir (121).

PV'da artmış *JAK2V617F* mutant allel yükü kaşıntı ve fibrotik transformasyonla ilişkilendirilmiştir (127).

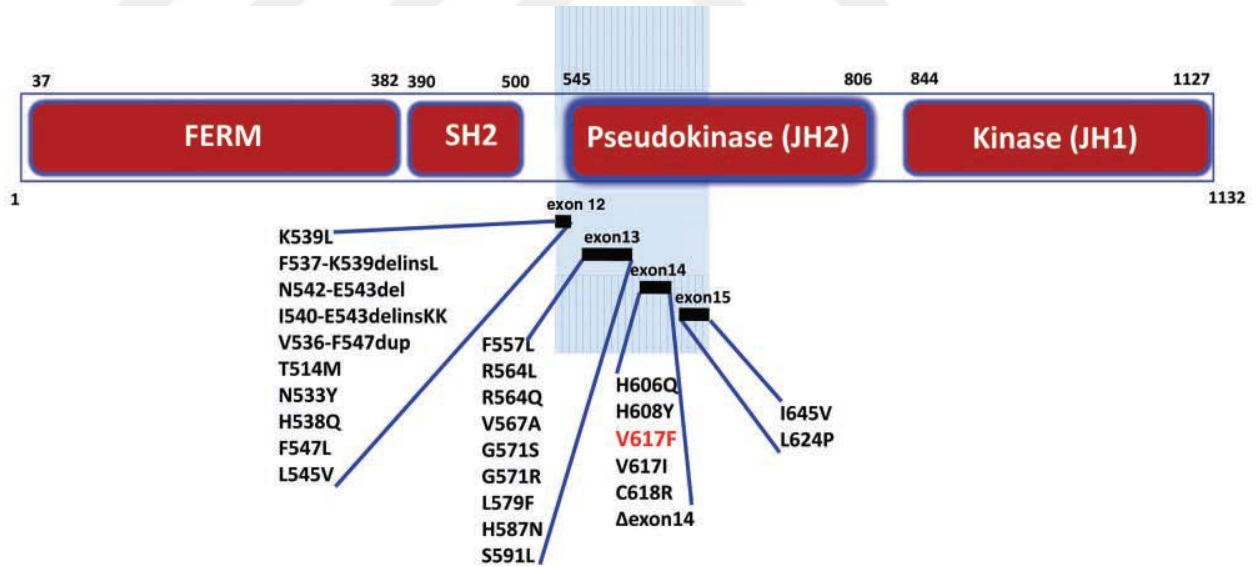
Eritroid seri için STAT1 aktivasyonu eritroid differansiasyonda inhibisyona bağlı ET fenotipi ile bağlantılı iken, STAT5'in aktivasyonu PV gelişimi için anahtar faktördür. Bu nedenle, cinsiyet içerecek şekilde germ hücreleri belirleyici faktörlerin, *JAK2V617F* MPN fenotipinde önemli bir rol oynaması olasıdır. Çoğu PV ve ET'de *JAK2V617F* klonları wild tip *JAK2* klonlarıyla ilişkilidir. Mutasyonlu klonların klonal dominans mekanizması *JAK2V617F* yüzünden çevresel değişikliklerin öncesinde veya sonrasında ortaya çıkan ek somatik mutasyonlara bağlı olabilir (128).

2.4.2. JAK2 Ekzon 12 Mutasyonları

Bu mutasyonlar SH2 ve JH2 arasındaki bağlayıcı bölgeleri kapsar. Psödokinaz domaininde bulunmadığı halde, JH2 domainin yapısını V617F'ye benzer şekilde modifiye edebilir. *JAK2V617F* mutasyonlarından farklı şekilde, *JAK2* ekzon 12 mutant PV sekonder myelofibroze ilerleyebildiği halde, ET ve PMF ile ilişkili değildir (18).

JAK2 ekzon 12'de 17 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Şekil 2.8'de bazıları gösterilmiştir.

PV'da ekzon 12 mutasyon insidansı %3'tür (38, 56). Hastaların üçte ikisinde izole eritrositoz olduğu halde geri kalan grupta eritrositoza ek olarak lökositöz ve/veya trombositöz vardır. PV'lı hastaların büyük çoğunluğunda görülen kemik iliği panmyelozisi ekzon 12 mutasyonu olan hastalarda tipik olarak yoktur. *JAK2V617F*-pozitif PV hastalarla karşılaştırıldığında ekzon 12 mutasyonuna sahip olanların tromboz, myelofibrozis lösemi ve ölüm insidansları benzerdir (129, 130).



Şekil 2.8. Klinikte karşılaşılan JAK2 mutasyonları.

Jatiani ve diğ.(109)'den alınmıştır.

Ekzon 12 mutasyonları *JAK2V617F*'dan farklı olarak fonksiyon kazanım mutasyonudur. Hücre serilerinde bu mutasyonların ekspresyonu faktör bağımsız büyüme eğilimindedir. *JAK2* ekzon 12 mutasyonu pozitif

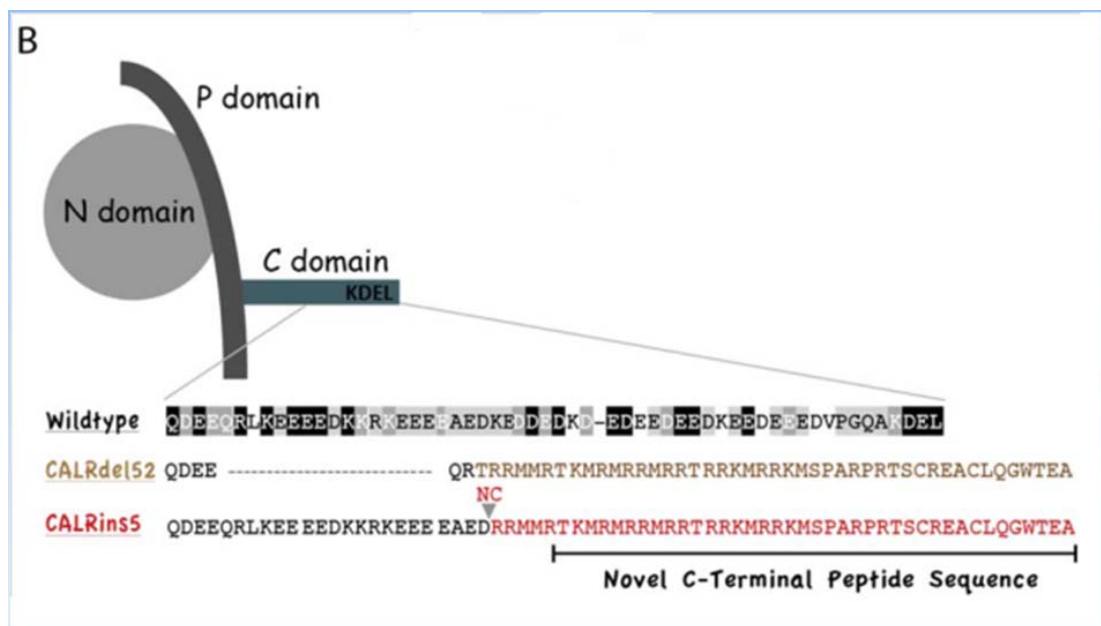
hastalar genelde ağırlıklı olarak eritroid myelopoez, daha yüksek hemoglobin seviyeleri, tanı sırasında daha genç, düşük lökosit ve trombosit sayıları, subnormal serum eritropoetin seviyeleri ile fenotipik olarak farklı ancak prognostik olarak *JAK2V617F* ile benzerdir. Yani tromboz, myelofibroz, lösemi ve ölüm insidansları benzerdir (131).

1.5. Calretikülin (CALR)

CALR gelişimsel olarak iyi korunmuş, multikompartmanlardan oluşan çoklu fonksiyonlu bir protein olup en iyi endoplazmik retikulum lümeninde (ER) Ca²⁺ bağlayıcı şaperon olarak bilinir ve böylece T hücrelerine antijen prezantasyonunda etkili olarak major histocompatibilite kompleksi (MHC) class I molekülünün ekspresyonunu ve dolayısıyla CD8 T hücrelerine MHC class I tarafından sunulan antijenlerin tanınmasında önemlidir (132, 133).

CALR geninin uzunluğu 4.2 kb.'dır. 9 ekzon içerir ve kromozom 19p13.2'de lokalizedir. *CALR*'in postnatal overekspresyonu kardiyak defektlere neden olurken; knock out fareler ölü doğan anormal kalsiyum varlığına bağlı bozulmuş miyofibrillogenenez ve bozulmuş kardiyak gelişim sergiler (134).

Matür *CALR* 46-kDa'luk bir protein olup , yapısal ve fonksiyonel olarak farklı 3 domainden oluşmuştur. (bkz Şekil 2.9)



Şekil 2.9. *CALR* domainleri ve mutasyonları.
Guglielmelli ve diğ.(135)'den alınmıştır.

Globüler N-terminal domaini (1-180 rezidü) lektini bağlar ve ER'yi hedefleyen sinyal sekansından oluşur. Ortadaki prolinden zengin P-domaini (181-290 rezidü) yüksek affiniteli, düşük kapasiteli, kalsiyum (Ca^{+2}) için bağlanma bölgesi içerir. Yüksek asidik C-terminal domaini (291-400 rezidü) yüksek kapasiteli, düşük affiniteli birçok Ca^{+2} bağlama bölgesi içerir ve hücrel Ca^{+2} homestazında yer alır.

CALR defekti olan hücreler ER'da azalmış Ca^{+2} depolama kapasitesine sahiptir ve *CALR* overekpresyonu ER'da kalsiyum retansiyonunu artırır (135).

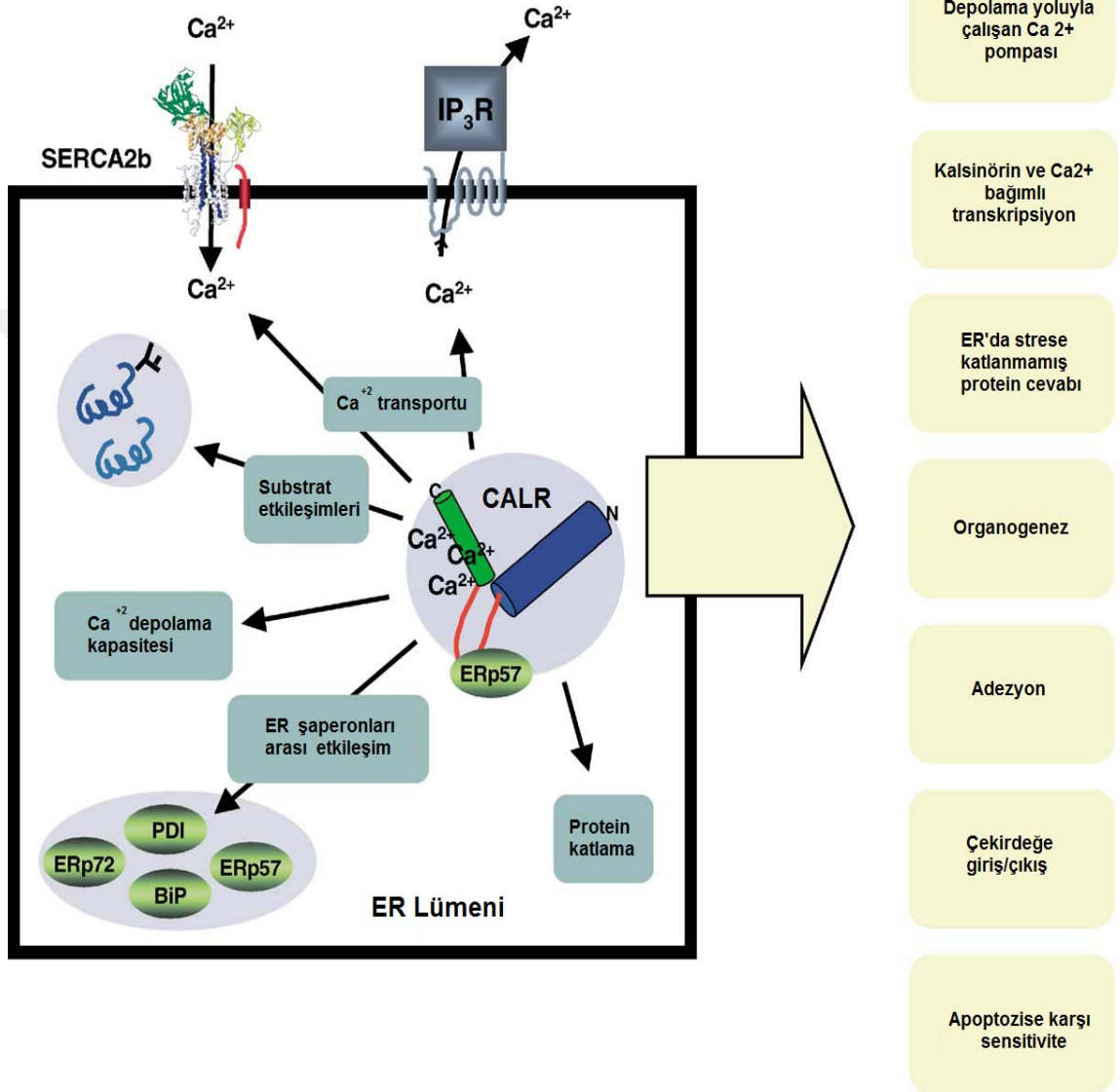
C-domaini K-del sekansının terminalinde yer alır; K-del reseptörlerinin K-del içeren proteinleri cis-golgiden ER'a geri almak ve ER'den protein sekresyonunu önlemek gibi fonksiyonları vardır. Bu K-del'in ER'da *CALR* retansiyonu için bağımsız mekanizmasının varlığını destekler. ER retansiyonunun *CALR*'in asidik bölgesi tarafından belirlenebileceğine dair kanıtlar, K-del varlığına rağmen proteinin sekrete edildiği bölgenin bloklanmasını gösteren çalışmalardan gelir. Bu bölge aynı zamanda sitozolde non-degradasyon işleminde *CALR* translokasyonunda rol oynayabilir (136).

Mutant *CALR* C-terminali hücrel mislokasyon şansını artıran K-del'i bloklar, ancak hedef hücrelerdeki mutant *CALR*'in ER içindeki lokalizasyonunu büyük ölçüde korur (135).

CALR; ER lümeni içinde diğer şaperon proteinleriyle beraber uygun protein ve glikoprotein katlanmasının sağlanmasında esansiyel rol alır. *CALR* calneksinle yapısal olarak homologtur ve "calnexin/calreticulin siklusu"nda, doğru protein katlanmasını ve /veya degradasyonu sağlayan ve protein aggregasyonunu önleyen mekanizmalarda beraber fonksiyon görür (135).

CALR; Ca^{+2} homestazı yanında moleküler şaperonlama ve oksidatif ve sıcaklık değişimlerine karşı yanıt üzerinde önemli rolü olan hücrel fonksiyonları etkileyen ER lümeninde yerleşik bir proteindir (137).

CALR'in, ER ilişkili standart fonksiyonlarına ek olarak immün yanıt, proliferasyon ve apoptozis, hücre fagositozu, yara iyileşmesi ve fibrozis gibi fizyolojik ve patolojik proseslerde kritik mediatör olarak birçok görevi gerçekleştirdiği raporlanmıştır (138).



Şekil 2.10. ER lümenindeki calretikülin ile ER bağımlı sinyalizasyon yolları arasındaki ilişki.

Michalak ve diğ.(133)'den alınmıştır

ER lümenindeki CALR, Ca²⁺ bağlayıcı/depolayıcı şaperon rolü görür. Protein ER depolarının Ca²⁺ kapasitesini etkiler. ER lümenindeki CALR diğer şaperonlar, spesifik substratlar ve SERCA2b ve InsP3 reseptörü içeren diğer

ER proteinleri ile etkileşimde olabilir. Protein birçok protein ve plazma membran kanalları, transporterları, ve reseptörlerini içeren glikoproteinlerin katlanmasında kritik rol oynar. İndirekt olarak calretikülin apoptoz, hücre adezyonu, Ca^{+2} bağımlı transkripsiyonel süreç ve depolamaya dayalı Ca^{2+} pompasını içeren ER-sensitif yolları etkiler.

Calretikülin ekspresyonu hipotermi, Ca^{+2} seviyeleri, viral enfeksiyonlar, açlık, oksidasyon ve ağır metal kontaminasyonu gibi çok çeşitli stress tiplerine cevap verir (135).

Mutasyonlu *CALR*'in yapı-fonksiyon ilişkisi incelendiğinde birçok hücresel fonksiyonu etkileyebilecek şekilde mutasyonlu proteinin Ca^{+2} bağlama kapasitesinin kaybıyla sonuçlandığı ortaya konmuştur. Calretikülin/calneksin defektleri megakaryositik hücre serilerinde tercihli genişlemeye yol açacak şekilde hematopoetik progenitörler için alternatif bir yolda görev alıyor olabilir (134).

ER dışında wild-tip *CALR*'in, sitozol, nükleus, hücre yüzeyi ve ekstraselüler sıvıda bulunduğu raporlanmıştır.

MDS'li hastaların lösemik blast ve displastik progenitörlerinin hücre yüzeyinde *CALR* upregülasyonu gösterilmiştir. Hücre membranında eksprese olan *calretikülin*, neoplastik hücrelerin fagositozunu etkileyen, CD47 tarafından dengelenen 'beni ye' sinyalini temsil ediyor olabilir (134). Ancak hücre yüzeyindeki *CALR* mutant granülositlerde belirgin bir *CALR* artışı bulunmamıştır (8).

İntraselüler *CALR* hücrelerden sekrete edilebilir ve ekstraselüler çevrede veya hücre yüzeyinde eksprese olabilir (135). Başlıca apoptotik hücrelerde ve insan kanser hücrelerinde ortaya çıkan hücre yüzeyinde bulunan *CALR*, fagositik uptake ve hücrelerin immunogenetisitesi ile alakalıdır (139). Ekstraselüler *CALR*, romatoid artrit ve sistemik lupus eritamatozus gibi otoimmün hastalığı olan hastaların vücut sıvılarında saptanmıştır (140).

2.5.1. Calretikülin/Calneksin Siklusu ve ER Kalite Kontrolü

CALR, calneksinle beraber Ca^{+2} bağlama, lektin benzeri aktivite ve yanlış katlanan proteinleri tanıma gibi çeşitli fonksiyonları paylaşan ER'un kalite kontrol ve salınım yolağındaki görevli en önemli şaperonlardır.

CALR, ER lümeninde serbestçe dolaşabilen lümen proteinidir ve lümenin serbest çevresinde protein katlama yardımcılarıyla ilişki kurar (133, 138).

Calneksinle beraber glikolize edilen, salınan veya ER'dan geçen integral membran proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonunu ve katlanmalarını direkt olarak etkilerler.

CALR ve calneksinin hareketleri hücre-hücre iletişimi ve tanıma; immün cevaplar ve tanıma; iyon, solüt ve metabolit pompaları ve metabolitlerin intraselüler üretimini içeren çeşitli hücresel fonksiyonlar için de yaşamsaldır (133).

Kısaca calretikülin/calneksin siklusu, glikoproteinlerin doğru katlanması ve degradasyonunu sağlayan ve protein agregasyonundan koruyan N-glikan bağımlı kalite kontrol sürecidir (134).

1.5.2. ER Lümeni, Calretikülin ve Ca^{+2} sinyalizasyonu

ER depolarından Ca^{+2} salınması ve ekstraselüler mesafeden Ca^{+2} girişi yoluyla kompleks Ca^{+2} sinyal oluşumu için hücreler ER'ye bağlıdır. Sonra Ca^{+2} sitoplazmadan Ca^{+2} pompası ve değiştiriciler vasıtasıyla sitoplazmadan atılır. Intraselüler Ca^{+2} 'un büyük çoğunluğu ER lümeninde calretikülin, B P ve grp94 gibi şaperonlara bağlı olarak depolanır (133).

Calretikülin defekti olan hücrelerde ER'nin Ca^{+2} depolama kapasitesi azalırken ,calretikülinin overekspresyonu intraselüler Ca^{+2} depolarında artışa neden olur (141).

Calretik linin asidik karboksi terminal, C-domaini proteinlerin in vivo Ca^{+2} depolanmasından sorumludur (142). Arkasındaki moleküler mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber Ca^{+2} bağlayan domain aynı zamanda glukokortikoid reseptörlerin nükleusa taşınmasında görev alır (133, 141).

Calretikülin aynı zamanda hücrenin farklı lokalizasyonlarında hücre adezyonunun etkileyebilir. Örneğin, ER'deki *calretikülinin* overekspresyonu hücre adezyonunu arttırırken, ekspresyondaki azalma hücre adezyonunu azaltır. Bu protein-tirozin fosforilasyon seviyelerindeki değişikliklerle olur (138).

Ca^{+2} 'un *calretiküline* bağlanması ve sonuç olarak ER- Ca^{+2} depolama kapasitesinde olan değişiklikler proteinin şaperon fonksiyonunu ve böylece sekresyon yolağının kalite kontrolünü etkiler. Calretikülin Ca^{+2} bağımlı olarak ER'nin diğer şaperonlarıyla ilişkiye girerek onların fonksiyonlarını modüle eder (143).

İn vitro çalışmalar calretikülindeki konformasyon değişikliklerinin fonksiyonunu etkileyebileceğini gösterir (133).

Hücre yüzey calretikülini kanser hücrelerinin ve ölmekte olan hücrelerin fagositik alımına katkıda bulunur (139). Preapoptotik calretikülin maruziyeti ölmekte olan tümör hücrelerinde gelişmiş immunitesiyle ilişkilidir. Hücre yüzey calretikülinin profagositik fonksiyonu ekstraselüler calretikülinin immunitesiyle ilgili olduğu belirtilmiştir (133).

Esansiyel trombositoz ve primer myelofibrozis dışında somatik *CALR*'in sadece myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazilerden belirgin trombositozla ilişkili ring sideroblastla giden refrakter anemide görülmesi ve bu vakaların *JAK2* ve *MPL* yönünden negatif olması gözlemi mutant *CALR* ile trombositoz fenotipi arasında güçlü bir ilişkiyi gösterebilir (144).

1.5.3. *CALR* Mutasyonları

BCR-ABL1-negatif MPN'leri başlatan olaylara ait kesin ayrıntılar hala anlaşılamaz olarak durmasına rağmen , *JAK2* ve *MPL* mutasyonları bununla ilişkilendirilmiş ve JAK-STAT yolunun esas önemi kabul edilmiştir (145).

JAK2 ve *MPL* mutasyonları PMF'li ve ET' lu hastaların %50-70'inde bulunur (8, 9). PMF ve ET tanısı alan olguların hatırı sayılır bir oranı ise *JAK2V617F* mutasyonu, *JAK2* ekzon 12 veya *MPL* mutasyonlarını içermez. Bu *JAK2* ve *MPL* wild tip hastalar Aralık 2013'te iki bağımsız ekzom sekanslama çalışmasının odak noktası olmuş ER'un Ca^{+2} bağlama şaperonunu olan calretikülini kodlayan gende *CALR* somatik mutasyonları keşfedilmiştir (8, 9).

Myeloproliferatif neoplazmlı 1107 hastaya ait örnekler arasında; *CALR* mutasyonu PV'da hiç görülmemişken ET'de (25%) ve PMF'de (35%) görülmüştür (9). ET'de *CALR* mutasyon frekanslarının %15-25 arasında olduğu tahmin ediliyor ki bu *CALR*'in myeloproliferatif neoplazilerdeki ikinci en yaygın mutant gen olduğunu gösterir (9, 144).

CALR mutasyonları *JAK-2* ve *MPL* mutasyonuna sahip olmayan ET hastalarının 25-49%'unda, PMF hastalarının 35-74%'ünde görülür (9, 136, 146). Böylece, bilinen moleküler markerlı ET ve PMF hastalarının oranı bugünlerde %80-85'lere kadar çıkmıştır.

Belirgin trombositoz ile ilişkili ring sideroblastlar olan refrakter anemi olan birkaç RARS-T hastanın haricinde (RARS-T), *CALR* mutasyonları PV ve diğer lösemiler veya solid tümörlü hastalarda nadiren bildirilmiştir (9). Dolayısıyla *CALR* mutasyonları, *JAK2* mutasyonlular PV için dışlama kriteri olarak değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (135).

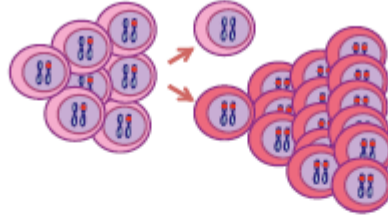
CALR'deki mutasyonlar, altta yatan mekanizma belli olmasa da , *JAK* *STAT* sinyalizasyonunu aktifler. *JAK2* aktivasyonu ile tutarlı olarak, *JAK2* inhibitörü mutant *CALR* eksprese eden BA/F3 hücrelerinin proliferasyonu bozulur. Bu üç major MPN ilişkili mutasyonun damgası *JAK-STAT* yolağının aktiflenmesidir (9).

Cazzola and Kralovics her MPN'nin genotipik özelliğinin başlangıç ET fenotipinden oluştuğunu ortaya koymuştur (144). Bu modelde , *JAK2V617F* mutant MPN'lerin klonal evriminde ET'den PV'ya ve sonrasında PV'den PMF'e fenotipik anahtar içerebilir. Ek olarak, *MPL* ve *CALR* mutant MPN'ler işbirliği olan bazı diğer mutasyonlarla beraber ET'den MF'ye fenotipik anahtardan sorumlu olabilir. Bu model , MPN'lerin fizyopatolojisinde megakaryositlerin rolü üzerine kurulmuştur ki bu ilk ET fenotip kavramını destekleyecek, sonradan MF'le geç dönem gelişim ile sonlanan bir subtipten diğerine geçebilecektir.

JAK2V617F-mutant MPN'ler kromozom 9p'nin heterozigositesinde doğal kazanılmış kopya kaybıyla ilişkili olup, *JAK2V617F*'nin heterozigositeden homozigositeye dönüşümüne sebep olur. Bu öncelikle ET'den PV'ya ve daha uzun dönemde de myelofibroze dönüşüm için

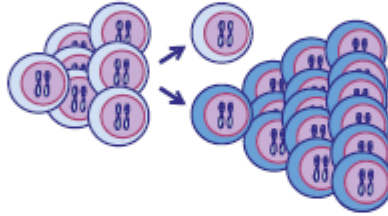
fenotipik anahtarda görev alır. ET'de ortadaki PV basamağı olmadan myelofibroze progresyon gösterebilir.

JAK2 V617F- mutant myeloproliferatif neoplazi



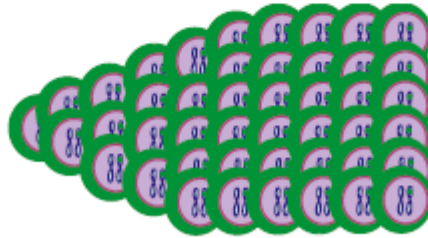
Esansiyel trombositoz Polistemia vera Myelofibrozis

MPL ekzon 10 mutant myeloproliferatif neoplazi



Esansiyel trombositoz Myelofibrozis

CALR ekzon-9 mutant myeloproliferatif neoplazi



Esansiyel trombositoz Myelofibrozis

Şekil 2.11. Farklı genotipik durumlarda klonal evrim ve fenotipik dönüşüm.

Kralovics ve diğ.(144)'den alınmıştır.

MPL-mutant MPN'lerin klonal evolüsyonu 1p kromozomunun heterozigositesinin kazanılmış doğal kopya kaybıyla ilişkili olup, *MPL* mutasyonunun homozigositeye dönüşümünü içerir. Bu moleküler mekanizma

ve/veya destekleyen diğer mutasyonlar ET'den PMF'e dönüşüme neden olan fenotipik anahtarlardır.

CALR-mutant MPN'ler mutant heterozigot klonun progresif büyüyerek kemik iliğinde tamamen dominant hale gelemesiyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Megakaryositlerin mutant *CALR* ve/veya destekleyici mutasyonlarla tarafından aktivasyonu ET'den myelofibroze fenotipik dönüşümünden sorumludur.

Tüm genotipik durumlarda trombositemi başlangıç fenotipinde yer alır.

Bir fenotipten diğerine geçiş çeşitli faktörlere bağlı oluşabilir veya oluşmayabilir ve dönüşüm oranı çeşitlilik gösterir. Şematize edilen bu patofizyolojik modele göre myelofibrozis farklı MPN'lerin evriminde son evredir (144).

ET ve PMF ile olan seçilmiş ilişki ve yüksek frekans nedeniyle *CALR* mutasyonlarının trombositoz ve veya myelofibrozin klonal olmayan, reaktif formlarının ayrımını kolaylaştırabilecek olması nedeniyle DSÖ komitesi tarafından *JAK2* ve *MPL* mutasyonlarıyla beraber ET ve PMF'nin major kriterleri arasına eklenmesinin onaylanması beklenmektedir (147).

Ekzon 9 mutasyonları ET ve PMF'in familial olgularında somatik olarak kazanılmış olaylardır (148).

CALR somatik mutasyonlarının ET ve PMF dışında sadece RARS-T olan hastalarda gözlenmesi *CALR*-mutant olanlarla trombositoz fenotipi arasında güçlü bir ilişki olduğunu ortaya koyar ve *CALR* mutasyonlarının öncelikle megakaryosit biyolojisini etkilediği fikrini pekiştirir (149).

JAK2, *CALR* ve *MPL* mutasyonları mutasyonel olarak özeldir ve patojenik katkılarının *JAK2* sinyalizasyonunda upregülasyonu içerdiğine inanılır (150).

JAK2 ve *MPL* mutasyonu olmayan ET ve PMF ile *CALR* mutasyonları arası seçilmiş ortaklık, MPN şüphesi olan *JAK2V617F* mutasyonu bulunmayan hastalarda *CALR* mutasyonu ilk basamak laboratuvar testi olarak nitelendirir. Günümüze kadar *JAK2* ve *CALR* mutasyonu beraberliği çok az sayıda vakada raporlanmıştır (80, 136).

Şimdiye kadar raporlanan çalışmalarda PCR'ı takip eden Sanger sekans veya fragment boyut analizi kullanmış olup % 5-10 sensitiviteye sahip bir yöntemdir (151).

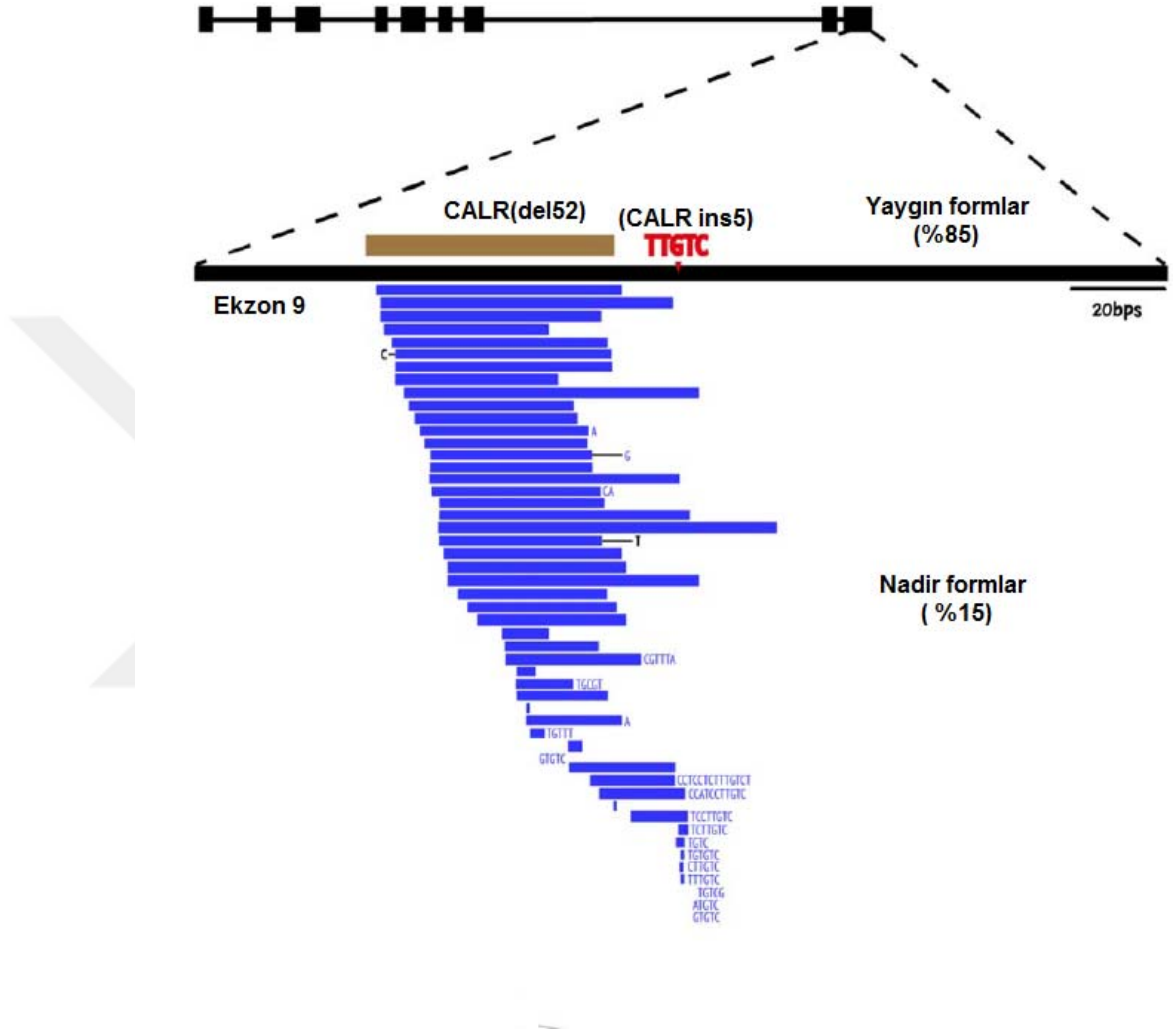
CALR mutasyonları oldukça heterojen olup, günümüze kadar hepsi ekzon 9' da lokalize değişik büyüklükte insersiyon, delesyon veya kompleks insersiyon/delesyonlar olarak görülen en az 55 farklı tip olarak raporlanmıştır (144). Mutasyon olan olguların %80-90 'ında gözlenen en sık iki mutasyon: olguların %45-53'ünde görülen 52-bp'lik delesyon (*CALR*del52/Tip I; c.1092_1143del; L367fs*46) ve olguların %32-41'inde görülen 5-bp'lik insersiyon (*CALR*ins5/Tip II; c.1154_1155ins TTGTC; K385fs*47) dur (8, 9, 134).

CALR geni ekzon 9'daki mutasyonlar spesifik alternatif reading frame'inde (open reading frame) +1 bp'lik frameshift'e neden olur. Bu da minimum 36 aminoasitten oluşan C terminalinde yeni bir C-terminal aminoasit sekansı ile sonuçlanır (152). ER- sinyal peptidinin görevini aksatan bu yeni sekans, *CALR*'nin subselüler lokalizasyonunu, stabilitesini ve /veya fonksiyonunu etkileyen geniş negatif yüklü wild-tip proteinle birlikte birçok pozitif yüklü aminoasit içerir ki bu ki bu net yükü negatiften pozitif'e çevirir ve *calretikülünin* kalsiyum bağlama aktivitesine zarar verir (9). Ek olarak mutant *CALR*'in düşük oranda da olsa ER'den dislokasyonu ile sonuçlanan ER retansiyon sinyaliindeki son dört C-terminalini kilitler ve proteinin endoplazmik retikulum retansiyon motifini (terminal KDEL aminoasit sekansını) de siler (9).

Mevcut bilgiler ışığında somatik *CALR* mutasyonu taşıyan hastalara karakterize şekilde bozuk kalsiyum bağlama kapasitesi ve mutant megakaryositlerdeki hücresel dislokasyon anormal platelet üretimi üzerinde rol oynuyor olabilir (144).

Bu mutasyonlar tipik olarak %50 allel yüklü olarak bulunur ancak tip 2 mutasyonları mitotik rekombinasyonla homozigot hale gelebilir. MPN hastalarından olan bireysel hematopoetik kolonilerin klonal analizi *CALR* mutasyonlarının hastalığın gelişiminin erken evrelerinde oluşma eğiliminde olduğunu düşündürmüştür (9).

En yaygın *CALR* mutasyonlarının (tip 1, c.1092_1143del) fonksiyonel analizleri , hem sitokin bağımlı hem de sitokin bağımsız hücre büyümesini artırdığını ortaya koymuştur (9).



Şekil 2.12. *Calretikülin* geninin intron-ekzon yapısının şematik gösterimi.

Guglielmelli ve diğ.(135)'den alınmıştır.

Kinazlar ve sinyalleme aktiviteleri elimine edildikten sonra *CALR* mutasyonlarının patolojik etkisi JAK/STAT sinyalizasyonu yoluyla sitokin bağımsız STAT5 fosforilasyonunda artışla sonuçlanır. Önemli olarak, *CALR*

mutasyonları MPN'li hastaların pürifiye kök ve progenitör hücrelerinde gözlemlenmiştir ve hastalık seyri boyunca stabil olarak kalmıştır (8, 9).

Beraber düşünüldüğünde bu bilgi *CALR* mutasyonlarının hastalık başlatıcı olayı temsil ettiğini ve MPN'lerin oluşum ve evolüasyonu sırasında *JAK2* ve *MPL* mutasyonlarının benzer önemli bir rol oynadığını akla getirir.

Tedavide interferon alfanın, *CALR* mutant ET hastalarında etkili olduğu gösterilmiştir ve bu hastalarda *CALR* mutant allel yükü %43'ten %19'a düşmüştür (153).

CALR mutant MF hastalarının *JAK* inhibisyonuna cevabının nedeni STAT aktivasyonu ile açıklanabilir (154).

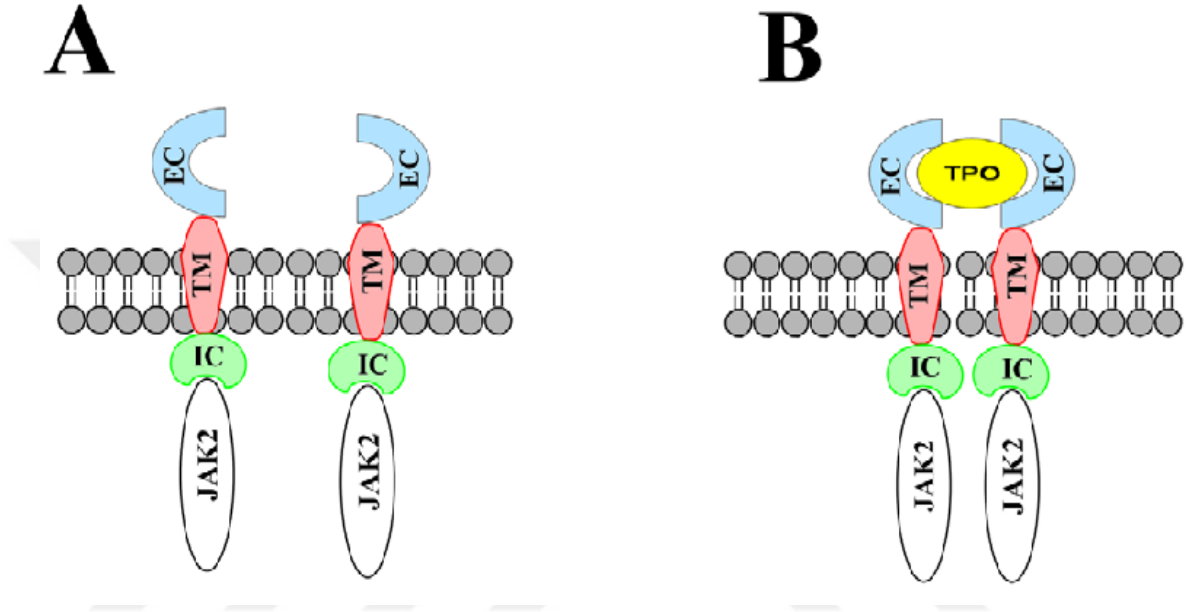
1.6. *MPL* (Myeloproliferatif lösemi virüs onkogen)

MPL hematopoetik reseptör süper ailesine dahildir ve hematopoetik büyüme faktörü trombopoetinin (TPO) bir reseptörüdür. Trombopoetin megakaryopoezin primer regülatörüdür ve hematopoetik kök hücre devamı için kritik öneme sahiptir.

MPL geni kromozom 1p34 bandında konumludur ve 12 ekzon içerir (155). Hematopoetik kök hücre homeostazında olduğu kadar megakaryosit büyüme ve differansiasyonunun kolaylaştıran ve trombosit üretimini regüle eden primer sitokin trombopoetini bağlayan trombopoetin reseptörünü kodlar (*c-MPL*)(156).

c-MPL, kinaz aktivitesi ve hücre yüzey lokalizasyonu için bağlı *JAK-2* 'ye ihtiyaç duyan tip-1 sitokin reseptörüdür. Trombopoetinin *MPL*'ye bağlanması *MPL*'yi fosforilize eden ve hücre yaşamını, proliferasyonunu ve differansiasyonunu regüle eden downstream sinyal kaskadını başlatan *JAK2* aktivasyonuna yol açar (157). Bu aşamada *c-mpl* monomerleri homodimerleşir ve *JAK-2* proteinlerinin diziliminin *JAK-2*'de trans-otofosforilasyonuyla sonuçlanacak şekilde reseptörün korunmuş box 1 ve 2 motiflerine bağlanmasına izin vererek konformasyonel değişim gösterirler. Fosforile *JAK-2* sırasıyla, *c-mpl* nin sitoplazmik domaini içinde ve ek olarak *JAK-STAT*, mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) yolağı, fosfotidil-3 kinaz (PI3K), ve protein kinaz C (PKC) 'yi içeren sinyal iletim proteinlerinde hücre yaşamını ve proliferasyonunu desteklemek için tirozin rezidülerini fosforiller.

MPL/JAK2 sinyal yolağının aktivasyonu temsili olarak Şekil 2.14'te gösterilmiştir. A'dan B'ye giden yolda ligand TPO, *MPL* molekülünün ekstraselüler (EC) domainine bağlanır, *MPL* dimerlerini oluşturur ve transmembran (TM) ve intraselüler (IC) domainleri biraraya getirir.



Şekil 2.13. MPL/JAK2 sinyal yolağının geleneksel aktivasyon görünümünün şematik temsili (A dan B'ye).

Lee ve diğerlerinden (158) ve diğerlerinden alınmıştır.

1.6.1. *MPL* Mutasyonları

JAK2V617F'nin keşfi PV, ET ve PMF'nin patogenezinde önemli bir açıklama oluşturmasına rağmen *JAK2V617F* ve Ph negatif MPN'lerin etyolojisi bilinmez kalmıştır. Bu grupta eritropoetin reseptörü, trombopoetin reseptörü ve granülosit- koloni uyarıcı faktör reseptörü için yapılan sekans analizi sonrasında *MPL*'nin transmembran-jukstamembran bağlantısında somatik triptofan lösin değişim mutasyonu (*MPLW515L*) keşfedilmiştir (5). Buna ek olarak az sayıda hastada kodon 515'de triptofan-lösin dönüşümü ile sonuçlanan alternatif mutasyon bulunmuştur. (*MPLW515K*) (80).

*JAK2V617F*li olgularda olduğu gibi *MPLW515* mutasyonları da myeloid ve lenfoid progenitörlerin ikisini de içeren erken kök hücre kaynaklı olaylardır (159). Bunlar granüositlerde bulunurken, hematopoetik olmayan germline DNAda bulunmadığı için hematopoetik hücrelerde klonal olarak bulunan somatik mutasyonlardır.(5)

Fareye *MPLW515L* allel eksprese eden kemik iliğı transplantasyonu belirgin trombositoz, retikülin fibrozisi, megakaryositik hiperplazi, splenomegali, ekstramedüller hematopoezi içeren, splenik infarktüs ve azalmış yaşam beklentisiyle karakterize myeloproliferatif bozukluk benzeri hastalık ile sonuçlanmıştır (5).

MPL geni hematopoetik kök hücre ve megakaryosit proliferasyonunu JAK/STAT, ERK/MEK, ve PI3K/ AKT yolaklarını aktifleyerek regüle eder, aynı zamanda da MPN için alternatif bir mekanizma gösterir (160). *MPLW515L*, *JAK2V617F*'ye benzer şekilde sitokin bağımsız büyümeyi ve trombopoetin hipersensitivitesini uyaran ve *JAK2*, *STAT3*, *STAT5*, *AKT* ve *ERK* fosforilasyonu ile sonuçlanan kazanılmış bir mutasyondur (80).

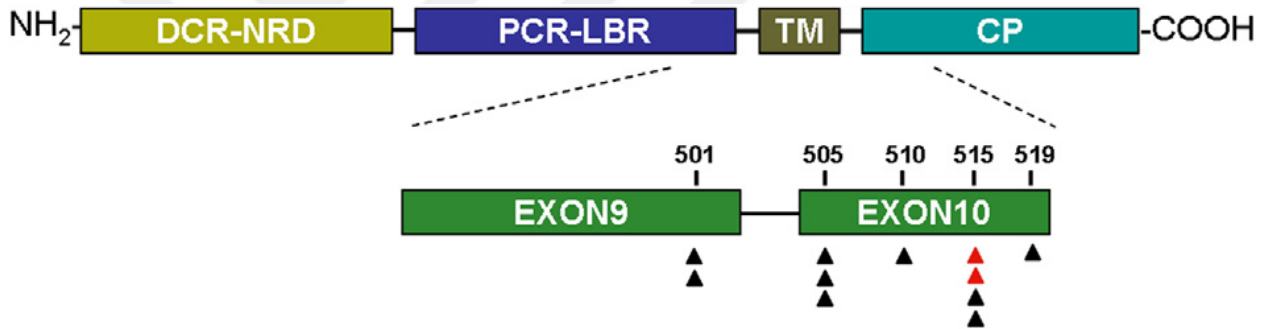
515. Aminoasit transmembran domaininden sonra sitoplazma içinde (K/RWQFP) 5 aminosit paketi olarak bulunur. Bu 5 aminoasit *MPL*'nin sitozolik konformasyonunda ve reseptörün spontan aktivasyonunda önemli bir rol alır (18). *W515L* mutasyonu, *MPL*'nin 1544. nükleotid bölgesinde lösinin triptofana dönüşümüne neden olan guanozinin timidine dönüşümünü temsil eder. *MPLW515K/L* ve *S505N* mutasyonları transmembran jukstamembran domaininde (*MPL* ekzon 10) lokalizedir ve reseptör dimerizasyonu için kritik olabilir. Tek amino asit değişimine neden olurlar ve *JAK2V617F* benzer şekilde fonksiyon kazanma mutasyonu olarak JAK STAT yolağının sitokin bağımsız aktivasyonunu gerçekleştirir (144, 161). Buradaki mutasyon otoinhibitör bölge fonksiyon ve sonraki ligand bağımsız trombopoetin reseptör aktivasyon bozukluğu ile sonuçlanır (162). Downstream tirozin kinazların aktivasyonu, megakaryositik hiperplazi ve kemik iliğı fibrozisi sonuçta sitokin bağımsız klonlardaki hematopoetik hücre transformasyonuna neden olan *STAT3* ve *STAT5* transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar. *MPL W515* mutasyonun G1/S dönüşüm

aktivasyonuna yola açan spontan MPL aktivasyonuna yol açtığını göstermiştir (163).

MPL W515L veya *W515K* mutasyonları PMF'li ve ET'li hastalarda sırasıyla yaklaşık %5 ve %3 frekansla bulunurlar (5, 80, 81). *JAK2 V617F* negatif ET'de %9 ve PMF'de %15 frekansına ulaşır (18, 164).

MPL'de Afriko-Amerikalıların yaklaşık %7 sinde K39N değişimini ile sonuçlanan yüksek platelet sayısı ve düşük *MPL* ekspresyonu gösteren tek nükleotid polimorfizmi (*G1238T*) tanımlanmıştır (165).

Germline *MPL* mutasyonları ailesel trombositoz, (GOF transmembran domain mutasyonu; *S505N*) splenomegali, yüksek trombotik risk ve myelofibrozis progresyonu ile ilişkilidir (166) *MPL* mutasyonları Şekil 2.27.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. *MPL* geni ve mutasyonlarının hot spot şematik gösterimi. Jerald ve diğ.(161)'den alınmıştır.

W515 mutasyonları PV, KML, MDS'nin yaygın formları ve sağlıklı hastalardan alınan hematopoetik dokularda tespit edilememiş olmasına rağmen ET ve PMF'de görülür (167). Nadir olgularda *MPL* ve *JAK2* mutasyon beraberliği raporlanmıştır. Bu beraberlikte mutasyon hücreleri pür eritropoetik, polisitemik fenotipten ziyade trombopoetik fenotipe transforme eder (80).

GEREÇ VE YÖNTEM

“Myeloproliferatif neoplazilerde *CALR*, *MPL* mutasyonlarının tanıya, klasifikasyona, laboratuvar sonuçlarına, frekansa ve klinik durum üzerine olan etkileri” konulu tez çalışması GATA Askeri Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD’dan Prof. Dr. Yusuf TUNCA’nın yöneticiliğinde, Tıbbi Genetik AD’dan Prof. Dr. Yusuf TUNCA, Dr.Hatice AKAR, Hematoloji BD’dan Prof. Dr. Türker ÇETİN ve Prof.Dr. Cengiz Beyhan’ın katılımı ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Araştırma Bilimsel Kurulu (AR–2009/62 numaralı ve 15 Aralık 2014 tarihli proje) desteği ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma Gülhane Askeri Tıp Akademisi Klinik Etik Kurulu tarafından 30 Ekim 2014 tarihinde [2014/06 (KA EK-14018 kayıt numaralı)] onaylanmıştır. Çalışma Mart 2015-Ağustos 2015 tarihleri arasında Araştırma Bilimsel Kurulu’nun 20.600 TL’lik bütçe desteği ile sarf malzemeleri alınarak yapılmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta Grubu

Çalışmamız bcr-abl negatif klasik myeloproliferatif neoplazili hasta örnekleri ile yapılmıştır. Olgular; Ocak 2011- Mayıs 2015 tarihleri arasında GATA Hematoloji BD’nda bcr-abl negatif myeloproliferatif neoplazi tanısıyla takip edilen, verileri ASOS sisteminde bulunan veya daha önceki yıllarda laboratuvar veya klinik verilerine dosyalarından ve kayıtlardan ulaşılabilen hastalarından seçilmiştir. Takipte olup 2008 DSÖ kriterlerini karşılayan, aydınlatılmış gönüllü onam formunu dolduran hastalar çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşları, cinsiyetleri, USG’de organomegali bulguları, rutin tetkiklerinde değerlendirilmiş olan hemogram, rutin biyokimya değerleri gibi verileri dosyalarından ve ASOS bilgi sistemi üzerinden retrospektif olarak alınmıştır. 18 yaş üstü belirlenen kriterleri sağlayan ve takipleri devam eden, bcr-abl negatif myeloproliferatif neoplazi tanısı konulan 78 PV’lı, 79 ET’li, 11 PMF’li hasta örneği kullanılmıştır. Çalışma grubundan aydınlatılmış onam formu ile birlikte EDTA’lı periferik kan örneği alınmış, örnekler +4 °C de saklanmıştır.

Uygun hastalarda bakılması planlanan *CALR* ve *MPL* gen mutasyonları; DNA dizileme (sekans) cihazında, *MPL*'de ekzon 10 ve *CALR*'de ekzon 9 bölgelerine spesifik primerler kullanılarak DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

3.1.2. Cihazlar

<u>Cihazlar</u>	<u>Marka</u>
1)Buzdolabı	Rega
2)Derin dondurucu (-20 °C)	Electrolux
3)Otomatik DNA Dizileme Cihazı (ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems
4)Otomatik mikropipet seti	Discovery comfort
5)Mikrosantrifüj	Sigma-Aldrich
6)Termomikser	Eppendorf
7)Jel görüntüleme sistemi	Cleaver
8)Mikrodalga fırın	Bosch
9)Thermal cycler	Applied Biosystems Veriti
10)Laminar-Flow Kabini	Sistem Teknik
11)Vorteks	Nüve

3.1.3. Ticari Kit, Kimyasallar Ve Laboratuvar Malzemeleri

- DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel-Almanya)
- Primer sentezleri (Biomatik,USA)
- Taq DNA polimeraz (Biomatik,USA)
- dNTP (deoksiribonükleotid) miks (Biomatik,USA)
- PZR tamponu (Biomatik,USA)
- MgCl₂ (Biomatik,USA)
- Agaroz (Serva-Almanya)
- Etidyum bromür
- Etanol (Merck- Almanya)
- Mikro tüp 1,5 ml (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (Axygen, USA)
- Filtreli steril pipet ucu 0,1-10 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (Axygen, USA)

- Filtreli steril pipet ucu 1-200 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (Axygen, USA)
- Filtreli steril pipet ucu 100-1000 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (Axygen, USA)
- PZR tüpü 0,2 ml (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (Axygen, USA)
- DNA Ladder 100 bp (GeneON, Almanya)
- Jel yükleme tamponu 6X (SNP, Türkiye)
- Bigdye terminator v3.1 cycle sequencing RR-100(A&B, USA)
- Bigdye terminator v3.1 5X sequencing buffer (A&B, USA)
- Sekans Temizleme kiti (Zymo Research, USA)

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA İzolasyonu

DNAlar, GATA Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, hastalardan 4 ml.'lik etilen diamin tetra asetikasitli (EDTA) tüplere alınan 2 ml periferik venöz kan lökositlerinden spin kolon yöntemiyle "Nucleospin® Blood Kit"(Macherey-Nagel, Almanya) DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyon protokolü aşağıdaki gibidir:

- Örnekler oda sıcaklığına (15-25°C) getirilir.
- Su banyosu 70°C dereceye ayarlanır.
- Bütün santrifüj basamakları oda sıcaklığında yapılır.
- 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içine 25 µl proteinaz K ve 200 µl'ye kadar kan konulur.
- Örnekler 200 µl Buffer B3 (guanidin hidroklorid %36-50) eklenerek kuvvetlice 10-20 saniye vortekslenir.
- Örnekler, 70°C'de 10-15 dakika inkübe edildikten sonra her bir örneğe yaklaşık 210 µl etanol (%96-100) eklenir.
- Her bir örnek için toplama tübü içine yerleştirilmiş spin kolonlara alınır.
- Tüpler kapağı kapatıldıktan sonra 11000xg hızda 1 dakika santrifüj edilir. Spin kolon tüplerinin üstündeki filtreli kısım temiz 2 ml'lik collection (toplama) tüplerine yerleştirilir ve santrifüj sonrasında

içerisinde solusyon biriken eski collection tüpler atılır. Spin kolon tüplerinin filtreli kısmı yeni collection tüpü içerisine yerleştirilmiş olur.

- Spin kolon tüplerinin kapakları dikkatlice açılır ve tüplerin içerisine 500 µl Buffer BW(guanidin hidroklorid %36-50+ izopropanol%20-50) eklenir. Tüplerin kapağı kapatıldıktan sonra 11000xg hızda 1 dakika santrifüj edilir, spin kolon tüplerinin filtreli kısmı yeni collection tüpü içerisine yerleştirilir. Santrifüj sonrasında içerisinde solüsyon biriken eski tüpler atılır.
- Aynı işlem 600 µl Buffer B5 ile yıkama işlemi için yapılır.
- Spin kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içine yerleştirilir ve 100 µl önceden ısıtılmış Buffer BE (70°C) eklenir. Oda ısısında 1 dakika inkübe edilir.
- 11000xg hızda 1 dakika santrifüj edilir ve tüp içerisinde biriken DNA çalışılma zamanına kadar –20°C'de saklanır.

3.2.2. JAK2 V617F Mutasyon Analizi

Hasta örneklerinde JAK2 V617F mutasyon analizi Real Time ARMS – TaqMan yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Dr. Zeydanli JAK2 Tip I Mutasyon Analiz Kiti, Ankara, Türkiye). Çalışma grubuna ait DNA örnekleri, “Real time” PZR (Bio-Rad, iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System, ABD) ile değerlendirilmiştir. PZR reaksiyonu örnek başına 4,5 µl DNA örneği, 20,5 µl “master miks” ve 0,3 µl “Superhot Taq” DNA polimeraz (Biomatik, USA) ile gerçekleştirilmiştir. PZR koşulları 95 °C'de 5 dakika (1 döngü), 95 °C'de 15 saniye ve 60 °C'de 1 dakikadır (32 döngü).

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzole edilen genomik DNA örnekleri Tablo 3.1'de gösterilen CALR geni 9. Ekzon ve MPL geni 10. Ekzon için tasarlanmış primerler ile Tablo 3.2'de ve Şekil 3.1'de belirtilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) protokol ve programı ile çoğaltıldı.

Tablo 3.1. *CALR* geni ekzon 9 ve *MPL* geni ekzon 10 bölgesi için tasarladığımız primerler.

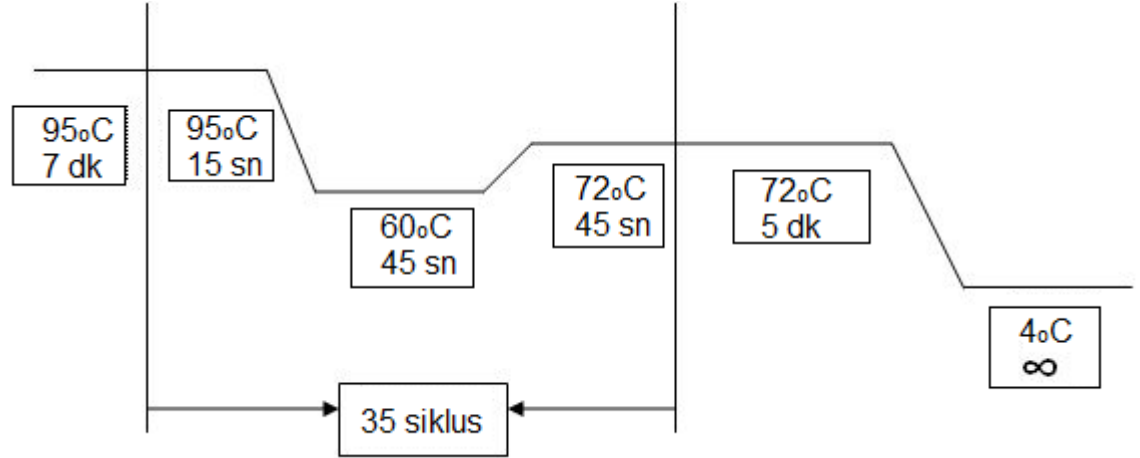
Gen	Primer Dizileri	Lokalizasyonu
CALR	CALR (Forward Primer):	Ekzon 9
	5' CAC CAA CGA TGA GGC ATA CG 3'	
	CALR (Reverse Primer):	Ekzon 9
	5' TCT CTA CAG CTC GTC CTT GG 3'	
MPL	MPL (Forward Primer):	Ekzon 10
	5' TGA CCT TGC GGG CCG AC 3'	
	MPL (Reverse Primer):	Ekzon 10
	5' GAT CTG GGG TCA CAG ACC GA 3'	

Tablo 3.2. Çalışılan genlere ait beklenen PZR ürünlerinin uzunlukları

	Elde Edilen Ürün Uzunluğu
CALR	345 bp
MPL	170 bp

Tablo 3.3. *CALR* ekzon 9 ve *MPL* ekzon 10 için PZR'u bileşenleri

Bileşenler	GEN BÖLGESİ	
	CALR	MPL
dH ₂ O	14,1 µl	13,6 µl
Buffer(10X)	2,5 µl	2,5 µl
MgCl(25Mm)	3 µl	3 µl
Primer F(10pmol)	0,75 µl	1 µl
Primer R(10pmol)	0,75 µl	1 µl
dNTP (8Mm)	0,5 µl	0,5 µl
Taq DNA Pol.(5ü/ml)	0,4 µl	0,4 µl
DNA(10-100ng)	3 µl	3 µl



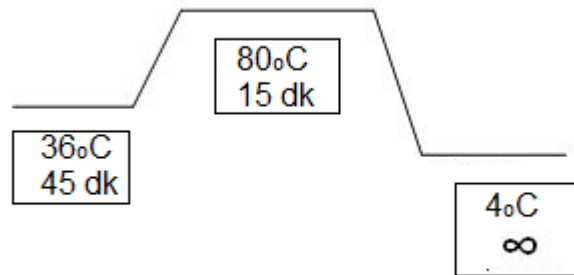
Şekil 3.1. CALR ekzon 9 ve MPL ekzon 10 için PZR Programı.

3.2.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Elde edilen PZR ürünleri ortamdaki artıkların uzaklaştırılması için Tablo 3.4’de belirtilen EXO-SAP (Ekzonükleaz I + Shrimp alkalen fosfataz) protokolü ve Şekil 3.2’de gösterilen PZR programı kullanılarak saflaştırıldı.

Tablo 3.4. EXO-SAP-IT Protokolü.

Bileşen	Miktar(µl)
EXO-	5 µl
PCR	2 µl



Şekil 3.2. EXO-SAP için PZR Programı.

3.3. Saflaştırılmış PZR Ürünlerine DNA Dizi Analizi (sekans) PZR Uygulanması

DNA Dizi Analizi PZR’de Tablo 3.5’de belirtilen sekans protokolü ve Şekil 3.3’deki PZR programı ile Forward veya Reverse primerler kullanılarak gerekli bölgeler çoğaltıldı.

Tablo 3.5. Bigdye Sekans Reaksiyonu İçin Gerekli Bileşenler

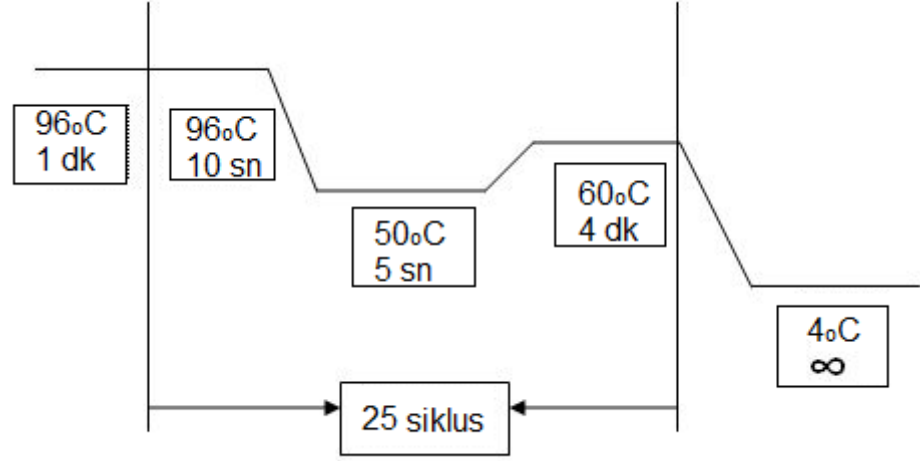
Bileşen	CALR için Miktar(µl)	MPL için Miktar(µl)
Big dye terminator V3.1	4 µl	2 µl
X5 sekans buffer	2 µl	2 µl
dH2O	2 µl	2 µl
PCR Ürünü	2 µl	2 µl
Primer Forward veya Reverse (3,3 pmol)	2 µl	2 µl

3.3.1. DNA Dizi Analizi (sekans) PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

DNA dizi analizi PZR ürünlerinin saflaştırılması spin kolon yöntemiyle ZR DNA Sequencing Clean-up Kiti (Zymo Research, USA) kullanılarak yapıldı. Yöntemin aşamaları aşağıda belirtilmiştir:

- 5-20ul’lik sekans reaksiyona 240ul sekans bağlayıcı bufferdan 240ul eklenir.
- Elde edilen karışım toplama tüpleri içine yerleştirilen Zymo-Spin™ IB kolonlarına transfer edilir.
- 13,000 rpm’de (15,000-16,000 x g) 30 sn. süreli santrifüj edilir.
- Kolona 300ul. sekans yıkama buffer’ı konur. 13,000 rpm’de (15,000-16,000 x g) 30 sn süreli santrifüj edilir.

Kolon matriksine 6-20ul. su direkt eklenir. Kolon 1,5ml.’lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edilir ve 13,000 rpm’de (15,000-16,000 x g) 15 sn süreli santrifüj edilerek DNA elüsyonu sağlanır.



Şekil 3.3. Bigdye sekans reaksiyonu için PZR Programı.

3.3.2. PZR Ürünlerinin Otomatize DNA Dizi (Sekans) Analizi

Cihazına Yüklenmesi

- Elde edilen ürünler; 96'lık well platete ilk çalışma grubu için tekli bloğa, ikinci çalışma grubu için çiftli bloğa yerleştirilir.
- Cihazın bilgisayar programına örneklerin listesi girilir.
- Uygun sekans programı seçilerek başlatılır.

3.3.3. DNA Dizi (sekans) Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

DNA dizi (sekans) analizi cihazından alınan hastaların forward veya reverse dizileri wild tip (yabanıl tip) nükleotid dizisi ile bilgisayar yazılım programı yardımıyla karşılaştırılarak mutasyonlu bölgeler tespit edilmiştir.

CALR Geni Ekzon 9 Wild Tip Dizisi (345 Bp)

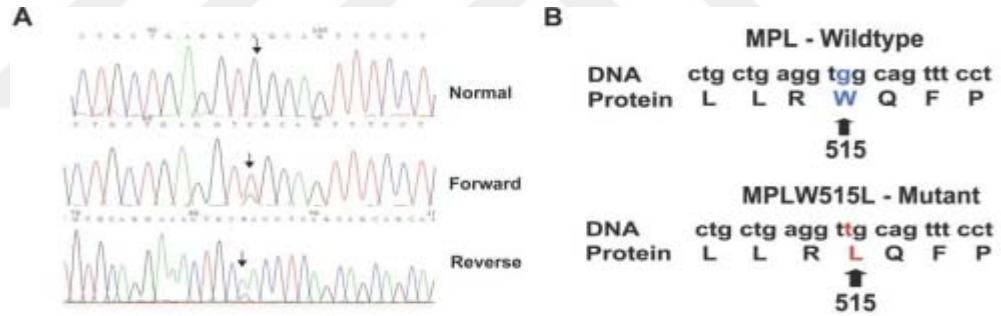
catccttcccattcatcctccaggtaagctctggcaccatctttgacaacttcctcatcaccaacgat
gaggcatacgctgaggagtttgcaacgagacgtggggcgtaacaaaggtgaggcctggctctggtcct
gatgtcggggcgggcagggctggcagggggcaaggccctgaggtgtgtgctctgcctgcag**GCAG**
CAGAGAAACAAATGAAGGACAAACAGGACGAGGAGCAGAGGCTTAA
GGAGGAGGAAGAAGACAAGAAACGCAAAGAGGAGGAGGAGGCAGA
GGACAAGGAGGATGATGAGGACAAAGATGAGGATGAGGAGGATGAG
GAGGACAAGGAGGAAGATGAGGAGGAAGATGTCCCCGGCCAGGCCA
AGGACGAGCTGTagagaggcctgcctccagggtggactgaggcctgagcgctcctgccgcag
agctggccgcgccaataatgtctctgtgagactcgagaactttcattttttccaggctggttcggatttgggg

tggaatttggtttgggtccctcctccactctccccacccccctccccgcccttttttttttttaaaactggatattta
tctttgattctccttcagccctcacccttggttctcatcttcttgatcaacatctttcttgccctgtccccttctctca

MPL Geni Ekzon 10 Wild Tip Dizisi (170Bp)

ggggcgcgagagagggcggggcccctgacctgcgggcccgcagggctgcgcaggtgcccgca
gtgccagggggcgggcgagggcggggcccagagtaggggctggctggatgagggcggggctccggcc
cggtggggccgaagtctgaccctttgtctcctag**CCTGGATCTCCTTGGTGACCGCTCT**
GCATCTAGTGCTGGGCCTCAGCGCCGTCCTGGGCCTGCTGCTGCTGA
GGTGGCAGTTTCCT[G]CACACTACAGGTACCGCCCCCGCCAGGCAGG
AGACTGGCGGTGGACCAGGTGGAGCCGAAGGCCTGTAAACAGGCATT
CTTGGTTCGCTCTGTGACCCAGATCTCCGTCCACCGCCCGTGCGCACC
TACGGCTTCGCCACTTCCTGCACGTCACCTCTGGGACTCGCCGCGGCT
CCTTACACTCTAAcacgcccactataccgcccacctcgaacagccccgcctcctgctgtcacct
cggcgactagggccaccgtccacccttcagccaaactgccactccaccccatccaatctgccgtcaggt

Şekil 3.4'te *MPLW515K/L* mutasyonunun beklenen sekans görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.4. *MPLW515K/L* Mutasyonu. Pikman ve diğ.(5)'den alınmıştır.

3.3.4. İstatiksel Analizler

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar MS-Excel 2013 ve SPSS for Windows V. 15.0 ile yapıldı. Kesikli değişkenler sayı (%), sürekli değişkenler ortalama, standart sapma olarak gösterildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda kesikli değişkenler için ki-kare, sürekli değişkenler için normal dağılıma uyum durumlarına göre varyans analizi veya Kruskal Wallis testi kullanıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Biyokimyasal ölçüm değerlerinin hastalık gruplarına göre karşılaştırılması için Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi uygulandı. Farklılık bulunması durumunda farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirleyebilmek amacı ile Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testine post-hoc ikili karşılaştırmalar için başvuruldu. Nitel verilerin analizinde ki-kare testi kullanıldı.

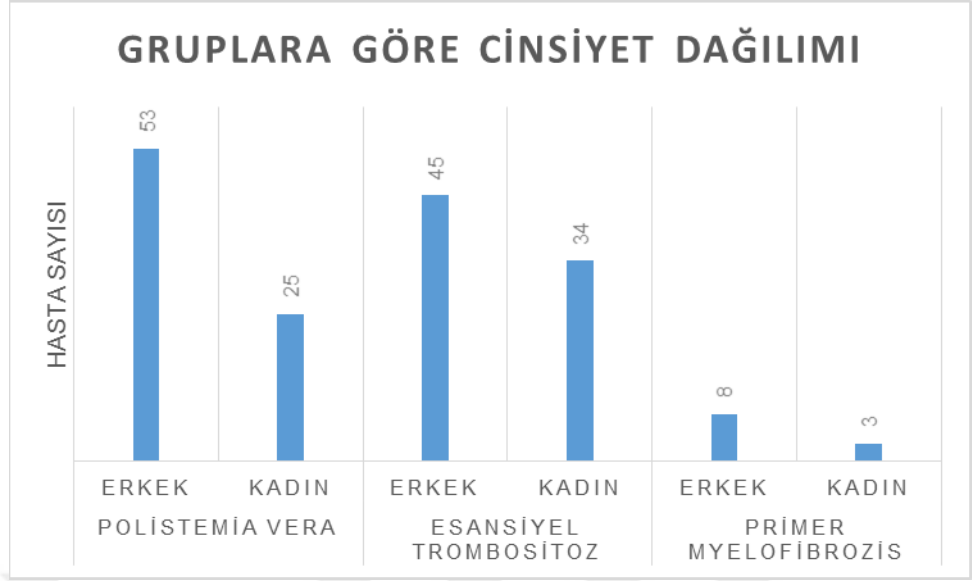
3.4. Bulgular

Çalışmaya Ph kromozomu (-) kronik myeloproliferatif hastalığı olan, *JAK2* geni ekzon 14'de V617F mutasyonu real-time PCR ile analiz edilmiş ve *CALR* geni ekzon 9 ve *MPL* geni ekzon 10'u iki yönlü sekanslanmış 168 hasta alındı. Hastaların 78'u (%46,4) PV, 79'sı (%47) ET ve 11'i (%6,5) PMF'di. Toplam hasta grubunun 106'sı (%63,1) erkek, 62'si (%36,9) ise kadındı.

Çalışmaya alınan PV hastalarının 53'ü (%67,9) erkek, 25'i (%32,1) kadın, ET hastalarının 45'i (%57) erkek, 34'ü (%43) kadın, PMF hastalarının 8'i (%72,7) erkek, 3'ü (%27,3) kadındı.

Yaş ve cinsiyet açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (yaş için $p=0,495$, cinsiyet için $p=0,286$). Şekil 3.6.'da hasta sayısı ve cinsiyet dağılımı gösterilmiştir. Tablo 3.6.'da da hastalara ait demografik ve laboratuvar verileri gösterilmiştir.

PV, ET ve PMF hasta grupları arasında PLT açısından fark vardır ve normal dağılıma uyduğu için One-way Anova testi kullanılmıştır. RBC, WBC, HGB, HCT, Ferritin, Folat ve Vit B12 yönünden fark vardır ancak normal dağılıma uymadığı için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Gruplara Göre Cinsiyet Dağılımı.

Tablo 3.6. Hastaların demografik ve laboratuvar verileri.

	Ortalama±Standart Sapma	Minimum-Maksimum
Yaş (yıl)	53,62 ± 19,64	(21 - 87)
Hgb (g/dl)	15,11 ± 2,69	(5,75-20,35)
Hct (%)	45,78 ± 8,54	(9,10-64,80)
WBC (X10 ³ µl)	9,98 ± 4,67	(3,18-28,60)
RBC (X10 ⁶ µl)	5,67 ± 1,29	(1,97- 9,17)
PLT (X10 ³ µl)	558,62 ± 301,33	(35 - 1787)
Ferritin (ng/mL)	59,70 ± 82,80	(5,20 - 537,50)
Folat (ng/mL)	9,23 ± 3,82	(2,31- 28,00)
Vit B12 (pg/mL)	397,74 ± 242,02	(8,08 - 1487)
CRP (mg/L)	4,70 ± 5,41	(0,3- 23,03)
ESR (mm/saat)	7,70 ± 10,75	(1-66)
LDH (U/L)	389,57 ± 206,20	(73,00-1256,00)
Demir (mg/dl)	68,84 ± 42,00	(5 -177)
TDBK (mg/dl)	339,86 ± 68,86	(148- 481)
DDBK (mg/dl)	253,16 ± 120,28	(47-429)

PLT açısından One-way Anova sonrası ($p=0,000$) farkı bulmak için Bonferroni düzeltmesi yapılarak Post-Hoc testi uygulanmış ve $p<0,0017$ anlamlı kabul edilmiştir. PLT değeri için gruplar ikili kıyaslandığında ET'deki PLT sayısı PV ve PMF hastalarından daha yüksektir (sırasıyla $p=0,000, p=0,000$). PMF'li hastalarda gözlenen PLT değeri ile PV'lı hastalarda gözlenen arasında fark yoktur. ($p=0,678$)

Hgb, RBC, Hct, ferritin ve vitamin B12 değerleri için gruplar arası fark vardır. Bu farkın kaynağını bulabilmek için de bağımsız gruplarda t testi uygulanmıştır.

Tablo 3.7. Hastalık Gruplarına Göre Laboratuvar Verilerinin Tanımlayıcı İstatistikleri.

Tanı	Parametre	Ortalama±Standart Sapma	Minimum-Maksimum
PV	HGB	16,43± 2,66	5,75-20,35
	HCT	50,56± 7,09	18,7-64,8
	WBC	10,69± 5,07	3,8-25
	RBC	6,28± 1,28	1,97-9,17
	PLT	406,63± 185,11	142-967
	YAŞ	54,46± 19,14	21-83
ET	HGB	14,34± 1,64	10,44-18,6
	HCT	42,80± 5,47	23,8-53,2
	WBC	8,88± 2,78	3,95-19,5
	RBC	5,19± 0,94	3,33-8,26
	PLT	736,77± 295,17	252-1787
	YAŞ	51,49± 20,09	21-87
PMF	HGB	11,42± 3,52	7,3-19,9
	HCT	33,16± 12,94	9,1-59,2
	WBC	12,907± 9,35	3,18-28,6
	RBC	4,73± 1,55	2,72-7,3
	PLT	315,55± 258,81	23-819
	YAŞ	62,91± 18,42	21-81

PV ve ET hasta grupları arasında Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi sonrası Hgb, Hct, RBC, ferritin, vit B12 değerleri için anlamlı fark vardır (Hgb için $p=0,000$, Hct için $p=0,00$, RBC için $p=0,000$, ferritin için $p=0,011$, vit-B12 için $p=0,010$). PV'lı grupta Hgb, Hct, RBC ve vitamin B12 değerleri ET hastalarında daha yüksekken, ferritin daha düşüktür.

PV ve PMF hasta gruplarının laboratuvar parametreleri için karşılaştırılması sonucunda Hct değeri PV'lılarda anlamlı yüksekken ($p=0,00$) diğer parametreler yönünden fark yoktur.

ET ve PMF hasta gruplarının laboratuvar parametreleri için karşılaştırılması sonucunda Hct değeri ET'lu hastalarda anlamlı yüksekken ($p=0,002$) diğer parametreler yönünden fark yoktur.

Cinsiyet açısından laboratuvar değerlerinin karşılaştırmasında farkı saptamak için bağımsız gruplarda t testi uygulanmış ve Hgb, RBC ve WBC normal dağılıma uyduğu görülmüştür. ($p=0,051$, $p=0,065$, $p=0,050$) Uygulanan t testi sonrası Hgb düzeyi erkeklerde daha yüksekken WBC ve RBC yönünden istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p=0,051$, $p=0,548$, $p=0,359$). (bkz Tablo 3.8)

Tablo 3.8. Cinsiyete Göre Laboratuvar Verilerinin Tanımlayıcı İstatistikleri 1.

Biyokimyasal Parametre	Cinsiyet	Ortalama	Standart Sapma
HGB	erkek	16,2643	3,57594
	kadın	14,4225	4,11929
WBC	erkek	11,1243	5,37684
	kadın	11,9083	4,95753
RBC	erkek	6,4660	1,40856
	kadın	6,1342	1,52336
Folat	erkek	8,9971	3,76505
	kadın	9,6935	2,81625

Ferritin, Plt, Hct ve vitamin B12 için uygulanan Mann- whitney U testinde sadece ferritin değeri için cinsiyetler arasında fark vardır ve erkeklerde daha yüksektir (Hct için p=0,212 ,Plt için p=0,066, Vit B-12 için p=0,097, Ferritin için p=0,021) (bkz Tablo 3.9).

Gruplar arasında *CALR* mutasyonu varlığı ve yokluğuna dönük karşılaştırmada kullanılan çok gözlü ki-kare testine göre beklenen değer varsayımları karşılamadığı için %'ler yönünden yorum yapılmıştır. *CALR* mutasyonu PV'lı grupta hiç görülmezken, ET'li hastaların %12,7'sinde, PMF'li hastaların %9,1'inde görülmüştür.

Tablo 3.9. Cinsiyete Göre Laboratuvar Verilerinin Tanımlayıcı İstatistikleri 2.

Cinsiyet		HCT	PLT	Ferritin	Vit_B12
erkek	Minimum	4,9	142	5,7	138
	Maksimum	64,8	967	160	1266
	Median	52	355	34,5	352
	Range	59,9	825	154,3	1128
kadin	Minimum	32,4	203	5,2	157,8
	Maksimum	60,2	733	164,5	1487
	Median	47,9	445,5	14,2	581
	Range	27,8	530	159,3	1329,2
Toplam	Minimum	4,9	142	5,2	138
	Maksimum	64,8	967	164,5	1487
	Median	51,6	374	22,7	376,1
	Range	59,9	825	159,3	1349

3.4.1. *JAK2V617F* Mutasyonu ve *CALR* ekzon 9 ve *MPL* ekzon 10 Mutasyon Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan olguların %70,8 'i (n=119) *JAK2V617F* mutasyon analizi pozitif , %6,5'i (n=11) *CALR* mutasyon analizi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların hiçbirinde *MPL* mutasyonu bulunamamıştır. Totalde hastaların %23,2'si (n=39) her üç mutasyon için de negatiftir.

MPL ve *JAK2V617F* mutasyonu negatif hastaların %22,4'ünde *CALR* mutasyonu pozitifken, *MPL* ve *JAK2V617F* mutasyonu negatif ET ve PMF hastaları ayrı değerlendirildiğinde %40,7 bulunmuştur. *MPL* ve *JAK2V617F* mutasyonu negatif ET'de *CALR* mutantlar %43,47 iken *MPL* ve *JAK2V617F* mutasyonu negatif PMF'de %25'tir.

JAK2 allel durumu ve yükü normal dağılıma uymadığı için Mann whitney U testi ile değerlendirilmiştir. *JAK2* allel yükü yönünden PV ve ET (p=0,008) arasında anlamlı fark varken; ET ile PMF (p=0,278) ve PV ile PMF (p=0,278) arasında fark bulunamamıştır. PV'lı *JAK2V617F* pozitif hastaların mutasyon yükünün ET'ye göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Gruplar arası allel yükü değişimleri Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

Tablo 3.10. Gruplar arası *JAK2V617F* allel yük değişimine ait tanımlayıcı istatistikler

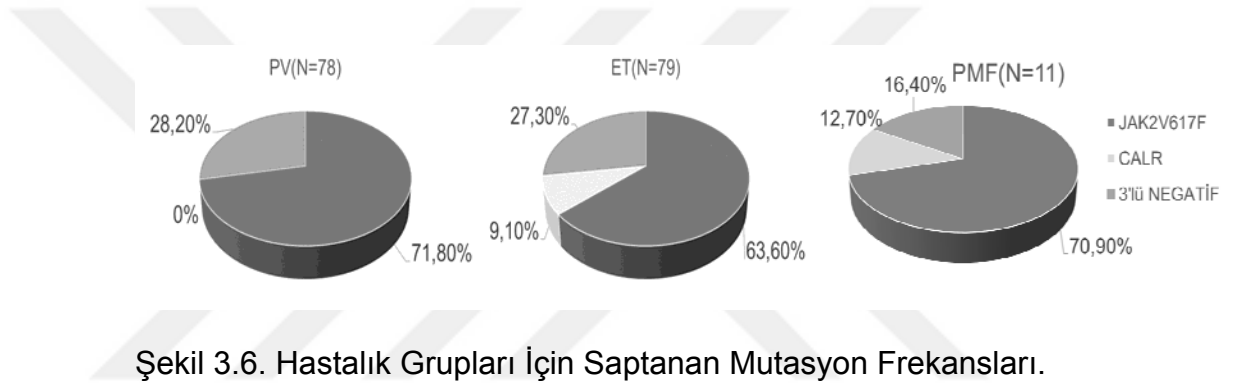
Tanı	Minimum Allel yükü	Maksimum Allel Yükü	Ortalama± Standart sapma
PV	10	65	39,85± 14,75
ET	8	60	31,88± 13,97
PMF	7	65	39,57± 19,94

Yüksek *JAK2V617F* allel yükü olan PV hastalarında yüksek WBC, yüksek platelet sayısı, yüksek vitamin B12 düzeyi, yüksek LDH, ve ileri yaş gözlenmiştir (sırasıyla p=0,033, p=0,013, p=0,017, p=0,03, p=0,021). Düşük *JAK2V617F* allel yükü olan ET hastalarında ise yüksek hematokrit; yüksek *JAK2V617* mutasyon yükü olan ET hastalarında ise yüksek LDH gözlenmiştir (sırasıyla p=0,044 ve p=0,05).

Çalışmaya alınan olguların *JAK2 V617F* mutasyon analizi, *CALR* ekzon 9 ve *MPL* ekzon 10'a ait mutasyon değerlendirmesine ait veriler Tablo 3.11.'de ve şekil 3.8'de özetlenmiştir.

Tablo 3.11. Olgulara ait *JAK2V617F* mutasyon analizi, *CALR* ve *MPL* genlerinin sekans analiz sonuçları.

Hastalık Grubu	Olgu sayısı (n=168)	<i>JAK2V617F</i>	<i>CALR</i>	<i>MPL</i>	Açıklama
Polistemia vera	78	56/78 71,8%	0/78 0%	0/78 0%	
Esansiyel trombositoz	79	56/79 70,9%	10/79 12,7%	0/79 0%	<i>JAK2V617F</i> pozitif olan bir olgu aynı zamanda <i>CALR</i> pozitif idi.
Primer Myelofibrozis	11	7/11 63,6%	1/11 9,1%	0/11 0%	



Olgularda öncelikli olarak yapılan *JAK2V617F* mutasyon analizi sonucunda PV olgularının %71,8'inde, ET olgularının %70,9'unda, PMF olgularının %63,6'sında pozitif sonuç saptandı.

Olgularda daha sonra *CALR* ekzon 9 da ve *MPL* ekzon 10'da görülen mutasyonlara dönük inceleme yaptık. *MPL* geni ekzon 10'daki W515L, W515K, S505N mutasyonlarını saptamaya yönelik yapılan iki yönlü sanger sekans analizi sonucu tüm olgular için normal olup, mutasyon saptanmamıştır.

JAK2V617F mutasyonu pozitif olan gruba negatif olan grup arasında cinsiyet ve splenomegali açısından fark vardır ($p=0,032$, $p=0,027$). *JAK2V617F* mutasyonu pozitiflerde erkek cinsiyet ve belirgin splenomegali mevcuttur.

JAK2V617F mutasyon varlığının gruplar arasında (PV, ET, PMF) değerlendirilmesinde cinsiyetler arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p=0,33$, $p=0,803$, $p=0,236$).

CALR mutasyonu taşıyan ve taşımayan hastalarda organomegali açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,976$).

JAK2V617F mutasyonu pozitif olan olgularla CALR mutasyonu pozitif olan hastalar karşılaştırıldığında iki grup arasında yaş, WBC ve Hgb değerleri yönünden fark yokken Hct, RBC ve PLT değerleri yönünden fark vardır (bkz Tablo 3.12).

Tablo 3.12. JAK2V617F(+) ve CALR(+) Olguların Laboratuvar Verilerinin Kıyaslanması.

Karşılaştırılan Parametre	JAK2V617F (+)	CALR (+)	p değeri
Hct	46,02 (18,70-64,80)	38,13 (9,10-46,00)	0,028
Hgb	15,05 (5,75-20,35)	13,61 (9,10-16,10)	0,127
WBC	10,32 (3,18-27,00)	11,84 (5,90-28,60)	0,408
RBC	5,8 (1,97-9,17)	4,47 (3,55-5,32)	0,002
PLT	554,00 (56-1396)	966 (390-17,87)	0,002
Yaş	57,44 (21-87)	50,70 (23-80)	0,261

CALR mutasyonu pozitif olgularda JAK2 mutasyonu pozitif hastalara göre Hct ve RBC değerleri anlamlı düşük iken PLT değeri anlamlı yüksektir. Yaş, Hgb ve WBC yönünden aralarında fark yoktur.

CALR mutasyonu pozitif olgularda üç mutasyon negatif gruba göre Hct, Hgb ve RBC değerleri anlamlı düşük iken PLT değeri anlamlı yüksektir. Yaş, ve WBC yönünden aralarında fark yoktur.(bkz Tablo 3.13)

Tablo 3.13. Üç Mutasyon Negatif ve *CALR*-mutant Olguların Laboratuvar Verilerinin Kıyaslanması.

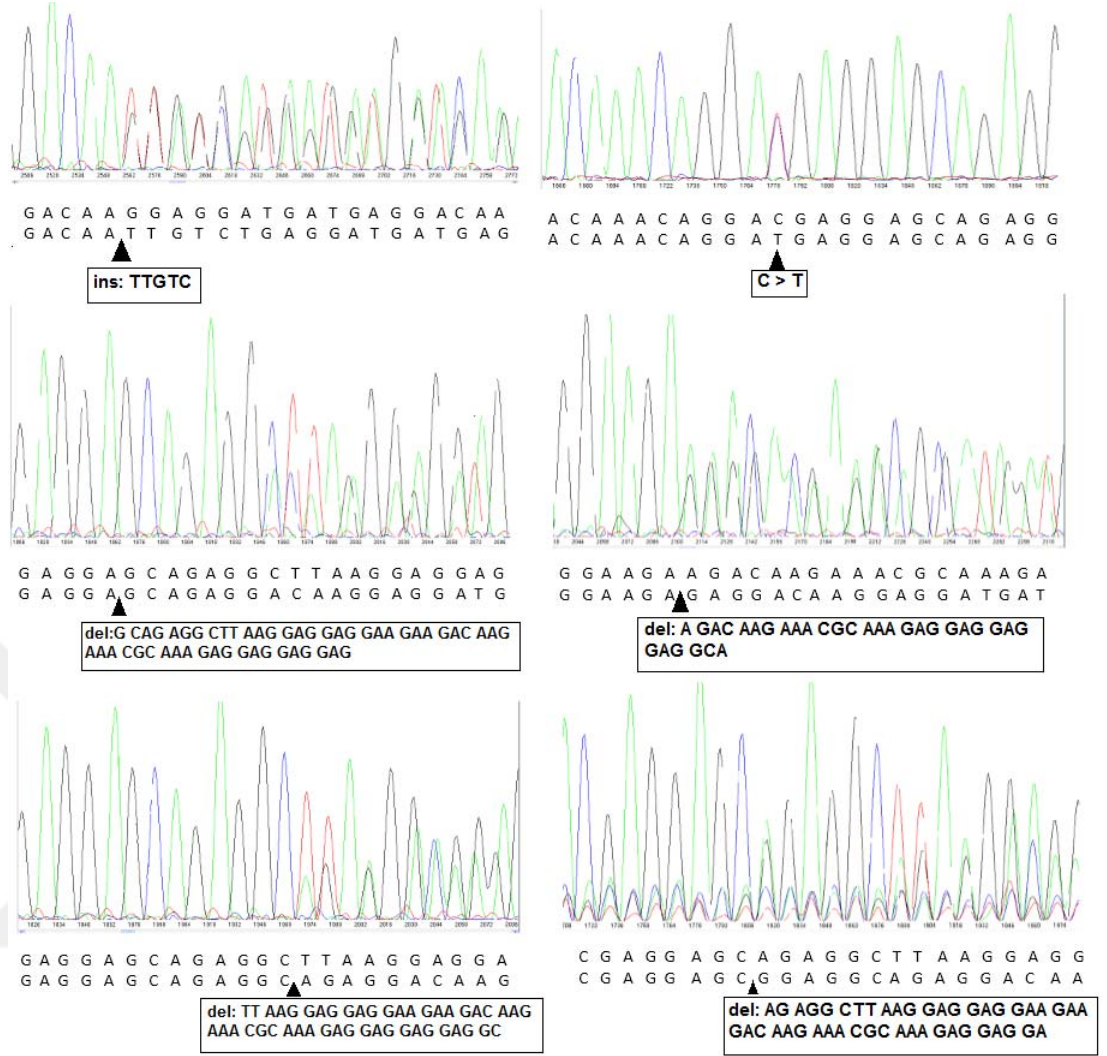
Karşılaştırılan Parametre	Üç mutasyon negatif	<i>CALR</i> mutant	p değeri
Hct	46,76 (29,50—59,20)	38,13 (9,10-46,00)	0,015
Hgb	15,68 (9,40-19,90)	13,61 (9,10-16,10)	0,034
WBC	8,38 (3,80-17,05)	11,84 (5,90-28,60)	0,074
RBC	5,32 (3,22-6,75)	4,47 (3,55-5,32)	0,015
PLT	457,7 (35-1482)	966 (390-17,87)	0,001
Yaş	42,9 (21-76)	50,70 (23-80)	0,259

Splenomegali açısından grupları karşılaştırmak için yapılan ki-kare testine göre *JAK2* (+) ve *CALR* (+) hastalar ile üç mutasyon yönünden negatif grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,114$). Splenomegali olan hastaların %25,4'ü üç mutasyon yönünden negatif, %66,7'si *JAK-2* (+) ve %7,9'u *CALR* (+)'tir. Yani *CALR*(+) hastalar üç mutasyon yönünden negatif olan gruba göre daha düşük splenomegali frekansına sahiptir.

***CALR* Mutasyonları**

CALR mutasyonları *JAK2* negatif ET ve PMF'li grubun %22,2'sinde, *JAK2* ve *MPL* negatif ET hastalarının %43,47'sinde; *JAK2* ve *MPL* negatif PMF'li hastaların %25'inde pozitif olarak bulunmuştur. Hastalardan biri hem *JAK2V617F* mutasyonu hem de *CALR* mutasyonu pozitif olarak saptanmıştır.

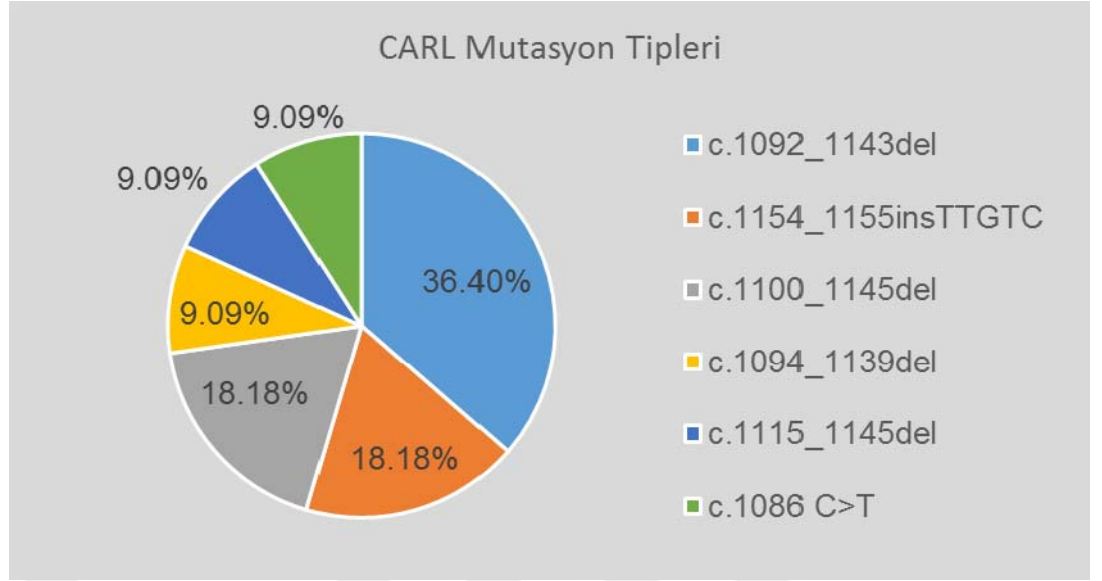
Yapılan sekans analizi sonrası tüm *CALR* mutasyonları ekzon 9'da lokalize insersiyon, delesyon veya baz değişikliği ile giden sinonim mutasyon olarak bulduk. *CALR* mutasyonlu 11 hastada delesyon ($n=4$), insersiyon ($n=1$) ve sinonim mutasyon ($n=1$) 6 farklı tip mutasyon tanımlanmıştır. 52-bp'lik delesyon olan tip 1 mutasyon (c.1092_1143del) %36,36 ile en sık görülen değişiklik olarak saptanmıştır (bkz Tablo 3.14-şekil 3.7).



Şekil 3.7. Bu çalışmada tanımlanmış *CALR* mutasyonları.

Oklar insersiyon ve delesyonun başladığı bölgeyi gösterir. Dikdörtgen şekiller insersiyon veya delesyon nükleotid sekansını temsil eder. İlk sıradan başlayarak sağdan sol ve yukarıdan aşağıya tanımlı mutasyonların sırasıyla: c.1154_1155insTTGTC, c.1086 C>T, c.1092_1143del (tip1), c.1115_1145del, c.1100_1145del, c.1094_1139del şeklindedir.

Çalışmamızda iki hastada *CALR* geninde ekzon 9'daki delesyonlara ek olarak 8 ve 9. ekzonlar arasında yer alan intron bölgesinde duplikasyonlar saptanmıştır. Bu hastalarda 46 bp'lık delesyona karşı intron bölgesindeki 47 bp'lık duplikasyon ve 52 bp'lık delesyona karşılık intron bölgesindeki 53 bp'lık duplikasyon mevcuttur (bkz.Şekil 3.8) .



Şekil 3.9. CALR mutasyon tiplerinin pasta grafikte gösterimi

CALR tip 1 mutasyonu pozitif olan hastalar tip 2 mutantlara göre daha genç ve Hgb, Hct, WBC, RBC, PLT değerleri daha yüksek bulunmuştur, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamı yoktur (Tablo 3.15).

CALR c.1092_1143del mutasyonu (tip 1) sadece erkek cinsiyette saptanmıştır.

PMF hastalarında tek bir mutasyon gözlenmiş olup bu mutasyon da CALR c.1092_1143del mutasyonudur (tip 1).

Tablo 3.15. CALR Tip 1 mutant ve Tip 2 mutant olguların laboratuvar verilerinin kıyaslanması.

Karşılaştırılan Parametre	CALR Tip 1 mutant	CALR Tip 2 mutant	p değeri
Hct	35,15 (9,10-46,00)	34,75 (32,60-36,90)	0,348
Hgb	13,42 (9,10-15,7)	10,87 (10,44-11,30)	0,165
WBC	13,00(5,90-28,60)	10,7	0,083
RBC	4,52 (3,98-5,32)	3,61 (3,55-3,68)	0,355
PLT	1014 (670-1787)	629 (530-729)	0,99
Yaş	51,50 (34-71)	66,5 (53,0-80,0)	0,355

Tablo 3.16'da CALR mutasyon tiplerine göre laboratuvar ve yaş kıyaslaması gösterilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı fark saptanmasa da en sık

mutasyon olan c.1092_1143del (tip 1) mutant hastalar diğ er mutasyona sahip hastalara g ore daha y uksek WBC sayısına; c.1100_1145del'lu hastalar tip 2 ve c.1092_1143del (tip 1) mutant hastalara g ore daha y uksek Hct d uzeyi, Hgb d uzeyi, RBC sayısı ve PLT sayısına sahip oldukları ve tip 2 mutant hastaların da diğ er tiplere g ore daha ileri yaşta oldukları g ozlenmiştir.



Tablo 3.16. CALR Mutasyon Tiplerine Göre Laboratuvar ve Yaş Kıyaslaması.

Değişken	1	2	3	Diğer	p1-2	p1-3	p1-4	p2-3	p2-4	p3-4
Hasta sayısı(E:K)	1:1	1:1	3:1	2:1						
Yaş(yıl)	48(30-66)	66,5(53-80)	51,5(34-71)	40,66(23-50)	0,439	0,468	0,39	0,348	0,246	0,475
WBC ($\times 10^9/L$)	11,25(10,4-12,1)	10,7	13(5,9-28,6)	10,4(8,6-12,8)	0,99	0,923	0,948	0,99	0,953	0,723
Hct (%)	45,65(43-48,3)	34,75(32,6-36,98)	35,15(9,1-46)	46,36(44,9-49)	0,221	0,498	0,193	0,355	0,137	0,157
Hb (g/L)	15,12(14,14-16,1)	10,87(10,44-11,3)	13,425(9,1-15,7)	10,4(8,6-12,8)	0,121	0,264	0,236	0,355	0,192	0,288
RBC	4,75	3,615(3,55-3,68)	4,526(3,98-5,32)	5,28(5-5,64)	0,221	0,172	0,142	0,083	0,096	0,275
PLT	1265(1184-1346)	629,5(530-729)	1014(670-1787)	858,33(390-1426)	0,121	0,177	0,377	0,165	0,378	0,479

1=c.1100_1145del

2= c.1154_1155insTTGTC

3= c.1099-1150del

Diğer= C1116_1146del/c.1095_1141del/c.1086C>T

TARTIŞMA

Bu çalışmada Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji ve Tıbbi Genetik bölümlerine başvuran 78'i PV, 79'u ET ve 11'i PMF olmak üzere toplam 168 bcr-abl negatif MPN hastası *JAK2* geni ekzon 14'teki *JAK2V617F* mutasyonu, *CALR* ekzon 9'daki ve *MPL* ekzon 10'daki mutasyonlar, sıklıkları, laboratuvar verileri, organomegali açısından değerlendirildi. Hastaların 106'sı erkek, 62'si kadındı ve yaş ortalaması (53,62 ±19,67) idi.

4.1. *MPL*

MPL mutasyonlarının büyük çoğunluğu 10. ekzon 515. kodonda bulunur; W515 L en yaygın olanıdır ve W515K tarafından takip edilir. *MPL* W515L mutasyonları 45 *JAK2V617F* negatif PMF'li hastada %9 (n=4/45) frekansla bulunmuştur. Bu çalışmada *JAK2V617F* negatif 50 ET ve 10 PV hastasında saptanmamıştır (5).

1182 myeloproliferatif ve diğer myeloid bozukluğu olan hasta [290 myeloid neoplaziyle birlikte myelofibrozis (MMM), 242 PV, 318 ET, 88 MDS, 118 kronik myelomonositik lösemi (KMML) ve 126 AML] ve 64 sağlıklı kontrolün *JAK2* mutasyonu dikkate alınmadan *MPLW515* mutasyonu taranması şeklinde yapılan çalışmada 20 hastada *MPLW515L* ve *MPLW515K* mutasyonu tespit edilmiştir. Mutant *MPL* alleleri moleküler testler sırasında denovo olarak 12 MMM hastasında, 4 ET, 1 post-ET MMM ve 3 blast krizindeki MMM 'de gözlenmiştir. 6 hastanın *MPLW515L* ve *JAK2V617F* allelerini beraber taşımakta olduğu bulunmuştur. *MPLW515L* veya *MPLW515K* mutasyonları MMM ve ET'de sırasıyla %5 ve %1 frekansında bulunmuştur. Diğer myeloid bozukluklar ve PV'da gözlenmemiştir (80).

Guglielmelli tarafından 217 myelofibrozis hastası ile yapılan çalışmada %8,2'si *MPL* mutasyonuna sahipken, bunların %22'sinin (n=4) *JAK2V617F* ile birlikte olduğu saptanmıştır. *MPL* wild tiplerle kıyaslandığında *MPLW515L/K* mutasyonluların bayan, daha yaşlı, daha ciddi anemik olduğu ve daha fazla transfüzyon desteğine ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir (168).

MPL mutasyonlu PMF hastaları *JAK2V617F* pozitif ve *JAK2V617F* negatif hastalarla kıyaslandığında tanı sırasında düşük hemoglobin ve transfüzyon bağımlılığı riskinde artışla ilişkili bulunmuşlardır (168).

Türkiyede 77 (11 PMF, 66 ET) hastası ile yapılan çalışmada ise ET'luların %43,9'u, PMF'lilerin %54,5'i *JAK2V617F* pozitif olup *MPLW515K/L* prevalansı hasta grupta %2,6, *JAK2* negatif grupta %4,8'olarak saptanmıştır. Bu iki vakadada (124 ve 71 aylık takip sonrası) trombotik ve hemorajik komplikasyon veya ek sitogenetik anormallik görülmemiştir (169).

İtalyada 994 ET hastası ile yapılan bir çalışmada *MPLW515K/L* mutasyonu %3,0 olup wt ile kıyaslandığında düşük Hgb seviyeleri ve yüksek platelet sayıları ile ilişkili bulunmuştur. *MPL* wt ile *JAK2V617F* mutantlar arasında da aynı durum daha belirgin olarak mevcuttur. Hastaların %8'inde *JAK2V617F* ile beraberlik söz konusudur (82).

İngilterede 200 ET veya PMF hastası üzerinde yapılan çalışmada hastaların %8,5'inde *MPL* ekzon 10 mutasyonu gösterilmişken bir hasta hem *MPL* hem *JAK2V617F* pozitif bulunmuştur. *MPLW515K*, L'ye göre daha fazla allel yüküne sahip bulunmuştur. *JAK2V617F* (+) ile karşılaştırıldığında *MPL* (+)ler tanı sırasında daha düşük Hgb ve daha yüksek Plt değerine , yüksek serum eritropoetin seviyesi, yüksek endojen megakaryosit ancak eritroid koloni büyümesi ve kemik iliğinde düşük selülarite ve düşük total selülariteye sahip bulunmuştur (81).

ABD 'de *MPLW515K/L* fonksiyon kazanım mutasyon frekansı ET'de %1 ve PMF'de %5 olarak raporlanmıştır (80).

PMF hastalarında *MPL* mutasyonu tanı sırasında hem *JAK2 V617F* negatif ve hem *JAK2V617F* pozitif hastalarla kıyaslandığında düşük hemoglobin seviyeleri ve artmış transfüzyon bağımlılık riski ile ilişkili bulunmuştur (168). *MPL* mutasyonu olan ET'li hastalar *JAK2V617F* pozitif ET hastalarıyla kıyaslandığında daha yüksek platelet seviyelerine ve izole megakaryositik proliferasyona sahip olduğu raporlanmıştır (168).

Bu durum bizim çalışmamızda *MPL* ekzon 10 mutasyonlarının saptanmamasının yöntemler arasındaki farktan ve çalışılan hasta grubunda

JAK2V617F negatif ET ve PMF hasta sayımızın düşük olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

4.2. CALR

BCR-ABL negatif MPN'lerde, *CALR* mutasyonunun tanımlanması ile *JAK2V617F* negatif ET ve PMF'li olgulara daha doğru ve kesin tanı koyma şansı sağlanmıştır.

MPN tanısı kesin olarak koymak için *JAK2* ve *MPL* mutasyonlarının tanımlanması gereklidir. Ancak ET ve PMF'li hastaların yaklaşık %30-45'i bu mutasyonları taşımamaktadır. Kalan kişilerin büyük çoğunluğunda *CALR* mutasyonları raporlanmıştır. Tüm bu mutasyonlar *JAK2* ve *MPL* yokluğunda ortaya çıkar. *CALR* mutasyonlarının tam olarak ortaya konmasında etyolojik, biyolojik ve klinik etkileşimler etkili olabilir (170).

ET'de *CALR* mutasyon frekanslarının %15-25 arasında olduğu tahmin ediliyor ki bu *CALR*'in myeloproliferatif neoplazilerdeki ikinci en yaygın mutant gen olduğunu gösterir (8, 9, 144).

Günümüzde Türkiye'deki MPN hastalarıyla yapılmış *CALR* mutasyonuna dönük bir çalışma bulunmamaktadır.

Klampfl'in 1107 MPN'lik çalışmasında; *CALR* mutasyonu PV'de (n:382) hiç görülmezken ET'de %25 (n:311) ve PMF'de 35%(n:203) görülmüştür (9).

Kim'in 199 MPN'li hastayı [79 ET, 58PV, 54 PMF, 8 MPN-U, 4 APMF (myelofibrozisle giden akut panmyelozis)] içeren çalışmasında total *CALR* mutasyon frekansı 12.6%'dır. En yaygın *CALR* mutasyon frekansı %37,5 ile MPN-U'da olup, bunu %17.7 ile ET ve %14.8 ile PMF takip eder. *CALR* mutasyonları PV'da veya APMF'de bulunmamıştır (171).

Tefferi'nin bir çalışmasında 254 PMF hastasının %58'inde *JAK2*, %25'inde *CALR* , %8,3'ünde *MPL* mutasyonu pozitif ve %8,7'sinde üç mutasyonda negatif tespit edilmiştir (136).

Çinlilerde Fu tarafından 436 ET hastasında yapılan çalışmada %55,1'i *JAK2V617F*, %1,4 *MPL* mutasyonu pozitif saptanmış olup *JAK2* ve *MPL* negatiflerin %52,7'si *CALR* pozitifdir. 2 hasta hem *CALR* hem *JAK2* için pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada 159 sağlıklı kontrol de kullanılmış olup

JAK2V617F ve *CALR* mutasyonlarının sağlıklı kontrollerde saptanmaması bu iki genin beraberliğinin MPN gelişimi için kalıtsal bir yatkınlık sonucu olduğunu düşündürebileceği veya bir somatik mutasyonun ardından gelen genetik instabilite olarak değerlendirilebileceği öngörülmüştür (172).

Nunes'in 65 kişilik çalışmasında (21 PMF, 21 MPET ve 23 ET) hastaların 36'sında (%55.4) *JAK2V617F*, birinde (%1.5) *MPLW515L* ve 18'inde (%27.7) *CALR* mutasyonu saptanmıştır. 10 hasta (15.4%) triple negatiftir. 29 *JAK2V617F* ve *MPLW515K/L* negatif hastanın, 18'i (%62.1) *CALR* mutasyonu içerir: Bu hastaların 8/10'i PMF'li (%80.0), 7/9'si MPET'li (77.8%), ve 3/10'ü ET'ludur (%30.0)(173).

Gangat ve arkadaşlarının 300 ET hastası ile yaptıkları çalışmada hastaların %53'ü *JAK2*, %32'si *CALR*, %3'ü *MPL* ve %12'si *JAK2*, *CALR* ve *MPL* için wild-tip olarak bulunmuştur (174).

Andrikovics ve arkadaşlarının 215 *JAK2 V617F* pozitif PV, 289 ET ve 99 PMF'li olguyu içeren çalışmasında PMF'de 56 (%57) *JAK2V617F*, 25 (%25) *CALR*, 7 (%7) *MPL* ve 11 (%11) üç mutasyon da negatif olgu saptanırken, ET'de 154 (%53) *JAK2V617F*, 96 (%33) *CALR*, 9 (%3) *MPL*-pozitif ve 30 üç mutasyon negatif (11%) olgu tanımlanmıştır (175).

Rotunno'nun 576 ET hastasında yaptığı çalışmada % 15,5'inde *CALR* mutasyonu saptanırken, *JAK-2* ve *MPL* negatif olan grup için frekans %48,9 olarak bulunmuştur (146).

Li B. ve arkadaşlarının 357 PMF'li Çinli hastayı *CALR*, *MPL* ve *JAK2* mutasyonları için taradığı çalışmalarında *CALR* mutasyonu 76 (%21) olguda, *JAK2* ve *MPL* olmayan 168 olgunun ise 72'sinde (%43) *CALR* mutasyonu saptanmıştır (176).

197 MPN (94PV, 69 ET, 34 PMF) hastasının 105 gen mutasyonu yönünden next-generation sekans incelenmesinde hastaların % 69'u *JAK2V617F*, %15'i *CALR*, %12'si *TET2*, %5'i *ASLX1* ve %5'i *DNMT3A* somatik mutasyonuna sahip bulunmuştur (1).

Li'nin *JAK2V617F* ve *MPL* ekzon 10 mutasyonu negatif 234 ET ve 50 PMF'yi içeren 1088 MPN'li hastada yaptığı çalışmada *CALR* mutasyonu ET'de %53 ve PMF'da %56 bulunmuştur (170).

Rumi E ve arkadaşlarının yaptığı 517 MPN'yi kapsayan çalışmada hastaların %64,7'si *JAK2V617F* (+), %22,7'si *CALR* ekzon 9 (+), %4'ü *MPLW515* (+) ve %8,6'sı üç mutasyon negatif saptanmıştır (177).

Xiumen ve arkadaşlarının çalışmasında ET hastalarında *CALR* mutasyonları %25,3 (38/150), *JAK2 V617F* %61.3 (92/150) ve *MPL W515K* %2.7 (4/150) bulunmuştur. *JAK2 V617F* ve *MPL W515K* mutasyonu olmayan 54 ET hastasında *CALR* mutasyon frekansı 70.4% tür (38/54) (178).

Tefferi'nin 1027 hastalık çalışmasında; 402 ET hastasının 227'sinde (%57) *JAK2* , 11'inde (%3) *MPL* , ve 114'ünde (%28) *CALR* mutasyonu saptanmış olup; %12 'si ise her üç mutasyon için negatif olarak bulunmuştur (179).

Sazawal'ın çalışmasında 80 PMF'li hastanın %11.2'sinde (9/80), *JAK2V617F/MPL* mutasyonu olmayan hastaların 25.7%'sinde (9/35) *CALR* tip 1 mutasyonu saptanmıştır. Yeni bir *CALR* mutasyon paterni (c.1241_1288del) bir (1/9) hastada tanımlanmıştır (180).

Ha'nın 168 MPN hastasında yaptığı çalışmada [36 (PV), 114 (ET), ve 18 (PMF)] %16,7'sinde, PV'luların %0'ında, ET'luların %21,9'unda ve PMF'lilerin %16,7'sinde *CALR* mutasyonu tespit edilmiştir. *JAK2* mutasyon frekansları ise PV için %86,1, ET için %59,6 ve PMF için %50 bulunmuştur. *JAK2* ve *MPL* olmayan grupta *CALR* mutasyon frekansı ET ve PMF için sırasıyla %58.5 ve %33.3'e denk gelir. *MPL* sadece ET hastalarında olup frekansı %4,4 saptanmıştır. Bir hastada hem *CALR* hem *JAK2V617F* mutasyonu tespit edilmiştir. Üç mutasyon negatif insidans PV'de %13,9, ET'de %14,0 ve PMF'de %33,3 bulunmuştur (181).

Al Assaf'ın 103 *JAK2V617F* negatif ET hastası ile yaptığı çalışmada hastaların %56'sı *CALR*, %12'si *MPLW515K/L* mutasyonu taşıırken %32'si üç mutasyon yönünden negatif saptanmıştır. Hem *JAK2V617F* hem *MPL* negatiflerin %63,7'si *CALR* pozitif olup, bir hasta hem *JAK2V617F* hem *CALR* pozitif bulunmuştur (182).

Labastida-Mercado ve arkadaşlarının 27 MPN hastasında yedi moleküler markera ait taramasına dayalı bir çalışmada (14 ET, 8 PV, 4 PMF) ise ET'lerin %36'sı *JAK2V617F* , %7'si *MPL* ve %29'u *CALR* mutasyonu

pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada PV'luların %62'si *JAK2* pozitif olup PMF'li grupta %25 *JAK2* ve %25 *CALR* mutasyon pozitifliği mevcuttur (183).

Qiao'nun 301 MPN hastasıyla Çinde yaptığı çalışmada (222 ET, 37 PV, 33 PMF, 6 post ET MF ve 3 post-PV MF) hastaların %24,3'ünde *CALR* mutasyonu varken; ET'de %31,1, PMF'de %12,1 bulunmuştur. *JAK2V617F* negatif ET grubunda % 57,0 ve *JAK2V617F* negatif PMF grubunda %30,8 saptanmıştır. PV, PET-MF, PPV-MF'li hastalarda *CALR* mutasyonu saptanmamıştır. Tüm MPN'lerde *JAK2V617F* %52,2 bulunmuştur. ET hastalarının %0,9'u *MPLW515K/L* mutasyonu görülürken *JAK2V617F* negatif PV hastalarının %2,7'sinde de *JAK2* ekzon 12 mutasyonu görülmüştür (184).

30 PMF hastasıyla Xia ve arkadaşlarınca yapılan başka bir çalışmada hastaların %50'si *JAK2V617F* taşıırken *JAK2* (-) grupta sadece 2 hasta (%6,7) *MPLW515L* mutasyonuna sahipken ekzon 12 mutasyonu tüm grupta negatif bulunmuştur (185).

Pósfai 'nin çalışmasında Güney Macaristandaki 101 ET hastasının % 60'ı *JAK2V617F* mutasyonunu taşıırken *MPL* mutasyonu 3.96 % ile W515L olarak tek hastada saptanmıştır. *JAK2* ve *MPL* negatif 3 hastada *CALR* tip 2 saptanmıştır. *CALR* tip 2 mutasyon varlığı daha genç yaş, tanı sırasında düşük median lökosit sayısı ile beraber yüksek median platelet sayısı ve düşük trombotik olayla ilişkilendirilmiştir (186).

Tayvan'da Chen'in 147 ET hastasında gerçekleştirdiği çalışmada ise *JAK2V617F* 94 (%63,9), *MPL* 4 (%2,7), *CALR* mutasyonu 33 (%22,5) saptanmıştır. *JAK2* ve *MPL* wild-tip olgularda *CALR* frekansı %67,3'tür (187).

Bizim çalışmamızda ise *CALR* geni ekzon 9'un DNA dizi analizi (sekans) yöntemiyle değerlendirilmesi sonucunda tüm hastaların %6,5'i (11/168) *CALR* mutant olarak saptandı. Hastalıklar değerlendirildiğinde *CALR* mutasyon pozitifliği PV'da %0 (0/78), ET'de %12,7 (10/79) ve PMF'de %9,1 (1/11) frekansında saptandı. *JAK2V617F* ve *MPL* ekzon 10 mutasyonu negatif olan grupta ise *CALR* mutasyon frekansı , totalde % 40,74 iken ET için %43,47, PMF için %25 bulundu. Benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında, çalışmamızdaki verilerin PV için literatür bulguları ile paralel ET ve PMF için beklenenden biraz düşük olduğu görüldü.

Bunun sebebinin özellikle başta PMF grubu olmak üzere hastalık gruplarındaki hasta sayısının azlığı ve yapılan çalışmalarda yöntem (Chi (152)'nin çalışmasında high-resolution melting (HRM) analizi ve Taqman Real-Time PCR, Klampfl(9)'ın çalışmasında tüm-genom sekanslama ve kapiller fragman analizi, Nangalia(8)'ninkinde ekzom sekanslama, diğer çalışmalarda sanger sekanslama..vs) farklılıklarından kaynaklandığı düşünüldü. *JAK2/MPL* negatif PMF grubunda elde edilen frekanslar Sazaval ve Qiao'nun (180, 184) çalışmalarıyla, *JAK2/MPL* negatif ET grubunda elde edilen frekanslar ise Rotunno'nun (188) çalışmasıyla paralellik göstermiştir (Tablo 4.9, Tablo 4.10 ve Tablo 4.11).

4.2.1. *CALR* Mutasyon Tipleri

Literatürde tanımlanmış tüm farklı *CALR* mutasyonlarının ve çalışma sonunda elde ettiğimiz mutasyonların tipleri ve frekansları Tablo 4.1'de verilmiştir. Buna göre altı farklı 52 bp'lik delesyon mutasyonu ve dokuz farklı 5 bp'lik insersiyon raporlanmıştır. Tip1 ve tip 2 sadece iki spesifik varyanttır. *CALR* ekzon 9'daki sonraki en yaygın mutasyonlar total mutasyonların %1,26'sını temsil eden 46bp'lik delesyon (c.1095_1140del) ve spesifik 34 bplık delesyondur (c.1102_1135). 34bplık delesyonlar 10 farklı tip mutasyonla en fazla varyasyon olan tiptir (total *CALR* mutasyonların %3,56'sı). Literatürde raporlanan 55 mutasyonun hepsi de 36 değişmeyen aminoasitle sonlanan yeni C-terminal sekansına giden open reading frame (ORF)'de +1 bplık frameshift mutasyonla sonuçlanır (152).

CALR ekzon 9 insersiyon/delesyonları ET ve PMF'teki en sık 2. mutasyonu temsil eder ; mutasyon frekanslarının ET'de %15- %32 ve PMF'te %25 -%35 arasında olduğu tahmin edilmektedir.(8, 9, 72)

Rumi'nin bir çalışmasında ET'lularda tip 1 ve 2 frekansları sırasıyla %46, %38 bulunmuştur (189).

Cabagnols'un *CALR*-mutant PMF'li Kaskasyalıları'da yapılan çalışmasında %72'sinin 52-bp'lik delesyon (tip 1 mutasyonu) , %16'sının 5-bplık insersiyon (tip 2 mutasyonu) ve %12'sinin daha nadir sıklıktaki insersiyon delesyonları taşıdığı bulunmuştur (190).

Rumi ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında ise tüm *CALR* mutasyonları içinde tip 1 mutasyonu %72, tip 2 mutasyonu %12,6 frekansta saptanmıştır. Tip 1 mutasyon frekansının PMF’de ET’den daha yüksek bulunması bu mutasyonun myelofibrotik transformasyon üzerinde spesifik bir rolü olduğunu düşündürmüştür (177).

Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada literatürde elde edilen çalışmalara zıt olarak; tip 2 mutasyon frekansı daha fazla saptanmıştır. PMF’li hastalarda tip 1 mutasyonu %32 ve tip 2 mutasyonu %64 bulunmuştur (176).

Ha ve arkadaşlarının çalışmasında 5 tip *CALR* mutasyonu saptanmış bunlar arasında L367fs*46 %53,4 ile en yaygın tip olup %35,7 ile K385fs*47, %3,6 ile E364fs*55 ve %3,6 ile E369fs*46 tarafından takip edilmiştir. Bir ET hastasında da K385fs*47 öncesinde A delesyonu saptanmıştır (181).

Al Assaf ve arkadaşlarının çalışmasında *CALR* mutantların %60,3’ü tip 1, %31’i tip 2 mutasyonuna sahiptir. Bunlar dışında 5 farklı tip mutasyon daha saptanmıştır (182).

Qioa ve arkadaşlarının çalışmasında on iki farklı *CALR* mutasyonu saptanmış olup tip 1 %44,6 ile ilk sırayı tip 2 %33,8 ile ikinci sırayı almıştır. ET grubunda *CALR* mutasyonlarının %14,0’ı tip 1, %10,4’ü tip 2’dir. Bu frekans PMF için sırasıyla %3,0 ve 56,1’dir (184).

Li N ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bulunan 152 *CALR* mutasyonları delesyon (n = 8), insersiyon (n = 3) ve kompleks insdel (n = 4) içeren 15 farklı tipten oluşmuştur. Aynı zamanda dokuz yeni mutasyon tanımlanmıştır. Ortalama mutant allel yükü 31 ± 12 (%0.5–69) arasında saptanmıştır ve PMF’li hastalar ET’lu hastalara göre daha yüksek mutant allel yüküne sahip bulunmuştur. *CALR* mutasyonlu hastalar arasında PMF’liler ET’den daha farklı klinik özelliklere sahiptir (170).

Tefferi ve arkadaşlarının 114 *CALR* mutasyonlu hasta ile yaptığı çalışmada %45’i tip-1, %39’u tip-2 mutasyonuna sahip olup erkek cinsiyet sadece tip-1 ile genç yaş ise sadece tip 2 ile bağlantılı bulunmuştur. Platelet sayıları tip-1 ile kıyaslandığında tip-2 de belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (179)

Tablo 4.1. *CALR* Mutasyon Tipleri günümüze kadar myeloproliferatif neoplazi hastalarında raporlanmış *CALR* ekzon 9 mutasyonları ve frekansları Chi ve diğ.(152)'den uyarlama.

Boyut	Total Frekans	cDNA değişikliği	Protein Değişikliği	Çalışma frekansları (%)	Frekans (%)	Referans
1 bp	0,63	c.1140del	p.K385fs*45		0,42	Klampfl T(9)
		c.1122del	p.K375fs*55		0,21	Klampfl T
2 bp	0,84	c.1123_1125delinsTGTTT	p.K375fs*56		0,21	Klampfl T
		c.1153_1154delinsTGTC	p.K385fs46		0,21	Klampfl T
		c.1127_c.1129delinsTTTGC	p.R376fs*55		0,21	Nangalia J(8)
		c.1151_1154delinsCATGTC	p.D384fs*47		0,21	Chi J(151)
3 bp	0,42	c.1143_1154delinsTCCTTGTCU	p.E381fs*48		0,21	Nangalia J
4bp	0,42	c.1120_1123del	p.K374fs*55		0,42	Klampfl T, Chi J
		c.1135_1152delinsCCTCCTCTTTGTC	p.E379fs*50		0,21	Klampfl T
5bp	36.27	c.1154_1155insTTGTC	p.K385fs*47	18,2	34,38	Klampfl T, Nangalia J, Chi J
		c.1154delinsTGTGTC	p.K385fs*47		0,42	Klampfl T
		c.1151A>G;1154_1155insTTGTC	p.D384fs*48		0,21	Klampfl T
		c.1154_1155insATGTC	p.E386fs*46		0,21	Klampfl T
		c.1154_delinsCTTGTC	p.K385fs*47		0,21	Klampfl T
		c.1154_delinsTTTGTC	p.K385fs47		0,21	Klampfl T
		c.1155_1156insTGTCG	p.E386fs*46		0,21	Klampfl T
		c.1154_1155insGTGTC	p.E386fs*46		0,21	Nangalia J,

Boyut	Total Frekans	cDNA değişikliği	Protein Değişikliği	Çalışma frekansları (%)	Frekans (%)	Referans
		c.1153_1154delinsTCTTGTC	p.K385fs*47		0,21	Nangalia J,
7bp	0,63	c.1120_1131delinsTGCGT	p.K374fs*54		0,21	Klampfl T
		c.1137_1154delinsCCATCCTTGTC	p.E379fs*49		0,21	Klampfl T
		c.1113_1125delinsTTGTCT	p.E371fs*57		0,21	Chi J
10bp	0,21	c.1120_1129del	p.K375fs*52		0,21	Nangalia J
19bp	0,84	c.1118_1136del	p.D373fs*51		0,21	Klampfl T
		c.1120_1138del	p.K374fs*50		0,21	Klampfl T
		c.1122_1141delinsA	p.K375fs*49		0,21	Klampfl T
		c.1113A>C;C.1122_1140	p.E371fs*53		0,21	Rumi E(50)
22bp	0,42	c.1118_1145delinsCGTTTA	p.D373fs*50		0,21	Klampfl T
		c.1131_1152del	p.E378fs*45		0,21	Klampfl T
31bp	0,84	c.1110_1140del	p.E371fs*49		0,42	Klampfl T, Nangalia J
		c.1115_1145del	p.D373fs*47	9,1	0,21	Nangalia J,
		c.1110_1140del;1145C>G	p.E371fs*49		0,21	Chi J
34bp	3,56	c.1102_1135del	p.K368fs*51		1,26	Klampfl T , Nangalia J
		c.1104_1137del	p.E369fs*50		0,42	Klampfl T
		c.1098_1131del	p.L367fs*52		0,42	Klampfl T, Nangalia J
		c.1100_1134delinsA	p.L367fs*52		0,21	Klampfl T
		c.1101_1134del	p.K368fs*51		0,21	Klampfl T
		c.1102_1135del;1145C>G	p.K368fs*51		0,21	Klampfl T
		c.1102_1137delinsCA	p.K368fs*51		0,21	Klampfl T

Boyut	Total Frekans	cDNA değişikliği	Protein Değişikliği	Çalışma frekansları (%)	Frekans (%)	Referans
		c.1104_1137del;1148A>T	p.E369fs*50		0,21	Klampfl T
		c.1096_1129del	p.R366fs*53		0,21	Nangalia J
		c.1091_1124	p.E364fs*55		0,21	Rumi E
37 bp	0,63	c.1109_1145del	p.E371fs*47		0,42	Klampfl T ,Chi J
		c.1108_1144del	p.E370fs*48		0,21	Klampfl T, Nangalia J
46bp	2,31	c.1095_1140del	p.L367fs*48		1,26	Klampfl T, Chi J
		c.1094_1139del	p.Q365fs*50	9,1	0,84	Klampfl T, Nangalia J
		c.1092G>C;1095_1140del	p.E364fs*51		0,21	Klampfl T
*		c.1100_1145del		18,2		Tez Çalışması
52bp	51,36	c.1092_1143del	p.L367fs*46	36,4	49,9	Klampfl T, Nangalia J, Chi J
		c.1091_1142del	p.E364fs*49		0,42	Klampfl T
		c.1102_1153del	p.k368fs*45		0,42	Klampfl T
		c.1104_1155del	p.K368fs*45		0,21	Klampfl T
		c.1109_1160del	p.E370fs*43		0,21	Nangalia J
		c.1101_1152del	p.K368fs*45		0,21	Rumi E
61bp	0,42	c.1100_c1160del	p.K368fs*42		0,21	Nangalia J
		c.1095_1155del	p.R366fs*44		0,21	Nangalia J
70bp	0,21	c.1107_1176del	p.E370fs*37		0,21	Nangalia J
*		c.1086C>T	Sinonim mut	9,1		Tez Çalışması

Başka bir çalışmada PMF'li hastaların %27'si *CALR* mutasyonuna sahipken bunların sırasıyla %80'i tip 1 ve %11'i tip 2'dir (191).

Kim ve arkadaşlarının çalışmasında tip 1 frekansı % 61,1, tip 2 frekansı %27,8 olarak bulunmuştur (171).

Li B ve arkadaşlarının PMF'lilerle yaptığı çalışmada tip-2 mutant olgular, *JAK2* mutant olgularla kıyaslandığında düşük hemoglobin konsantrasyonu, düşük WBC seviyeleri, yüksek kan blastları vardır. Bu olgularda aynı zamanda anormal platelet seviyeleri mevcuttur ve splenomegali yoktur. Avrupa ırklarındaki tersine Çinlilerde Tip-1 ve tip-2 arasındaki oran tersine dönmüştür. *CALR* mutasyonlarının istenmeyen prognostik etkileri Çinli PMF'lilerde sadece tip-2 mutasyonu için söz konusudur (176).

Chen'in çalışmasında toplamda yedi *CALR* mutasyon tipi olup tip 1 *CALR* mutasyonu frekansı %54,5, tip 2 mutasyon frekansı ise %27,3'tür. Hastalardan birinin tip 2 *CALR* mutasyonuna ek olarak düşük allel yükünde *JAK2V617F* (%0.025) mutasyonunu barındırdığı bulunmuştur. Buna ek olarak sonuç proteini mutant tip 6 *CALR*'in aminoasit sekansına eş olan yeni bir mutasyon bulmuşlardır (187).

Nunes'un çalışmasında tüm hastalardaki en yaygın *CALR* mutasyonu tip 1 (p.L367fs*46)'dir (32.1%) ve bunu tip 2 (p.K385fs*47) mutasyonu (%21.4) takip etmiştir. Diğerleri tip 32 (p.K385fs*46) ve tip 40 (p.K375fd*49), ve bir tane de novel mutasyondur (1125delA). ET hastalarında tip2 mutasyon gösterilmemiştir (173).

Xiumen ve arkadaşlarının çalışmasında 4 farklı tip *CALR* mutasyonu tanımlanmıştır (tip1, n=17; tip 2, n=16; tip3 c.1094_1139del46bp, n=4; tip4 c.1103_1136del34bp, n=1) (178).

Yaptığımız çalışmada literatürdekilere benzer şekilde (bkz Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4) en sık mutasyon %36,4 ile c.1092_1143del *CALR* tip 1 mutasyonudur (bkz Tablo 4.9). Bunu %18,2 ile *CALR* tip 2 mutasyonu ve %18,2 ile [c.1100_1145del] mutasyonları izlemiştir.

2 hastada (%18,2) daha önce tanımlanmamış c.1100_1145del mutasyonu bulunmuştur. Bu mutasyonun Klampfl (9)'ın çalışmasında

tanımlanmış p.L367fs*48 protein değişikliği yapan c.1095_1140del mutasyonunun aminoasit sekansına eş olan yeni bir mutasyon olduğu düşünülmektedir. Bunun doğrulanması için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

CALR tip1 mutasyonu sadece erkek cinsiyet ile ilişkili bulunmuştur.

PMF hastalarında tek bir mutasyon gözlenmiş olup bu mutasyon da *CALR* c.1092_1143del (tip 1) mutasyonudur.

Çalışmamızda iki hastada *CALR* geni ekzon 9'daki delesyonlara ek olarak 8 ve 9. ekzonlar arasında yer alan intron bölgesinde duplikasyonların varlığı dikkat çekmektedir. 46 bp'lık delesyona karşı bu bölgedeki 47 bp'lık duplikasyon ve 52 bp'lık ekzon bölgesindeki delesyona karşılık intron bölgesindeki 53 bp'lık duplikasyon; mevcut mutasyonları kompanse etmek için organizmanın ortaya koyduğu savunma mekanizması olarak değerlendirilebilir. Bu hastalar ET tanısıyla takipli olup, erkektir.

MPN'de *CALR* mutasyonlarının orjinal tanımı hastalığın fenotipi ve sonucu üzerindeki belirgin etki hakkında bilgi vermiştir (8, 9). Ufkumuzu açan 2 makaladan birinde, *CALR* mutasyonu olan ET hastaları *JAK2* mutasyonlu emsalleriyle karşılaştırıldığında, yüksek platelet sayısı, düşük lökosit sayısı, düşük hemoglobin düzeyi, yüksek fibrotik transformasyon insidansı, düşük tromboz riski ve daha uzun yaşam göstermişlerdir. Yazarlar aynı zamanda *CALR* mutasyonlu PMF'lerin *JAK2* mutasyonlu olgularla karşılaştırıldığında yüksek platelet sayısı, düşük lökosit sayısı , düşük hemoglobin sayısı ve daha iyi survival (sağ kalım) gösterdiklerini raporlamışlardır (9).

Tefferi'nin çalışmasında PMF'te mutant *CALR* ve *JAK2* mutasyonları da genç yaş, düşük hemoglobin düzeyi , düşük hastalık riski, düşük DIPSS-plus skoru, yüksek platelet sayısı, düşük anemi , düşük lökositoz ve spliceosom mutasyonu ile ilişkili bulunmuştur (136). *CALR* mutant hastalar sağ kalım üzerine olumlu etkiye sahip olup, daha az anemiktir, transfüzyon ihtiyaçları ve lökositoz görülmesi riski düşüktür (136).

PMF ve ET'nin ikisinde de *CALR* mutasyonları tanı sırasında genç olma , daha az ciddi sitopeni ve daha iyi bir prognoz göstermeye eğilimindedir (9).

Tablo 4.2. Yapılan Çalışmalarda PV ve MPN Hastalarında JAK2, MPL ve CALR Mutasyon Frekansı.

MPN Tipi	Çalışmayı Yapan	Ref No:	Sayı	JAK2V617F	JAK2 ekzon 12	MPLW515K/L	CALR tip1	CALR tip2	JAK2/MPL(-)lerde CALR	Hem JAK2(+) hem CALR(+)
PV	Qiao ve diğ.	(184)	37 PV	91,90%	2,70%	Çalışılmamış	0%			
	Kim ve diğ.	(171)	58PV				0%			
	Pardanini ve diğ.	(80)	242 PV			%0				
	Ha ve diğ.	(181)	36 PV	86,1%	0%	0%	0%		0%	
	Wu ve diğ.	(192)		82,50%	12,50%	0%	0%			
	Pikman ve diğ.	(5)	10 PV			0%				
	L-Mercado ve diğ.	(183)	8 PV	62,50%	0%	0%	0%			
	Bu çalışma		78 PV	71,80%	Çalışılmamıştır	0%	0%			
MPN	Lundberg ve diğ.	(1)	197 MPN	69%			15%			
	Ha J-S ve diğ.	(181)	168 MPN	64,3%	0%	3%	16,7%		28%	1 hasta
	Rumi E ve diğ.	(177)	617 MPN	64,7%		4,0%	22,7%			
	Beer PA ve diğ..	(81)	200 ET/PMF			8,50%				
	Qiao C S ve diğ.	(184)	301 MPN	52,2%			24,3%			
	Akpınar ve diğ.	(169)	77 MPN			2,6% -JAK2(-) 4,8%				
	Nunes ve diğ.	(173)	65 MPN	55,40%		1,50%	27,70%	62,10%		
	Klampfl ve diğ.	(9)	1107 MPN				17%			
	Bu çalışma		168 MPN	70,9%	Çalışılmamıştır		6,5%		40,7%	

Tablo 4.3. Yapılan Çalışmalarda ET Hastalarında JAK2, MPL ve CALR Mutasyon Frekansı.

MPN Tipi	Çalışmayı Yapan	Ref No:	Sayı	JAK2V617F	JAK2 ekzon 12	MPLW515K/L	CALR tip1	CALR tip2	JAK2/MPL(-)lerde CALR	Hem JAK2(+) hem CALR(+)
ET	Klampfl ve diğ.	(9)	311 ET				25%		67,00%	
	Nangalia ve diğ.	(8)	151 MPN						82,00%	
	Tefferi ve diğ.	(179)	402 ET	57%	Tanımlanmamış	3,00%	16%	14%		
	Chen ve diğ..	(187)	147 ET	63,90%	Tanımlanmamış	2,70%	22,5%		67,3%	
	Rumi ve diğ.	(50)	717 ET	62%	0%	4,00%	11,30%	9,30%	63,10%	
	Al Assaf C. ve diğ.	(182)	103 JAK2(-)ET			12,00%	34,00%	7,00%	63,70%	
	Pardanini ve diğ.	(80)	318 ET			1,00%				
	Vanucchi Am AE ve diğ.	(121)	994 ET			3,00%				
	Pikman ve diğ.	(5)	50 ET			%0				
	Qiao ve diğ.	(184)	222 Et	45,50%	Çalışılmamış	0,90%	%14,0	%10,4	57,00%	
	É. Pósfaı ve diğ.	(186)	101 Et	60,00%		3,96%				
	Ha ve diğ.	(181)	114 ET	59,60%	0%	4,40%	21,90%		58,50%	1 hasta
	Wu ve diğ.	(192)		56,30%	0%	5,10%	25%			
	Kim ve diğ.	(171)	79 ET				18%			
	Fu ve diğ.	(172)	436 ET	55,10%		1,70%			52,70%	2
	Xiumen ve diğ.	(178)	150 ET	61,30%	3%		25,30%		70,40%	
	Nunes ve diğ.	(173)	21 ET						30,00%	
	Akpınar ve diğ.	(169)	66 ET	43,90%	Çalışılmamış	0,00%	Çalışılmamış			
	Rotunno ve diğ.	(146)	576 ET				15,50%		48,90%	

MPN Tipi	Çalışmayı Yapan	Ref No:	Sayı	JAK2V617F	JAK2 ekzon 12	MPLW515K/L	CALR tip1	CALR tip2	JAK2/MPL(-)lerde CALR	Hem JAK2(+) hem CALR(+)
	Andrikovics ve diğ.	(175)	289 ET	53,00%		3,00%	33,00%			
	AM Vanucchi GR ve diğ..	(82)	994 ET			JAK2(-) 3,00%				
	Pardanani ve diğ.		318 ET			1,00%				
	Li N ve diğ.	(170)	234 ET						53,00	
	Gangat ve diğ.	(78)	300 ET	53,30%		3,00%	32,00%			
	Mercado ve diğ.	(183)	14 ET	36,00%	0,00%	7,10%	21,00%	7,00%		
	Bu çalışma		79 ET	70,90%		0,00%	30,00%	20,00%	43,47%	

Tablo 4.4. Yapılan Çalışmalarda PMF Hastalarında JAK2, MPL ve CALR Mutasyon Frekansı.

MPN Tipi	Çalışmayı Yapan	Ref No:	Sayı	JAK2V617F	JAK2 ekzon 12	MPLW515K/L	CALR tip1	CALR tip2	JAK2/MPL(-)lerde CALR	Hem JAK2(+) hem CALR(+)
PMF	Klampfl ve diğ.	(9)	203 PMF				35,00%		88,00%	
	Nangalia ve diğ.	(8)	151 MPN						80,00%	
	Li ve diğ.	(176)	357 PMF				21,00%		43,00%	
	Qiao ve diğ.	(184)	33 PMF	60,60%	0%	0,00%	3,00%	6,10%	30,08%	
	Xia ve diğ.	(185)	30 PMF	50,00%	0%	6,70%	Tanımlanmamış			
	Kim ve diğ.	(171)	54 PMf				14,80%			
	Guglielmelli ve diğ..	(168)	217 PMF			8, 20%				
	Tefferi ve diğ.	(193)		54,70%	Çalışılmamış	Çalışılmamış	21,00%	%2,8		
	Nunes ve diğ.	(173)	21 ET						80%	
	Pikman ve diğ.		45 PMF			9,00%				
	Ha ve diğ..	(181)	18 PMF	50,00%	0,00%	0,00%	16,70%	33,30%		
	Li N. ve diğ.	(170)	50 PMF						56,00%	
	Andrikovics ve diğ.	(175)	99 PMF	57,00%		7,00%	25,00%			
	Akpınar ve diğ.	(169)	11 PMF	54,50%	Çalışılmamış		Tanımlanmamış			
	Mercado ve diğ.	(183)	4 PMF	25,00%	0%	0%	0,00%	25,00%		
	Sazaval ve diğ.	(180)	80 PMF				11,20%		25,70%	
	Tefferi ve diğ.	(136)	254 PMF	58,00%		8,30%	25,00%		74%	
	Bu çalışma		11 PMF	63,60%			9,10%	0%	25%	

4.2.2. *CALR*-mutant/*JAK2V617F*-mutant Değerlendirilmesi

Nunes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *CALR* mutasyonu taşıyan hastalar *JAK2V617F* mutant hastalara göre daha yüksek platelet sayısına ve daha düşük splenomegali frekansına; üç mutasyon negatif hastalar da *JAK2V617F* taşıyanlara göre daha yüksek platelet seviyelerine sahip bulunmuşlardır.

PMF’de *CALR* mutantlar *JAK2V617F* mutantlara göre daha düşük RBC, düşük Hgb seviyesi, düşük Hct, düşük c-reactive protein seviyesi ve düşük splenomegaliye sahiptir. Ayrıca, *CALR* mutant PMF hastaları *JAK2V617F* mutantlar ile kıyaslandığında daha düşük trombotik olay frekansına sahiptir. *CALR* mutantlar *CALR* wild tip ile karşılaştırıldığında C-reactive protein seviyeleri ve splenomegali varlığı wild tipte daha yüksektir.

CALR mutasyonu taşıyan ET hastaları *JAK2V617F* mutantlara göre daha yüksek platelet sayısına sahiptir ve MPET’de *CALR* mutasyonuna sahip olanlar *JAK2V617F* mutantlardan daha yüksek body mass indekse sahiptir (173).

Al Asaf ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *CALR* mutasyonlu ET hastaları *JAK2V617F* mutant ile kıyaslandığında daha genç yaş, daha yüksek platelet sayısı, düşük lökosit sayısı, düşük eritrosit sayısı, düşük hgb ve düşük hct değerleri ve artmış miyelofibrozis progresyon riski ile ilişkili bulunmuştur. 60 yaş ve altı hastalarda *CALR* tip 1 mutasyonları erkek cinsiyetle ilişki bulunmuştur. *CALR* mutasyonlular *JAK2 V617F* pozitif hastalara göre daha iyi sağ kalım göstermiştir (182).

Tayvan’da gerçekleştirilen çalışmada *CALR* mutant ET hastalarının *JAK2* mutantlarla karşılaştırıldığında daha genç, düşük lökosit sayısı, yüksek platelet sayısı ve düşük tromboz riski ile karakterize olduğu görülmüştür. *CALR* mutasyonlarının ET hastalarında trombozsuz sağ kalım üzerinde iyi etkisi olduğu değerlendirilmiştir. *CALR* mutasyonlularda genç yaşın (<60 yıl), ve düşük platelet sayılarının ($<1,000 \times 10^9/L$) bağımsız olarak ET hastalarında daha uzun trombozsuz sağ kalımla ilişkili olabileceği öngörülmüştür (187).

Hintli PMF hastalarında yapılan çalışma sonrası CALR mutasyonları genç yaş ve daha büyük splenomegali ile ilişkilendirilmiştir. CALR mutasyonu ile PMF hastaları IPSS skorlaması veya klinik durum ile hematolojik parametreler arasında ilişki bulunamamıştır (180).

Ha JS ve arkadaşlarının çalışmasında CALR mutant ET hastalarının JAK2 mutantlara göre daha genç ve düşük lökosit sayısına sahip olduğu bulunmuştur. Hgb ve PLT yönünden gruplar arası fark yoktur. PMF’de ise iki grup arasında bu parametreler yönünden belirgin fark saptanamamıştır (181).

Rumi ve arkadaşlarının çalışmasında CALR mutant hastalar belirgin şekilde genç, düşük lökosit sayısı, yüksek platelet sayısı ve düşük IPSS riskine sahip, üç mutasyon olmayan grup ise ileri yaş, düşük Hgb değeri, düşük PLT sayısı ve yüksek IPSS riskine sahip bulunmuştur. CALR mutantların JAK2V617F mutantlara göre daha az anemi oluşumu, daha düşük tromboz riski, daha düşük trombositopeni insidansı ve daha uzun aşırı büyük splenomegali olmadan yaşam gösterdikleri bulunmuştur.(177)

Çin’de yapılan bir çalışmaya göre de JAK2V617F hastalarıyla kıyaslandığında CALR mutant hastaların düşük lökosit, düşük granülosit sayısı ve düşük Hgb düzeyi ve düşük pozitif endojen eritroid koloni (EEC) ama yüksek platelet sayısına sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda CALR pozitif grup JAK2 pozitif gruba göre yüksek megakaryosit proliferasyonu ve düşük eritropoez de gösterir. Üç mutasyon negatif grup CALR ve JAK2 pozitif gruplar arasında ortalama lökosit, Hgb ve PLT sayısına ve ortalama megakaryosit proliferasyonu ve eritropoeze sahiptir (172).

Polonya’da 184 MPN hastasında yapılan çalışmada CALR mutant ET hastaları JAK2V617F mutantlara göre daha genç, Hgb seviyeleri ve WBC sayıları daha düşük ve PLT sayıları daha yüksek olarak bulunmuştur. CALR mutant PMF hastalarında JAK2V617F mutantlara göre anemi seviyeleri daha az ciddi bulunmuştur (194).

ET’lular arasında yapılan çalışmada Hgb seviyeleri ve lökosit sayısı CALR mutant hastalarda JAK2V617F mutantlara göre belirgin daha düşük, CALR mutant hastalarda ortalama yaşı triple negatif hastalardan belirgin daha yüksek bulunmuştur (178).

Rotunno'nun geniş bir hasta grubunda yaptığı çalışmasında *CALR* mutant hastaların *JAK2* ve *MPL* mutantlarla karşılaştırıldığında daha genç, çoğunlukla erkek, daha yüksek PLT sayısı ve daha düşük Hgb ve lökosit sayısı olduğu bulunmuştur. Bu mutasyonunun sağ kalım veya post-ET MF dönüşümü üzerinde etkisi bulunmamıştır (146).

JAK2 mutant hastalarla karşılaştırıldığında *CALR* mutant hastalar daha genç ve daha yüksek platelet seviyelerine sahip olarak bulunmuştur. *CALR* mutant ET'lu hastalarda yaşam süreleri değişmezken daha düşük venöz tromboz oluşum riski göstermişlerdir. *CALR* mutant PMF'li hastalarda ise *JAK2* pozitif veya üç mutasyon negatif olanlardan daha iyi bir sağ kalım saptanmıştır. Tip 2 *CALR* mutasyonu ET'de PMF'den daha yaygın olarak bulunmuştur. ET'de *CALR* mutasyon yükü *JAK2* mutasyon yükünden daha fazladır ve ilerleyen evrelerde kademeli olarak artar. ET'de *CALR* mutasyon yükü tanı sırasındaki kan sayımını etkiler (175).

Kim'in çalışmasında 84 ET hastasından *CALR* mutantlar, *JAK2V617F* mutantlarla kıyaslandığında yüksek platelet sayısı ve düşük lökosit sayısı ile ilişkili bulunmuştur. 50 PMF hastasında *CALR* mutantlar *JAK2V617F* mutantlarla kıyaslandığında ise yüksek platelet sayısı ve düşük sitogenetik anormallik oranı ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir (171).

Tefferi'nin çalışmasında *CALR* mutant hastalar *JAK2* mutantlarla kıyaslandığında; her iki tip *CALR* mutasyonunun da yüksek platelet, düşük hemoglobin ve lökosit sayısı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (179).

Labastida-Mercado ve arkadaşlarını yaptığı bir çalışmada *CALR* mutant MPN'ler *JAK2V617F* ve üç mutasyon yönünden negatif olanlarla kıyaslandığında düşük WBC gözlenmiştir. *JAK2V617F* mutantlarda ise daha yüksek tromboz frekansı görülmüştür (183).

Bizim çalışmamızın sonuçları da diğer çalışmalara paralel şekilde *CALR* mutasyonu pozitif olgularda *JAK2* mutasyonu pozitif hastalara göre Hct ve RBC değerleri anlamlı düşük iken PLT değeri anlamlı yüksektir. Yaş, Hgb ve WBC yönünden aralarında fark yoktur.

CALR mutasyonu pozitif olgularda üç mutasyon negatif olan gruba göre Hct , Hgb ve RBC değerleri anlamlı düşük iken PLT değeri anlamlı yüksektir. Yaş, ve WBC yönünden aralarında fark yoktur.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ve literatür çalışmalarının sonuçları Tablo 4.5, Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de özetlenmiştir.

4.2.1. JAK2V617F ve CALR mutasyon beraberliği

Na Xu ve arkadaşları PV’sı olan ve interferon alfa tedavisi ile hematolojik remisyonda olan bir hastada JAK2V617F mutasyonuna ek olarak CALR c.1095-1097del,p.E371fs*49 mutasyonu raporlanmışlardır. Aynı ekip heterozigot JAK2V617F mutasyonuna ek olarak CALR’in ekzon 9’unda 52 bplik delesyon olan (c.1092_1143del olarak tanımlanan) ikili mutasyonların beraberliğini göstermişlerdir (195). Bunun dışında bir PMF ve iki ET hastasında da CALR mutasyonu ve JAK2V617F mutasyon beraberliği gösterilmiştir (1, 136). İki veya daha fazla mutasyonun birlikte bulunması total sağ kalımı ciddi şekilde azalttığı ve akut myeloid lösemi dönüşüm riskini arttırdığı ortaya konmuştur. Hastalığın erken evreleri ile ileri evreleri arasında mutasyon oranı yönünden belirgin farklılıklar saptanmamış olması MPN’de mutasyon oranının düşük olduğunu düşündürmüştür (1).

Tablo 4.5. ET hastalarında CALR mutasyonunun varlık veya yokluk durumuna göre fenotipe etkileri-1

Referans Numarası	Tez	E.postai ve diğ. (186)	Klampt ve diğ.(9)	HaJS ve diğ.(181)	Al Assaf C ve diğ.(182)	Rumi E ve diğ.(177)	Xiumen ve diğ.(178)
Hasta sayısı	79	101	311	114	103	617	150
CALR(+) Hasta Yüzdeleri	%12,7	%3	%25	%21	%63,7	%22,7	%25,3
Hematolojik karakter							
Düşük Hgb/Hct	Evet		Evet	Hayır	Evet		Evet
Düşük WBC	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet
Yüksek PLT	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet	Evet	
Klinik Karakter							
Genç yaş	Hayır	Evet		Evet	Evet	Evet	
Cinsiyet							
Hastalık seyri							
Palpabl splenomegali							
Düşük trombotik olay			Evet			Evet	
MF'ye ilerleme					Evet		
Daha iyi sağkalım			Evet		Evet		
AML'ye ilerleme					Evet		
Düşük IPSS risk						Evet	
Yüksek fibrotik transformasyon			Evet				

Tablo 4.6. ET hastalarında CALR mutasyonunun varlık veya yokluk durumuna göre fenotipe etkileri-2

Referans Numarası	Rotunno ve diğ.(188)	Nunes ve diğ.(173)	Andrikovics ve diğ.(175)	Fu Rx ve diğ.(172)	L-Mercado ve diğ.(183)	Kim ve diğ.(171)	Chen ve diğ.(187)
Hasta sayısı	576	23	289	436	14	79	147
CALR(+) Hasta Yüzdeleri	%15,5	%57	%33		%29	%17,7	%22,5
Hematolojik karakter							
Düşük Hgb/Hct	Evet			Evet			
Düşük WBC	Evet			Evet	Hayır	Evet	Evet
Yüksek PLT	Evet	Evet	Evet	Evet		Evet	Evet
Klinik Karakter							
Genç yaş	Evet		Evet				Evet
Cinsiyet	Erkek						
Hastalık seyri							
Palpabl splenomegali							
Düşük trombotik olay		Hayır	Evet		Evet		Evet
MF'ye ilerleme	Hayır						
Daha iyi sağkalım	Hayır		Hayır				
AML'ye ilerleme							
Düşük IPSS risk							
Yüksek fibrotik transformasyon							

Tablo 4.7. PMF hastalarında CALR mutasyonunun varlık veya yokluk durumuna göre fenotipe etkileri

Referans Numarası	Tez	E.postai ve diğ.(186)	Ha JS ve diğ.(181)	Klampfl ve diğ.(9)	Nunes ve diğ.(173)	Hindlilerdana ve diğ.(196)	Tefferi ve diğ.(179)	Kim ve diğ.(171)	Tefferi A. ve diğ.(136)
Hasta sayısı	11	101	18	150	60	80	80	54	254
CALR(+) Hasta Yüzdeleri	%9,1	%3	%16,7	%49	%48	%11,2	%47	%14,8	%25
Hematolojik karakter									
Düşük Hgb/Hct			Hayır		Evet	Hayır	Hayır		Hayır
Düşük WBC		Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır		Hayır
Yüksek PLT		Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet
Klinik Karakter									
Genç yaş		Evet	Hayır		Hayır	Evet	Evet		Evet
Cinsiyet			Hayır		Hayır				
Hastalık seyri					Hayır		Evet		
Palpabl splenomegali						Evet			
Düşük trombotik olay					Evet		Hayır		
Düşük sitogenetik anormallik							Hayır	Evet	
Düşük DIPSS skoru									Evet

4.2.2. JAK2-mutant/JAK2-wt Değerlendirilmesi

ET'lu hastalarda JAK2 mutantlarda: yüksek total WBC ve yüksek Hgb seviyesi (197), düşük PLT sayısı ve bu mutasyon olmayanlara nazaran daha yüksek PV transforme olma ihtimali mevcuttur (198, 199).

Pósfai ve arkadaşlarının çalışmasında JAK2V617F mutantlarda, JAK2V617F negatif olanlara göre artmış PLT, Hgb, RBC, Hct seviyeleri ve hepatomegali saptanmıştır. JAK2V617F mutasyon durumu ile müteakip trombotik komplikasyon arasında ilişki bulunamamıştır (186).

Campbell ve arkadaşlarının ET hastaları üzerinde yaptığı çalışmasında JAK2V617F mutasyon frekansı %53 olarak saptanmıştır ve JAK2 mutantlar, mutasyon olmayanlara göre daha yüksek Hgb düzeyi, nötrofil sayısı, kemik iliği eritropoezi ve granülopoezi, venöz tromboz ve polistemik dönüşüm oranı göstermişlerdir (200).

Williams DM ve arkadaşlarının çalışmasında 157 PV hastasının %94'ü JAK2V617F pozitifdir, negatiflerin ise %3'ü JAK2 ekzon 12 pozitifdir. JAK2 negatif grup pozitiflerle karşılaştırıldığında ortaya çıkış yaşları, hastalık seyri , aile öyküsü, cinsiyet veya splenomegali frekansı gibi veriler yönünden fark saptanmamıştır.

32 PMF hastasının %47'si JAK2V617F pozitif olup negatif grupla karşılaştırıldığında her iki grupta da erkek dominantlığı görülmektedir. JAK2 negatif grupta ET öncülü insidansı daha yüksekken, pozitif grupta daha yüksek beyaz küre sayısı vardır (201).

30 PMF hastalık çalışmada JAK2V617F mutantlar, olmayanlara göre daha yüksek platelet sayısına ve kemik iliğinde daha fazla megakaryosit sayısına sahiptir (185).

107 ET ve 77 PMF Türk hasta ile yapılan çalışmada PMF'li JAK2V617F mutant hastaların mutasyon yükünün ET'ye göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yüksek JAK2V617F allel yükü olan ET hastaları ile düşük Hgb ve Hct, yüksek LDH ve daha belirgin splenomegali ile ilişki bulunmuştur. Yüksek JAK2V617F allel yükü olan ET hastaları düşük mutasyon yükü ve wild-tip mutasyon olanlarla kıyaslandığında daha yüksek kanama frekansı, daha yüksek DVT oranı saptanmıştır. Yüksek JAK2V617F

allel yükü olan PMF hastalarında ise daha yüksek Hgb, Hct seviyeleri ve daha yüksek lökosit sayısı ile ilişki bulunmuştur (196).

320 *JAK2V617F* mutant PV hastası ile yapılan başka bir çalışmada ise mutant allel yükü ile hemoglobin konsantrasyonu, WBC, dalak büyüklüğü, yaş ve kemik iliği selülaritesi arasında doğrusal bir ilişki varken platelet sayısı ile arasında ters bir ilişki söz konusudur (127).

Bizim çalışmamızda da literatürdekine benzer (50, 57) şekilde *JAK2V617F* pozitif PV'lı hastaların mutasyon yükü ET'ye göre anlamlı daha yüksektir.

PV hastalarında yüksek *JAK2V617F* allel yükü ile yaş arasında Passomonti'nin çalışmasıyla (127) paralel şekilde direkt ilişki varken ($p=0,012$) Türkiye'de yapılan çalışmaya paralel şekilde (196) de düşük *JAK2V617F* allel yükü olan ET hastaları ile yüksek hematokrit ve yüksek *JAK2V617* mutasyon yükü olan ET hastalarında da yüksek LDH gözlenmiştir (sırasıyla $p=0,03$ ve $p=0,05$) (bkz Tablo 4.8).

Tablo 4.8. ET hastalarında *JAK2V617F* allelinin varlık veya yokluk durumuna göre fenotipe etkileri. Vanucchi(121)'den uyarlanmıştır.

Referans Numarası	Tez	(200)	(202)	(199)	(197)	(198)	(125)	(186)
Hasta sayısı	79	776	130	150	60	176	639	101
<i>JAK2V617F</i> (+)Hasta Numarası (%)	56 (70,9)	414 (53)	74 (57)	73 (49)	29 (48)	96 (55)	382 (60)	60 (60)
Hematolojik karakter								
Yüksek Hgb/Hct	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet
Yüksek WBC	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır
Düşük PLT	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Hayır
Klinik Karakter								
İleri yaş	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır
Cinsiyet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	
Hastalık seyri		Hayır	Hayır	Hayır	Hayır		Hayır	
Palpabl splenomegali	Hayır	Evet		Hayır		Hayır	Evet	Evet
Major Kardiovasküler olay		Hayır		Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
Küçük damar hastalığı				Hayır		Hayır		
Major hemoraji		Hayır	Hayır	Hayır			Hayır	Hayır
Kemoterapi tedavisi				Hayır			Hayır	
MF'ye ilerleme		Hayır	Hayır	Hayır			Hayır	
AML'ye ilerleme		Hayır		Hayır			Hayır	
PV'ya ilerleme		Evet		Evet		Hayır	Hayır	
Total sağ kalım		Hayır		Evet		Hayır		

SONUÇ VE ÖNERİLER

GATA Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD başvuran myeloproliferatif neoplazi tanılı olgularda (PV,ET, PMF) retrospektif olarak yaptığımız çalışmada, hastaların yaşları, cinsiyetleri, organomegali bulguları, rutin tetkiklerinde değerlendirilmiş olan hemogram değerleri, saptanan *JAK2*, *CALR* ve *MPL* gen mutasyon sonuçları kaydedilmiştir. Myeloproliferatif neoplazili olgular *JAK2* ve *CALR* gen mutasyon analiz sonuçlarına göre gruplandırılmış ve saptanan mutasyonla hastalık ilişkisi değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda DNA dizi analizi yöntemi ile yapılan inceleme sonucunda hastalarda *MPL* geni ekzon 10'da mutasyon saptanmamış, 11 (%6,5) hastada *CALR* mutasyonu saptanmıştır. *JAK2V617F* ve *MPL* ekzon 10 mutasyonu negatif olan grupta ise *CALR* mutasyon frekansı, totalde % 40,74 iken ET için %43,47, PMF için %25 bulunmuştur. Bu yüksek frekans *CALR*'in ET ve PMF'de *JAK2/MPL* negatif hastaların tanısında *JAK2* mutasyonu gibi belirgin seçiciliği ve yüksek frekansı nedeniyle tanısal marker olarak değerlendirilebileceğini ortaya koyar.

JAK2V617F, *CALR* ekzon 9 mutasyonu taşıyan ve taşımayan hastalarda; yaş, hemoglobin, lökosit değerleri ve organomegali durumu ile mutasyon varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken *CALR* mutasyonu pozitif olgularda *JAK2* mutasyonu pozitif hastalara göre Hct ve RBC değerlerinin anlamlı düşük, platelet sayısı anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu durum *CALR* mutasyonunun fenotipik görünümünün *JAK2V617F* mutasyonundan farklı olduğunu ortaya koyar ki bu gerçek, hastalıkların prognozunun da etkilenebileceğini bu durumda da farklı alt tiplerin tanımlanması gerekliliği ortaya çıkarır.

Elde edilen veriler MPN patogenezinde ve tanısal sınıflandırmasında, *CALR* geninin rolünün ortaya konması açısından bir ön bulgu niteliğindedir. Bu konuda hasta sayısının arttırılarak daha uzun süreli klinik takip ile farklı hastalık tablolarına dönüşüm gerçekleşen olgularda *CALR* gen mutasyonlarının bu dönüşüme etki eden bir faktör olup olmadığı konusunda daha detaylı bilgi elde edilebilecektir.

Ayrıca çalışmamızda altı *CALR* mutasyon tipinden yeni bulunan c.1100_1145del mutasyon saptanan olgularda *CALR* geninin klonlaması, eksprese edilen hücrelerde protein değişikliğini ortaya konmasına olanak sağlayacaktır.

Literatürde ülkemizde ulaşabildiğimiz çalışmalar arasında *CALR* geni ekzon 9'da DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyon taraması yapılan başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. *JAK2/MPL/CALR* mutasyonu negatif hastaların oranına bakarak tanı kriterlerine katkıda bulunacak yeni genetik markerların saptanması için farklı popülasyonlarda yapılacak daha çok vakanın incelendiği geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Ayrıca myeloproliferatif neoplaziler üzerindeki ileri moleküler araştırmalar hastalığın biyolojisinde önemli ilerlemelere neden olmuştur. Böylece bu hastalıklar için ilk hedef tedavi JAK inhibitörleri bulunmuştur. MPN'deki birçok genomik değişiklik ve hastalığın klonal kompleksliği klinisyenlere zorluk oluşturduğu gibi, bulunan bu genetik değişiklikler tedavi için hedef oluşturup MPN hastaları için yüzgüldürücü çözümlerin ve umut vaaden tedavi yönetimlerinin ortaya çıkarılmasına olanak tanıyabilir veya incelenen *CALR* gibi moleküllerin karakteristik özellikleri ortaya konarak klinisyenlere hangi tedaviyi seçeceği veya hastalık tanısı ve prognozu hakkında fikir verebilir.

KAYNAKLAR

1. Lundberg P. KA, Nienhold R., Looser R., Hao-Shen H., Nissen I., Girsberger S, Lehmann T., Passweg J, Stern M., Beisel C., Kralovics R., Skoda RC. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. . Blood. 2014;123(14):2220–8.
2. James C. UV, Le Couedic JP. ve diğerleri. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive sig-nalling causes polycythaemia vera. Nature. 2005;434(7037):1144-8.
3. Levine RL. WM, Cools J. ve diğerleri. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell. 2005;7(4):387-97.
4. Scott LM., Tong W., Levine RL. ve diğerleri. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med. 2007;356(5):459-68.
5. Pikman Y. Lee BH., Mercher T. ve diğerleri. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med. 2006;3(7):e270.
6. Goldman JM., Melo J. Chronic myeloid leukemia - advances In biology and new approaches to treatment. New Engl J Med. 2003;349(15):1451- 64.
7. Deiniger MW., Goldman J., Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96 (10):3343-56.
8. Nangalia J., Massie C., Baxter EJ ve diğerleri. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med 2013;369:2391.
9. Klampfl T. GH, Harutyunyan AS., Nivarthi H., Rumi E., Milosevic JD. ve diğerleri Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med 2013;369:2379–90.
10. Gunsilius E. Gastl G., PetzerA.L. Hematopoietic stem cells. Biomed Pharmacother. 2001;55 : 186-94
11. Takashina T. Haemopoiesis in the human yolk sac. J Anat 1987;151:25~35.
12. Papayannopoulou T SD. Stem-cell ecology and stem cells in motion. 2008;111:3923.
13. Szilvassy SJ. The Biology of Hematopoietic Stem Cells. Hematology, 23. 2003;(03/124).
14. Damashek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood. 1951;6(4):372-5.
15. Vainchenker W. Delhommeau F., Constantinescu SN. ve Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Blood. 2011;118(7):1723-35.

16. Tefferi A ve diğerleri. WHO Classification of MPNs. Cancer 2009:DOI: 10.1002/cncr.24440.
17. Tefferi A. Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. J Clin Oncol 2011;29:573–82.
18. Vainchenker W., Delhommeau F., Constantinescu SN., Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Blood. 2011;Volume 118, Number 7
19. Delhommeau F., Pissani D., James C., Casadevall N., Constantinescu S., Vainchenker W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. Cell Mol Life Sci. 2006;63(24):2939-53.
20. Campbell PJ., Green AR. The myeloproliferative disorders. N Engl J Med. 2006;7;355(23):2452- 66.
21. Swerdlow SHCE., Harris NL., Jaffe ES., Pileri SA., Stein H., Thiele J. ve diğerleri. WHO Classification Of Tumours Of Haematopoietic And Lymphoid Tissues. IARC press. 2008:40-53.
22. Vardiman JW. TJ, Arber DA., Brunning RD., Borowitz M.J, Porwit A. ve diğerleri. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114(5): 937–51.
23. Vanucchi AM., Barbui T., Cervantes F., Harrison C., Kladjian JJ.,Kröger N.,Thiele J.,Buske C. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology 2015;26:85-99.
24. Tefferi A. CME Information: Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and management. American Journal of Hematology,. 2015;Vol. 90, No. 2.
25. Calabretta B. Perrotti D. The biology of CML blast crisis. Blood. 2004;103:4010-22.
26. Frazer R. Irvine AE., McMullin MF. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. Ulster Med J 2007;76 (1) 8-17.
27. Smith A. HD, Patmore R. ve diğerleri. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. Br J Cancer. 2011;105:1684.
28. Konopka JB., Witte ON. Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. Mol Cell Biol 1985;5:3116.
29. Fainstein E., Marcelle C., Rosner A. ve diğerleri. A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia. Nature. 1987;330:86.
30. Druker BJ., Moshe T., Resta DJ., Peng B., Buchdunger E., Ford JM. ve diğerleri. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL

tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2001;344(14):1031-7.

31. Peggs K, Mackinnon S. Imatinib mesylate - the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2003;348(11):1048-50.
32. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian H.M. The biology of chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med*. 1999;341(3):164-72.
33. Damon A, Halub DA. Host factors in polycythemia vera. *Ann Intern Med*. 1958;49:3-60.
34. Martyre MC. TGF-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 1995;20:39-44.
35. Prchal JT, Beutler E. New York: McGraw-Hill. Primary and Secondary Polycythemia (Erythrocytosis). *Williams Hematology*. 2006:779-802.
36. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A. ve diğeri. The 2008 WHO Diagnostic Criteria for Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia, and Primary Myelofibrosis. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2009;4:33-40.
37. Passamonti F, ML, Orlandi E. ve diğeri. Polycythemia vera in young patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia. *Haematologica* 2003;88:13.
38. Tefferi A, RE, Finazzi G. ve diğeri. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013;27:1874.
39. Kutti J, Riddel B. Epidemiology of the myeloproliferative disorders. Essential thrombocythemia, polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Pathol Biol*. 2001;49(2): 164-6.
40. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB ve diğeri. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol* 1986;23: 132-43.
41. Berk PD, Wasserman LR, Fruchtman SM. ve diğeri. Treatment of polycythemia vera: A summary of clinical trials conducted by the polycythemia vera study group. In: *Polycythemia Vera and the Myeloproliferative Disorders*, 1995:166.
42. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R. ve diğeri. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005;23:2224-32.
43. Saini KS, Patnaik MM, Tefferi A. Polycythemia vera-associated pruritus and its management. *Eur J Clin Invest*. 2010;40:828.

44. van Genderen PJ., Michiels J. Erythromelalgia: a pathognomonic microvascular thrombotic complication in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost.* 1997;23:357.
45. Thoennissen NH., Krug UO., Lee DH. ve diğerleri. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010;115:2882-90.
46. Gruppo Italiano Studio Policitemia: Polycythemia vera. The natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995;123(9):656-6.
47. Tefferi A., Thiele J., Orazi A. ve diğerleri. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood.* 2007;110:1092-7.
48. Barbui T., Thiele J., Passamonti F. ve diğerleri. Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. *Blood.* 2012;119:2239.
49. Tefferi A., Spivak JL. Polycythemia vera: scientific advances and current practice. *Semin Hematol.* 2005;42:206.
50. Rumi E., Pietra D., Ferretti V. ve diğerleri. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood.* 2014.
51. Tefferi A., Sirhan S., Lasho TL ve diğerleri. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol.* 2005;131:66.
52. Tefferi A., Lasho TL., Schwager SM. ve diğerleri. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer.* 2006;106:631.
53. Gangat N., Strand J., Li CY.ve diğerleri. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol.* 2007;138:354.
54. Zwicky C., Theiler L., Zbären K. ve diğerleri. The predictive value of clonogenic stem cell assays for the diagnosis of polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 2002;117:598.
55. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am J Hematol.* 2011;86:668.
56. Scott LM. Beer P, Bench AJ. ve diğerleri. Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 2007;139:511.
57. Scott LM. SM, Campbell P.J, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood.* 2006;108:2435.

58. Georgii A., Buesche G., Kreft A. The histopathology of chronic myeloproliferative diseases. *Baillière's Clin Haematol.* 1998;11:721-49.
59. Elliott MA., Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2005;128:275-90.
60. Streiff MB., Smith B., Spivak JL. The diagnosis and management of polycythemia vera in the era since the Polycythemia Vera Study Group: a survey of American Society of Hematology members' practice patterns. *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1144-9.
61. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: Why does it matter. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 27. 2014:129-140.
62. Schafer AI. Thrombocytosis. *N Engl J Med.* 2004;350:1211.
63. Harrison CN. Current trends in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2002;117:796.
64. Taksin AL., Couedic JP., Dusanter-Fourt I ve diğerleri. Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocythemia and idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L. *Blood.* 1999;93:125.
65. El-Kassar N., Hettet G., Brière J., Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis and thrombopoietin levels in patients with essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma.* 1998;30:181.
66. Mesa RA., Silverstein M., Jacobsen SJ., ve diğerleri. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol.* 1999;61:10.
67. Gugliotta L ve diğerleri. Epidemiological, diagnostic, therapeutic, and prognostic aspects of essential thrombocythemia in a retrospective study of the GIMMC group in two thousand patients. *Blood.* 1997;90:348a.
68. Fenaux P., Simon M., Caulier MT. ve diğerleri. Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases. *Cancer.* 1990;66:549.
69. Tefferi A., Fonseca R., Pereira DL., Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc.* 2001;76:22.
70. Kurzrock R ve Cohen PR. Erythromelalgia and myeloproliferative disorders. *Arch Intern Med* 1989;149:05.
71. Cortelazzo S., Vierro P., Finazzi G. ve diğerleri. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol.* 1990;8:556.
72. Tefferi A., Guglielmelli P., Larson DR. ve diğerleri. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood.* 2014;24(16):2507-13. .

73. Tefferi A., Wassie E., Lasho TL. ve diğerleri. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2014.
74. Barbui T., Thiele J., Passamonti F. ve diğerleri. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: An international study. *J Clinl Oncol* 2011;29(3):3179–84.
75. Tefferi A., Ho TC., Ahmann G. ve diğerleri. Plasma interleukin-6 and C-reactive protein levels in reactive versus clonal thrombocytosis. *Am J Med.* 1994;97:374.
76. Mughal TI., Barbui T., Abdel Wahab O., Kralovics R., Jamieson C., Kvanicka HM., Mullaly A., Rampal R., Mesa R., Kiladjian JJ., Deininger M, Prchal J., Hehlmann L., Saglio G., Van Etten RA. Novel Insights into the Biology and Treatment of Chronic Myeloproliferative Neoplasms *Leukemia and lymphoma* 2015;56(7):1938-48.
77. Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. . *Blood* 2006: 107:4214.
78. Gangat N., Wolanskyj AP., McClure RF. ve diğerleri. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: A single institutional study of 605 patients. *Leukemia.* 2007;21(2):270–6.
79. Levine RL., Belisle C., Wadleigh M. ve diğerleri. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. . *Blood* 2006;107:4139.
80. Pardanani AD., Levine RL., Lasho T. ve diğerleri. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472.
81. Beer PA., Campbell PJ., Scott LM. ve diğerleri. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008;112:41.
82. Vannucchi AM., Antonielli E., Guglielmelli P. ve diğerleri. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood.* 2008;112:844.
83. Rumi E., Pietra D, Ferretti V. ve diğerleri. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood.* 2014.123(10):1544-51
84. Stoll DB., Peteroson P., Exten R. ve diğerleri. Clinical presentation and natural history of patients with essential thrombocythemia and the Philadelphia chromosome. *Am J Hematol* 1988;27:77.
85. Tefferi A., Losho T., Wolanskyj AP., Mesa RA. . Neutrophil PRV-1 expression across the chronic myeloproliferative disorders and in secondary or spurious polycythemia. *Blood.* 2004;103:3547.

86. Thiele J., Kvasnicka H., Tefferi A. ve diğerleri. Primary myelofibrosis. In: WHO Classification of Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press. 2008:44.
87. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia N Engl J Med. 2000;342:1255.
88. Reilly JT., McMullin M., Beer PA. ve diğerleri. Guideline for the diagnosis and management of myelofibrosis. Br J Haematol. 2012;158:453.
89. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol 2013;88:141.
90. Visani G. Finelli C, Castelli U. ve diğerleri. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. Br J Haematol 1990;75:4.
91. Barbui T., Carrobbio A., Cervantes F. ve diğerleri. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. Blood 2010 115:778.
92. Valla D., Cassadeval N., Huisse MG. ve diğerleri. Etiology of portal vein thrombosis in adults. A prospective evaluation of primary myeloproliferative disorders. Gastroenterology 1988;94:1063.
93. DiBella NJ., Silverstein MN., Hoagland HC Effect of splenectomy on teardrop-shaped erythrocytes in agnogenic myeloid metaplasia. Arch Intern Med 1977;137:380.
94. Thiele J., Kvasnicka H., Werden C. ve diğerleri. Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact. Leuk Lymphoma 1996;22:303.
95. Koike K., Matsuda K. Recent advances in the pathogenesis and management of juvenile myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol. 2008;141:567.
96. Aricò M., Biondi A., Pui CH. Juvenile myelomonocytic leukemia. Blood 1997;90:479.
97. Taborraki A. ve Tiu RV. Molecular Genetics of Myelofibrosis and its associated Disease Phenotypes. Translational Medicine. 2014;8:53-64.
98. Tefferi A., Losho T., Schwager SM. ve diğerleri. The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinival correlates. BrJ Haematol. 2005;131;320.
99. Rampal R., Levine RL. A primer on genomic and epigenomic alterations in the myeloproliferative neoplasms. Best Practice & Research Clinical Haematology 27. 2014:83-93.
100. Cervantes F. Dupriez B., Pereira A. ve diğerleri. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. . Blood. 2009 113:2895-901.

101. Ballen KK., Shrestha S., Sobocinski KA. ve diğerleri. Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:358-67.
102. Passamonti F., Cervantes F., Vannucchi AM. ve diğerleri. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: A study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment. *Blood* 2010;115:1703-8.
103. Kishimoto T., Taga T., Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell*. 1994;76:253-62.
104. Taniguchi T. Cytokine signaling through non-receptor tyrosine kinases. *Science*. 1995;268:251-5.
105. Stevan R Hubbard and Jeffrey H. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*. 2000;69: 373-98.
106. Sun H., Tonks NK. The coordinated action of protein tyrosine phosphates and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 1994;303: 1800-5.
107. Sushil G., Rane ve Premkumar E. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. . *Reddy Oncogene* 2000;19: 5662-79.
108. Yamaoka K., Saharinen P., Pesu M., Holt VE., Silvennoinen O., O'Shae JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 2004;324: 1155- 64.
109. Jatiani S., Baker S., Silverman LR. ve Reddy E. P. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer* 2010;1(10) 979–93.
110. Jeffrey G. Williams. STAT signalling in cell proliferation and in development. . *Current Opinion in Genetics & Development* 2000;10:503–7.
111. Chatterjee-Kishore M., van den Akker F, Stark G. Association of STATs with relatives and friends. . *Trends Cell Biol*. 2000;10:106-11.
112. Benekli M., Baer MR., Baumann H. ve Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*. 2003;101:2940-54.
113. Wells JA., de Vos AM. Hematopoietic receptor complexes. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:609-34.8,9
114. Imada K.Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology*. 2000;37:1-11.
115. Baker SJ., Rane SG., Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007;26(47):6724-37.
116. Kisseleva T., Bhattacharya S., Braunstein J., Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285:1- 24.

117. Witthuhn BA., Quielle FW., Silvennoinen O. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 1993;74:227-36.
118. Parganas E., Wang D., Stravopodis D. ve diğerleri. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. . *Cell*. 1998;93:385-95.
119. Baxter EJ., Scott L., Campbell PJ. ve diğerleri. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-6.
120. Jamieson CH., Gotlib J., Durocher JA. ve diğerleri. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6224-9.
121. Vannucchi AM., Antonielli E., Guglielmelli P. ve diğerleri. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: A critical reappraisal. *Leukemia* 2008.
122. Kralovics R., Passomonti F., Buser AS. ve diğerleri. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352::1779-90.
123. Lacout C., Pisani DF., Tulliez M. ve diğerleri. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006;108:1652-60.
124. Scott L.M., Beer PA., Bench A.J., Erber W.N. ve Green A.R. Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*. 2007;139, 504–13
125. Vannucchi AM., Antonielli E., Guglielmelli P. ve diğerleri. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;110:840.
126. Lasho TL., Tefferi A., Hood JD. ve diğerleri. TG101348, a JAK2-selective antagonist, inhibits primary hematopoietic cells derived from myeloproliferative disorder patients with JAK2V617F, MPLW515K or JAK2 exon 12 mutations as well as mutation negative patients. *Leukemia*. 2008;22(9):1790–2.
127. Passamonti F., Rumi E., Pietra D. ve diğerleri. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: The impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. . *Leukemia*. 2010;24(9):1574–9.
128. Pasquier F., Cabagnols X., Secardin L., Plo I., Vainchenker W. Myeloproliferative Neoplasms: JAK2 Signaling Pathway as a Central Target for Therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014;14(23):23-35.
129. Lasho TL., Pardanani A., Tefferi A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2010;363:1189.

130. Butcher CM., Hahn U., To LB. ve diğerleri. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia*. 2008;22:870.
131. Passamonti F., Elena C., Schnittger S. ve diğerleri. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011;117:2813.
132. Gold LI., Eggleton P., Sweetwyne MT. ve diğerleri. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease *FASEB J*. 2010;24:665–83.
133. Michalak M., Robert Parker JM., Opas M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 2002;32 (5–6), 269–78.
134. Guglielmelli P., Bartalucci N., Rotunno G. ve Vannucchi AM. Calreticulin: a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms *Expert Rev Hematol*. 2014;7(4):423–5.
135. Guglielmelli P., Nangalia J., Green AR., Vannucchi AM. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: Hidden behind the reticulum *American Journal of Hematology*. 2014;89:5:453-6.
136. Tefferi A., Lasho T., Finke CM. ve diğerleri. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-7.
137. Jethmalani SM., Henle K.J. Calreticulin associates with stress proteins: implications for chaperone function during heat stress. *J Cell Biochem* 1998;69, 30–43.
138. Michalak M., Corbett EF, Mesaeli N., Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem*. 1999;344: 281–92.
139. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F. ve diğerleri. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13:54-61.
140. Tarr JM., Winyard PG., Ryan B., Harries LW., Haigh R., Viner N., Eggleton P. Extracellular calreticulin is present in the joints of patients with rheumatoid arthritis and inhibits FasL (CD95L)-mediated apoptosis of T cells. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2919-29.
141. Mery L., Mesaeli N., Michalak M., Opas M., Lew DP., Krause K-H. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 1996;271: 9332–9.
142. Nakamura K., Zuppini A., Arnaudeau S. ve diğerleri. Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol*. 2001;154: 961–72.
143. Corbett EF Michalak Km, Oikawa K ve diğerleri. The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum lumenal environment. *J Biol Chem*. 2000;275: 27177–85.

144. Cazzola M. ve Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms *Blood*. 2014;123:24.
145. Mughal TI., Barbui T., Abdel-Wahab O., Kralovics R., Jamieson C., Kvasnicka HM., Mullaly A., Rampal R., Mesa R., Kiladjian J.J., Deininger M., Prchal J., Hehlmann R., Saglio G., Van Etten RA. Novel Insights into the Biology and Treatment of Chronic Myeloproliferative Neoplasms* *Leukemia & Lymphoma* 2014;doi: 10.3109/10428194.2014.974594.
146. Rotunno G., Mannarelli C, Guglielmelli P. ve diğerleri. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014;123(10):1552-5.
147. Tefferi A., Thiele J., Vannucchi AM. ve Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2014.
148. Rumi E., Harutyunyan AS., Pietra D., Milosevic J.D, Casetti IC., Bellini M. ve diğerleri. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;123(15):2416-9.
149. Luca Malcovati., Elisa Rumi. ve Mario Cazzola. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms *Italy haematology*. 2014:113944.
150. Rampal R., Al-Shahrour F., Abdel-Wahab O. ve diğerleri A-SF, Abdel-Wahab O. ve diğerleri. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*. 2014;123(22):e-e33.
151. Chi J. Nicolaou K., Nicolaidou V. ve diğerleri Calreticulin exon 9 frame-shift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia*. 2013.
152. Chi J., Manoloukos M., Pierides C., Nicolaidou V., Nicolaou K., Kleopa M., Vassiliou G. ve Costea P. . Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms and new methodology for their detection and monitoring. . *Ann Hematol* 2014;94:399-408.
153. Verger EC., Dosquet C., Andreoli A., Schlagater MH., Chomienne C., Kiladjian JJ. Clinical and Molecular Response to Interferon Alpha Therapy in Essential Thrombocythemia Patients with CALR Mutations. *Haematologica*. . 2014;99(s1):529.
154. Passamonti F., Caramazza D., Maffioli M. JAK inhibitor in CALR-mutant myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1168-9.
155. Le Coniat M., Souyri M., Vigon I., Wendling F., Tambourin P., Berger R. The human homology of the myeloproliferative virus maps to chromosome band 1p34. *Hum Genet*. 1989;83:194 – 6.
156. Kuter D. ve Begley C.G. KDvB. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood*. 2002;100:3457-69.

157. Drachman JG., Kaushansky K Structure and function of the cytokine receptor superfamily. *Curr Opin Hematol* 1995;2:22-8
158. Lee T-S., Kantarjian H., Wanlong M., Yeh C-H., Giles F., Albitar M. Effects of clinically relevant MPL mutations in the transmembrane domain revealed at the atomic level through computational modeling. *PLOS ONE*. 2011;6(8): 23396.
159. Pardanani A., Lasho T, Finke CM. ve diğerleri. Extending JAK2V617F and MPL515 mutation analysis to single myeloid colonies and T and B lymphocytes. *Stem Cells*. 2007;25:2358 – 62.
160. Kaushansky K., Ranney HM. Thrombopoietin in normal and neoplastic stem cell development. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22:495e9.
161. Jerald Z. Gong JRC, Timothy C. Greiner, Cyrus Hedvat, Charles E. Hill, Megan S. Lim, Janina A. Longtine, Daniel Sabath, and Y. Lynn Wang. Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms A Report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013;15:6.
162. Gong JZ., James C., Greiner TC., Hedvat C., Hill CE., Lim MS., Longtine JA., Sabath D., Wang YL. JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms A Report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2013;15:733-44.
163. Chaligne R., Tonetti C., Besancenot R., Roy L., Marty C., Mossuz P. ve diğerleri. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*. 2008;22(8):1557-66.
164. Vannucchi AM. Rotunno G, Bartalucci N., Raugei N., Carrai V., Balliu M., Mannarelli C., Pacilli A., Calabresi L., Fjerza R., Pieri L, Bosi A., Manfredini R. ve Guglielmelli P. . Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia* 2014;28(9):1811-8.
165. Moliterno AR., Williams DM., Gutierrez-Alamillo LI., Salvatori R., Ingersoll RG., Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 11444 – 7.
166. Ding J., Komatsu H., Wakita A. ve diğerleri . Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103:4198 – 200.
167. Steensma DP., Caudill JS., Pardanani A., McClure RF., Lasho TL., Tefferi A. MPL W515 and JAK2 V617 Mutation Analysis in Patients With Refractory Anemia With Ringed Sideroblasts And An Elevated Platelet Count *Haematologica*. 2006;91:(11)e155-e6.
168. Guglielmelli P. Pancrazzi A, Bergamaschi G., Rosti V., Villani L., Antonioli E., Bosi A., Barosi G.ve Vannucchi A.M. Anaemia characterises

patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *British Journal of Haematology* 2007;137, 244–7.

169. Akpınar T S., Hançer V S., Naçacı M., Diz-Küçükkaya R. MPL W515 L/K Mutations in chronic Myeloproliferative Neoplasms *Turk J Hematol.* 2013;30:8-12.

170. Li N., Yao QM., Gale RP., Li JL. ve diğerleri. Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2(V617F) or MPL mutations. *Leukemia Research.* 2015;39:510–4.

171. Kim SY., Im K., Park SN., Kwon J., Kim JA., Lee DS. CALR, JAK2, and MPL mutation profiles in patients with four different subtypes of myeloproliferative neoplasms: primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myeloproliferative neoplasm, unclassifiable. *Am J Clin Pathol* 2015;5:143:635-44.

172. Fu R., Xuan M., Zhou Y. ve diğerleri. Analysis of calreticulin mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia: clinical implications in diagnosis, prognosis and treatment. *Leukemia.* 2014;28:1912-4.

173. Nunes DP., Lima L., Chauffaille Mde L., Mitne-Neto ., Santos M., Cliquet MG., Guerra-Shinohara EM. CALR mutations screening in wild type JAK2(V617F) and MPL(W515K/L) Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2015;55:236-40

174. Gangat N., Wassie EA., Lasho TL., Finke C., Ketterling RP., Hanson CA., Pardanani A., Wolanskyj AP., Maffioli M., Casalone R., Passamonti .F, Tefferi A.. Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia: prognostic interaction with age and thrombosis History. *Eur J Haematol.* 2015;94(1):502-9.

175. Andrikovics H., Krahling T., Balassa K., Halm G., Bors A. ve diğerleri. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations . *Haematologica* 2014;99(7)

176. Li B., Xu J., Wang J., Gale RP., Xu Z., Cui Y. ve diğerleri. Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis. *Haematologica.* 2014;99 (11):1697-700.

177. Rumi E., Pietra D., Pascutto C., Guglielmelli P., Martinez-Trillos A., Casetti I. ve diğerleri. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(7):1062-9.

178. Xiuwen Z., Min Z., Hongying C., Xuzhang L., Ling C. CALR gene mutation detection and clinical observation of 150 essential thrombocythemia patients. *Chin J Hematol.* 2015;36:5.

179. Tefferi A., Wassie E., Guglielmelli P. ve diğerleri. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol.* 2014;89(8):121-4.

180. Sazawal S., Singh N., Mahapatra M., Saxena R. Calreticulin mutation profile in Indian patients with primary myelofibrosis. *Hematology*. 2015.
181. Ha JS. Kim YK. CALR exon 9 mutations in MPNs *Ann Lab Med*. 2015;35:22-7.
182. Al Assaf C., Van Obbergh F., Billiet J., Lierman E., Devos T., Graux .4, Hervent AS., Emmerechts J. ve diğerleri. Analysis of phenotype and outcome in essential trombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica*. 2015;100(7) 893-7.
183. Labastida-Mercado N., Galindo-Becerra S., Garces-Eisele J., Colunga-Pedraza P.,Guzman-Olvera V., Reyes-Nunez V., J Ruiz-Delgado .G,J Ruiz Argüelles G. The mutation profile of JAK2, MPL and CALRin Mexican patients with philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Haematol Oncol Stem Cell Ther*. 2015.
184. Qiao C., Sun C., Ouyang Y., Wang JJ., Qian SX., Li JY., Zhang SJ. Clinical importance of different calreticulin gene mutation types in wild-type JAK2 essential thrombocythemia and myelofibrosis patients. *Haematologica* 2014;182-4.
185. Xia J., Lu M-Z., Jiang Y-G., Yang G-H., Zhuang Y., Sun H-I., Sen Y-F. JAK2 V617F, MPLW515L and JAK2 Exon 12 Mutations in Chinese patients with Primary Myelofibrosis. *Chin j Cancer Res*. 2012;24(1):72-6.
186. Pósfai É. Marton I, Király PA., Kotosz B., Kiss-László Z., Széll M., Borbényi Z. JAK2 V617F, MPL, and CALR mutations in essential thrombocythaemia and major thrombotic complications: a single-institute retrospective analysis. *Pathol Oncol Res*. 2015: 21:751–8.
187. Chen CC., Gau J., Chou H.J, You JY., Huang CE., Chen YY., Lung J., Chou YS., Leu YW., Lu CH., Lee KD., Tsai YH. Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. . *Ann Hematol*. 2014.
188. Rotunno G. Mannarelli C, Guglielmelli P. ve diğerleri. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*. 2014;123(10):1552-5.
189. Rumi E., Pietra D, Ferretti V, ve diğerleri: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123(10):1544-51.
190. Cabagnols X Defour J, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J. ve diğerleri. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2014

191. Tefferi A, Lasho T, Finke C. ve diğerleri. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*. 2014;28(7):1568-70.
192. Wu Z., Zhang X., Xu X., Chen Y., Hu T., Kang Z ve arkadaşları, . The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome- negative myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol*. 2014;7:48.
193. Tefferi A ve Pardanani A. Genetics: CALR mutations and a new diagnostic algorithm for MPN. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(3):125–6.
194. Wojtaszewska M., Iwola M., Lewandowski K. . Frequency and Molecular Characteristics of Calreticulin Gene (CALR) Mutations in Patients with JAK2-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Acta Haematol*. 2015;133(2):93-8.
195. Xu N. ve Ding L. A report on the co-occurrence of JAK2V617F and CALR mutations in myeloproliferative neoplasm patients. *Ann Hematol*. 2015;94:865-7.
196. Hindilerdena I-Y., Daglar-Adaya A., Akadam -Tekera B, Yilmaza C, Nalcacia M, Yavuza A-S, Sargina D. The Burden of JAK2V617F Mutated Allele in Turkish Patients With Myeloproliferative Neoplasms. *J Clin Med Res* 2015;7(3):161-70.
197. Cheung B., Radia D., Pantelidis P. ve diğerleri The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2006;132:244.
198. Kittur J., Knudson R., Lasho TL. ve diğerleri. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* 2007;109:2279.
199. Wolanskyj AP., Lasho TL., Schwager SM. ve diğerleri. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. . *Br J Haematol*. 2005;131:208.
200. Campbell PJ., Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT ve arkadaşları. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366: 1945–53.
201. Williams DM., Kim AH., Rogers O., Spivak JL., Moliterno AR. . Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol*. 2007;35(11):1641-6.
202. Antonioli E., Guglilemelli P., Pancrazzi A., Bogani C., Verrucci M., Ponziani V. ve arkadaşları. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005;19: 1847–9.