

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE
GEN EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİ**

İLDENİZ USLU

**DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. SELÇUK SÖZER TOKDEMİR**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi İlideniz USLU tarafından Yard. Doç. Dr. Selçuk SÖZER TOKDEMİR 'in danışmanlığında hazırlanan "Miyeloproliferatif Neoplazilerde Gen Ekspresyon Değişimleri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 15/08/2016 tarihinde yapılan Tez savunma Sunavında oy çokluğu ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Nihan ÜNALTUNA
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE Genetik A.D



Prof. Dr. Ranan Gülhan AKTAŞ
Maltepe Ün.Tıp Fak. Histoloji ve Emb.A.D.



Doç. Dr. Müge SAYITOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE Genetik A.D.



Prof. Dr. Akif Selim YAMUZ
İ.Ü. Tıp Fak. İç Hastalıkları A. D.



Yard. Doç. Dr. Selçuk S. TOKDEMİR
İ.Ü.DETAE Aziz Sancar Genetik A.D.
(Danışman)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

İldeniz USLU

İTHAF

Ani ve acı kaybımız, rahmetli Yard. Doç. Dr. Kenan ATEŞ' e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince benimle daima bilgisini, sabrını, emeğini paylaşan, her türlü imkanı sağlayan bir an olsun desteğini esirgemeyen ve her zaman iyi ki buradayım dedirten, kendime idol olarak gördüğüm tez danışmanım Yard. Doç. Dr. Selçuk Sözer Tokdemir' e,

Çalışmalarımızda kullandığımız hasta kanlarını temin etmemizi sağlayan İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı' ndan Prof. Dr. Akif Selim Yavuz' a

Çalışmalarındaki yardım ve desteklerinden ötürü ekip arkadaşlarım Hilal Hekimoğlu ve Cemil Altunay' a,

Tezimin teknik ve deneysel konularındaki yardımları için, Emrah Yücesan ve Özkan Özdemir' e,

Bu süreçte desteğini esirgemeyip bu süreci beraber yaşadığım arkadaşlarım Gamze Güven, Yeşim Kesim, Khusan Khoadzaev, Sarya Tunç ve Ebru Özer, Sinem Şişko ve Burak İşlek' e

Yanımda olamasa bile her zaman varlığını hissettiren bana desteği çok büyük olan Sevcan Mercan' a,

Hayatımın her anında olduğu gibi bu önemli zamanında da beni hep güldürmeyi başaran, olumsuzlukların olumlu yönlerine daha fazla bakabilmemi sağlayan, bir an olsun desteğinden şüphe ettirmeyen Ergün Bıçak' a

Akademik yolda ilerlemem için her zaman bana destek olup en küçük başarılarımla bile gururlanan, hayatımın her anında ihtiyacım olan desteği sağlayan çok değerli aileme,

Son olarak da katkıları için miyeloproliferatif neoplazi hastalarına,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 51224

Ayrıca bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 112S483



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Miyeloproliferatif Neoplaziler	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Sınıflandırma.....	3
2.1.3. JAK- STAT Sinyal İleti Sistemi	4
2.1.4. Janus Kinaz 2	6
2.2. Hematopoietik Kök Hücre	9
2.3. Kanser Kök Hücresi	10
2.4. Miyeloprolifetaif Neoplaziler Görülen Farklı Gen Mutasyonları.....	13
2.4.1. JAK2 Ekzon 12 Mutasyonu.....	13
2.4.2. MPL Mutasyonları	13
2.4.3. TET2 Mutasyonları	14
2.4.4. CALR Mutasyonları.....	14
2.5. Çalışmada Analiz Edilen Genler.....	15
2.5.1. MYC Geni.....	15
2.5.2. F2R Geni	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastalar	19

3.1.2. Deneylerde kullanılan Kontrol Örnekleri	19
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.1.4. Kullanılan Kitler	21
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	22
3.1.6. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Mononükleer Hücre İzolasyonu.....	24
3.2.2. Hücre Dondurma.....	25
3.2.3. Hücre Çözdürme	25
3.2.4. Hücre Ayırımı (Sorting).....	25
3.2.5. Hücrelerden DNA İzolasyonu.....	26
3.2.6. İki Aşamalı Allel Spesifik Nested PZR	27
3.2.7. Agaroz Jelde Görüntüleme.....	30
3.2.7.1. Agaroz Jelin Hazırlanması	30
3.2.7.2. Jelin Yüklenmesi Ve Görüntülenmesi	30
3.2.8. RNA İzolasyonu.....	31
3.2.8.1. Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyonu	31
3.2.8.2. Hücre Kompartmanlarında RNA İzolasyonu.....	32
3.2.9. Ters Transkriptaz PZR	33
3.2.10. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (Q-PCR).....	35
3.2.11. Gen Anlatım Verilerinin İstatiksel Analizi	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Hücre Ayırma (sorting) Sonuçları	40
4.2. DNA İzolasyon Sonuçları	42
4.2.1. Mononükleer Hücrelerden DNA İzolasyon Sonuçları.....	42
4.2.2. Hücre Kompartmanlarının DNA İzolasyon Sonuçları.....	43
4.3. RNA İzolasyon Sonuçları	45
4.3.1. Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyon Sonuçları	45
4.3.2. Hücre Kompartmanlarının RNA İzolasyon Sonuçları	46
4.4. İki Aşamalı Allel Spesifik Nested PZR Sonuçları	48
4.5. Gen Anlatım Sonuçları	53
4.5.1. <i>F2R</i> Gen Anlatım Sonuçları.....	54
4.5.2. <i>MYC</i> Gen Anlatım Sonuçları	56

5. TARTIŞMA	60
6. KAYNAKLAR	65
FORMLAR	75
ETİK KURUL KARARI	79
ÖZGEÇMİŞ	80



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Hücre Hatları.....	19
Tablo 3-2: Hastaların Klinik Parametreleri	20
Tablo 3-3: Kullanılan kimyasal maddeler.	21
Tablo 3-4: Kullanılan kitler.	22
Tablo 3-5: Kullanılan cihazlar.	22
Tablo 3-6: Hücre sayımı	24
Tablo 3-7: Allel Spesifik Nested PZR 1. Aşama bileşenleri	28
Tablo 3-8: İki aşamalı PZR 1. aşama koşulları.....	28
Tablo 3-9: İki aşamalı PZR için tasarlanan primer setleri	29
Tablo 3-10: Allel Spesifik Nested PZR 2. aşama bileşenleri	29
Tablo 3-11: Allel spesifik Nested PZR 2. aşama koşulları.....	30
Tablo 3-12: Kalıp RNA/ Primer Karışımı	34
Tablo 3-13: Reaksiyon Karışımı.....	34
Tablo 3-14: cDNA Sentez Koşulları.....	35
Tablo 3-15: Kantitatif gerçek zamanlı PZR Reaksiyon Bileşenleri	37
Tablo 3-16: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı	37
Tablo 3-17: <i>MYC</i> , <i>F2R</i> ve <i>ACTB</i> Primer Dizileri	38
Tablo 4-1: Mononükleer Hücrelerden DNA İzolasyonu	43
Tablo 4-2: CD133 ⁻ CD34 ⁺ CD45 ⁻ Hücre Kompartmanının DNA İzolasyon Sonuçları .	43
Tablo 4-3: CD133 ⁺ CD34 ⁺ CD45 ⁻ Hücre Kompartmanının DNA İzolasyon Sonuçları.	44
Tablo 4-4: CD133 ⁻ CD34 ⁻ CD45 ⁻ Hücre Kompartmanının DNA İzolasyon Sonuçları....	44
Tablo 4-5: CD133 ⁺ CD34 ⁻ CD45 ⁻ Hücre Kompartmanının DNA İzolasyon Sonuçları ...	45
Tablo 4-6: Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyon Sonuçları	45
Tablo 4-7: CD133 ⁻ CD34 ⁺ CD45 ⁻ Hücre Kompartmanının RNA İzolasyon Sonuçları ...	46
Tablo 4-8: CD133 ⁺ CD34 ⁺ CD45 ⁻ Hücre Kompartmanının RNA İzolasyon Sonuçları...	47
Tablo 4-9: CD133 ⁻ CD34 ⁻ CD45 ⁻ Hücre Kompartmanının RNA İzolasyon Sonuçları....	47
Tablo 4-10: CD133 ⁺ CD34 ⁻ CD45 ⁻ Hücre Kompartmanının RNA İzolasyon Sonuçları .	48
Tablo 4-11: Hücre ayırma sonrası her bir kök hücre kompartmanında elde edilen hücre sayılarının yüzdelerinin ortalaması.	48

Tablo 4-12: Hastaların Mononükleer Hücre ve Kök Hücre Kompartmanlarının <i>JAK2V617F</i> mutasyon durumu.	53
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO) 2008 yılındaki revizyonuna göre Miyeloproliferatif Neoplazilerin sınıflandırılması.....	4
Şekil 2-2: JAK- STAT Sinyal İleti Sistemi	6
Şekil 2-3: JAK'ın yapısı	8
Şekil 3-1: <i>F2R</i> geni ekspresyon analizi için PZR bileşenleri	36
Şekil 3-2: <i>MYC</i> geni ekspresyon analizi için PZR bileşenleri	36
Şekil 3-3: Referans gen <i>Beta-Aktin</i> geni ekspresyon analizi için PZR bileşenleri	37
Şekil 4-1: Heterozigot karakterde olan hastanın hücre ayrımı (sorting) sonuçları	40
Şekil 4-2: Yabani tip karakterde olan hastanın hücre ayrımı (sorting) sonuçları	41
Şekil 4-3: Kordon kanının hücre ayrımı (sorting) sonuçları.....	42
Şekil 4-4: Hasta 7- Hasta 8 MNH ve hücre kompartmanlarının nested pqr jel görüntüsü	49
Şekil 4-5: Hasta 10- Hasta 11 MNH ve hücre kompartmanlarının nested pqr jel görüntüsü	49
Şekil 4-6: Hasta 15 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pqr jel görüntüsü	50
Şekil 4-7: Hasta 23 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pqr jel görüntüsü	50
Şekil 4-8: Hasta 26- Hasta 27 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pqr jel görüntüsü	51
Şekil 4-9: Hasta 29- Hasta 34 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pqr jel görüntüsü	51
Şekil 4-10: Hasta 35 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pqr jel görüntüsü	52
Şekil 4-11: Hasta ve kordon kanı mononükleer hücrelerinde <i>F2R</i> gen anlatımı.....	54
Şekil 4-12: Hasta ve kordon kanı CD133 ⁻ CD34 ⁺ kök hücre kompartmanında <i>F2R</i> gen anlatımı	54
Şekil 4-13: Hasta ve kordon kanı CD133 ⁺ CD34 ⁺ kök hücre kompartmanında <i>F2R</i> gen anlatımı	55
Şekil 4-14: Hasta ve kordon kanı CD133 ⁻ CD34 ⁻ kök hücre kompartmanında <i>F2R</i> gen anlatımı	55
Şekil 4-15: Hasta ve kordon kanı CD133 ⁺ CD34 ⁻ kök hücre kompartmanında <i>F2R</i> gen anlatımı	56
Şekil 4-16: Hasta ve kordon kanı mononükleer hücrelerinde <i>MYC</i> gen anlatımı	56

Şekil 4-17: Hasta ve kordon kanı CD133 ⁻ CD34 ⁺ kök hücre kompartmanında <i>MYC</i> gen anlatımı	57
Şekil 4-18: Hasta ve kordon kanı CD133 ⁺ CD34 ⁺ kök hücre kompartmanında <i>MYC</i> gen anlatımı	57
Şekil 4-19: Hasta ve kordon kanı CD133 ⁻ CD34 ⁻ hücre kompartmanında <i>MYC</i> gen anlatımı	58
Şekil 4-20: Hasta ve kordon kanı CD133 ⁺ CD34 ⁻ kök hücre kompartmanında <i>MYC</i> gen anlatımı	58



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AML: Akut Miyeloid Lösemi
ATP: Adenozin Trifosfat
Bç: Baz çifti
CALR: Calreticulin
cDNA: Complementary Deoksiribonükleik Asit
dNTP: Deoksinükleotid Trifosfat
DNA: Deoksiribonükleik Asit
DMSO: Dimetil Sülfoksit
EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Epo: Eritropoietin
EpoR: Eritropoietin reseptörü
ET: Esansiyal Trombostemia
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS: Fetal Bovine Serum
G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor
HEL: Human Erythroleukemia Cell Line
HKH: Hematopoietik Kök Hücre
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Media
JAK2: Janus Kinaz 2
IL: İnterlökin
KEL: Kronik Eozinofilik Lösemi
KML: Kronik Miyeloid Lösemi
KNL: Kronik Nötrofilik Lösemi
LC480: LightCycler 480
MPDs: myeloproliferative diseases
MPN: Myeloproliferatif Neoplazi
mRNA: Messenger Ribonükleik Asit
MHH: Mast Hücre Hastalığı
PBS: Phosphate Buffered Saline
Ph: Philadelphia Kromozomu
PI: Propidium iodide

PMF: Primer Miyelofibroz

PV: Polisistemia Vera

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

qPZR: Quantitative Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA: Ribonükleik Asit

SCF: Stem Cell Factor

SET-2: Essential Thrombocythemia Cell Line

STAT: Signal transducer and activator of transcription

T: Timin

TAE: Tris-acetate-EDTA

TPO: Trombopoietin

TPOR: Trombopoietin reseptörü

TYK2: Tyrosine Kinase 2

UV: Ultra viyole

WHO: World Health Organization

ÖZET

Uslu, I. Miyeloproliferatif Neoplazilerde Gen Ekspresyon Değişimleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2016

Amaç. Miyeloproliferatif Neoplaziler (MPN), BCR-ABL negatif olan, kemik iliğinde bir veya birden fazla kan hücresinin yüksek oranda proliferasyonuna sebep olan klonal kök hücre hastalığıdır. *JAK2V617F* mutasyonunun varlığı MPN tanı kriterlerinden biridir. Bu çalışmada amaç, MPN’de sık görülen *JAK2V617F*’in primitif kök hücre kompartmanlarındaki karakterinin belirlenip mutasyonun başladığı ilk hücrelerin CD133 ve CD34 yüzey markerları aracılığıyla immünofenotipini belirlemek, *MYC* ve *F2R* genlerinin belirlenen hücre kompartmanlarındaki durumunu tespit etmektir.

Yöntem. 11 hasta ve 4 kontrol kordon kanı mononükleer hücrelerinden (MNH), CD133 ve CD34 antikorları kullanarak hücre ayırıcı yardımıyla CD133⁺CD34⁻, CD133⁻CD34⁺, CD133⁺CD34⁺, CD133⁻CD34⁻ kompartmanları izole edildi. MNH ve izole edilmiş kompartmanların DNA’larında *JAK2V617F* allel durumunun belirlenmesi amacıyla allel spesifik nested PZR, RNA’larında ise, *MYC* ve *F2R* genlerinin anlatım düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kantitatif PZR yapıldı.

Bulgu. Kök hücre kompartmanları ve MNH’lerinde *JAK2V617F* karakterinin belirlenmesi için yapılan nested PZR sonucunda MNH’lerinde mutasyon taşıyan hastaların kök hücre kompartmanlarında farklı karakterde mutasyon taşıyabildiği görülmüştür. MNH’lerinde mutasyon taşımayan hastaların ise kök hücre kompartmanlarında mutasyon olmadığı görülmüştür. MNH’ler ve kök hücre kompartmanlarında *F2R* gen ekspresyon analizi sonucunda primitif özellikte olan CD133⁺CD34⁻, CD133⁻CD34⁻ kompartmanında artmış gen anlatımı görülmektedir. *MYC* gen ekspresyon analizi sonucunda ise primitif özellikte olan CD133⁺ CD34⁻ ve CD133⁺CD34⁺ kompartmanında artmış gen anlatımı olduğu belirlenmiştir.

Sonuç. Kök hücre kompartmanlarında mutasyon karakterinin belirlenmesi ile elde edilen bulgular MPN’in kök hücre kaynaklı olduğunu destekler niteliktedir. Özellikle *F2R* geninin primitif özellikte olan kök hücre grubunda ekspresyon artışı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize MPN 'nin CD34⁺ den daha primitif hücre grubundan kaynaklandığını ve *F2R* 'in kanserogenez oluşumunda ve trombotik komplikasyonların gelişmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Miyeloproliferatif Neoplazi (MPN), *JAK2*, Polisitemia Vera, Kök Hücre, CD133, CD34

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 51224

Ayrıca bu çalışma Türkiye Bilimsel Ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 112S483

ABSTRACT

Uslu, I. (2016). Gene Expression Changes in Myeloproliferatif Neoplasms İngilizce Adı. İstanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Genetics. MSc. Thesis. İstanbul. 2016

Objective. Myeloproliferative Neoplasm (MPN) is clonal disease which causes proliferation of one or several types of BCR-ABL negative bone marrow cell. The presence of JAK2V617F is one of the criterias of MPN diagnosis. The aim of this study is to determine the presence of JAK2V617F and the expression levels of MYC and F2R genes in primitive stem cells compartments isolated according to CD133 and CD34 cell surface markers.

Method. CD133⁺CD34⁻, CD133⁻CD34⁺, CD133⁺CD34⁺, CD133⁻CD34⁻ compartments of mononuclear cells (MNCs) from 4 cord blood and 11 patient samples were obtained with cell sorter using CD133 and CD34 antibodies. MNCs and respective compartments were used for DNA to assess JAK2V617F by allele spesific nested PCR and RNA to the assess the MYC and F2R's expression levels by quantitatif real time PCR.

Findings. Nested PCR results indicate that JAK2V617F positive MNC exhibit different genotype characteristics in stem cell compartments. The analysis of F2R gene expression in CD133⁻CD34⁻ and CD133⁺ compartments were found to have elevated F2R gene expression. MYC gene expression analyses revealed that this gene was elevated in CD133⁺ and CD133⁺CD34⁺ cells which are primitive stem cell compartments.

Result. Characterization of genotypes of stem cell compartments indicate that MPN is originating from primitive stem cells. In particular, expression of F2R was found to be elevated in primitive stem cell compartments. These results are indicating that MPN is originating from primitive stem cells in a developmental stage preceding CD34⁺ and that F2R may have critical role in carsenogenesis and trombic complication formations.

Key words: Myeloproliferative neoplasms (MPN), JAK2, Polistemia Vera (PV), Stem cell, CD133, CD34

This project was supported by the Resaearch Fund of İstanbul University. Project No: 51224

This project was also supported by TUBİTAK. Project No: 112S483

1. GİRİŞ VE AMAÇ

BCR- ABL negatif Miyeloproliferatif Neoplaziler (MPN), multipotent hematopoietik kök hücreleri içeren klonal kemik iliği kök hücre bozukluklarıdır. Miyeloid, eritroid ve megakaryositik hücre soylarının artımı ile karakterizedir(1). Philadelphia kromozomu negatif (Ph⁻) neoplaziler grubunda klonal kemik iliği kök hücre bozuklukları olan polisitemia vera (PV), esansiyel trombositoz (ET) ve primer miyelofibrozis (PMF) bulunmaktadır(2).

PV eritroid, miyeloid ve megakaryositik hücre soylarını artması ile karakterizedir. Sıklıkla lökosit ve trombosit artışı da beraberinde görülmektedir. PV hastalarının %30 kadarında post-PV miyelofibrozis olarak bilinen miyelofibroz gelişmektedir. PV hastalarının %10'u akut miyeloid lösemi (AML) transformasyon riski ile karakterizedir(3).

MPN'lerde, bir sitozolik tirozin kinaz olan Janus Kinaz 2 (JAK2)'de meydana gelen mutasyonlar sıklıkla görülmektedir(4). JAK2 geninin 617. amino asidinde Valin'den Fenil Alenin'e dönüşümü ile oluşan V617F mutasyonu MPN'lerde % 50-95 gibi oldukça yüksek oranda görülür(5). V617F, JAK2 geninin hücre uyarını olmadan sürekli aktivasyonuna ve devamlı hücre çoğalmasına sebep olur(6).

JAK2 mutasyonunun belirlenmesi, MPN' nin moleküler patogenezi anlamada önemli bir ilerlemeyi temsil etmektedir. Hastalıklar için yeni bir sınıflandırma ve gelişmeye, yeni tedavi stratejilerinin gelişmesine olanak tanımıştır(7). Gen ekspresyon profili tanımlaması PV patofizyolojisinde ve hastalığın gelişme etyolojisinde önemli olduğu görülmektedir(8).

Hematopoietik kök hücre antijeni olan CD133, kanser kök hücreleri ve kanseri başlatan kök hücreleri için biyolojik belirteç olarak kullanılan bir transmembran proteinidir(9),(10). Hematopoietik progenitör hücre antijeni olan CD34, hematopoietik progenitör hücreler tarafından eksprese edilir. AML' de lösemi başlatıcı hücrelerinin ve lösemi kök hücrelerinin CD34+ hücre kompartmanına sahip olduğu görülmüştür(11).

Bu çalışmadaki hipotez; MPN hastalarında malignite, CD34⁺ kök hücrelerinden daha primitif özellikte olan hücre grubundan başlamaktadır ve MYC, F2R gen ekspresyon değişimlerinin primitif hücrelerde malignitenin başlamasında etkisi vardır.

Bu hipotez doğrultusunda amaç; hematopoietik kök hücrelerden kaynaklı MPN’lerde oldukça sık görülen, hastalığın oluşması ve ilerlemesinde büyük rolü olduğu düşünülen *JAK2V617F* mutasyonunun daha primitif hematopoietik kök hücre kompartmanlarındaki karakterinin belirlenip MPN’lerin kök hücre kompartmanlarındaki allel durumunu analiz etmek ve hastalığın prognozunda etkili olduğu düşünülen *MYC* ve *F2R* genlerinin MPN hastalarındaki ekspresyon seviyelerinin ve kök hücre düzeyinde ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi için bir pilot çalışma gerçekleştirmektir.

F2R, kanserde, anjiyogeneze, inflamasyonda ve trombozis de kritik rol oynayan koagülasyon faktör II reseptörüdür(12). *MYC*, hücre siklusunun ilerlemesinde ve apoptozunda rol alır. Hücre homeostazında ve büyümesinde kritiktir fakat düzensiz regülasyon için potansiyel onkogenik faktördür *MYC* geninde oluşan mutasyonlar, aşırı ekspresyon, yeniden düzenlemeler ve translokasyonu ile hematopoietik tümörlerle, lösemi, lenfoma ile ilişkili bulunmuştur(13).

Bu çalışma için MPN grubunda yer alan tanısı konmuş 11 gönüllüden flebetomi ile alınan periferik kanlarından izole edilen mononükleer hücreler kullanılmıştır. İlk olarak mononükleer hücreler CD133 ve CD34 hücre yüzey antikorları ile muammele edilerek, $CD133^+CD34^-$, $CD133^-CD34^+$, $CD133^+CD34^+$, $CD133^-CD34^-$ hücre kompartmanları FACS Aria Sort hücre ayırma cihazında ayrılmıştır. Kontrol olarak *JAK2* yabanil tip olan kordon kanı kullanılmıştır. Ayrımı sağlanan izole kök hücre kompartmanlarında ve mononükleer hücrelerde *JAK2V617F* karakterinin belirlenmesi amacıyla elde edilen hücre gruplarının DNA’larında 2 aşamalı allel spesifik nested polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıldı. RNA’larında ise hastalık prognozunda etkili olduğu düşünülen *F2R* ve *MYC* genlerinin ekspresyon seviyelerine bakılması amacıyla kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Miyeloproliferatif Neoplaziler

2.1.1. Tarihçe

Hematalog William Dameshek 1951'de; PV, ET, PMF ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML)' yi Klasik Miyeloproliferatif Hastalıklar (MPDs) olarak adlandırmıştır(14).

BCR-ABL füzyon geni veya *Philadelphia* (Ph) kromozomu 9. Ve 22. Kromozom translokasyonu (t(9;22)(q34;q11)) ile meydana gelen yüksek tirokinaz aktivitesi ile kronik miyeloid lösemiye(KML) sebep olur(15). 1973 yılında Gilbert, Ph kromozomu bulunan KML' yi, Ph kromozomu bulunmayan miyeloproliferatif hastalıklar olan PV, ET ve PMF' den ayırmıştır(16).

1990 yılında Hannover kemik iliği sınıflandırması ile KML diğer miyeloproliferatif hastalıklar olan ET, PV, kronik megakaryositik granülositik miyeloproliferasyon ve sınıflandırılmayan miyeloproliferatif hastalıklardan ayrılmıştır(17).

2005 yılında *JAK2* geninde oluşan V617F mutasyonunun keşfini takiben MPN hastalarında, *MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *CBL*, *IKZF1* ve *LN* gibi yeni mutasyonlar tanımlanmıştır. *JAK2*V617F mutasyonunun PV hastalarında %95 oranında, ET ve PMF hastalarında ise %60 oranında görülürken, diğer mutasyonlar, nadir ve MPN hastalarının oldukça az kısmında görülmektedir(18).

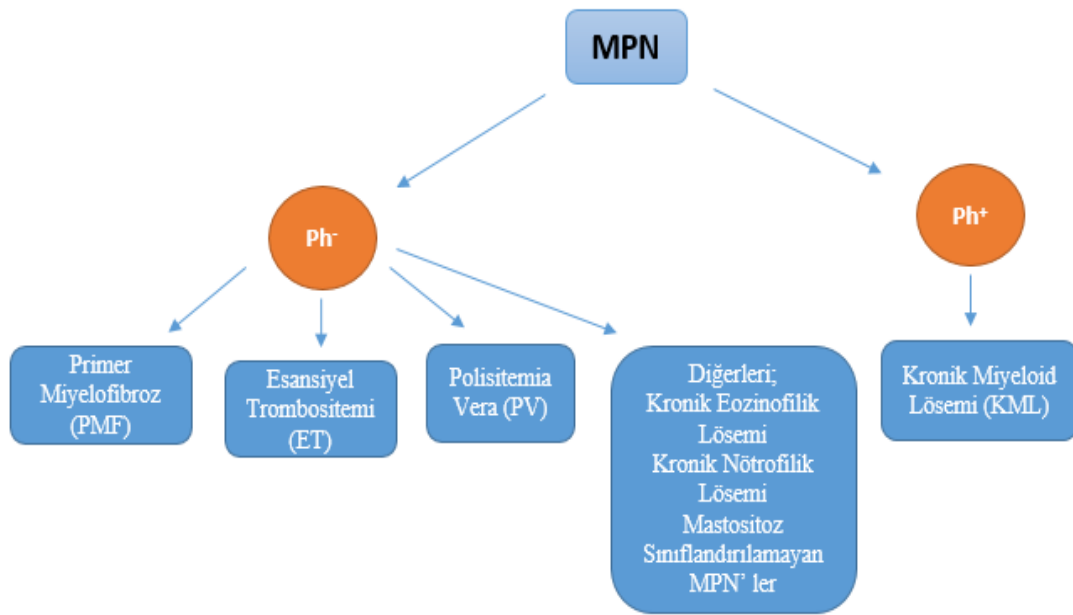
2013 yılında, *JAK2* ve *MPL* mutasyonu bulunmayan ET ve PMF' lerde *Kalretikulin* (*CALR*) geninin ekzon 9' unda somatik mutasyonlar saptanmıştır(19).

2.1.2. Sınıflandırma

Günümüzde, klasik miyeloproliferatif hastalıklar, miyeloproliferatif neoplaziler(MPN) olarak sınıflandırılmaktadır. MPN' ler bir veya birden fazla kan hücre hattının çoğalmasına sebep olan kök ve progenitör hücrelerin klonal proliferasyonu ile karakterize edilen hematopoietik kök hücrelerin klonal hastalığı olarak tanımlanmaktadır(20).

MPN' lerde sıklıkla görülen *JAK2V617F* mutasyonunun keşfi ile hastalığın patogenezi ileri düzeyde analiz edilmiş ve bu nedenle sınıflandırmada düzenleme yapılmıştır(21).

2008 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), miyeloid malignansileri sınıflandırmak için güncelleme yapmıştır. Bu düzenleme sayesinde Miyeloproliferatif Hastalıklar (MPD) yerine yeni gruplandırma ile miyeloproliferasyonun neoplastik olduğunu belirtmek için Miyeloproliferatif Neoplaziler terimi geçerli hale gelmiştir(22). Yapılan bu gruplandırmaya göre MPN' ler taşıdığı BCR-ABL füzyon geninin bulunmasına göre; KML, BCR- ABL füzyon geni bulunduğundan dolayı Ph(+) MPN olarak isimlendirilirken, PV, ET, PMF, Kronik Nötrofilik Lösemi (KNL), Kronik Eozinofilik Lösemi (KEL), Mast Hücre Hastalığı (MHH) ve Sınıflandırılmayan MPN' ler BCR- ABL füzyon geni bulunmadığından dolayı Ph(-) MPN olarak isimlendirilir. (Şekil 2-1)



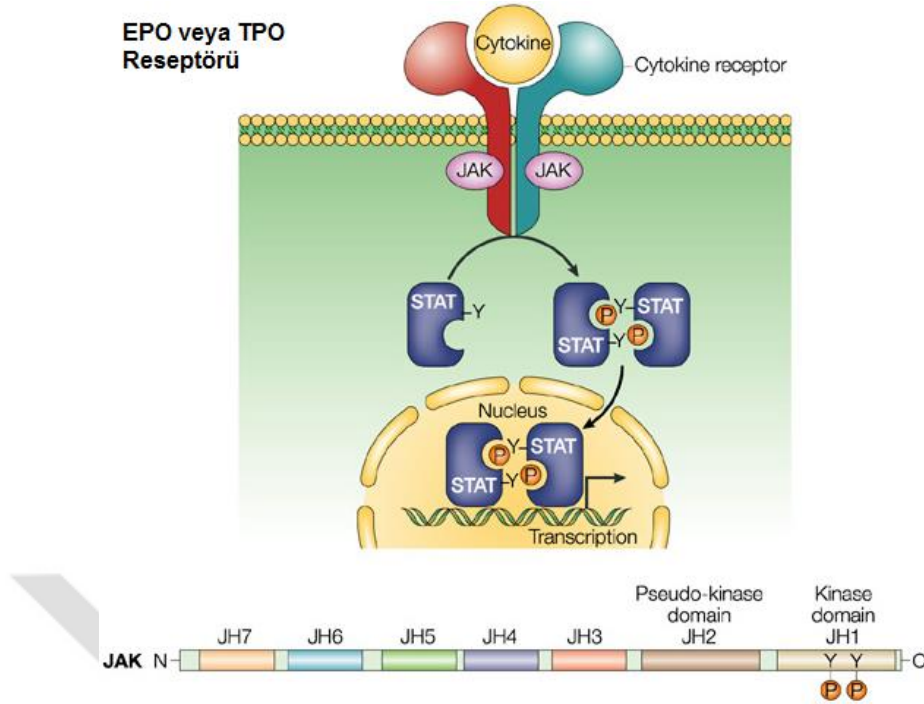
Şekil 2-1: Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO) 2008 yılındaki revizyonuna göre Miyeloproliferatif Neoplazilerin sınıflandırılması.

2.1.3. JAK- STAT Sinyal İleti Sistemi

JAK- STAT sinyal ileti sistemi, sitokinler ve büyüme faktörlerine karşı proliferasyon, hücre farklılaşması, migrasyon ve apoptoz gibi hücresel tepkilerin oluşmasında önemli rol almaktadır. Hematopoez, hücre büyümesi, bağışıklık

hücrelerinin gelişmesi gibi birçok gelişimsel ve homeostatik süreç için JAK- STAT sinyal yolağının önemli olduğu görülmüştür(23). JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2 olmak üzere dört farklı JAK ve yedi farklı STAT tanımlanmıştır. Janus Kinazlar, reseptör olmayan tirozin kinaz ailesinin üyeleridir(24). JAKlar, STAT moleküllerini fosforile ederek STAT' ları aktifleştirirler. Aktifleşen STAT' lar, kalıtsal ve edinilmiş immün cevapta önemlidir.

JAK/STAT sinyal yolağı; reseptör, Janus Kinaz (JAK) ve STAT olmak üzere 3 temel bileşenden oluşur. Reseptörler, JAK/ STAT sinyal ileti yolağının sinyal iletimini aktive eden hematopoietik sistem sitokinleri (interlökinler, koloni stimüle edici faktörleri, interferonlar, eritropoietin, trombopoietin) tarafından aktifleştirilir(25,26). Janus kinazlar reseptör olmayan tirozin kinazlardır. Sitokin reseptörlerine sitokin bağlandığında, reseptörlerin sitoplazmik domaininin tirozin fosforilasyonu aracılığıyla Janus kinazlar aktive edilir(27). JAK kinaz fonksiyonunu aktifleştirerek kendi kendini fosforiller. JAK' lar aktifleşmesiyle birlikte özgül tirozin rezdüleri üzerindeki fosforilasyonu düzenleyerek STAT ve diğer sinyal iletili moleküllerin bağlanabileceği alanlar oluşturur. STAT proteinleri reseptör aileleri için sinyal iletili olarak görev yaparlar. Aktif olmayan STAT transkripsiyon faktörlerinin tirozin rezidüleri üzerinden fosforillenmesi JAK tarafından fosforillenen reseptöre bağlanması ile gerçekleşir ve böylece STAT molekülleri fosforile ve dimerize olarak aktive olur. Fosforillenmiş STAT proteinleri sitoplazmadan nükleusa geçer ve hedef genin promotoruna bağlanarak transkripsiyonun artmasına sebep olur ve tekrar defosforile olarak sitoplazmaya geçer(28) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: JAK- STAT Sinyal İleti Sistemi

Sitokin uyarılması ile JAK' ların aktive edilmesinden sonra STAT' lar fosforile olup dimerize olarak sitoplazmadan transkripsiyonun yapıldığı nükleusa geçer. JAK yapısı; JH1- JH7 domainlerinden oluşmaktadır. JH1 kinaz domaini iki tirozin içerir ligand ile uyarılmasından sonra tirozin fosforile edilir. JH2, kinaz benzeri bölgedir. JH6 ve JH7 domainleri, JAK' ların reseptörlere bağlanmasına aracılık eder(29).

2.1.4. Janus Kinaz 2

Kinazlar, özellikle sinyal iletimi gibi birçok hücresel yolağın regülasyonunda önemlidir. Protein tirozin kinazlar, protein kinazların büyük bir alt grubudur. Protein tirozin kinazlar pürin nükleotid trifosfatların fosfat grubunu protein substratlarının spesifik tirozin rezidülerinin hidroksil grubuna transfer eder. Tirozin rezidülerinin fosforilasyonu proteinler için bağlanma bölgesi yaratır ve Src homoloji (SH2) domainini yapısal değişikliklere sebep olarak enzimatik aktivitesi gibi özellikleri aktifleştir. Bu prensiple protein tirozin kinazlar reseptör olan ve reseptör olmayan tirozin kinazlar olmak üzere ikiye ayrılır(20).

JAK, reseptör olmayan tirozin kinaz ailesindendir. JAK' lar, JAK-STAT yolağındaki etkilerini STAT molekülleri olarak isimlendirilen transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek gösterirler. JAK- STAT yolağı büyüme faktörlerinin ve sitokin reseptörlerinin sinyallerini ileten en önemli mekanizmadır. Bu mekanizma hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozunu regüle eder(23).

Janus Kinaz 2 (JAK2), 9. kromozomun kısa (p) kolunun 24. pozisyonunda konumlanmış ve JAK/ STAT sinyal yolağında görevli bir protein tirozin kinazı kodlayan bir gendir. JAK ailesinin JAK1, JAK2, JAK3 ve Tyk2 olmak üzere günümüze kadar tanımlanmış 4 üyesi vardır. JAK geni, 25 ekzonlu, 1132 aminoasit içeren JAK ailesinden olan JAK2 proteinini kodlar(30,31). JAK1, JAK2 ve Tyk2 memeli hücrelerinde eksprese olurken JAK3 sadece hematopoietik hücrelerde eksprese olmaktadır. JAK ailesi birçok hücre tipinin büyümesi, gelişmesi, farklılaşması için gereklidir. İmmün ve hematopoietik hücreler için de oldukça önemlidir(23).

JAK2 proteini, JAK sinyal iletimi ve transkripsiyon sinyal yolağının aktivatörü olarak görev yapar(32). Şekil 2- 3' de görüldüğü gibi JAK2 protein ailesinin 7 homolog domaini vardır. JH1 domaini, ATP sinyal yolağında aktivatör bölgesi, JH2 domaini psödokinaz domaini olup JH1 domainine homologdur. JH1 domaini, kinazı kodlamaktadır. JH2 domaini, JH1 domaininin katalitik aktivitesi için gereklidir. JH2 domaininin, JAK geninin bazal aktivitesini ve sitokin indüklenmiş aktivasyonunu ATP ve/ veya substratın katalitik bölgeye bağlanmasını engelleyerek regüle eden inhibitör fonksiyonu olduğu görülmüştür(33,34) (Şekil 2-3).

JAK2V617F mutasyonu klonal hematopoezi sürdüren hematopoietik kök hücrelerde ve kök hücrelerden farklılaşan hücrelerde saptanmaktadır ancak AML' de < %10 kadarında görülmektedir. Avrupa kohortundaki PMF hastalarında JAK2V617F mutasyonunun ileri yaş, hemoglobin seviyesi ve artan lökosit değeriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. PV hastalarında JAK2V617F mutasyonun artan hemoglobin ve nötrofil değerleriyle ilişkili görülmüş ancak bu korelasyonun trombozda önemli olmadığı görülmüştür(20).

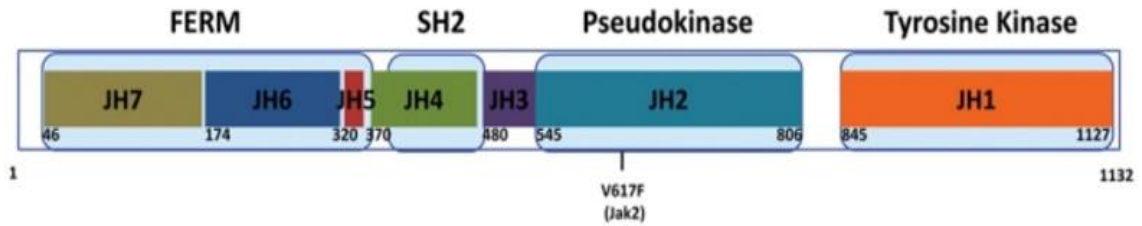
JAK2 geninin 14. ekzonunda 617. Aminosidinde meydana gelen bir nokta mutasyonu sonucunda valin den fenilalanine dönüşmüştür(35). JAK2V617F mutasyonu, Jak2 proteininin katalitik aktivitesi olmayan psödokinaz bölgesinde bulunmaktadır. Psödokinaz bölgesinin otoinhibitör baskılama rolü vardır fakat V617F mutasyonundan dolayı ortadan kalkmaktadır ve ligand olmadığında dahi kinaz aktivitesinin sürekliliği gözlemlenmiştir(36). Psödokinaz domaininin aktivasyonunu inhibe eden bu değişim, kinaz domainini negatif regüle ederek sitokin- reseptör sinyalizasyonunda rol alan JAK-STAT sinyal yolağının sitokin olmadan aktivasyonuna sebep olur. JAK2V617F nokta

mutasyonu kronik MPN' lerde oldukça sık görülmektedir; PV, ET ve PMF sırasıyla % 96, % 55 ve % 65 oranında gözlenir(37).

JAK2V617F kromatin yapısında değişimlere sebep olarak, DNA hasarına, apoptotik tepkiyi düşürerek gen ekspresyonunun genetik değişimine neden olur. Bu mekanizmalar genetik lezyonlarının oluşumunu artırarak maligniteye dönüşüme sebep olabilir(38).

JAK2 geninin JH2 psödokinaz domaininde V617F mutasyonu saptandıktan sonra *JAK2*'nin 12. ekzonu üzerinde ve *MPL* geninin 10. ekzonu üzerinde mutasyonlar saptanmıştır(39,40). *JAK2* geninde görülen ekzon 12 mutasyonları Src homoloji 2 (SH2) ve JH2 domaininin bağlanma bölgesinde görülen mutasyonlardır. Mutasyonlar direkt olarak JH2 domaininde bulunmuyor olmasına rağmen psödokinaz domaininin yapısını değiştirebilir ve *JAK2V617F* ile benzer olarak eritropoietin hipersensitivitesini indükler(41).

JAK2 geninde V617F taşıyan olguların mutasyonu sonradan somatik olarak kazandıkları ve sadece miyeloid seri hücrelerinde olduğu görülmüştür. Bu bulgu *JAK2V617F* mutasyonunun, miyeloid soyda progenitör kök hücrede meydana geldikten sonra farklı hücrelere aktarıldığı hipoteziyle bağdaşmaktadır(36).



Şekil 2-3: JAK'ın yapısı

JAK' ın 4 fonksiyonel domaini vardır; FERM domaini, SH2 domaini, psödokinaz domaini, katalitik aktivitesi olan tirozin kinaz domainidir. JH2 bölgesi, fonksiyonel kinaz bölgesi olmamasına rağmen JAK proteinlerini negatif regüle eder. JH2 bölgesi, JH1 bölgesinin katalitik aktivitesini düzenler. FERM ve SH2 domaini sırasıyla reseptör ve fosfotirozin bağlanma bölgesidir(42).

2.2. Hematopoietik Kök Hücre

Kan ve bağışıklık sistemi hücrelerini oluşturan kök hücreler, hematopoietik kök hücrelerdir(HKH). HKHler kendini yenileme özelliğine aynı zamanda hücre bölünmesi ve farklılaşması yoluyla progenitör hücreleri oluşturma özelliğine sahiptir. Progenitör hücreler; eritroid, granülositik, monositik, megakaryositik ve lenfositik hücrelerin yer aldığı kemik iliği hücrelerini oluşturur. Ana orijini kemik iliği olan, kan dolaşımında bulunan progenitör hücreler, endotel hücreleri oluşturabilmektedir. HKH; miyeloid hücre soyu (monosit, makrofaj, nötrofil, bazofil, eozinofil, eritrosit, megakaryosit, dendritik hücreler) lenfoid hücre soyu (T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler) ve bu hücre soylarının öncüsü olan multipotent hücrelerin kökenidir(43,44).

Hematopoietik kök hücrelerin esas kaynağı kemik iliğidir. Kan üretimi; kemikler, femurlar, kalça kemikleri, kaburgalar ve sternumun medulla bölgesinde olmaktadır. HKHler, periferik kan dolaşımında 1:100.000 gibi oldukça az sayıda bulunduğu görülmüştür. Hematopoietik kök hücreler, kemik iliği, göbek kordonu ve periferik kandan elde edilebilir. Günümüzde periferik kan, göbek kordon kanından sonra kullanılan HKH kaynağı olmuştur(44).

HKH, özelleşmiş hücelere dönüşebilir: Kan ve kemik iliği HKH, üç başlıca beyin hücrelerine(nöronlar, oligodendrositler ve astrositler), iskelet- kas hücrelerine, karaciğer hücrelerine farklılaşabilir. HKH, kemik iliğinden kan dolaşımına geçebilir, programlı hücre ölümü olan apoptoza girebilir. Kemik iliği hücreleri hematopoietik kök hücreler, stromal hücreler ve endotel progenitör hücreleri olmak üzere 3 kök hücre popülasyonu içerir(27).

1992 yılında Irvin Weissman tarafından hematopoietik kök hücrelerin belirlenebilmesi için, insan kök hücre yüzey markerlarının kullanılabileceği gösterildi. İnsan hematopoietik kök hücrelerinin CD34⁺ olduğu da bu çalışma ile gösterilmiş oldu. HKH yüzeyinde bulunan markerlar, floresan etiket taşıyan monoklonal antikolar ile işaretlenerek FACS (fluorescence-activated cell sorting) ile kemik iliğinden veya periferik kandan ayrılabilir. Periferik kanda bulunan CD34⁺ hücre grubunda progenitör hücreler ve farklı olgunlukta olan beyaz kan hücreleri bulunmaktadır(45).

Klonalite, farklılaşma ve kendini yenileme özellikleri açısından birden fazla türde HKH tanımlanmaktadır.

Farklılaşmamış hematopoietik kök hücrelerde ve hematopoietik progenitör hücreler c-kit, CD34 ve H-2k eksprese eder. HKH işleyişinde rol oynadığı bilinen en eski molekül osteoblast zarında eksprese olan SCF(kök hücre faktörü) ve HKH zarında eksprese olan reseptörü c-Kit' dir. TPO (trombopoietin) reseptörünün kemik iliğinde 2 farklı rolü vardır; megakaryosit ve trombositlerin üretimini, farklılaşmasını kontrol altındır tutar diğeri ise HKH sessiz konumda kalmasını sağlar(46).

Hematopoietik kök hücre yüzey belirteci olan CD34; hücreler arası adhezyonu sağlayan bir hücre yüzey glikoproteinidir. Kemik iliğinde hematopoietik hücrelerin ekstrasellüler matrikse ve stromal hücrelere bağlanmasını sağlar. Kan hücreleri dışında kordon kanı, mezenkimal hücrelerin bazılarında, endotel progenitor hücrelerde ve kan damarlarını çevreleyen endotel hücrelerinde bulunur. CD34 hücre yüzey markerı aynı zamanda mutipotent ve kendini yenileme özelliği olan hücrelerin izolasyonunda da kullanılır. CD34⁺ endotelyal progenitörlerin periferik kanda varlığı yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Postnatal dönemde CD34⁺ hücreler, ilkel hematopoietik ve endotel öncülerini içermektedir(47,48).

Kök hücre yüzey markerlarının keşfi ile, hücrelerin tanınması ve ayrılması sağlandı. Hücre yüzey proteinlerine göre monoklonal antikorlar tarafından tanımlanır. İnsan hematopoietik kök hücreleri saflaştırma için hücre yüzey markerları; CD34, CD38, Lin, CD90, CD133 ve aldehit dehidrogenaz enzimi için floresan substratlar geliştirilmiştir(49,50)

2.3. Kanser Kök Hücresi

Kanser kök hücresi, kendini yenileme özelliği ve tümörü oluşturan kanser hücrelerinin heterojenliğine sebep olan bir hücredir(51). Kanser hücreleri teorik olarak kök hücrelerden, progenitör hücrelerden ve farklılaşmış hücrelerden köken alabilir(50,52).

Tümörler, normal hücrelerde genetik modifikasyonların birikmesi sonucunda oluşur fakat kök hücrelerin, kanser kök hücrelerinin orijini olduğuna dair kesin bir kanıt bulunmamaktadır. Tümör başlatıcı hücreler, kök hücreler ile karşılaştırmaya göre yüksek oranda kök hücre benzeri özelliklere sahiptir. Metastatik kanser hücreleri incelenen deneysel ve klinik davranışları bakımından kök hücrelerinin klasik özelliklerine oldukça benzerdir(50,53).

Yapılan bir çalışmada, lösemi başlatıcı hücrelerin kök hücre benzeri hücreler ve bu hücrelerin olgunlaşmış kan hücrelerine göre hematopoietik kök hücreler ile daha yakından ilişkili olduğu görülmüştür(50,54).

Kök hücre ve kanser hücresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3 tip görüş vardır:

1. Kök hücre ve kanser kök hücresi kendini yenileme özelliğini regüle etme mekanizmaları bakımından benzerlik göstermektedir.
2. Kanser kök hücreleri, normal kök hücrelerden köken almış olabilir.
3. Tümörler, kanser kök hücrelerini içerebilir.

Kanser hücresi proliferasyonu kanser kök hücresi tarafından uyarılır. Normal kök hücrelerin transforme mutasyonların hedefi olduğunun en iyi kanıtı hematopoietik sistem kanserileri(lösemi)'dir(55).

CD133; AC133 olarakta bilinen bir glikoprotein molekülüdür. Başlangıçta CD133 antijeninin ekspresyonunun sadece CD34⁺ kök hücrelerde olduğu bilinirken artık hematopoietik hücrelerde, endotel progenitor hücrelerinde, glioblastomada, nöronal ve glial kök hücrede, çocukluk çağında görülen çeşitli beyin tümörlerinde, meme dokusunda, böbrekte, tükürük glandlarında, sindirim sisteminde, testislerde ve farklı diğer dokularda eksprese olduğu tespit edilmiştir. CD133 antijeni hematopoietik progenitör hücreler tarafından eksprese edilir ve erişkin kök hücre yüzey markerıdır. Yakın zamandaki çalışmalar, CD133⁺ hücre topluluğunun kanser kök hücre markerı olarak beyin tümörlerinde ve kolon kanserlerinde izole edilebildiği yönündedir(56). CD133⁺ pozitif hücrelerin endotel hücrelere ve hematopoietik hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip olduğu, G-CSF ile uyarılmış periferel kandan elde edilen CD133⁺ hücrelerde yapılan çalışmada gösterilmiştir(57).

Miyeloprolifetaif neoplazilerin, multipotent kök hücreden oluştuğu klonal miyelopoiezis ile desteklenmektedir(58). PMF' deki neoplastik kök hücrelerde, PMF' nin karakteristiği olarak periferel kanda oldukça sık görülen CD34⁺ hematopoietik kök/progenitör hücreler tanımlanmıştır(59).

Primer miyelofibrozis ile ilişkili potansiyel kök hücre markerı olarak CD133 yüzey antijeni araştırılmış, kök hücre hiyerarşisinde CD34' den önce eksprese olduğu gösterilmiştir(60,61). PMF hastalarında periferel kan dolaşımında CD133⁺ ve/ veya CD34⁺ hücrelerin sağlıklılara göre önemli oranda yüksek olduğu belirlenmiştir. CD133⁺

hücrelerin genelde CD34⁺ olmadığı görülmüştür. Hematopoietik kök/ progenitör hücre ve CD133/ CD34 ekspresyonu arasında PMF’ de belirgin bir korelasyon görülmemiştir. PMF hastalarının periferel kan dolaşımında bulunan CD133 antijeni olmayan CD34⁺ hücrelerin aksine, CD133⁺ hücreler megakaryosit / eritrosit soyları dahil olmak üzere tüm miyeloid hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir(62).

Normal CD133⁺ CD34⁺ hücrelerin multipotent farklılaşma kapasitesi özellikle megakaryosit farklılaşmasında daha önce in vitro çalışmalarda gösterilmiştir(63,64).

Hematopoietik kök/ progenitör hücrelerin farklılaşma potansiyeline göre; CD133⁺ CD34⁺ hücrelerin multipotent, bipotent ve unipotent miyeloid hücrelere (eritroid ve endotel benzeri monositler dahil), CD133⁻ CD34⁺ hücreler ise ağırlıklı olarak granülosit/ monosit hattıyla sınırlı progenitörlere veya endotel benzeri progenitörlere kaynak oluşturmaktadır(57,65).

Yapılan bir araştırmada; CD34⁻ Lin⁻ CD45⁻ CD133⁻ hücre grubunun hematopoietik progenitör hücreleri oluşturabildiği in vitro kültür ortamında tespit edilmiştir. CD34⁻ Lin⁻ CD45⁻ CD133⁻ hücreler farelere transplant edildiğinde hematopoietik ve endotel hücre farklılaşabildiği gözlemlenmiştir. CD34⁻ Lin⁻ CD45⁻ CD133⁻ hücreler pluripotent hücrelerin belirli fenotipik markerlarını eksprese ettiği görülmüştür. Hematopoietik kök hücre markerı podokalaksin kontrol olarak kullanılan hematopoietik hücrelerde eksprese olurken CD34⁻ Lin⁻ CD45⁻ CD133⁻ hücre grubunun podokalaksin ekspresyonundan yoksun olduğu görülmüştür. İn vivo olarak fareler kullanılarak yapılan çalışmada ise, CD34⁻ Lin⁻ CD45⁻ CD133⁻ kan ve kan damarlarının formasyonuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu hücre grubunun yetişkin hemangioblast özelliğinde olduğu yapılan bu çalışmada belirlenmiştir(66).

Lösemik hücrelerde *JAK2V617F* mutasyonu saptanmamıştır fakat CD133⁺ hücrelerde *EZH2* geninde D265H mutasyonu saptanmıştır. *JAK2V617F* mutasyonunu taşımayan CD133⁺ hücrelerin akut miyeloid lösemiye dönüşümü hasta örneklerindeki bulgularla uyumlu epigenetik mutasyon ile meydana gelmektedir. (62)

Yakın zamanda PMF hastalarının mononükleer hücrelerindeki CD133⁺ popülasyon ile ilgili yapılmış çalışmadaki sonuçlar bu hücrelerin PMF kronik hastalığına sebep olan mutasyonları barındıran neoplastik kök hücre klonu içerdiğidir. PMF hastaları kök hücre havuzu heterojenite göstermektedir ve bu fenotipik ve

genotipik farklılıkların spektrumu gelişen hastalığı yansıtmakta olduğu düşünülmektedir. (62)

PMF’ de eşlik eden mutasyonlardan dolayı kök hücre kompartmanlarında heterojenite görülmüş ve buna kanıt olarak *JAK2V617F* mutasyonunun klonal miyelopoiezisinin gelişmesi, erken hematopoietik kök hücre kompartmanlarının gelişmesinin veya miyeloprolifetatif neoplazilerin karakteristik fenotiplerinin açıklanmasında yetersiz olduğu gösterilmiştir(67,68).

2.4. Miyeloprolifetaif Neoplaziler Görülen Farklı Gen Mutasyonları

Ph- MPN’ lerde *JAK2* geninin 14. Ekzonunda yüksek sıklıkla görülen *JAK2V617F* en önemli tanı markerı olarak kullanılmaktadır. MPN’ lerde yüksek sıklıkla görülen *JAK2V617F* mutasyonu tanımlandıktan sonra farklı genlerin de hastalıkla ilişkisi belirlenmeye başlamıştır. *JAK2V617F* pozitif MPN hastalarının %70’ i *JAK2V617F* negatif akut miyeloid lösemiye dönüşmektedir(69). MPN progenitör hücrelerinde *TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2* somatik mutasyonları tanımlanmış ve bu mutasyonların hastalığın gelişiminde, pre- lösemik klon oluşumunda *JAK2V617F* ile birlikte etkili olduğu bilinmektedir(70).

2.4.1. *JAK2* Ekzon 12 Mutasyonu

JAK2V617F negatif PV hastalarında *JAK2* geninde ekzon 12 mutasyonu ilk olarak 2007’ de tanımlanmıştır(71). PV hastalarının yaklaşık %5’ inde *JAK2V617F* mutasyonu görülmemektedir. *V617F* mutasyonu taşımayan MPN hastalarında 12. ekzonunda farklı mutasyonlarının varlığı tespit edilmiştir. Ekzon 12 mutasyonlarına çerçeve kayması mutasyonları, nokta mutasyonlar ve duplikasyonlar dahildir. Bu mutasyonların JH2 ve JH3 domaini ile ilişkili olan bölgede olduğu psödokinaz bölgesinde bulunmadığı tespit edilmiştir. Ekzon 12 mutasyonları, sitokin bağımsız EpoR ekspresyonunun proliferasyonunu indüklemektedir(20). Farede yapılan çalışmalarda, bu mutasyonların eritrositozu indüklediği görülmüştür(71). PV hastaları *JAK2V617F* pozitif veya negatif olsa da benzer kliniği gösterdiği tespit edilmiştir(72).

2.4.2. *MPL* Mutasyonları

MPL, sitokin reseptör ailesi içinde yer almaktadır. *MPL*, Megakaryositler için yaşamsal ve ana büyüme faktörü olan trombopoietin reseptörüdür. *MPL* mutasyonları %5- 10 oranında *JAK2V617F*(-) ET ve PMF’ de görülmüş ancak PV hastalarında

görülmemiştir(20). MPN fenotipi ile ilişkili olarak, dalak büyümesi, miyelofibrozis ve artmış tromboz riski oluşturur(73). Somatik *MPL* mutasyonları nadir ve bunların oluşumu yüksek oranda MPN hastaları ile sınırlıdır(74). *MPLW515L*, triptofandan löesine dönüşüme sebep olduğu ilk olarak *JAK2V617F* negatif PMF’ de tanımlanmıştır. *JAK2* mutasyonlarında olduğu gibi, *MPL515* mutasyonları da kök hücre kaynaklıdır ve miyeloid, lenfoid progenitörlerde meydana gelir(75,76). *MPL* kaynaklı onkogeneze *JAK- STAT* aktivasyonuna sebep olur, spesifik *MPL* mutant varyantları (*MPLW515*) ve reseptör rezidüleri (Y112) gerektirebilir(77,78). *MPL* mutasyonları %5- 10 oranında *JAK2V617F*(-) ET ve PMF’ de görülmüş ancak PV hastalarında görülmemiştir. ET veya PMF hastalarının bazılarında birçok *MPL* mutasyonu bulundurmaktadır. Bazıları ise düşük allel yükü olan *JAK2V617F* klonu ile yüksek allel yüke sahip *MPL* mutasyonunu birlikte bulundurmaktadır(79).

MPL mutasyonu taşıyan ET’ nin ileri yaş, yüksek hemoglobin seviyesi, yüksek trombosit sayısı, mikrovasküler semptomlar ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *MPL* mutasyon varlığı MPN hastalarında fibrotik veya lösemik transformasyonu etkilememektedir(80).

2.4.3. *TET2* Mutasyonları

TET2 geni, metilsistein dioksigenaz enzimini kodlamaktadır ve DNA metilasyonunda rolü vardır. *TET2* mutasyonları somatik mutasyonlardır(20). İlk olarak 2008’ de tanımlanmış olan *TET2* mutasyonları *JAK2V617F* pozitif ve *JAK2V617F* negatif MPN’ lerde görülmektedir(81). *TET2* mutasyonlarının *JAK2V617F* mutasyonunun oluşumundan önce meydana geldiği belirlenmiştir. Mutant *TET2*’nin PV ve PMF’ de lösemik transformasyon veya trombozide, sitogenetik profilini etkisi olmadığı, düşük hemoglobin ve ileri yaş ile korelasyon gösterdiği görülmüştür(20). *TET2* mutasyonunun *MPL* mutasyonu ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir(81).

2.4.4. *CALR* Mutasyonları

Calretükilin, yüksek oranda korunmuş endoplasmik retikulum proteinidir. Şaperon aktivitesi, kalsiyum homeostezisinde hücresel proliferasyonda ve farklılaşmasında, apoptozun önemli rolü vardır. Çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olan *CALR* mutasyonları, hematopoietik kök ve progenitör hücrelerde gözlenmiştir. ET hastalarında *JAK* mutasyonlarına sahip olan hastalara göre düşük tromboz riski bulunmaktadır. *JAK2*, *MPL*, *CALR* mutasyonları sadece teşhiste değil prognozda da

önemlidir(20). 2013 yılına kadar yapılmış çalışmalarda *JAK2* ve *MPL* mutasyonu olmayan MPN hastalarındaki ana mutasyon tanımlanamamıştır. 2013 yılında, *JAK2* veya *MPL* mutasyonları olmayan MPN hastalarının büyük çoğunluğunda *CALR* mutasyonları tanımlanmıştır. *CALR* mutasyonları IL-3' den bağımsız STAT5 fosforilasyonuna sebep olarak JAK- STAT yolağının aktivasyonuna sebep olur ve MPN patogenezi ile ilişkili bulunmuştur. Ailesel MPN' lerde MPN somatik mutasyonlarını geliştirmede kalıtsal yatkınlık olduğu belirlenmiştir. *CALR* mutasyonunun da bu şekilde aynı ailedeki olgularda görüldüğü tespit edilmiştir(82).

2.5. Çalışmada Analiz Edilen Genler

Laboratuvar eş zamanlı olarak yürütülen diğer bir projede MPN hastalarında *JAK2V617* mutasyonunun bulunduğu mononükleer hücreler seçilmiş ve bu seçilen hücre grupları üzerinde JAK- STAT sinyal yolağı PZR array çalışması ile *MYC* ve *F2R* genlerinde gen anlatım seviyelerinin arttığı görülmüştür. Bu veriler ışığında bu çalışmada da hem hasta mononükleer hücrelerinde hem de hematopoietik kök hücre kompartmanlarında bu genlerin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmek istenmiştir.

2.5.1. *MYC* Geni

MYC geni 8q24.21 bölgelerinde lokalize 3 ekzondan oluşan proto- onkogendir. Miyelositomatozis (lösemi ve lenfoma) viral onkogen homologu olup *C-MYC*, *MRTL*, *MYCC*, *BHLHe39* gibi farklı isimlerle de bilinmektedir.

MYC geni tarafından kodlanan çok fonksiyonlu nükleer fosfoprotein, hücre döngüsü progresyonunda, apoptozda ve hücre sel dönüşümde rol almaktadır. Bu gende oluşan mutasyonlar, artmış ekspresyon, yeniden düzenlemeler ve translokasyonlar hematopoietik tümörler, lösemi ve lenfoma ile ilişkili bulunmuştur. *MYC* geninde alternatif translasyon başlama bölgelerinin kodladığı proteinlerin N- terminal bölgeleri birbirinden farklı olmasına rağmen aynı okuma çerçevesinde bulunmaktadır. AUG ile başlamayan protein sentezi, Burkitt lenfomada baskılandığı görülmüş ve bu nedenle genin normal fonksiyonunun önemli olduğu düşünülmektedir. Proto-onkogen *MYC*, insanlarda gelişen bir çok kanser türüne sebep olmaktadır. *MYC*' nin tümör gelişimindeki rolüne ek olarak, fibroblastlardan pluripotent kök hücreye yeniden düzenlemede yer alan 4 genden (*SOX2*, *OCT4*, *KLF4*) biri olarak tanımlanmıştır(83).

JAK-STAT yolağında da rol alan STAT5, büyüme ve canlılık proteinlerinin sentezini direkt regüle eder. *MYC* gibi büyüme ile ilişkili proteinler STAT5 aracılığıyla regüle edilebilir(84). *MYC* ekspresyonu büyüme faktör reseptörleri içerisinde Eritropoietin reseptörü gibi benzer yapısal elementleri gerektirebilir. *MYC* protein sentezinin *JAK2* kinaz aktivasyonuna bağlı olduğu görülmüştür. *JAK2* yolağının aktivasyonu *MYC* protein seviyesinin optimal indüksiyonu için gereklidir(85).

MYC ailesinin üyeleri olan; *c-Myc*, *N-Myc* ve *L-Myc* tarafından kodlanan heliks-loop- heliks lösin fermuar transkriptleri potansiyel onkogenlerdir. *MYC* proteinleri hücre proliferasyonu, hücre büyümesi anjiyogenez apoptoz, kromatin yapısının regülasyonu ve farklılaşması gibi birçok biyolojik süreçte gösterilmiştir. *c-MYC* (ya da *N-MYC*) yetişkin fibroblastların indüklenerek yeniden düzenleme ile embriyonik kök hücre oluşturmada anahtar elementtir(86). Ayrıca *MYC* genindeki yüksek ekspresyonun tümorogenezi tetiklediği belirlenmiştir(87).

Kemik iliğinde *c-Myc* aktivitesinin düzgün hematopoietik kök hücre fonksiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. *c-Myc*' de meydana gelen delesyon fonksiyonel olarak hasarlı hematopoietik kök hücrelerin oluşması ile sonuçlanmaktadır(88). İlginç olarak *c-Myc* yoksun hematopoietik kök hücrelerin bölünmeye devam ettiği ve proliferasyon kapasitelerinin değişmediği görülmüştür. Bunun nedeninin ise *N-Myc*' nin *c-Myc* yoksun hematopoietik hücrelerde normal seviyede eksprese olabilmemesidir(88). Hematopoietik kök hücrelerde *c-Myc* ve *N-Myc*' nin önemli rolü olduğu belirlenmiştir. *c-Myc* ve *N-Myc* olgunlaşmamış hematopoietik progenitör hücre popülasyonlarında birlikte eksprese olduğu ve total *MYC* aktivitesinin hematopoietik kök hücre fonksiyonunu etkilediği belirlenmiştir. Olgunlaşmamış hematopoietik kök hücrelerde *c-myc* ve *N-myc* eşit seviyede mRNA eksprese ettiği görülmüştür. Kemik iliğinde *N-myc* delesyonu hematopoezi etkilemiyor olmasına rağmen *N-myc* ve *c-Myc* delesyonu pansitopeni ve hızlı ölüme sebep olur. Hematopoietik kök hücre proliferasyonu ilginç olarak homeostazide her iki *Myc* geninin de ekspresyonuna bağlıdır fakat yaralanma sonrası kemik iliği onarımında *c-Myc* ve *N-Myc* birbirinden bağımsızdır. Hiç bir hematopoietik hücre tipi *c-Myc* olmadan yalnızca *N-myc* veya *L-myc* eksprese edememektedir. Olgunlaşmamış hematopoietik kök hücrelerde total *MYC* ekspresyonunun artmış olduğu fakat progenitörlerde ve daha olgun hücre tiplerinde ekspresyonun azalmış olduğu görülmüştür. *MYC* geni homeostatik hematopoietik kök

hücre siklusunu kritik ve pleiotropik kontrol elementleri ile regüle etmenin yanı sıra kök hücrelerin farklılaşmasında ve canlı kalımını da regüle eder(89).

Normal endotel hücrelerden eksprese edilen *Myc*, endotel hücrelerinin çoğalmasını ve vaskülojeneze katılım için gerekli değildir fakat kemik iliği progenitörlerinden endotelyal öncülerinin oluşumu için gereklidir(90).

2.5.2. *F2R* Geni

Koagülasyon faktör II (trombin) reseptörü olan *F2R* geni kromozom 5q13 bölgelerinde lokalizedir ve 2 ekzondan oluşmaktadır. *HTR*, *PAR-1*, *CF2R*, *PAR1*, *TR* isimleri ile de bilinmektedir.

Koagülasyon faktör II reseptörü, trombotik tepkisinin düzenlenmesinde rol oynayan bir transmembran reseptörüdür. Reseptörde meydana gelen proteolitik kırılma sonucunda reseptör aktifleşmektedir. PAR-1, N- terminal bölgesinde hücre dışı trombin benzeri proteazlar aracılığıyla gerçekleşen proteolitik kırılma sonucunda aktifleşir. Bu kırılma sonucunda ligand bağlı yeni N- terminal bölge, hücre içi sinyal aktivasyonunu sağlar/ izin verir(91,92).

Megakaryosit gelişimi plazma membran reseptörleri tarafından uyarılmaktadır. Megakaryosit hücrelere dönüşüm için indüklenen yetişkin hematopoietik CD34⁺/CD38^{lo} hücrelerinde, içinde *F2R* da bulunan plazma membran genlerinin yüksek oranda eksprese olduğu görülmüştür. Megakaryositlerin ve trombositlerin gelişiminde, fonksiyonunda önemli biyolojik rolü olduğu gösterilmiştir(93).

Koagülasyon faktörleri ve trombin kanser invazyonunda esas rol almaktadır. *F2R* tarafından eksprese edilen PAR-1 proteininin insanlarda gelişen birçok kanser tipi ile ilişkili olduğu ve hem birincil hem de metastatik tümörlerde invazivliğinin derecesi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. PAR proteinleri neredeyse tüm damar hücreleri (endotel hücreleri, fibroblastlar, miyositler) ve kan hücreleri (kırmızı kan hücreleri hariç) tarafından eksprese edilmektedir. Ayrıca PAR-1, epitel hücreleri, sinir hücreleri ve bağışıklık sistem hücrelerinde de eksprese olmaktadır(94).

PAR, yedi transmembran α - heliks, G-proteini birleştirmek için bir sitoplazmik alan ve hücre dışı N-terminal sekansından oluşmaktadır. Trombin, PAR-1 reseptörünün N-terminal sekansına bağlanarak PAR-1' i aktifleştirmektedir(94,95). Trombin aracılı proteoliz tarafından ortaya çıkan ligand-reseptör kompleksi başka bir PAR molekülünü

direkt uyarabilir ve etkili bir şekilde hücre içi sinyali indükleyebilir. Trombin ve tripsin PAR aktivatörleri arasında yer almaktadır(94,96).

Trombin, fibrinojenden fibrin oluşmasını sağlar ve damar yaralanmalarında kan trombositlerini aktive eden koagülasyon yolağında esas role sahiptir. Trombin bu rolünün yanı sıra PAR-1 aktivatörüdür. Birçok kanser hücrelerine karşı hücrel cevapta rol oynar. Trombin aracılı PAR-1 aktivasyonu kanser progresyonu gibi enflamasyon yolağını regüle eder. Trombin aktive edilmiş PAR proteinleri, damar geçirgenliğini artırır, endotel ve kanser hücre invazyonunu ve göçünü indükler. Lipid üretimini, sitokinlerin ekspresyonunu ve adezyon moleküllerini artması endotel hücre proliferasyonunu, trombositlerin toplanmasını ve malignant hücre tutunmasını tetikler(97).

Trombin tümör hücreleri üzerinde PAR-1 ile doğrudan etkileşim yoluyla sinyal yanıtını ortaya çıkarabilir. Göğüs kanserinde PAR-1 azalmış ekspresyonu kanser hücrelerinin invazyonunun azalması ile ilişkili bulunmuştur(98).

Malign melanoma, göğüs kanseri ve bir çok kanser hücre soyunda PAR-1 ekspresyonunun artmış olduğu görülmektedir. Bu nedenle PAR-1 onkogen olarak görülebilmektedir(92).

PAR-1 hematopoietik sistemde rol aldığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir(99). Hematopoietik kök hücrelerde PAR1, miyeloid ve lenfoid progenitör hücrelere farklılaşana kadar yüksek oranda eksprese olmaktadır(92).

Yapılan bir çalışmada; PAR-1' in özellikle sağlıklı hematopoietik kök hücrelerde eksprese olduğu görülürken akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında PAR-1 ekspresyonunun ciddi bir şekilde düştüğü görülmüştür. PAR-1 ekspresyonunun düşüşü, in vivo lösemik kök hücre fonksiyonunu arttırdığı görülmüştür. Sağlıklı gönüllülerden izole edilmiş olan CD34⁺ hücre grubu ile AML hastalarındaki alt gruplarının kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonuna göre ekspresyonları karşılaştırılmış ve AML hastalarının alt gruplarında PAR-1 ekspresyonunun azalmış olduğu görülmüştür. AML' de lösemi başlatıcı hücreler PAR-1 tarafından regüle edilmektedir. AML hastalarında, PAR-1 kök hücre fonksiyonunu baskıladığı görülürken diğer kanserlerde onkogenik faktör olarak görülmektedir. (92).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastalar

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümü'nde Miyeloproliferatif Neoplazi grubunda olan 11 gönüllüden flebetomi ile alınan periferik kan mononükleer hücreleri kullanıldı. Hastalardan alınan periferik kan örneklerinin çalışmaya dahil edilebilmesi için hastalara gereken bilgilendirme yapılarak, gönüllü onam formu okutuldu ve onayları alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalar için değerlendirmede kullanılan klinik parametreler ve hasta değerleri Tablo 3-2' de özetlenmiştir.

3.1.2. Deneylerde kullanılan Kontrol Örnekleri

MPN' lerde *JAK2V617* mutasyon karakterinin allel düzeyinde belirlenmesi amacıyla deneylerde kontrol olarak 2 farklı hücre soyu kullanıldı. Bunlar; *JAK2V617F* mutasyonunu heterozigot formda taşıyan SET-2 (İnsan esansiyel tromboz hücre soyu) ve *JAK2V617F* mutasyonunu taşımadığı bilinen K562 (İnsan kronik miyeloid lösemi hücre soyu) hücre soylarıdır, Tablo 3-1' de özetlenmiştir.

JAK2V617F heterozigot SET-2 hücre soyları DSMZ (Leibniz Enstitüsü Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonu) firmasından alındı. *JAK2* yabanil tip K562 hücre soyu, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Duran ÜSTEK'ten temin edildi.

Tablo 3-1: Hücre Hatları

Hücre Hattı	Alındığı Organizma	Hastalık	Morfolojisi	Kültür tipi	<i>JAK2V617F</i>
K562	<i>Homo sapiens</i>	Kronik Miyeloid Lösemi(KML)	Lenfoblast	Süspanse	-
SET- 2	<i>Homo sapiens</i>	Esansiyel Trombositemi(ET)	Megakaryosit	Süspanse	Heterozigot

Tablo 3-2: Hastaların Klinik Parametreleri

Hasta No	Yaşı	Tanı Yaşı	Tanı	İlgili dönem HGB	HCT	Lökosit	Trombosit	Klinik risk skoru	1. basamak tedavi	Güncel HGB	HCT	Lökosit	Trombosit	Tromboz Öyküsü
H11	64	59	NA	14.5	47	25,000	195,000	PV very low	F-H-A	12.70	38	39,000	162,000	Veri yok
H34	56	56	PV	17.5	53.2	7,500	18,600	PV very low	F	14.1	43	7,200	200,000	Var
H26	59	45	ET	14.4	46.1	8,300	856,000	PV intermediate	F-H-T-Ü-A	14.2	44	4,800	709,000	Yok
H15	66	63	PV	15.5	50.9	10,200	378,000	PV high risk	F-H-A	12.7	40	10,600	381,000	Yok
H23	51	35	PV	14.2	45.1	5,600	206,000	PV high risk	F-H-V	14.9	48	11,600	229,000	Var
H10	27	21	PV	14.9	46.2	7,100	165,000	PV very low	F-A	16.4	50.6	7,900	196,000	Yok
H7	53	46	PV	14.9	46.3	7,100	385,000	PV low	F-H-A	14.1	45	9,300	521,000	Yok
H35	69	68	PV	15.1	47.3	6,600	232,000	PV high risk	F-H-A-Ü	13.9	40.9	5,900	209,000	Yok
H27	49	40	ET	14.9	45.3	7,300	554,000	PV low	F-H-A-f	12.8	38.4	4,800	506,000	Yok

Tabloda Kullanılan Kısaltmalar:

F: Flebetomi

H: Hidroksiüre

T: Tromboreduktin

Ü: Ürikoliz

A: Asetilsalisilik asit

V: Varfarin

f: Felbial

NA: Tanımlanamayan Kronik MPN

HGB: Hemoglobin

HCT: Hematokrit

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3-3’de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Kullanılan kimyasal maddeler.

Agaroz (Sigma)
IMDM (Iscoe’s Modified Dulbecco’s Medium)(Gibco)
Etidyum Bromid (M.Biotech)
Etil alkol (Merc)
İzopropanol (Merc)
DPBS (Fosfat Tampon Çözeltisi) (Gibco)
Fikol (GE Lifesciences)
FBS (Fetal Bovine Serum)
Tris baz (BioChemika)
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Gibco)
Steril, nükleaz içermeyen su
Ultra Pür Su (Biochrom)
50 bp Ladder (BioRad)
Propidium Iodide
CD133/1 (AC133)- APC Antikor (BD Pharming)
CD34 PE (8G12) Antikor (BD Pharming)
CD45 FITC Antikor (BD Pharming)
Universal Probe Library qPCR Probe 17 (Roche)
Universal Probe Library qPCR Probe 66 (Roche)
Universal Probe Library qPCR Probe 64 (Roche)

3.1.4. Kullanılan Kitler

Kullanılan kitler Tablo 3-4’de gösterilmiştir.

Tablo 3-4: Kullanılan kitler.

Pico Pure RNA Isolation Kit (Applied Biosystems KIT 0204)
SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience)
ORA qPCR Probe Master Mix, 2X (HighQu)
Quick gDNA Micro Prep (Zymo Research D3021)
Extract-N-Amp Blood PCR Kit (Sigma, XNAB2R)
Sigma PZR Mix

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 3-5’de gösterilmiştir.

Tablo 3-5: Kullanılan cihazlar.

Buzdolabı ve Derin Dondurucular (+4°C, -20°C, -80°C) (Samsung, Haier, Haier)
Buz Makinası (Cornelius)
Çeker ocak (Kermanlar)
Otoklav (Kermanlar)
Jel görüntüleme sistemi (UVP)
Vorteks (Kermanlar)
Otomatik Pipetler (Eppendorf)
PZR Aleti (Thermo-Cycler) (Bio-Rad T100)
Elektroforez Aleti (Bio-Rad)
Güç Kaynağı (E-C Apparatus Corporation)
Distile Su Cihazı (Millipore)
Masaüstü Mini Santrifüj (Beckman Coulter)
Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter)
Su Banyosu (Mettler)
Laminer Akış Kabini (NUAIRE)
Hücre Ayırım Ünitesi (FACS Aria Akım Sitometri Cihazı, BD Bioscience)
Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)
Mikroskop (Olympus)
Hassas Terazî (Shimadzu)
Mikrodalga Fırın (Arçelik)
Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Cihazı (LightCycler 480 II - Roche)

3.1.6. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

% 70'lik Etil Alkol

70 ml Etil alkol

Steril distile su ile 100ml'ye tamamlandı.

50 X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA)

- 242 g Tris baz
- 57,1 g Glasiyal asetik asit
- 100 ml EDTA (0,5M)

Distile su ile 1 lt'ye tamamlandı ve otoklav ile steril edildi.

MACS Solüsyonu

500 ml PBS

% 0.5 (7.5 M) BSA

2Mm (0.5M) EDTA

Filtrelendi.

Propidoum Iodide Solüsyonu

10µl Propidoum iodide

10 ml' ye MACS solüsyonu ile tamamlandı.

Hücre Dondurma Solüsyonu

%80 FCS (Fetal Calf Serum)

%20 DMSO ile tamamlanır.

20 dkk buzda bekletilir.

Hücre Dondurma Solüsyonu 2

%80 IMDM

%20 FCS (Fetal Calf Serum) ile tamamlanır. 0,20 µm membranlı filtreden geçirilir.

Hücre Çözdürme Solüsyonu

%2 FCS (Fetal Calf Serum)

IMDM ile tamamlanır. 0,20 µm membranlı filtreden geçirilir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mononükleer Hücre İzolasyonu

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümü'nde toplanarak laboratuvarımıza getirilen 11 MPN tanısı almış hastanın flebetomi ile alınmış periferik kan ve kontrol olarak kullanılan 4 kordon kanı, ficol üzerine yayıldı, ficol-gradient santrifüj yöntemi ile ayrıştırıldı ve ficol içindeki periferik kan mononükleer hücreleri, pastör pipet ile toplandı. Toplanan bu periferik kan mononükleer hücreleri yüzey belirteçlerine göre hücre ayrımı ayrılıp DNA ve RNA izolasyonunda kullanıldı, kalan kısmı ise hücre dondurma protokolüne uygun olarak dondurulup sonraki çalışmalarda kullanıldı.

- 1) Kan örneği PBS ile 1:1 oranında sulandırılır.
- 2) 15 ml ficol üzerine serolojik pipet ile 35 ml kan örneği yavaş yavaş yayılır.
- 3) 2000 rpm' de 30 dakika yükselme ve durma hızı minimumda olacak şekilde santrifüjlenir.
- 4) Ficol- gradient santrifüj tekniği ile sırasıyla plazma, mononükleer hücre, ficol, granülosit fazlarına ayrılır. Ayrımı net bir şekilde santrifüj sonrasında görülen mononükleer hücreler 15 ml MACS içerisine toplanır. Serum ve granülositler gerektiği kadar başka çalışmalarda kullanılmak üzere saklanır.
- 5) 2000 rpm' de 15 dakika santrifüjlenir.
- 6) Santrifüj sonrasında süpernatantı dikkatli bir şekilde atılarak, pellet 10 ml MACS ile çözülür ve tüm tüpler birleştirilir.
- 7) 2000 rpm' de 15 dakika santrifüjlenir.
- 8) Santrifüj sonrasında süpernatant atılır, pellet 10 ml IMDM ile çözülür.
- 9) IMDM içerisindeki hücrelerden 10 µl alınarak 90 µl IMDM' e alındı ve 10' luk dilüsyonlar hazırlanır. Seyreltilen bu hücrelerden 10 µl alınıp 10 µl trypan blue ile karıştırılıp hemacytometer ile sayılır (Tablo 3- 6).

Tablo 3-6: Hücre sayımı

Hücre sayısı /ml = (SAYILAN DÖRT KARENİN ORTALAMASI) X 10⁴ X (DILUSYON ORANI)
--

3.2.2. Hücre Dondurma

Mononükleer hücre izolasyonundan sonra kalan hücre sayısına göre hücre dondurma solüsyonları 1:1 oranda hazırlanır.

- 1) Hücre dondurma solüsyonu 1, hazırlandıktan sonra 20 dakika buzda bekletilir.
- 2) Hücreler 2000 rpm 15 dakika santrifüjlendi, hücre dondurma solüsyonu 2 ile pellet çözülür ve damla damla hücre dondurma solüsyonu 1 eklenir.
- 3) 2ml ve 5 ml dondurma tüplerine alınır. 1 gece -80 buzdolabında bekletilir ve ertesi gün uzun süre saklamak için sıvı azot tankına alınır.

3.2.3. Hücre Çözdürme

Hasta ve kordon kanı mononükleer hücre izolasyonu esnasında mononükleer hücrelerin kalan kısmı sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurulur. Hücrelerin çalışmalarda kullanılması gerektiğinde hücreler azot tankından alınır ve hücre çözündürme için aşağıdaki protokol takip edilir.

- 1) Azot tankından alınan hücreler 37 su banyosunda eritilir.
- 2) Hücre süspansiyonuna %10 oranında 1mg/ 1ml olarak hazırlanan Dnaz eklenir ve 37 su banyosunda 90 saniye bekletilir.
- 3) Filtrelenmiş %2 oranında FBS içeren IMDM damla damla 10 ml eklenir. 1500 rpm/ 6 dakika santrifüjlenir.
- 4) Pellet, %7 oranında Dnaz ile çözülür ve tekrar FBS' li IMDM damla damla 10 ml eklenir. 1500 rpm/ 6 dakika santrifüjlenir.
- 5) Pellet, %4 oranında Dnaz ile çözülür ve hücrelerin dondurulma sayısına göre 100 milyon hücreye 5ml olacak şekilde MACS eklenir.
- 6) MACS içerisinde olan hücreler hücre sayımı protokolüne uygun bir biçimde sayılır ve çalışmalarda kullanmak üzere hücreler hazır duruma getirilmiş olur.

3.2.4. Hücre Ayrımı (Sorting)

MPN hastalarından ve kordon kanlarından fikol-gradient santrifüj yöntemi ile ayrılan mononükleer hücreler CD45, CD133, CD34 hücre yüzey antikorları kullanılarak, hücre yüzey belirteçlerine göre; CD133⁻CD34⁺CD45⁻, CD133⁺CD34⁺CD45⁻, CD133⁻CD34⁻CD45⁻, CD133⁺CD34⁻CD45⁻ kök hücre

kompartmanlarının ayrımı sağlanmıştır. (Tezin diğer kısımlarında bu kompartmanlardan CD133⁻CD34⁺, CD133⁺CD34⁺, CD133⁻CD34⁻ CD133⁺CD34⁻ olarak bahsedilecektir.)

- 1) Hücre sayımı yapılmış MACS içerisinde bulunan hücre süspansiyonuna 500 µl MACS eklenerek 1500rpm/ 6dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında pellet 2 ml MACS ile çözülür ve filtreli sort tüpünde filtrelendir.
- 2) Hücre sayısına göre 1 milyon hücreye 1 µl olacak şekilde CD45 FITC, CD34 PE ve 1 milyon hücreye 2 µl olacak şekilde CD133APC antikorları eklenir.
- 3) 45 dakika buzda inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında her bir sort tüpüne 2 ml MACS solüsyonu eklenir.
- 4) 1500 rpm/ 6 dakika santrifüj edilir.
- 5) Santrifüj sonrasında pellet üzerine 2 ml propidium iodide (PI) solüsyonu eklenir, filtreli sort tüpünde filtrelendir ve hücre ayırma cihazına (FACS Aria Akım Sitometri Cihazı, BD Bioscience) verilir.
- 6) Öncelikle hücre iç yapısı ve hücre büyüklüğüne göre hücreler seçilir daha sonra CD45⁻ ve PI ile boyanmayan canlı hücreler seçildi ve ardından CD133⁻CD34⁺CD45⁻, CD133⁺CD34⁺CD45⁻, CD133⁻CD34⁻CD45⁻, CD133⁺CD34⁻CD45⁻ kök hücre kompartmanlarının hücre ayırıcı (FACS Aria Akım Sitometri Cihazı, BD Bioscience) ile ayrımı sağlanmıştır.

3.2.5. Hücrelerden DNA İzolasyonu

MPN hastalarından flebetomi ile toplanan periferik kanlardan izole edilen mononükleer hücrelerde ve hücre ayırıcı ile ayrımı sağlanmış CD133⁻CD34⁺CD45⁻, CD133⁺CD34⁺CD45⁻, CD133⁻CD34⁻CD45⁻, CD133⁺CD34⁻CD45⁻ kök hücre kompartmanlarında DNA izolasyonu yapıldı.

- 1) Hücre süspansiyonları masaüstü mini santrifüj kullanarak 3 000 x g, 5 dk santrifüj edilir, üst sıvı mikropipet ile dikkatlice çekilerek hücrelerin pellet haline gelmesi sağlanır.
- 2) Pellet olarak saklanmış örnekler üzerine 200 µl "Lysis Buffer" eklendi ve 4- 6 saniye vortekslenip 5- 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 3) Zymo Spin kolona aktarılır ve 10.000 x g/ 1 dakika santrifüjlenir ve yıkama aşamasına geçilir.

Yıkama Aşamaları;

- 1) Spin kolon üzerine 200 µl ‘‘Pre- Wash Buffer’’ eklendi ve 10.000 x g/ 1 dakika santrifüjlenir.
- 2) 500 µl ‘‘g-DNA Wash Buffer’’ spin kolona eklendi tekrar 10.000 x g/ 1 dakika santrifüjlenir.
- 3) Kolon Rnase- Dnase olmayan 1,5 ml ependorflara alınıp 10 µl ‘‘Elution Buffer’’ eklenir.
- 4) 2- 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir ve en yüksek hızda 30 saniye santrifüjlenir. Eğer gerek duyulursa elüsyon basamağı tekrarlanabilir.

DNA’nın Saklanması

Uzun süreli saklama için -20 °C’de, kısa süre içinde kullanılacaksa +4 °C’de muhafaza edilebilir.

3.2.6. İki Aşamalı Allel Spesifik Nested PZR

MPN hastalarından izole edilen mononükleer hücrelerinden ve hücre ayrımı sağlanmış CD133⁻CD34⁺CD45⁻, CD133⁺CD34⁺CD45⁻, CD133⁻CD34⁻CD45⁻, CD133⁺CD34⁻CD45⁻ kök hücre kompartmanlarından izole edilmiş DNA’larında JAK2V617F mutasyonunun allel düzeyinde tespit edilmesi amacıyla 2 farklı primer seti kullanılarak 2 aşamalı allel spesifik nested PZR yapıldı. Mutasyona özel tasarlanmış primerler kullanılarak PCR gerçekleştirilir. PZR’nin ilk aşamasında mutasyonu içeren bölgenin çoğaltılmasının haricinde spesifik olmayan bağlanmalardan kaynaklı farklı bölgeler de çoğaltılır. İlk aşamadan sonra jelde 521 bazlık DNA fragmentlerinin görülmektedir. İlk aşama sonunda mutant ve yabani tipteki JAK2 genini ayırt edilememektedir. PZR işlemi 2. aşamasında mutasyon bölgesine özgü farklı primer seti kullanılır. Bu şekilde sadece istenilen bölgenin çoğaltılması sağlanarak spesifik bantlar elde edilir.

İki aşamalı allel spesifik nested PZR’de şu protokol izlendi:

- 1) Sigma PZR karışımı, primerler ve kalıp DNA -20°C’ de tutulur. Çalışma sırasında tüm komponentler buz içerisinde tutulmalıdır.
- 2) Allel spesifik nested PZR 1. Aşamasında Tablo 3-7’ de belirtilen miktarlarla çalışmada çoklu örnekle çalışıldığından homojen bir karışım hazırlanıp Dnaz/ Rnaz içermeyen PZR tüplerine 18 µl dağıtıldı.

Ortak karışımda bulunanlar: steril su, Sigma PZR karışımı, primerler.

- 3) Allel spesifik nested PZR'nin 1. aşamasında P1 ve P2 primerleri, ikinci aşamasında ise P3, P4, P5 ve P6 primerleri kullanıldı (Tablo 3-9).

Tablo 3-7: Allel Spesifik Nested PZR 1. Aşama bileşenleri

Bileşen	Miktar
Sigma PZR Mix	10 µl
Primer 1 (Forward)	1 µl
Primer 2 (Reverse)	1 µl
Kalıp DNA	2 µl
H₂O	20 µl' ye tamamlandı.

- 4) 2 µl kalıp DNA negatif kontrol tüpü haricindeki tüm tüplere dağıtılır. Negatif kontrol tüpüne de DNA yerine 2 µl steril su eklenir.
- 5) Allel spesifik nested PZR' nin 1. Aşaması için uygun programda reaksiyon başlatılır. (Tablo 3-8).

Tablo 3-8: İki aşamalı PZR 1. aşama koşulları

94 °C	1 dakika	
95 °C	30 saniye	35 Siklus
60 °C	30 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	2 dakika	

Tablo 3-9: İki aşamalı PZR için tasarlanan primer setleri

			Primer Dizisi	Ürün
1.AŞAMA PRİMER SETİ		P1 (Forward)	5'-GATCTCCATATTCCAGGCTTACACA-3'	453 bç
		P2 (Reverse)	5'-TATTGTTTGGGCATTGTAACCTTCT-3'	
2. AŞAMA PRİMER SETİ	Mutant Spesifik Primerler	P3 (Forward)	5'-CCTCAGAACGTTGATGGCA-3'	279 bç
		P4 (Reverse)	5'-ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGA-3'	
	Yabani Tip Spesifik Primerler	P5 (Forward)	5'-AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG-3'	229 bç
		P6 (Reverse)	5'-GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA-3'	

- 6) PZR' nin 1. Aşamasından sonra elde edilen ürün, 1:40 oranında dilüe edilerek PZR' nin 2. Aşamasında kullanılır.
- 7) Tablo 3-10' da belirtilen miktarlarda 1. aşamada olduğu gibi DNA haricinde bir karışım hazırlanır ve 18 µl steril tüplere dağıtılır ve dilüe edilen DNA' lardan 2 µl karışıma dağıtılır. Negatif kontrol tüplerine de 2 µl steril su eklenir.
- 8) Uygun koşullarda nested PZR' nin 2. aşaması gerçekleştirilir (Tablo 3-11).

Tablo 3-10: Allel Spesifik Nested PZR 2. aşama bileşenleri

Bileşen	Miktar (20 µl)
Sigma PZR Mix	10 µl
Primer 3 (Forward)	0,8 µl
Primer 4 (Reverse)	0,8 µl
Primer 5 (Forward)	0,8 µl
Primer 6 (Reverse)	0,8 µl
Kalıp DNA(1. aşama PZR ürünü 1:40 dilüe)	2 µl
H ₂ O	20 µl'ye tamamlandı

Tablo 3-11: Allel spesifik Nested PZR 2. aşama koşulları

94 °C	1 dakika	
95 °C	30 saniye	35 Siklus
59 °C	25 saniye	
72 °C	25 saniye	
72 °C	2 dakika	

3.2.7. Agaroz Jelde Görüntüleme

JAK2 mutasyon karakterinin tespit edilmesi amacıyla yapılan iki aşamalı Allel Spesifik Nested PZR sonrasında örnekler agaroz jelde yürütülür ve görüntüsü alınır. Jele yüklenen örneğin mutant alleli (*JAK2V617F*) taşıması durumunda **279 bp** uzunluğunda bant görülür, yabanıl tip allel taşıması durumunda ise **229 bp** uzunluğunda bant görülür.

3.2.7.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Allel spesifik Nested PZR 2. aşamasının ürünlerinin jelde yürütülmesi için; 1 gr agaroz, 50 ml 1X TAE tamponuna eklenerek %2' lik jel hazırlanır. Agarozun TAE içerisinde tam olarak çözünmesini için karışım mikrodalga fırında ısıtılır. Karışım tam olarak çözüldükten sonra 2,5 µl etidyum bromür ilave edilerek karıştırılır. Taraklı jel kasedine karışım dökülür ve jelin donması beklenir.

3.2.7.2. Jelin Yüklenmesi Ve Görüntülenmesi

Taraklı jel kasedinde agaroz jel donduktan sonra taraklar çıkartıldı. Jel kasediyle birlikte yürütme tankına alındı ve yürütme tamponu 1X TAE eklendi. Allel spesifik nested pzs ürünlerinden 2 µl alındı ve 6,5 µl jel yükleme tamponuyla karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Örneklerin uygun büyüklüğüne göre marker yüklenip, 65 voltta 45 dakika yürütüldü ve sonrasında U.V. ışık altında görüntü alındı.

3.2.8. RNA İzolasyonu

3.2.8.1. Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyonu

MPN hastalarından alınan periferel kanlardan ve kontron kordon kanlarından izole edilen mononükleer hücrelerin RNA izolasyonunun yapılmasında RNA Purification Kit (Jena Bioscience) kullanımıştır. Mononükleer hücre RNA izolasyon aşamasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- 1) 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpü içindeki hücre süspansiyonu, 3 000 x g’ de 5 dk santrifüj edilir ve üst sıvı atılarak hücreler pellet haline getirilir.
- 2) Hücre pelletine 500 µl “Lysis Buffer” eklenir ve vortekslenerek hücreler buffer içerisinde parçalanır.
- 3) Hücre lizatına 300 µl (hücre lizatının 0.6 katı olacak şekilde) izopropanol eklenir ve vorteks uygulanır ve karışım spin kolonuna alınır.
- 4) Spin kolondaki karışım 10 000 x g’ de 30 sn santrifüjlenir ve toplama haznesine geçen sıvı atılır. Bu aşamada RNA, spin kolon içerisindeki membranda bulunmaktadır.

Yıkama Aşamaları

- 1) Spin kolon tekrar toplama haznesine alınır ve spin kolonuna 700 µl “Primary Washing Buffer” eklenir.
- 2) Spin kolon 10 000 x g’ de 30 sn santrifüjlenir ve santrifüj sonrasında toplama haznesindeki sıvı atılır.
- 3) 700 µl “Secondary Washing Buffer” spin kolonuna eklenir.
- 4) Spin kolon 10 000 x g’ de 30 sn santrifüjlenir ve toplama haznesine geçen sıvı atılır.
- 5) Spin kolonu içerisindeki sıvının elimine olması için 10 000 x g’ de 2 dk daha santrifüj yapılır.

RNA Elüsyonu

- 1) Spin kolon içerisindeki sıvı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, Dnaz/ Rnaz içermeyen 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.

- 2) Mikrosantrifüj tüpü içerisindeki spin kolon membranına mikropipet ucu temas edecek şekilde 30- 40 µl “Elution Buffer” eklenir ve 10 dk inkübe edilir.
- 3) 10 000 x g’ de 1 dk 2 defa santrifüj yapılır ve santrifüj sonrasında mikrosantrifüj tüpü içerisinde RNA elde edilmiş olur.
- 4) RNA -20 °C’ de kısa süreli olarak veya -80 °C’ de uzun süre saklanır.

3.2.8.2. Hücre Kompartmanlarında RNA İzolasyonu

MPN hastaları ve kordon kanları mononükleer hücrelerinden hücre ayırıcı ile ayrımı sağlanmış CD133⁺CD34⁺CD45⁻, CD133⁺CD34⁺CD45⁻, CD133⁻CD34⁻CD45⁻, CD133⁺CD34⁻CD45⁻ kök hücre kompartmanlarının her bir hücre grubu, MPN hastalarından izole edilen toplam mononükleer hücre grubuna göre oldukça az sayıda hücre içerdiğinden izole edilen bu kompartmanların RNA izolasyonu Pico Pure RNA Extraction Kit (Applied Biosystems) ile aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır.

- 1) Hücre süspansiyonları masaüstü mini santrifüj kullanarak 3 000 x g, 5 dk santrifüj edilir, üst sıvı mikropipet ile dikkatlice çekilerek hücrelerin pellet haline gelmesi sağlanır.

Hücre Pelletlerinden RNA Ekstraksiyonu:

- 2) Hücre pelleti üzerine 100 µl “Extraction Buffer (XB)” eklenir ve hücre pelleti vortekslenmeden pipetaj yapılarak Extraction buffer içerisinde çözülür.
- 3) 42 °C/ 30 dakika inkübe edilir ve masaüstü mini santrifüjde 3,000 x g/ 2 dk santrifüjlenir.
- 4) Süpernatant pelletle temas etmeden dikkatlice mikropipetle çekilerek yeni bir 1,5 ml epenforfa alınır.
- 5) Bu aşamada RNA izolasyon basamağına geçilebilir veya -70 °C’ de daha sonra çalışmaya devam edilmek üzere dondurulabilir.

RNA İzolasyon Aşaması;

- 6) 100 µl Etanol (EtOH) hücre ekstraktına eklenir ve pipetaj ile yavaşça karıştırılır. Toplam hacim ortalama 200 µl olmuş olacaktır.

RNA Pürifikasyon Kolonlarının Hazırlanması;

- i) Pürifikasyon kolonu filtre membranlarına 250 µl “Conditioning Buffer (CB)” eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ii) Pürifikasyon kolonu toplama tüpünün içerisinde 16,000 x g’ de 1 dk santrifüjlendi.

RNA İzolasyon Aşaması Devam;

- 7) EtOH eklenmiş hücre ekstraktı iyice karıştırılır ve önceden hazırlanmış pürifikasyon kolonlarına aktarılır.
- 8) RNA' nın filtreye bağlanması için öncelikle 100 x g' de 2 dk santrifüjlenir sonrasında 16,000 x g' de 30 saniye santrifüjlenir.

Yıkama Aşamaları;

- 9) Pürifikasyon kolonuna 100 µl "Wash Buffer 1 (W1)" eklenir ve 8,000 x g/ 1dk santrifüjlenir.
- 10) 100 µl "Wash Buffer 2 (W2)" pürifikasyon kolonuna eklenir ve 8,000 x g/ 2dk santrifüjlenir.
- 11) Pürifikasyon kolonuna tekrar 100 µl "Wash Buffer 2 (W2)" eklenir ve 8,000 x g/ 1dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrasında yıkama solüsyonlarından herhangi bir kalıntı kalmadığına dikkat edilir eğer ki bir kalıntı varsa 16,000 g/ 1 dk tekrar santrifüjlenmelidir.
- 12) Pürifikasyon kolonu kit içerisinde bulunan steril 0,5 µl mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.

RNA Elüsyon Aşaması;

- 13) Pürifikasyon kolonu filtre membranına en az 11 µl ve en fazla 30 µl olacak şekilde " Elution Buffer (EB)" eklenir. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 14) İnkübasyon sonrasında pürifikasyon kolonu 1,000 x g/ 1 dk santrifüjlenir, gerek duyulursa santrifüj basamağı tekrarlanabilir.

RNA' nın saklanması

Uzun süreli saklama için -80 °C' ye en kısa sürede alınmalıdır.

3.2.9. Ters Transkriptaz PZR

Hasta ve kordon kanı mononükleer hücrelerinden ve CD133⁻CD34⁺CD45⁻, CD133⁺CD34⁺CD45⁻, CD133⁻CD34⁻CD45⁻, CD133⁺CD34⁻CD45⁻ kök hücre kompartmanlarından izole edilen RNA, cDNA'ya çevrilmiştir. Bu amaç doğrultusunda "ScriptcDNA Sentez Kiti" (Jena Bioscience) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı ve aşağıdaki protokol izlendi:

Kalıp RNA/ Primer Karışımının Hazırlanması;

- 1.) Tablo 3-12’de belirtilen miktarlar DNaz/RNaz içermeyen steril PZR tüplerine eklenilerek RNA/ primer karışımı hazırlanır. İşlemlerin tamamı buz üzerinde gerçekleştirilir.
- 2.) RNA/ primer karışımı hazırlandıktan sonra 65-70 °C’ de 5 dakika inkübe edilip hemen buza alınır.

Reaksiyon karışımının hazırlanması:

- 3.) İnkübasyon sırasında Tablo 3-13’ de yazan bileşenler ile örnek sayısına göre bir reaksiyon karışımı hazırlanır.
- 4.) İnkübasyondan sonra primer/ kalıp RNA karışımına, inkübasyon esnasında Tablo 3-13’ e göre hazırlanmış reaksiyon karışımından 10 µl eklenir. Toplam hacim bu aşamada 20 µl olmuş olur.

Tablo 3-12: Kalıp RNA/ Primer Karışımı

Bileşen	Bileşenin Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu	Miktar (10 µl)
H ₂ O			10 µl’ye tamamlanır.
Primer: Oligo- dT₁₅₋₂₅ Random Hexamer	-	50 pmol (300ng) 50 pmol (100ng)	0,5 µl 0,5 µl
Kalıp RNA	-	55 ng	X µl

Tablo 3-13: Reaksiyon Karışımı

Bileşen	Bileşenin Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu	Miktar (10 µl)
H ₂ O			10 µl’ye tamamlanır.
SCRIPT-RT Tampon Solüsyonu	5X	1X	4 µl
dNTP Karışımı	Herbiri için 10 mM	Herbiri için 500 µM	1 µl
DTT Solüsyonu	100 mM	5 mM	1 µl
RNaz inhibitörü	40 ünite/µl	40 ünite	1 µl
SCRIPT Ters Transkriptaz	200 ünite/µl	100 ünite	0,5 µl

- 5.) Belirtilen miktarlarda bileşenleri içeren PZR tüpleri, PZR cihazına yerleştirilir ve uygun koşullarda reaksiyon gerçekleştirilir (Tablo 3-14).

Tablo 3-14: cDNA Sentez Koşulları

42 °C	10 dakika
50 °C	30- 60 dakika
70°C	10 dakika

cDNA' nın saklanması;

- 6.) PZR sonucunda elde edilen cDNA -20 °C' de saklanır.

3.2.10. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (Q-PCR)

Laboratuvarda diğer araştırmacılar tarafından eş zamanlı yürüten JAK-STAT yoluyla ilgili yapılan Ekspresyon Array çalışmasında, F2R, MYC, genlerinde ekspresyon değişikliği saptandı. Polisitemia Vera hastalığının prognozunda etkili olduğu düşünülen *F2R*, *MYC* genlerinin değişen ekspresyon seviyelerinin hastalıkla ilişkilerini incelemek üzere ekspresyon analizi yapıldı.

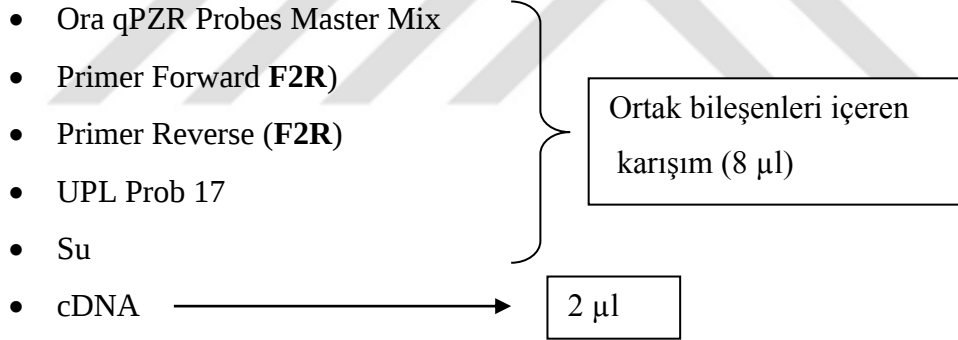
Gerçek zamanlı kantitatif PZR ile rölatif kantifikasyon yapılmıştır. Çalışmada, hidroliz prob ilkesine göre çalışan UPL problemleri kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz problemleri; DNA' ya komplementer, floresan işaretli tek zincirli problemlerdir. Her bir probun 5' ucunda "fluorophore" (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda "quencher" (6-karboksitetrametil-rodamin=TAMRA) olarak isimlendirilen işaretli eklentiler yer almaktadır. Problemlerin 3' ucunda floresan ışık yaymayan, baskılayıcı TAMRA (quencher) molekülü, 5' ucunda bulunan floresan ışık yapan FAM boyasının sinyal oluşturmaya engel olmaktadır. Bu şekilde prob floresan ışık yapamamaktadır. Primerlerin bağlanması ile yeni zincir oluşmaya başladığında Taq polimeraz, 5'→3' yönünde polimerizasyon yaparken ekzonükleaz aktivitesiyle probu keser. FAM molekülü, TAMRA baskılayıcı molekülünden ayrılması sonucunda floresan ışık yapar. Her PZR döngüsünde amplifikasyon ürünü çoğaldıkça floresan ışık miktarı da artarak devam eder.

Kantitatif PZR' da ekspresyon analizi için kök hücre komrpartmentmanlarından ve mononükleer hücrelerden elde edilen cDNA' lar kullanılmıştır. Ekspresyon analizi,

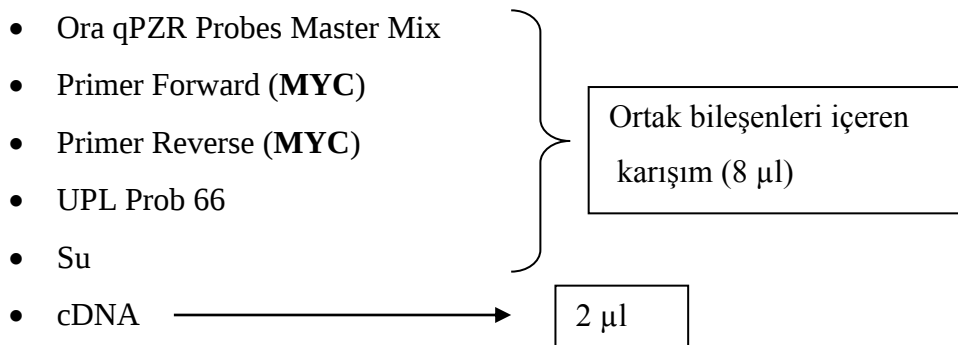
F2R, *MYC* genlerinden her birine özgü tasarlanmış primerler, UniversalProbeLibrary (UPL) problemleri ve PZR karışımı olarak ‘‘ORA qPZR Prob Mix’’ kullanılarak yapılmıştır.

Kantitatif PZR için şu basamaklar izlendi;

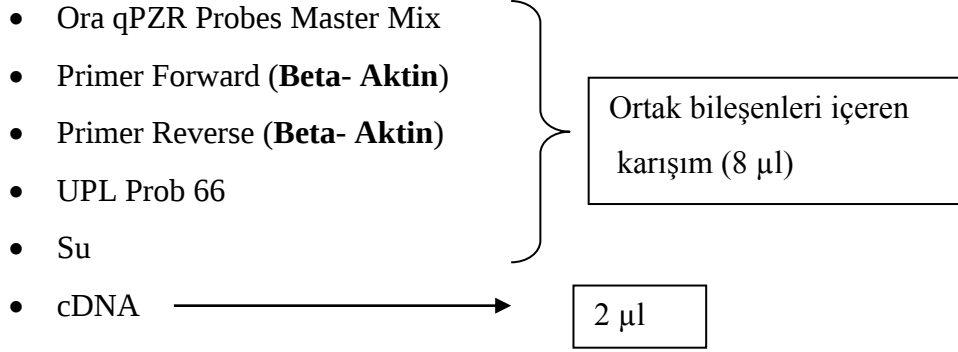
- 1.) PZR işlemleri laminar akışlı kabin içerisinde yapılır ve kullanılacak malzemeler (filtreli pipet uçları, steril su, 96 kuyulu PZR plate, 1,5 ml’lik steril tüpler) 10-15 dk kabinde U.V. ışık altında bekletilir.
- 2.) PZR bileşenlerini içeren ortak bir reaksiyon karışımı örnek miktarından %10 fazla olacak şekilde hazırlanır (Şekil 3-1)(Şekil 3-2)(Şekil 3-3).
Ortak karışımda; prob, ORA PZR karışımı, primer, steril su bulunmaktadır. Bileşenlerin konsantrasyonu Tablo- 3- 15’ te gösterilmektedir.
- 3.) Hazırlanan reaksiyon karışımından 96 kuyulu PZR plağındaki her bir kuyuya 8 µl dağıtıldı ve 2 µl cDNA kuyulara eklenerek plate folyosu yapıştırılır.
- 4.) Hazırlanan plate, 1.500 x g’ de 2 dk santrifüj edilir. Tablo 3-16’de gösterilen PZR koşullarında amplifikasyon gerçekleştirilir.



Şekil 3-1: *F2R* geni ekspresyon analizi için PZR bileşenleri



Şekil 3-2: *MYC* geni ekspresyon analizi için PZR bileşenleri



Şekil 3-3: Referans gen *Beta-Aktin* geni ekspresyon analizi için PZR bileşenleri

Tablo 3-15: Kantitatif gerçek zamanlı PZR Reaksiyon Bileşenleri

İçerik	Konsantrasyon	Miktar	Son konsantrasyon
High Qu Ora qPZR Miks	2X	5 µl	1X
Forward Primer	100 µM	0,8 µl	200 nM
Reverse Primer	100 µM	0,8 µl	200 nM
UPL Prob	20 U	0,2 µl	0,04 U
dH ₂ O	-	1,2 µl	-
ToplamMiktar	-	8 µl	-

Tablo 3-16: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı

Başlangıç Denatürasyonu	95°C	2 dk	1 Döngü
Amplifikasyon	95°C	5 sn	45 Döngü
	60°C	20 sn	
Soğutma	40 °C	30 sn	1 Döngü

Kantitatif gerçek zamanlı PZR için *MYC*, *F2R* ve referans gen olarak da *Beta-Aktin* kullanılmıştır.

MYC geni için, NM_002467.4 kodlu transkript varyantı kullanılmıştır. Varyantın boyu 2379 bp olup 454 aminoasit kodlamaktadır. Genin 7 farklı transkrip varyantı bulunmaktadır(Ensembl release 84). NM_002467.4 dizisi referans alınarak, 66 no'lu UPL prob ve primerleri kullanılmıştır. Amplikon boyutu 73 nükleotittir. *MYC* primer dizileri Tablo 3-17' te gösterilmektedir.

F2R geni için ENST00000319211.4 kodlu transkript varyantı kullanılmıştır. Varyantın boyu 3821 bp ve 425 aminoasit kodlamaktadır. Genin toplam 2 farklı transkript varyantı bulunmaktadır.(Ensembl release 84)ENST00000319211.4 dizisi referans alınarak, 17 no'lu UPL prob ve primerleri kullanılmıştır. *F2R* primer dizileri Tablo 3-17' te gösterilmektedir.

Referans gen *Beta-Aktin* için NM_001101.3 dizisi referans alınarak, 64 no' lu UPL prob ve primerleri kullanılmıştır. *ACTB* primer dizileri Tablo 3-17' te gösterilmektedir.

Tablo 3-17: *MYC*, *F2R* ve *ACTB* Primer Dizileri

Primer	Primer Dizileri
<i>MYC</i> İleri Primer	5' GCTGCTTAGACGCTGGATTT 3'
<i>MYC</i> Geri Primer	5' TAACGTTGAGGGGCATCG 3'
<i>F2R</i> İleri Primer	5' TCAGAAGATGCCTCCGGATA 3'
<i>F2R</i> Geri Primer	5' CACAGATGGGACAAAGAGTGTC 3'
<i>ACTB</i> İleri Primer	5' CCAACCGCGAGAAGATGA 3'
<i>ACTB</i> Geri Primer	:5' CCAGAGGCGTACAGGGATAG 3'

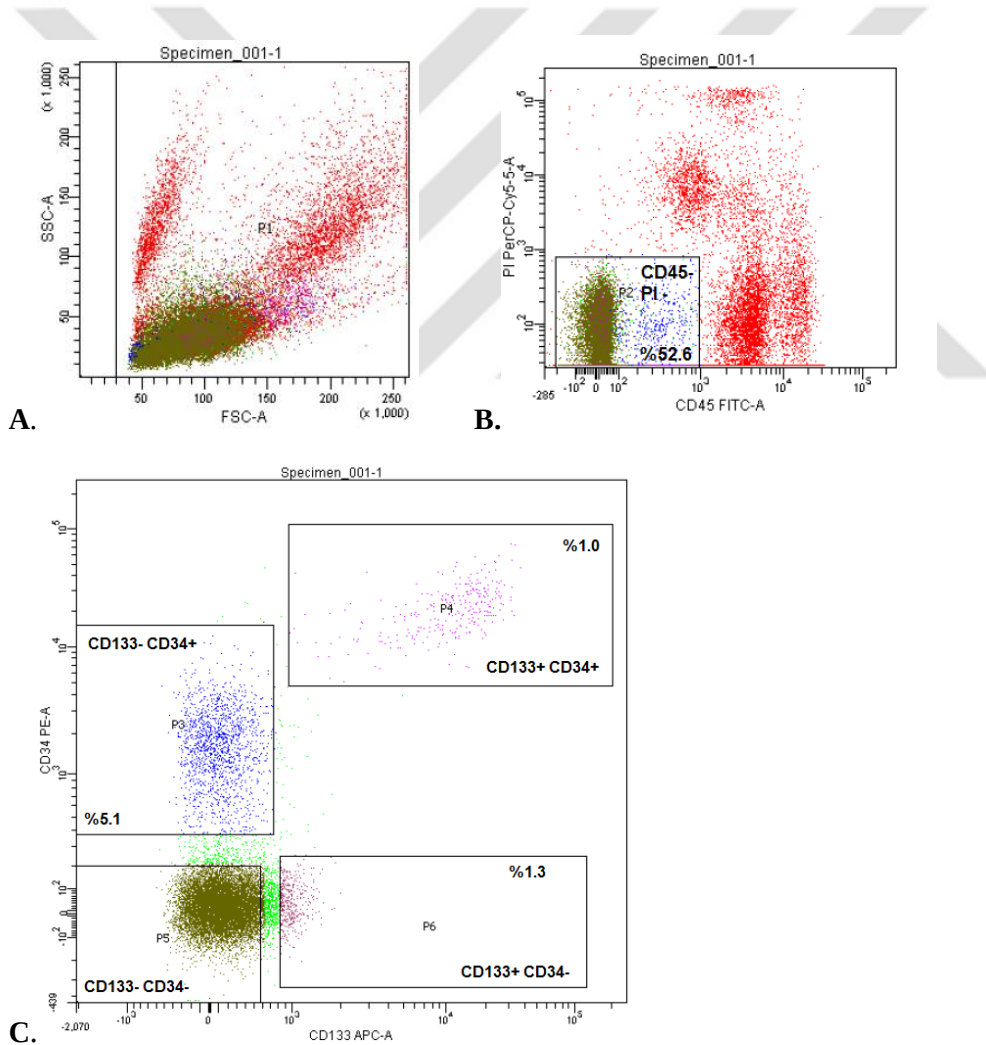
3.2.11. Gen Anlatım Verilerinin İstatiksel Analizi

Hasta mononükleer hücreleri ve ayrımı sağlanmış kök hücre kompartmanları, kontrol olarak kullanılan kordon kanı mononükleer hücreleri ve hücre ayrımı sağlanmış kordon kanı kök hücre kompartmanlarının her birinden elde edilen cDNA' lar kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif PZR yapıldı. Gen ekspresyon analizi için yapılan kantitatif PZR' da örnekler duplike çalışıldı. Belirlenen PZR verimi 2' dir. Rölatif PZR yapılan örneklerde *F2R* ve *MYC* gen ekspresyonları *ACTB* referans geni kullanılarak, $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{Örnek}} - Ct_{\text{Referans}})}$ yöntemi ile hesaplanmıştır(100). Gen ekspresyon verilerinin istatiksel analizi için GraphPad Prism 7.0 yazılımı kullanılmıştır. Hasta ve kordon kanı örneklerinin rölatif mRNA düzeylerinin kıyaslanması amacıyla parametrik olmayan istatistik testi olarak Mann- Whitney U testi kullanılmıştır. Mann- Whitney U testi, 2 bağımsız grubun medyanlarını kıyaslayarak iki örneğin verilerinin aynı anakütleden gelip gelmediğini analiz etmek amacıyla kullanılır.

4. BULGULAR

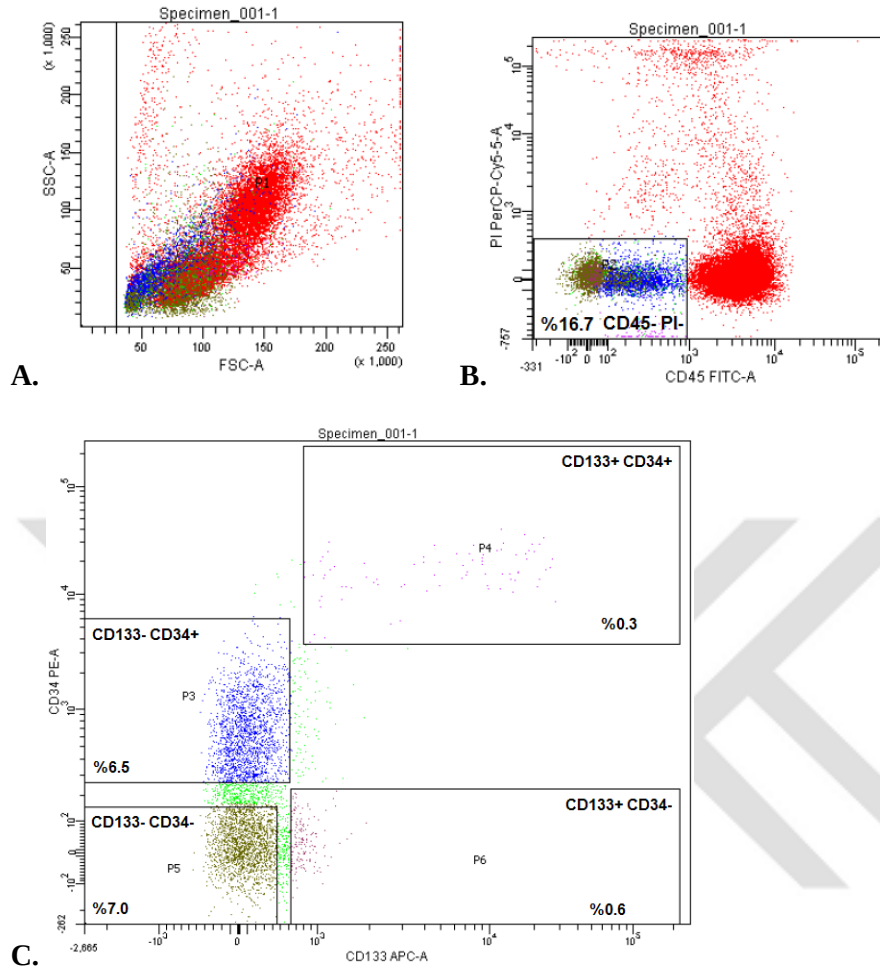
Çalışma için seçilen 11 MPN hastasında ve kontrol olarak 4 kordon kanında CD34 ve CD133 markerlarının yüzey ekspresyonu tespiti ve ayrımı için CD45 ve PI yardımıyla akım ölçer cihazında okutulmuş ve analiz edilmiştir. CD45⁺ popülasyonda olgunlaşmış hücreler, PI⁺ ölü hücreler elimine edilmiştir. Aşağıda heterozigot hasta hücre ayrımı örneği Şekil 4-1' de yabancı tip hasta hücre ayrımı örneği şekil 4-2' de, kordon kanı hücre ayrımı örneği Şekil 4-3' de gösterilmiştir.

4.1. Hücre Ayrırma (sorting) Sonuçları



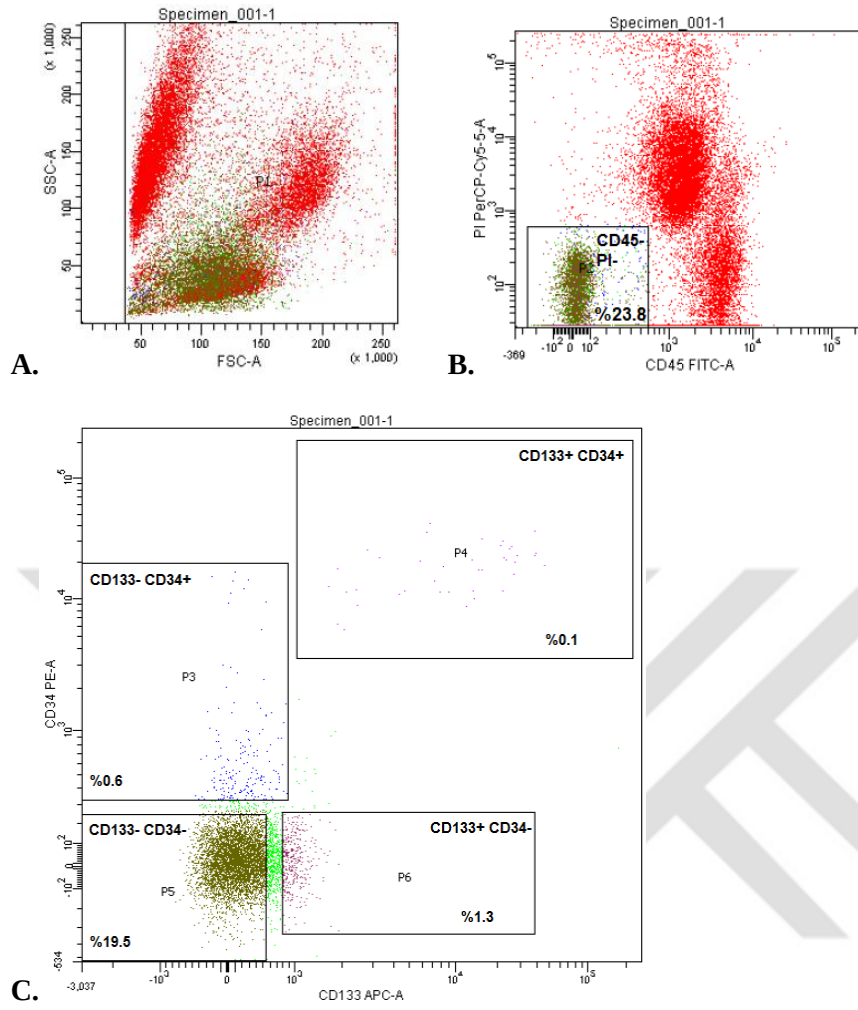
Şekil 4-1: Heterozigot karakterde olan hastanın hücre ayrımı (sorting) sonuçları

A: Hücreler öncelikle hücre iç yapısı ve büyüklüğüne göre P1 kapısında seçildi. **B:** P1 kapısı içindeki hücrelere P2 kapısı alındı ve CD45⁻ olan PI ile boyanmayan canlı hücreler seçildi. **C:** P2 kapısı içindeki hücrelere, CD133/ CD34 hücre yüzey antikoruna göre sırasıyla P3 (CD133⁻CD34⁺), P4 (CD133⁺CD34⁺), P5 (CD133⁻CD34⁻), P6 (CD133⁺CD34⁻) kapısı alındı.



Şekil 4-2: Yabanil tip karakterde olan hastanın hücre ayrımı (sorting) sonuçları

A: Hücreler öncelikle hücre iç yapısı ve büyüklüğüne göre P1 kapısında seçildi. **B:** P1 kapısı içindeki hücelere P2 kapısı alındı ve CD45⁻ olan PI ile boyanmayan canlı hücelere seçildi. **C:** P2 kapısı içindeki hücelere, CD133/ CD34 hücre yüzey antikoruna göre sırasıyla P3 (CD133⁻CD34⁺), P4 (CD133⁺CD34⁺), P5 (CD133⁻CD34⁻), P6 (CD133⁺CD34⁻) kapısı alındı.



Şekil 4-3: Kordon kanının hücre ayırımı (sorting) sonuçları

A: Hücreler öncelikle hücre iç yapısı ve büyüklüğüne göre P1 kapısında seçildi. **B:** P1 kapısı içindeki hücelere P2 kapısı alındı ve CD45⁻ olan PI ile boyanmayan canlı hücreler seçildi. **C:** P2 kapısı içindeki hücelere, CD133/ CD34 hücre yüzey antikoruna göre sırasıyla P3 (CD133⁻CD34⁺), P4 (CD133⁺CD34⁺), P5 (CD133⁻CD34⁻), P6 (CD133⁺CD34⁻) kapısı alındı.

4.2. DNA İzolasyon Sonuçları

4.2.1. Mononükleer Hücrelerden DNA İzolasyon Sonuçları

Hastalardan flebetomi ile alınan periferik kan örneklerinden mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. Mononükleer hücrelerden DNA izolasyon sonuçları Tablo 4-1 'de gösterilmektedir.

Tablo 4-1: Mononükleer Hücrelerden DNA İzolasyonu

Örnek	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	104,2	1,84	1,70
Hasta 8	77,8	1,88	0,40
Hasta 10	58,7	1,83	0,16
Hasta 11	31,8	1,82	0,19
Hasta 15	32,3	1,78	1,12
Hasta 23	311,9	1,87	1,31
Hasta 26	196,6	1,89	1,82
Hasta 27	41,1	1,97	0,18
Hasta 29	42,1	1,68	0,07
Hasta 34	299,4	1,84	1,03
Hasta 35	82,4	1,98	0,42

4.2.2. Hücre Kompartmanlarının DNA İzolasyon Sonuçları

Hücre ayırma cihazı (sorting) ile izole edilen hücre gruplarından DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA ların konsantrasyonları ve kaliteleri Tablo 4-2 , Tablo 4-3 , Tablo 4-4 , Tablo 4-5 ‘de görülmektedir.

Tablo 4-2: CD133⁺ CD34⁺CD45⁻ Hücre Kompartmanının DNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	Hücre Sayısı	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	1 421.000	18,1	1,84	0,70
Hasta 8	500 000	14,6	1,68	0,06
Hasta 10	358 000	4,0	2,72	0,10
Hasta 11	690 000	10,7	1,96	0,19
Hasta 15	191 000	9,4	2,55	0,09
Hasta 23	369 000	4,4	2,16	0,09
Hasta 26	108 000	4,5	2,19	0,02
Hasta 27	1 500.000	7,3	1,97	0,09
Hasta 29	244 000	7,3	2,12	0,10
Hasta 34	308 000	6,8	1,65	0,48
Hasta 35	463 190	9,8	1,56	0,42

Tablo 4-3: CD133⁺ CD34⁺ CD45⁻ Hücre Kompartmanının DNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	Hücre Sayısı	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	11 976	3,8	1,71	0,03
Hasta 8	80 000	10,3	1,59	0,11
Hasta 10	13 700	7,4	2,15	0,03
Hasta 11	320 000	18,8	1,78	0,56
Hasta 15	1 673	8,5	2,28	0,06
Hasta 23	842	6,7	1,71	0,04
Hasta 26	3 800	4,4	2,31	0,01
Hasta 27	33 000	5,5	2,48	0,02
Hasta 29	5 800	4,8	2,02	0,04
Hasta 34	66 800	8,5	1,89	0,31
Hasta 35	22 100	16,9	1,53	0,39

Tablo 4-4: CD133⁻ CD34⁻ CD45⁻ Hücre Kompartmanının DNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	Hücre Sayısı	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	750 000	26,1	1,58	0,15
Hasta 8	12 260 000	31,6	1,73	0,34
Hasta 10	1 590 000	15,5	1,89	0,36
Hasta 11	1 133 000	16,8	1,78	0,56
Hasta 15	518 000	10,7	2,20	0,12
Hasta 23	7 534 900	11,8	1,80	0,07
Hasta 26	830 000	12,3	1,72	0,05
Hasta 27	1 000 000	15,3	1,62	0,16
Hasta 29	6 632 000	13,6	2,02	0,21
Hasta 34	5 888 000	25,7	1,73	0,58
Hasta 35	8 600 000	11,8	1,73	0,07

Tablo 4-5: CD133⁺CD34⁺CD45⁻ Hücre Kompartmanının DNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	Hücre Sayısı	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	44 000	6,8	1,34	0,11
Hasta 8	520 000	8,3	1,41	0,10
Hasta 10	65 100	6,8	1,87	0,05
Hasta 11	541 000	14,6	1,66	0,09
Hasta 15	14 500	11,9	2,62	0,11
Hasta 23	41 000	7,2	2,19	0,08
Hasta 26	231 000	5,8	2,25	0,01
Hasta 27	39 00	6,1	2,06	0,02
Hasta 29	87 100	4,5	1,72	0,03
Hasta 34	173 000	17,3	1,51	0,45
Hasta 35	197 220	4,1	1,58	0,23

4.3. RNA İzolasyon Sonuçları

4.3.1. Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyon Sonuçları

Hastalardan flebetomi ile alınan periferik kan örneklerinden ve kordon kanlarından mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. Bu hücrelerden RNA izolasyonu sonucunda elde edilen RNA ların konsantrasyonları ve kaliteleri Tablo 4-6' da görülmektedir.

Tablo 4-6: Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	456,9	2,03	1,46
Hasta 8	89,7	1,99	0,28
Hasta 10	88,1	2,01	0,42
Hasta 11	47,3	2,03	0,09
Hasta 15	101,5	2,04	0,53
Hasta 23	201,3	2,10	0,37
Hasta 26	51,6	2,09	0,13
Hasta 27	96,0	1,98	0,25
Hasta 29	85,8	2,06	0,37
Hasta 34	180,0	1,93	1,18
Hasta 35	102,4	2,00	0,85
Kordon Kanı 1	82,0	2,07	0,13
Kordon Kanı 3	294,1	1,92	1,03
Kordon Kanı 4	225,7	2,05	0,84
Kordon Kanı 5	398,8	2,03	1,59

4.3.2. Hücre Kompartmanlarının RNA İzolasyon Sonuçları

Hücre ayırıcı (sorting) ile izole edilen hücre gruplarından RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA ların konsantrasyonları ve kaliteleri Tablo 4-7, Tablo 4-8, Tablo 4-9, Tablo 4-10' da gösterilmiştir. Her bir kök hücre kompartmanında bulunan hücrelerin yüzde ortalaması Tablo 4- 11' de gösterilmiştir.

Tablo 4-7: CD133⁺CD34⁺CD45⁻ Hücre Kompartmanının RNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	Hücre Sayısı	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	4 890 000	10,6	1,58	0,77
Hasta 8	1 1000 000	2,1	2,24	0,24
Hasta 10	690 000	12,5	1,60	0,54
Hasta 11	690 000	16,5	1,46	0,50
Hasta 15	635 000	14,7	1,61	0,19
Hasta 23	3 400 000	7,2	1,50	0,12
Hasta 26	23 000	14,7	1,61	0,37
Hasta 27	4 142 000	5,9	1,48	0,43
Hasta 29	307 000	14,2	1,52	0,17
Hasta 34	1 013 000	30,8	1,62	0,40
Hasta 35	258 000	15,1	1,58	0,69
Kordon Kanı 1	325 000	35,3	1,49	0,44
Kordon Kanı 3	57 000	30,1	1,49	0,32
Kordon Kanı 4	132 000	38,7	1,53	0,42
Kordon Kanı 5	698 000	25,8	1,87	0,22

Tablo 4-8: CD133⁺CD34⁺CD45⁻ Hücre Kompartmanının RNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	Hücre Sayısı	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	29 000	7,0	1,49	0,40
Hasta 8	120 000	12,6	1,42	0,16
Hasta 10	24 800	31,4	1,48	0,44
Hasta 11	320 000	14,7	1,40	0,33
Hasta 15	6 000	5,7	1,58	0,27
Hasta 23	3 200	24,2	1,43	0,46
Hasta 26	23 000	24,3	1,45	0,34
Hasta 27	100 000	8,5	1,41	0,42
Hasta 29	15 000	15,1	1,53	0,06
Hasta 34	77 000	18,4	1,57	0,06
Hasta 35	8 300	22,7	1,55	0,56
Kordon Kanı 1	600 000	14,2	1,46	0,12
Kordon Kanı 3	22 400	14,0	1,49	0,42
Kordon Kanı 4	13 200	15,4	1,47	0,10
Kordon Kanı 5	30 000	6,0	1,62	0,41

Tablo 4-9: CD133⁺CD34⁺CD45⁻ Hücre Kompartmanının RNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	Hücre Sayısı	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	1 525 000	24,3	1,74	1,13
Hasta 8	1 700 000	19,8	1,96	0,59
Hasta 10	2 565 000	26,4	1,72	0,39
Hasta 11	1 133 000	25,4	2,05	0,04
Hasta 15	1 514 000	14,1	1,58	0,68
Hasta 23	10 500 000	12,7	1,39	0,04
Hasta 26	4 244 000	21,8	1,88	0,72
Hasta 27	2 926 000	64,1	1,53	0,69
Hasta 29	906 000	47,6	1,74	0,56
Hasta 34	1 460 000	28,3	1,70	0,32
Hasta 35	4 830 000	18,4	2,15	0,25
Kordon Kanı 1	8 800 000	36,3	1,86	0,08
Kordon Kanı 3	741 000	11,6	1,57	0,30
Kordon Kanı 4	1 200 000	18,0	2,06	0,03
Kordon Kanı 5	1 500 000	12,20	2,04	0,10

Tablo 4-10: CD133⁺CD34⁺CD45⁻ Hücre Kompartmanının RNA İzolasyon Sonuçları

Örnek	Hücre Sayısı	ng/ µl	260/280	260/230
Hasta 7	100 000	16,5	1,49	0,42
Hasta 8	740 000	6,5	1,52	0,94
Hasta 10	129 000	20,3	1,49	0,32
Hasta 11	541 000	14,7	1,68	0,04
Hasta 15	24 400	3,8	1,70	0,23
Hasta 23	450 000	10,5	1,47	0,18
Hasta 26	280 000	19,7	1,50	0,33
Hasta 27	161 000	10,7	1,48	0,51
Hasta 29	24 100	10,4	1,38	0,28
Hasta 34	95 600	25,6	1,51	0,70
Hasta 35	343 000	19,1	1,51	0,32
Kordon Kanı 1	1 270 000	13,7	1,48	0,49
Kordon Kanı 3	94 000	17,7	1,51	0,19
Kordon Kanı 4	245 000	23,6	1,51	0,57
Kordon Kanı 5	1 100 000	29,9	1,91	0,66

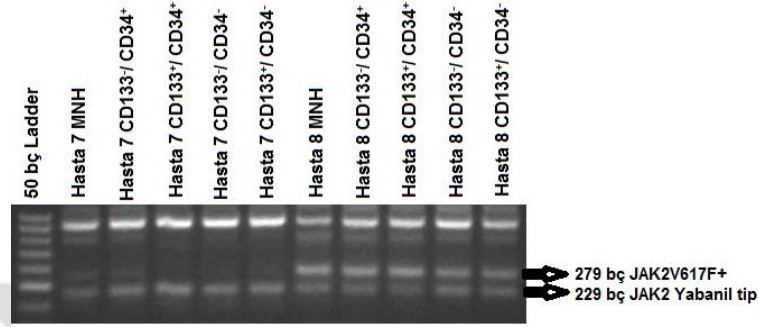
Tablo 4-11: Hücre ayırma sonrası her bir kök hücre kompartmanında elde edilen hücre sayılarının yüzdelerinin ortalaması.

Kordon Kanı Hücre sayıları (%ortalama)	Hücre kompartmanları	Hasta Hücre Sayıları (%ortalama)
0.9 + 0.4	CD133 ⁻ CD34 ⁺ CD45 ⁻	4.49 + 4.44
0.18 + 0.09	CD133 ⁺ CD34 ⁺ CD45 ⁻	0.20 + 0.30
41.8 + 24.42	CD133 ⁻ CD34 ⁻ CD45 ⁻	23.40 + 18.45
1.28 + 1.37	CD133 ⁺ CD34 ⁻ CD45 ⁻	0.62 + 0.45

4.4. İki Aşamalı Allel Spesifik Nested PZR Sonuçları

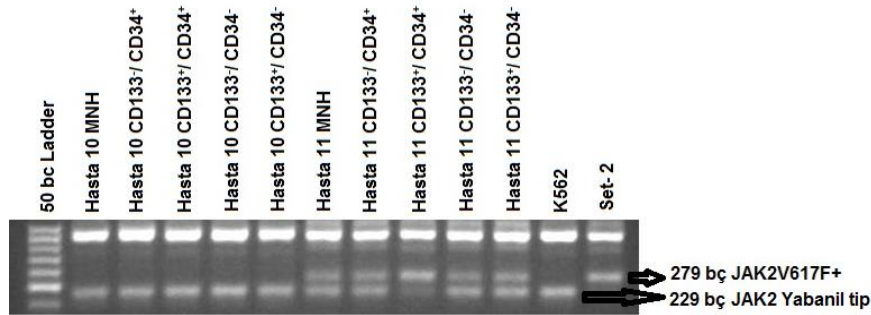
Hasta periferik kanlarından izole edilen mononükleer hücrelerden ve hücre kompartmanlarından elde edilen DNA larına JAK2V617F karakterinin belirlenmesi amacıyla yapılan allel spesifik iki aşamalı nested pqr sonuçları Şekil 4-4, Şekil4-5, Şekil

4-6 ve Şekil 4-7' de gösterilmektedir. PZR' da negatif kontrol olarak yabancı tip K562 hücre soyu ve pozitif kontrol olarak heterozigot karakterde olan Set- 2 hücre hattı kullanılmıştır. JAK2V617F taşıyan hücrelerin 279 bp uzunluğunda ve mutasyon taşımayan hücrelerin ise 229 bp uzunluğunda bant vermiştir.



Şekil 4-4: Hasta 7- Hasta 8 MNH ve hücre kompartmanlarının nested pcr jel görüntüsü

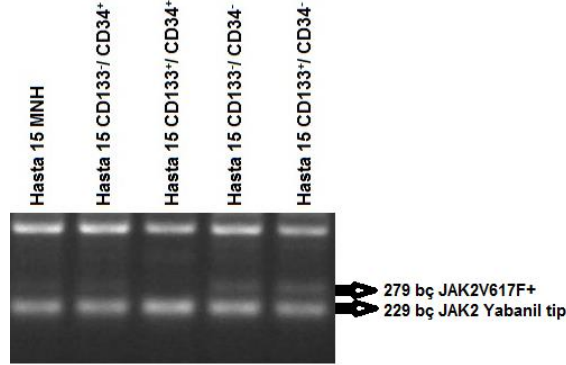
Hasta 7 mononükleer hücrelerinin ve $CD133^-CD34^+$ kompartmanının heterozigot karakterde olduğu görülürken diğer izole edilmiş üç kök hücre kompartmanının ise yabancı tip karakterde olduğu görülmüştür. Hasta 8 mononükleer hücreleri ve kök hücre kompartmanları heterozigot karakterde olduğu ancak $CD133^-CD34^+$ ve $CD133^+CD34^+$ kompartmanının diğer kompartmanlara kıyasla mutant allel yoğunluğunun olduğu görülmüştür (Şekil 4-4).



Şekil 4-5: Hasta 10- Hasta 11 MNH ve hücre kompartmanlarının nested pcr jel görüntüsü

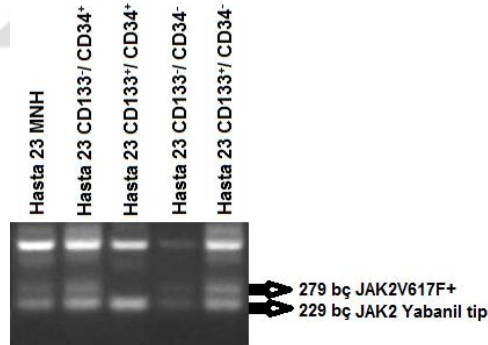
Mutasyon taşımayan hasta 10 mononükleer hücreleri ve diğer kök hücre kompartmanları arasında bir fark görülmemiştir. Mononükleer hücreleri heterozigot karakterde olan hasta 11, kök hücre kompartmanları da heterozigot karakterde olduğu

özellikle $CD133^-CD34^+$ ve $CD133^+CD34^+$ kompartmanında mutant allel dominantlığı bulunmaktadır(Şekil 4-5).



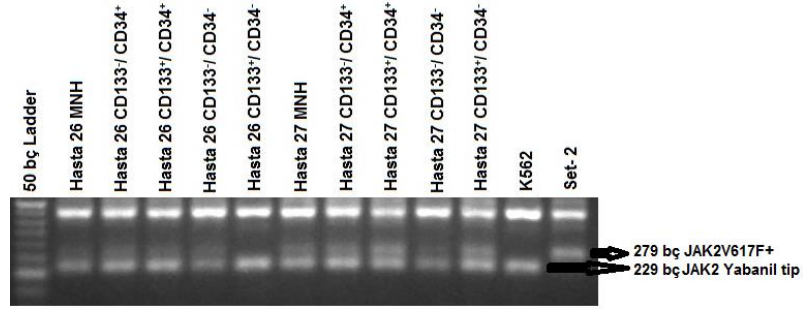
Şekil 4-6: Hasta 15 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pcr jel görüntüsü

Mononükleer hücreleri heterozigot karakterde olan hasta 15' in $CD133^-CD34^-$ ve $CD133^-CD34^+$ kompartmanında mutant allel yoğunluğu görülürken $CD133^+CD34^+$ kompartmanının yabanil tip karakterde olduğu görülmüştür(Şekil4-6).



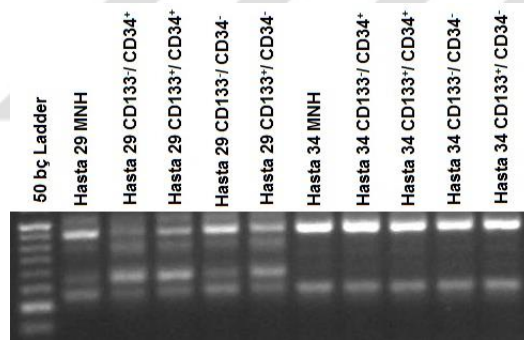
Şekil 4-7: Hasta 23 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pcr jel görüntüsü

Hasta 23 mononükleer hücreleri heterozigot karakterde olduğu, $CD133^-CD34^+$ ve $CD133^+CD34^-$ kompartmanının mutant allel yoğunluğu taşıdığı, $CD133^+CD34^+$ kompartmanının ise yabanil tip allel karakterinde olduğu görülmüştür (Şekil 4-7).



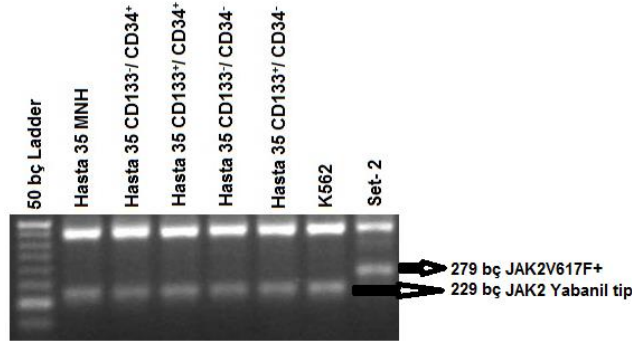
Şekil 4-8: Hasta 26- Hasta 27 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pcr jel görüntüsü

Hasta 26 mononükleer hücreleri heterozigot karakterde iken $CD133^-CD34^+$ ve $CD133^+CD34^+$ kök hücre kompartmanının mutant allel yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmüştür. $CD133^+CD34^-$ kompartmanı ise yabanil tip allel taşımaktadır. K562 yabanil tip alleli taşıyan (229 bp), Set-2 ise heterozigot karakterde (279 bp) olan kontroldür (Şekil 4-8).



Şekil 4-9: Hasta 29- Hasta 34 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pcr jel görüntüsü

Hasta 29' un, mononükleer hücrelerine kıyasla heterozigot karakteri daha baskın olan kök hücre kompartmanları olduğu görülmüştür. Özellikle $CD133^-CD34^+$, $CD133^+CD34^+$ ve $CD133^+CD34^-$ hücre kompartmanlarındaki mutant allelin baskın olduğu görülmüştür. Mononükleer hücreleri yabanil tip karakterde olan hasta 34 kök hücre kompartmanlarında da bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4-9).



Şekil 4-10: Hasta 35 MNH ve hücre kompartmanlarında nested pcr jel görüntüsü

Mononükleer hücrelerinde mutasyon taşımadığı görülen hasta 35' in mononükleer hücreleri ile kök hücre kompartmanları arasında bir farklılık olmadığı görülmüştür. K562 yabanil tip alleli taşıyan (229 bp), Set-2 ise heterozigot karakterde (279 bp) olan kontroldür (Şekil 4-10).

MPN hastalarının mononükleer hücrelerinde ve izole kök hücre kompartmanlarında JAK2 geninde V617F mutasyonunun allel bazında değerlendirilmesi Tablo 4-12' de gösterilmektedir.

Tablo 4-12: Hastaların Mononükleer Hücre ve Kök Hücre Kompartmanlarının JAK2V617F mutasyon durumu.

Örnek	Mononükleer Hücre	CD133-CD34+	CD133+CD34+	CD133-CD34-	CD133+CD34-
Hasta 7	+ /-	+ /-	-	-	-
Hasta 8	+ /-	+ /- ↑	+ /- ↑	+ /-	+ /-
Hasta 10	-	-	-	-	-
Hasta 11	+ /-	+ /-	+ /- ↑	+ /-	+ /-
Hasta 15	+ /-	+ /-	-	+ /- ↑	+ /- ↑
Hasta 23	+ /-	+ /- ↑	-	+ /- ↓	+ /- ↑
Hasta 26	+ /-	+ /- ↑	+ /- ↑	+ /- ↓	-
Hasta 27	+ /-	+ /- ↑	+ /- ↑	+ /-	+ /- ↑
Hasta 29	+ /-	+ /- ↑	+ /- ↑	+ /-	+ /- ↑
Hasta 34	-	-	-	-	-
Hasta 35	-	-	-	-	-

Tabloda bulunan kısaltmalar:

- : JAK2 Yabanıl tip allel

- : JAK2 Yabanıl tip allel

+/- : Heterozigot JAK2V617F allel

+/- ↑ - : Heterozigot JAK2V617F allel ve JAK2V617F mutasyon yoğunluğunun daha fazla olması

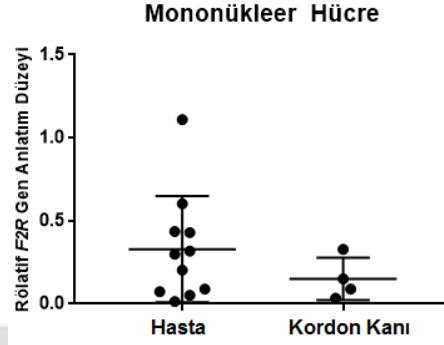
+/- ↓ : Heterozigot JAK2V617F allel ve JAK2V617F mutasyon yoğunluğunun daha düşük olması

4.5. Gen Anlatım Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 11 MPN hastasında ve 4 kontrol kordon kanı örneğinden izole edilen mononükleer hücrelerinde ve CD133/ CD34 hücre yüzey belirteciye göre hücre ayrımı sağlanan kompartmanlarında rölatif *F2R* ve *MYC* gen ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

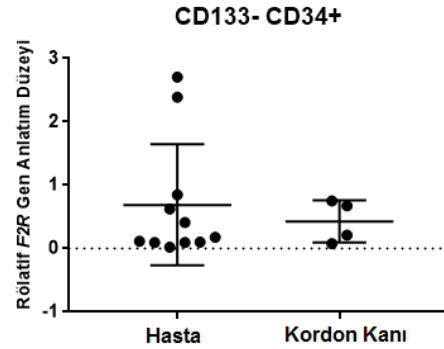
4.5.1. *F2R* Gen Anlatım Sonuçları

11 gönüllü hasta ve kontrol olarak 4 kordon kanı örneği mononükleer hücreleri ve izole edilen kök hücre kompartmanlarında *F2R* gen anlatım düzeylerinin analizi yapılmıştır.



Şekil 4-11: Hasta ve kordon kanı mononükleer hücrelerinde *F2R* gen anlatımı

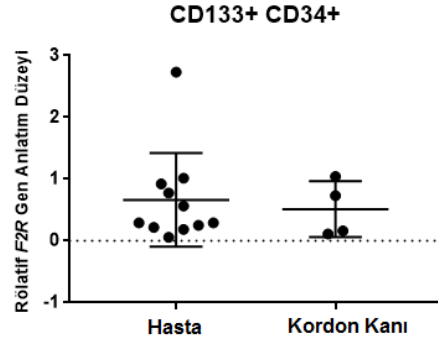
Şekil 4-11’ de hasta ve kordon kanı mononükleer hücrelerin *F2R* gen anlatımı incelenmiştir. Hasta ve kordon kanı mononükleer hücrelerindeki gen anlatım düzeyi karşılaştırılmıştır. mRNA seviyeleri *ACTB* referans geni ile normalize edilmiştir. Hasta mononükleer hücrelerinde *F2R* geni anlatım düzeyi kordon kanı mononükleer hücrelerinin gen anlatım düzeyine göre arttığı tespit edilmiştir. (p=0,49 Mann-Whitney U testi)



Şekil 4-12: Hasta ve kordon kanı CD133⁻CD34⁺ kök hücre kompartmanında *F2R* gen anlatımı

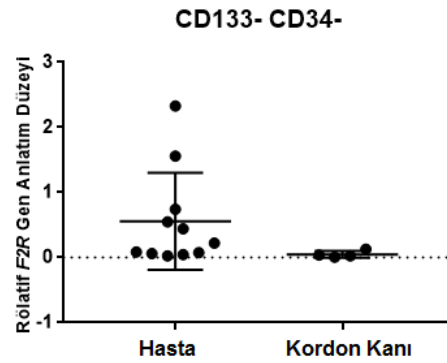
Şekil 4-12’ de PV hasta ve kordon kanı CD133⁻CD34⁺ kök hücre kompartmanında *F2R* gen anlatım düzeyi incelenmiştir. mRNA seviyeleri *ACTB*

referans geni ile normalize edilmiştir. CD133⁺CD34⁺ kompartmanının hastalardaki gen anlatım seviyesinin kordon kanına göre daha yüksek olduğu görülmüştür.(p=0.95 Mann-Whitney U testi)



Şekil 4-13: Hasta ve kordon kanı CD133⁺CD34⁺ kök hücre kompartmanında F2R gen anlatımı

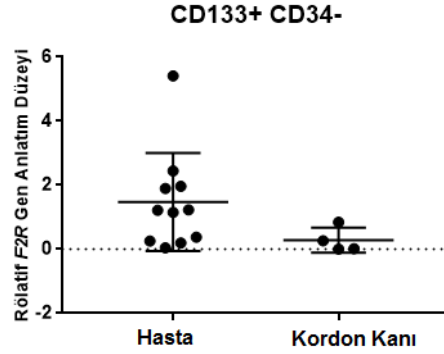
Şekil 4-13' de PV hastalarından ve kordon kanlarından izole edilmiş CD133⁺CD34⁺ kök hücre kompartmanında F2R gen anlatım düzeyi analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. CD133⁺CD34⁺ kök hücre kompartmanının F2R gen anlatım düzeyinin hastalarda kordon kanına göre artmış olduğu belirlenmiştir. (p=0,75 Mann-Whitney U testi)



Şekil 4-14: Hasta ve kordon kanı CD133⁻CD34⁻ kök hücre kompartmanında F2R gen anlatımı

Şekil 4-14' te mRNA seviyeleri *ACTB* referans geni kullanılarak normalize edilmiştir. PV hastaları ve kontrol olarak kullanılan kordon kanından CD133⁻CD34⁻ kök hücre kompartmanı izole edilmiş ve *F2R* gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Hastalardaki CD133⁺CD34⁻ kök hücre kompartmanında artmış *F2R* gen anlatımı olduğu belirlenmiştir.($p=0,04$ Mann-Whitney U testi)

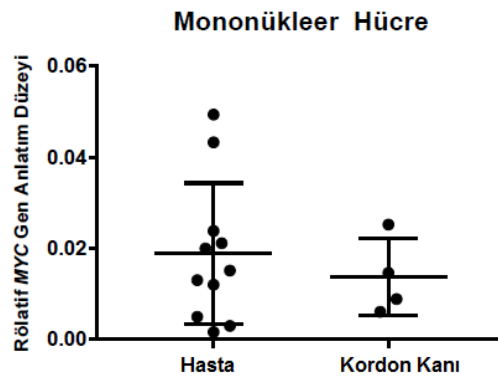


Şekil 4-15: Hasta ve kordon kanı CD133⁺CD34⁻ kök hücre kompartmanında *F2R* gen anlatımı

Şekil 4-15' te hasta ve kordon kanı CD133⁺CD34⁻ kök hücre kompartmanında *F2R* gen anlatım düzeyleri incelenmiştir. mRNA seviyeleri *ACTB* referans geni kullanılarak normalize edilmiştir. PV hastalarındaki *F2R* gen anlatım düzeyinin kordon kanına göre artmış olduğu görülmüştür.($p=0,05$ Mann-Whitney U testi)

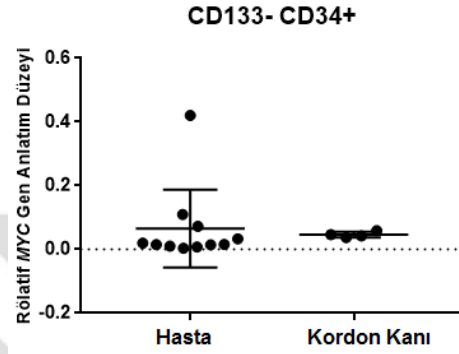
4.5.2. MYC Gen Anlatım Sonuçları

11 gönüllü hasta, kontrol olarak 4 kordon kanı örneği mononükleer hücreleri ve izole edilen kök hücre kompartmanlarında *MYC* gen anlatım düzeyleri qRT- PCR kullanılarak araştırılmıştır.



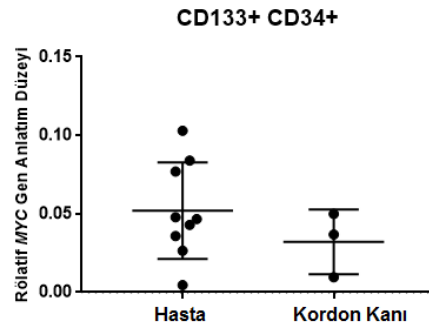
Şekil 4-16: Hasta ve kordon kanı mononükleer hücrelerinde *MYC* gen anlatımı

Şekil 4-16’ da MPN hastaları ve kontrol olarak kullanılan kordon kanı örneklerinden izole edilen mononükleer hücrelerde *MYC* gen anlatım düzeyi incelenmiştir. mRNA seviyelerinin normalize edilmesi amacıyla *ACTB* referans geni kullanılmıştır. MPN hastalarına ait mononükleer hücrelerde *MYC* gen anlatım düzeyinin artmış olduğu görülmüştür. (p=0,85 Mann-Whitney U testi)



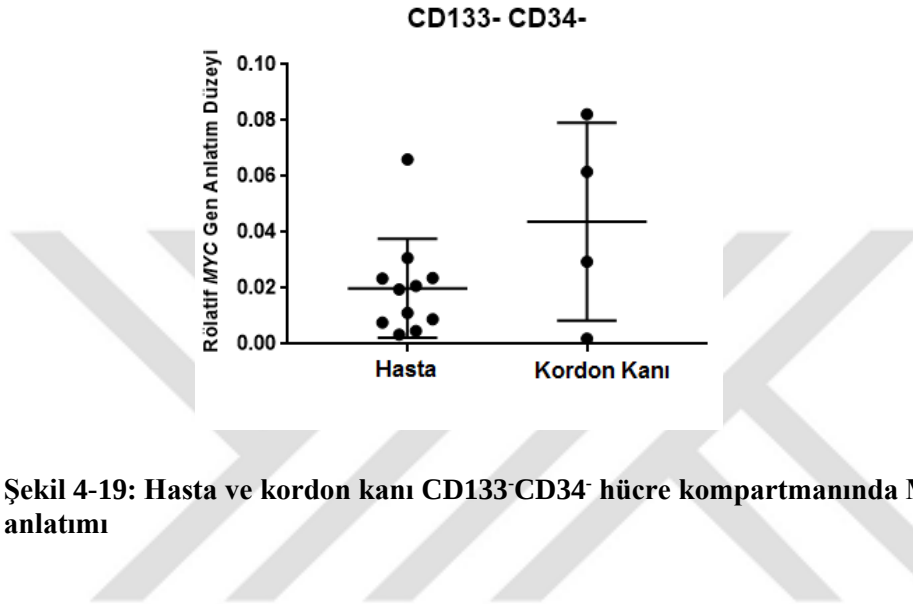
Şekil 4-17: Hasta ve kordon kanı CD133-CD34⁺ kök hücre kompartmanında *MYC* gen anlatımı

Şekil 4-17’ de MPN hastalarının ve kontrol kordon kanı örneklerinden izole edilmiş CD133⁺CD34⁺ kök hücre kompartmanında *MYC* gen anlatım düzeyi incelenmiş ve karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. mRNA seviyelerinin normalize edilmesinde *ACTB* referans geni kullanılmıştır. Hasta örneklerinde *MYC* gen anlatım düzeyinin kordon kanına kıyasla artmış olduğu görülmüştür. (p=0,23 Mann-Whitney U testi)



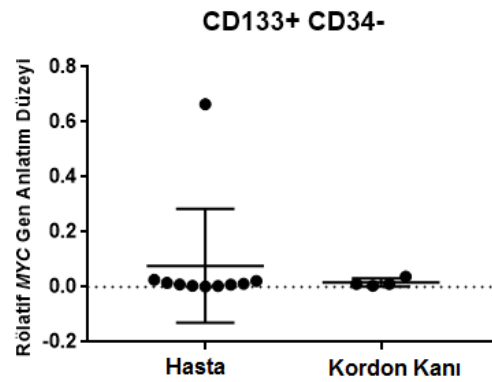
Şekil 4-18: Hasta ve kordon kanı CD133⁺CD34⁺ kök hücre kompartmanında *MYC* gen anlatımı

Şekil 4-18’ de MPN hastalarından ve kontrol kordon kanı örneklerinden izole edilmiş $CD133^+CD34^+$ kök hücre kompartmanında MYC gen anlatım düzeyi incelenmiş ve karşılaştırmalı olarak analizi yapılmıştır. mRNA seviyeleri ACTB referans geni kullanılarak normalize edilmiştir. MPN hastalarında MYC gen anlatım düzeyinin kordon kanına göre daha yüksek oranda olduğu görülmüştür. (p=0,60 Mann-Whitney U testi)



Şekil 4-19: Hasta ve kordon kanı $CD133^-CD34^-$ hücre kompartmanında MYC gen anlatımı

Şekil 4-19’ da MPN hastalarından ve kontrol kordon kanı örneklerinden izole edilen $CD133^-CD34^-$ hücre kompartmanında rölatif MYC gen anlatımı analiz edilmiştir. ACTB mRNA seviyelerinin normalize edilmesi için referans gen olarak kullanılmıştır. Kordon kanında MYC gen anlatım düzeyinin MPN hastalarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. (p=0,34 Mann-Whitney U testi)



Şekil 4-20: Hasta ve kordon kanı $CD133^+CD34^-$ kök hücre kompartmanında MYC gen anlatımı

Şekil 4-20' de MPN hastalarından ve kordon kanından izole edilen CD133⁺CD34⁻ kök hücre kompartmanında MYC gen anlatımı düzeyi analiz edilmiştir. mRNA seviyelerinin normalizasyonunda ACTB referans geni kullanılmıştır. MPN hastalarındaki MYC gen anlatımı kordon kanına kıyasla artmış olduğu görülmüştür.(p=0,84 Mann-Whitney U testi)



5. TARTIŞMA

Yapmış olduğum bu yüksek lisans tez projesinde, hipotezim; MPN hastalarında malignite, CD34⁺ kök hücrelerinden daha primitif özellikte olan hücre grubundan başlamaktadır ve *MYC*, *F2R* gen ekspresyon değişimlerinin primitif hücrelerde malignitenin başlamasında etkisi vardır.

Bu hipotez doğrultusunda MPN' lerde CD45-FITC, CD133-APC, CD34-PE antikorları kullanılarak CD45⁻ popülasyonda, CD133⁺CD34⁻, CD133⁻CD34⁺, CD133⁺CD34⁺, CD133⁻CD34⁻ kök hücre kompartmanları hasta periferel kanlarından elde edilen mononükleer hücrelerden izole edilerek kök hücre immünofenotipleme yapılmıştır. Bunun yanında izole edilen herbir grupta *F2R* ve *MYC* genlerinin gen ekspresyon değerlendirilmesi de gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın önemi, kök hücreden kaynaklanıp klonal proliferasyonla yayıldığı düşünülen myeloproliferatif hastalıkların CD34 progenitör marker haricinde CD133 kök hücre markeri da kullanarak hastalığın daha primitif bir seviyeden başlama ihtimalini irdelemek ve farklı CD34/ CD133 kombinasyonları kullanarak CD133' ün mutasyon başladığı popülasyonla ilişkisini ortaya çıkarmaktır.

CD133⁻CD34⁺ kök hücre kompartmanında ortalama 559.290 ± 47.853 hücre, CD133⁺CD34⁺ kök hücre grubunda 50.881 ± 93.137 hücre, CD133⁻CD34⁻ kompartmanında $424.8718 \pm 4.092.165$ ve CD133⁺CD34⁻ kök hücre kompartmanında $174.346 + 191.459$ hücre ayrımı yapılmıştır. MPN hasta grubunda primitif özellikte olan CD133⁺ hücre grubunun en az sıklıkla görüldüğü belirlenmiştir(Tablo 4-11).

Bu bağlamda literatürde yapılmış çalışmalarda MPN grubunda yer alan primer miyelofibroz (PMF) hastalarındaki periferel kandan izole edilen mononükleer hücrelerde yapılmış olan çalışmalarda sağlıklı donörlerde periferel kanda bulunan CD133⁺ hücre grubunun hasta grubunda neredeyse tamamının CD133⁺CD34⁺ hücreler olduğu tespit edilmiştir. CD133⁺ ve/ veya CD34⁺ hücre popülasyonunun sağlıklı donörlerden daha fazla olduğu belirlenmiştir(62).

Primer miyelofibroz hastalarında periferel kanda bulunan CD133⁺ hematopoietik progenitör hücrelerin genellikle CD34⁺ ekspresyonundan yoksun olduğu görülmüştür. CD133⁺ hücre grubunun farklı mutasyonları barındıran neoplastik kök

hücre klonu içerdiğinden PMF hastalığının seyrini etkilediği bulunmuştur(62). Periferel kan dolaşımında CD133 neoplastik kök hücre aktivitesini gösteren marker olarak görülebilir. Bu araştırma MPN grubundan primer miyelofibroza CD133 ekspresyonunu analiz eden ilk ve tek literatürdür(62). Miyeloid metaplazisi olan PMF hastalarının periferel kandaki CD133⁺CD34⁺VEGFR2⁺ hücrelerin sağlıklı gönüllülerdeki ve diğer kronik MPN hastalardaki CD133⁺CD34⁺VEGFR2⁺ hücre popülasyonundan daha fazla olduğu tespit edilmiş ve olgunlaşmamış hematopoietik progenitör (CD45⁺CD34⁺CD38⁻) hücre grubu ile arasında ters korelasyon olduğu belirlenmiştir. Periferel kan dolaşımında bulunan endotel progenitör hücrelerin sayısı azaldıkça hematopoietik progenitör hücrelerin sayısının arttığı belirlenmiştir(101).

Bu çalışmada; toplam 11 MPN hastası çalışılmıştır (9 PV, 1 ET, 1 sınıflandırılmayan MPN). Bu hastaların mononükleer hücreleri ve izole edilmiş olan CD133⁺CD34⁻, CD133⁻CD34⁺, CD133⁺CD34⁺, CD133⁻CD34⁻ kök hücre kompartmanları arasında JAK2V617F allel karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda; hastaların 8'inin mononükleer hücrelerinin JAK2V617F heterozigot allel karakterinde, 3'ünün ise JAK2 yabanil tip allel taşıdığı görülmüştür. Mononükleer hücrelerde mutasyon taşımayan 3 hastanın analiz edilen herbir kök hücre kompartmanlarında da mutasyon olmaması hastalığın gelişmesine JAK2V617F mutasyonu haricinde başka mutasyonların da etki ettiğini düşündürmektedir(20).

Mononükleer hücreleri heterozigot karakterde olan 8 hastanın 8'inde de CD34⁺CD133⁻ kompartmanında JAK2V617F heterozigot allel tespit edilmiş ve bu hastalardan 5' inde mutant bandın daha yoğun olmasıyla orantılı olarak mutant allel dominantlığı görülmüştür. Bu sonuç şimdiye kadar yapılan çalışmalarla örtüşmektedir. Nitekim, CD34⁺ progenitör hücre grubu periferel kan dolaşımında yaygın olarak görülmekte(47) ve CD34⁺ progenitör hücre grubu kanseri başlatıcı hücre grubu olarak bilinmektedir(102).

Mononükleer hücreleri heterozigot karakterde olan 8 hastanın 5' inde CD34⁺CD133⁺ kök hücre grubunda mutant allel dominantlığı görülmüştür. CD34⁺ hücre grubuna göre daha primitif özellikte olduğu düşünülen CD133⁺CD34⁺ kompartmanının bağlantılı olarak burada görülen mutasyonun CD34'den daha primitif kök hücreden başladığını düşündürmektedir. CD133⁺CD34⁺ hücre grubu multipotent, bipotent,

unipotent özellikte miyeloid öncü hücrelerine farklılaşma potansiyeli vardır. CD34⁺CD133⁻ hücre grubu ise granülosit/ monosit progenitörleri veya endotel benzeri progenitör hücre hatlarına farklılaşma ile sınırlıdır(62).

Mononükleer hücrelerinin heterozigot karakterde olduğu belirlenen 8 hastanın 7'sinde CD34⁻ CD133⁻ hücre grubunda mutant allel görülmüş ve bunun sadece 3'ü allel dominantlığı olarak kendini göstermiştir. Bu bulgu, hücre grubunda mutasyon karakterinin periferik kandaki mononükleer hücre grubundan farklı olabileceğini göstermiştir.

Mononükleer heterozigot karakterde olan 8 hastanın 6'sında CD34⁻CD133⁺ hücre grubunda heterozigot mutant allel tespit edilmiş ve bunun 4'ünde mutant allel dominantlığı görülmüştür. Primitif özellikte olan CD133⁺ kök hücre grubunda mutasyon taşıyan allelin baskın olması kanserin, kök hücre seviyesine yakın primitif hücre grubunda oluşup malignite ile ilişkilendirildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada analiz edilen hastalar mutasyon karakteri bakımından heterozigot ve yabancıl tip allel taşımaktadır. Bu çalışmanın eksik olduğunu düşündüğümüz bir yönü de homozigot allel taşıyan hasta grubunu çalışmamızdır. Bu özelliğe sahip hasta grubunun da ilerdeki çalışmalarda eklenmesi sonuçları katkıda bulunacak ve kök hücre kompartmanlarının karakteri daha net bir şekilde belirlenebilecektir.

Tüm bu çalışmalara ek olarak, izolasyonları yapılan CD133⁺CD34⁻, CD133⁻CD34⁺, CD133⁺CD34⁺, CD133⁻CD34⁻ kompartmanlarında ve karşılaştırmalı olarak da mononükleer hücrelerde hastalığın patogenezinde etkili olduğu düşünülen *F2R* ve *MYC* rölatif gen anlatımları incelenmiştir.

Hasta mononükleer hücrelerinde, CD133⁻CD34⁻ ve CD133⁺CD34⁻ kompartmanın *F2R* anlatım düzeyinde diğer CD133⁻CD34⁺ ve CD34⁺CD133⁺ kompartmana kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur. CD133⁻CD34⁻ ve CD133⁺CD34⁻ kompartmanı dışında görülen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Önceki yıllarda yapılmış olan çalışmalarda ise sağlıklı donörlerden izole edilen CD34⁺ hücreler ile AML hastalarındaki blast hücrelerinde *F2R* ekspresyonu karşılaştırıldığında AML hastalarındaki blast hücrelerinin *F2R* ekspresyonunun azalmış olduğu ve *F2R*' in AML' de kök hücre fonksiyonlarını baskılayıcı rolü olduğu görülmüştür(92). Ancak yapmış olduğum bu çalışmada *F2R*' da bulunan artışın nedeni olarak MPN' de görülen trombotik komplikasyonlar etkili olmuş

olabilir şöyle ki; trombin reseptörü olan *F2R*, trombin benzeri proteazlar tarafından kırılma ile aktiveşerek trombotik tepkinin düzenlenmesini sağlar. AML' de azalmış ekspresyonu olan *F2R*' in MPN' de ekspresyonu çoklu trombotik komplikasyonlarının gelişmesini trombin üzerinden indükleyebilir. Bu farklılık MPN' lerin kök hücre kaynaklı olmasından dolayı kök hücre kompartmanlarında *F2R* ekspresyonunun görülmesi *F2R*, hastalığın gelişmesinde etkili olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Hasta mononükleer hücrelerinde ve $CD133^+ CD34^+$ kök hücre grubunda *MYC* gen anlatımında artış olduğu, $CD133^- CD34^+$ kök hücre kompartmanında kordon kanı ile aynı oranda eksprese olduğu, $CD133^- CD34^-$ hücre kompartmanında ise kordon kanındaki ekspresyonunun artmış olduğu, $CD133^+ CD34^-$ kök hücre kompartmanında ise kordon kanına göre yüksek oranda eksprese olduğu görülmüştür ancak istatistiksel anlamlılık yakalanamamıştır. Özellikle primitif hücre grubu olan $CD133^+ CD34^-$, $CD133^+ CD34^+$ kök hücre kompartmanında *MYC* protoonkogeninin ekspresyonunun artmış olmasının kanserogenezi arttırdığını düşündürmektedir(87).

JAK- STAT array çalışmasında belirlenen bu *MYC* ve *F2R* genlerinin mutasyon varlığı tespit edilen hücrelerde saptanması ve çalışmada kullanılan kök hücre, mononükleer hücrelerin mutasyon taşıyan-taşımayan hücreler üzerinde yapılmasından dolayı öngörülen anlamlı değişikliğin saptanamadığı düşünülmektedir.

Deneylerde kontrol olarak kullanılan kordon kanı örneklerinin ve heterozigot, homozigot, yabanıl tip hasta sayısının arttırılmasının çalışmanın istatistiksel anlamlılığını arttıracakı düşünülmektedir. Bunun yanında bu çalışma için kullanılacak kontrol grubunun kordon kanı yeride G-CSF ile uyarılmış insan perifer kan MNH' lerinin olması sonuçları anlamlı olarak değiştireceği şeklindedir. Ancak maddi olarak ek bütçe gerektirecek böyle bir işlem bu aşamada gerçekleştirilememiştir.

Mononükleer hücrelerin $CD133$ ve $CD34$ hücre yüzey antikorlarına göre seçildiği $CD133^-CD34^+$, $CD34^+CD133^+$, $CD34^-CD133^-$, $CD133^+CD34^-$ kök hücre kompartmanlarının her birinin farklı hücre sayısında olduğu belirlenmiştir ve kompartmanlarda az hücre sayısı görüldüğünden dolayı az sayıda hücrelerden kaliteli izolasyonunun yapılabilmesi ve gen eksprespreyon analizi sürecinde sıkıntılar yaşanmıştır.

Gelecek dönemlerde yapılacak çalışmalarda; hasta sayısının arttırılarak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç yakalanacakı düşünülmektedir ve hasta sayısının arttırılmasıyla

genlerle ilgili fonksiyonel çalışmalar yapılarak genlerin MPN ile ilgili gerçek rolünün tespit edilmesi planlanmaktadır. MPN’ de PAR-1 proteinin de rol aldığı düşünülen trombotik olaylarla ilgili çalışmalar yapılması ve bu trombotik parametrelerin ölçümü ve değerlendirilmesi gibi çalışmaların da yapılması planlanmaktadır. Bu çalışmaya dahil edilen hasta grubu içinde 9 PV ve 1 ET ve 1 tanımlanamayan MPN grubunda yer alan hasta ile çalışılmıştır. İleriki dönemlerde yapılacak çalışmalarda hasta çeşitliliğinin artırılarak MPN grubundaki PV, ET ve PMF hastaları da çalışmalara dahil edilmesiyle anlamlı sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile literatürde ilk defa olarak PV hastalarında;

- CD133 ve CD34 antikorları kullanılarak seçilmiş CD133⁺CD34⁺, CD34⁺CD133⁺, CD34⁺CD133⁻, CD133⁺CD34⁻ kompartmanları analiz edilmiştir ve farklı sıklıkta görülen her allel kompartmanının farklı JAK2V617F mutasyon karakterinde olduğu belirlenmiştir
- MPN’ lerde en az sıklıkta görülen CD133⁺CD34⁺ kök hücre kompartmanı analizi yapılmıştır.
- Aynı zamanda MPN’ lerde de ilk defa *F2R* gen anlatım düzeyi analiz edilmiş ve kordon kanına kıyasla CD133⁺CD34⁻ primitif özellikte olan kök hücre kompartmanında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *The New England journal of medicine* 2006; **355**(23): 2452-2466.
2. Koopmans SM, Schouten HC, van Marion AM. BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasia: a review of involved molecular mechanisms. *Histology and histopathology* 2015; **30**(2): 151-161.
3. Murray J. Myeloproliferative disorders. *Clinical medicine (London, England)* 2005; **5**(4): 328-332.
4. Wang JY, Ai XF, Xu JQ, Li QH, Xu ZF, Qin TJ, ve ark. [JAK2 exon 12 mutations in patients with Philadelphia (Ph) chromosome-negative myeloproliferative neoplasms]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi* 2012; **33**(9): 705-709.
5. Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard G, Akiki S, ve ark. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *British journal of haematology* 2013; **160**(1): 25-34.
6. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms 2012: the John M. Bennett 80th birthday anniversary lecture. *Leukemia research* 2012; **36**(12): 1481-1489.
7. Geetha JP, Arathi CA, Shalini M, Srinivasa Murthy AG. JAK2 Negative Polycythemia Vera. *Journal of laboratory physicians* 2010; **2**(2): 114-116.
8. Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, Guo G, Hao-Shen H, Dirnhofer S, ve ark. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *The Journal of experimental medicine* 2014; **211**(11): 2213-2230.
9. Chen H, Luo Z, Dong L, Tan Y, Yang J, Feng G, ve ark. CD133/prominin-1-mediated autophagy and glucose uptake beneficial for hepatoma cell survival. *PloS one* 2013; **8**(2): e56878.
10. Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *The Journal of pathology* 2008; **214**(1): 3-9.
11. Traweek ST, Kandalaft PL, Mehta P, Battifora H. The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *American journal of clinical pathology* 1991; **96**(1): 25-31.

12. Swift S, Xu J, Trivedi V, Austin KM, Tressel SL, Zhang L, ve ark. A novel protease-activated receptor-1 interactor, Bicaudal D1, regulates G protein signaling and internalization. *The Journal of biological chemistry* 2010; **285**(15): 11402-11410.
13. Hsiao HH, Nath A, Lin CY, Foltz-Stogniew EJ, Rhoades E, Braddock DT. Quantitative characterization of the interactions among c-myc transcriptional regulators FUSE, FBP, and FIR. *Biochemistry* 2010; **49**(22): 4620-4634.
14. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes [editorial]. *Blood*. 1951;6(4):372-375. *Blood* 2016; **127**(6): 663.
15. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984; **36**(1): 93-99.
16. Gilbert HS. The spectrum of myeloproliferative disorders. *The Medical clinics of North America* 1973; **57**(2): 355-393.
17. Georgii A, Vykoupil KF, Buhr T, Choritz H, Dohler U, Kaloutsi V, ve ark. Chronic myeloproliferative disorders in bone marrow biopsies. *Pathology, research and practice* 1990; **186**(1): 3-27.
18. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010; **24**(6): 1128-1138.
19. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, ve ark. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *The New England journal of medicine* 2013; **369**(25): 2391-2405.
20. Saeidi K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. *Critical reviews in oncology/hematology* 2016; **98**: 375-389.
21. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, ve ark. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet (London, England)* 2005; **365**(9464): 1054-1061.
22. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, ve ark. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; **114**(5): 937-951.

23. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological reviews* 2009; **228**(1): 273-287.
24. Schindler C, Plumlee C. Interferons and the JAK-STAT pathway. *Seminars in cell & developmental biology* 2008; **19**(4): 311-318.
25. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews. Immunology* 2007; **7**(6): 454-465.
26. Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011; **31**(5): 980-985.
27. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature reviews. Cancer* 2007; **7**(9): 673-683.
28. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; **285**(1-2): 1-24.
29. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature reviews. Immunology* 2003; **3**(11): 900-911.
30. Patnaik MM, Knudson RA, Gangat N, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A, et al. Chromosome 9p24 abnormalities: prevalence, description of novel JAK2 translocations, JAK2V617F mutation analysis and clinicopathologic correlates. *European journal of haematology* 2010; **84**(6): 518-524.
31. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome biology* 2004; **5**(12): 253.
32. Gabler K, Behrmann I, Haan C. JAK2 mutants (e.g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms. *Jak-stat* 2013; **2**(3): e25025.
33. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, Niranjana Y, Young C, Jensen ON, et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nature structural & molecular biology* 2011; **18**(9): 971-976.
34. Yeh TC, Dondi E, Uze G, Pellegrini S. A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; **97**(16): 8991-8996.
35. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; **118**(7): 1723-1735.
 36. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, ve ark. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008; **111**(8): 3931-3940.
 37. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; **29**(5): 573-582.
 38. Kiladjan JJ. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2012; **2012**: 561-566.
 39. Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. *Haematologica* 2007; **92**(12): 1585-1589.
 40. Lee TS, Ma W, Zhang X, Kantarjian H, Albitar M. Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC structural biology* 2009; **9**: 58.
 41. Lakey MA, Pardanani A, Hoyer JD, Nguyen PL, Lasho TL, Tefferi A, ve ark. Bone marrow morphologic features in polycythemia vera with JAK2 exon 12 mutations. *American journal of clinical pathology* 2010; **133**(6): 942-948.
 42. Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 2007; **26**(47): 6724-6737.
 43. Cutler C, Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2001; **19**(2): 108-117.
 44. Can A. *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları* 2014.
 45. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; **89**(7): 2804-2808.

46. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, ve ark. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell stem cell* 2007; **1**(6): 685-697.
47. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, ve ark. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 1997; **275**(5302): 964-967.
48. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, ve ark. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 2002; **100**(9): 3203-3208.
49. Negrin RS, Atkinson K, Leemhuis T, Hanania E, Juttner C, Tierney K, ve ark. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2000; **6**(3): 262-271.
50. Charles A. Goldthwaite J. 9. Are Stem Cells Involved in Cancer? *Regenerative Medicine* Bethesda, MD: National Institutes of Health, Department of Health and Human Services; 2009:89-95.
51. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, ve ark. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* 2006; **66**(19): 9339-9344.
52. Rapp UR, Ceteci F, Schreck R. Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2008; **7**(1): 45-51.
53. Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 2008; **12**(2): 374-390.
54. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 1997; **3**(7): 730-737.
55. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**(6859): 105-111.

56. Meregalli M, Farini A, Belicchi M, Torrente Y. CD133(+) cells isolated from various sources and their role in future clinical perspectives. *Expert opinion on biological therapy* 2010; **10**(11): 1521-1528.
57. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, ve ark. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; **95**(10): 3106-3112.
58. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, ve ark. 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**(10): 4139-4141.
59. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, ve ark. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001; **98**(12): 3249-3255.
60. Bhatia M. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia* 2001; **15**(11): 1685-1688.
61. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, ve ark. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; **90**(12): 5002-5012.
62. Trivai I, Stubig T, Niebuhr B, Hussein K, Tsiftoglou A, Fehse B, ve ark. CD133 marks a stem cell population that drives human primary myelofibrosis. *Haematologica* 2015; **100**(6): 768-779.
63. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, ve ark. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009; **113**(13): 2895-2901.
64. Charrier S, Boiret N, Fouassier M, Berger J, Rapatel C, Pigeon P, ve ark. Normal human bone marrow CD34(+)CD133(+) cells contain primitive cells able to produce different categories of colony-forming unit megakaryocytes in vitro. *Experimental hematology* 2002; **30**(9): 1051-1060.
65. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, ve ark. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; **109**(5): 1801-1809.

66. Ciraci E, Della Bella S, Salvucci O, Rofani C, Segarra M, Bason C, ve ark. Adult human circulating CD34(-)Lin(-)CD45(-)CD133(-) cells can differentiate into hematopoietic and endothelial cells. *Blood* 2011; **118**(8): 2105-2115.
67. James C. The JAK2V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2008: 69-75.
68. Kent DG, Li J, Tanna H, Fink J, Kirschner K, Pask DC, ve ark. Self-renewal of single mouse hematopoietic stem cells is reduced by JAK2V617F without compromising progenitor cell expansion. *PLoS biology* 2013; **11**(6): e1001576.
69. Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, ve ark. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 2007; **110**(1): 375-379.
70. Rice KL, Lin X, Wolniak K, Ebert BL, Berkofsky-Fessler W, Buzzai M, ve ark. Analysis of genomic aberrations and gene expression profiling identifies novel lesions and pathways in myeloproliferative neoplasms. *Blood cancer journal* 2011; **1**(11): e40.
71. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, ve ark. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *The New England journal of medicine* 2007; **356**(5): 459-468.
72. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, ve ark. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* 2011; **117**(10): 2813-2816.
73. Teofili L, Giona F, Torti L, Cenci T, Ricerca BM, Rumi C, ve ark. Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis. *Haematologica* 2010; **95**(1): 65-70.
74. Hussein K, Bock O, Theophile K, Schulz-Bischof K, Porwit A, Schlue J, ve ark. MPLW515L mutation in acute megakaryoblastic leukaemia. *Leukemia* 2009; **23**(5): 852-855.

75. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, ve ark. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; **108**(10): 3472-3476.
76. Chaligne R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couedic JP, Fava F, ve ark. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* 2007; **110**(10): 3735-3743.
77. Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, ve ark. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* 2008; **22**(8): 1557-1566.
78. Pecquet C, Staerk J, Chaligne R, Goss V, Lee KA, Zhang X, ve ark. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. *Blood* 2010; **115**(5): 1037-1048.
79. Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, Mesa RA, Levine RL, Gilliland DG, ve ark. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *British journal of haematology* 2006; **135**(5): 683-687.
80. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, ve ark. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; **112**(1): 141-149.
81. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, ve ark. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009; **23**(5): 905-911.
82. Maffioli M, Genoni A, Caramazza D, Mora B, Bussini A, Merli M, ve ark. Looking for CALR mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014; **28**(6): 1357-1360.
83. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell* 2012; **149**(1): 22-35.
84. Mui AL, Wakao H, Kinoshita T, Kitamura T, Miyajima A. Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *The EMBO journal* 1996; **15**(10): 2425-2433.
85. Wernig G, Gonneville JR, Crowley BJ, Rodrigues MS, Reddy MM, Hudon HE, ve ark. The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases

- requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood* 2008; **111**(7): 3751-3759.
86. Knoepfler PS. Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell stem cell* 2008; **2**(1): 18-21.
 87. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature reviews. Cancer* 2002; **2**(10): 764-776.
 88. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, ve ark. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & development* 2004; **18**(22): 2747-2763.
 89. Laurenti E, Varnum-Finney B, Wilson A, Ferrero I, Blanco-Bose WE, Ehninger A, ve ark. Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity. *Cell stem cell* 2008; **3**(6): 611-624.
 90. Fletcher S, Prochownik EV. Small-molecule inhibitors of the Myc oncoprotein. *Biochimica et biophysica acta* 2015; **1849**(5): 525-543.
 91. Seeley S, Covic L, Jacques SL, Sudmeier J, Baleja JD, Kuliopulos A. Structural basis for thrombin activation of a protease-activated receptor: inhibition of intramolecular liganding. *Chemistry & biology* 2003; **10**(11): 1033-1041.
 92. Baumer N, Krause A, Kohler G, Lettermann S, Evers G, Hascher A, ve ark. Proteinase-Activated Receptor 1 (PAR1) regulates leukemic stem cell functions. *PloS one* 2014; **9**(4): e94993.
 93. Sun S, Wang W, Latchman Y, Gao D, Aronow B, Reems JA. Expression of plasma membrane receptor genes during megakaryocyte development. *Physiological genomics* 2013; **45**(6): 217-227.
 94. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. Protease-activated receptors (PARs)--biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer metastasis reviews* 2015; **34**(4): 775-796.
 95. Lin H, Liu AP, Smith TH, Trejo J. Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews* 2013; **65**(4): 1198-1213.
 96. O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS, ve ark. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *The Journal of biological chemistry* 2000; **275**(18): 13502-13509.

97. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2004; **30**(1): 63-69.
98. Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer research* 2006; **66**(1): 307-314.
99. Yue R, Li H, Liu H, Li Y, Wei B, Gao G, ve ark. Thrombin receptor regulates hematopoiesis and endothelial-to-hematopoietic transition. *Developmental cell* 2012; **22**(5): 1092-1100.
100. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 2001; **25**(4): 402-408.
101. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, ve ark. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; **23**(24): 5688-5695.
102. Aoki Y, Watanabe T, Saito Y, Kuroki Y, Hijikata A, Takagi M, ve ark. Identification of CD34+ and CD34- leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; **125**(6): 967-980.

FORMLAR

Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

"Miyeloproliferatif Neoplazilerde Gen Ekspresyon Değişimleri" başlıklı deneysel bir araştırma için sizin vereceğiniz damardan alınan kana ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu araştırma ile miyeloproliferatif bir hastalık olan Polisitemia Vera hastalığını başlatan kan hücreleri araştırılacaktır.

Polistemia vera tedavisinin bir parçası olan "Flebotomi-damardan kan verme" işleminde vermiş olduğunuz kan toplanarak laboratuvar ortamında işleme tabi tutulacak ve bu araştırmada değerlendirilecektir. Tedaviniz süresince vücut sağlığınız için vermiş olduğunuz bu kan normal şartlarda imha edilerek atılır. Ancak sizin vereceğiniz bu olurla damardan vereceğiniz bu kan değerlendirilerek bu hastalığın nasıl ve hangi olaylar neticesinde oluştuğu konusunu anlamakta araştırmacılara yardımcı olacaktır.

Bu araştırmaya katılmanın size hiçbir zorluğu veya ekstra vereceği ağrı, acı veya istenmeyen bir sonucu oluşturmayacaktır. Bu araştırma size uygulanıyor olan tedavinin bir parçası veya alternatifi değildir. Atılacak olan kanınız toplanarak laboratuvar ortamında araştırma için kullanılacaktır.

Belirtilen araştırma 1 yıllık bir süreç te gerçekleşecektir. En az 4 hastadan elde edilen kanlar toplanacak ve laboratuvar ortamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar için kullanılacaktır.

Bu araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Siz istediğiniz anda araştırmacıya haber vererek çalışmadan çekilebilir ya da araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabilirsiniz.

Gönüllü olarak bu araştırmaya katılımınız kendi isteğinize bağlıdır ve kabul etmeme durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkarılmanız veya istediğiniz zaman çıkmanız halinde, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz

kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceğiniz veya araştırmadan çekilebileceğiniz, hastalığınız ile ilgili yapılan tedavinizde herhangi bir aksama olmayacağı güvencesi verilmektedir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyeceksiniz ayrıca size bu araştırmaya katıldığınız içinde bir ödeme yapılmayacaktır.

Sizden alınacak bu kan örnekleri sadece belirtilen araştırma için kullanılacaktır. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin sizin orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri bulur, ancak bu bilgiler gizli tutulacak, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla sizin veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız.

İlgili mevzuat gereğince kimlik bilgileriniz ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, hiçbir şekilde kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi sizin kimliğinin gizli kalacaktır.

İkinci bölüm

Sayın Dr..... tarafından İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan

çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, **Prof.Dr Akif Selim Yavuz'u (0533-4942914, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı)** 'dan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

" Miyeloproliferatif Neoplazilerde Gen Ekspresyon Değişimleri " çalışması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan);

(Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)

- Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.”

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Araştırma Ekibinde Yer Alan ve Yetkin Bir Araştırmacının Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1770

Tarih : 21.11.2014

Konu : Yrd.Doç.Dr.Selçuk Sözer TOKDEMİR

Sayın Yrd.Doç.Dr.Selçuk Sözer TOKDEMİR
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

İlgi :Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünün 04/11/2014 gün ve 366 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve İldeniz USLU'nun yürüteceği 2014/1709 dosya numaralı "Miyeloproliferatif Neoplazilerde Gen Ekspresyon Değişimleri" başlıklı çalışma kurulumuzun 14/11/2014 tarih ve 19 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yagız ÜREŞİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu