



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**JAK2 VE MPL MUTASYONU NEGATİF ESANSİYEL
TROMBOSİTOZ VE PRİMER MYELOFİBROZ HASTALARINDA
KALRETİKÜLİN (CALR) MUTASYON DURUMUNUN
BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Enver Okan ÖTE

Ankara, 2015



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**JAK2 VE MPL MUTASYONU NEGATİF ESANSİYEL
TROMBOSİTOZ VE PRİMER MYELOFİBROZ HASTALARINDA
KALRETİKÜLİN (CALR) MUTASYON DURUMUNUN
BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Enver Okan ÖTE

Tez DanıŐmanı: Prof. Dr. Feride İffet ŐAHİN

Ankara, 2015

Bu tez Başkent Üniversitesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: KA14/318

ÖZET

Myeloproliferatif hastalıklar (MPH), matur ve immatur kan hücrelerinin aşırı yapımı ile karakterize kronik myeloid kanserlerdir. Esansiyel Trombositemi (ET) ve Primer Myelofibroz (PMF), BCR-ABL negatif kronik myeloproliferatif hastalıklar grubundadır. Bu hastalıkların tanısında JAK2 ve MPL mutasyonları kullanılmaktadır fakat bu mutasyonlar hastaların %30-40'lık kısmında saptanmamaktadır. Çalışmamızda JAK2 ve MPL mutasyonu negatif hastalarda Kalretikulin (CALR) mutasyon sıklığını, mutasyon tiplerini ve klinikle ilişkilerini araştırdık.

Çalışmaya 16 ET ve 4 PMF hastası dahil edildi. Tüm hastalar JAK2V617F, MPL W515K/L ve S505N mutasyonları açısından negatif olan hastalardı. CALR mutasyonları Sanger dizileme yöntemi ile araştırıldı.

CALR geninde tüm hastaların %25'inde mutasyon saptandı. 4 PMF hastasında mutasyon saptanmazken, 16 ET hastasının 5'inde (%31.25) mutasyon saptandı. Saptanan mutasyonların üç tanesi (%60) 52 baz çifti (bç) delesyon (Tip I mutasyon, c.1092_1143del), bir tanesi 5 bç'lik insersiyon (Tip II mutasyon, c.1154_1155insTTGTC)ve bir tanesi 46 bç'lik delesyon (c.1094_1139del) olarak saptandı. Tip I mutasyon saptanan hastalar genç ve kadın hastalar idi.

Çalışmamızda saptanan mutasyon sıklıkları ve tipleri daha önce yapılan çalışmalar ile benzer oranlarda bulundu. Daha fazla sayıda hasta ile yapılacak prospektif çalışmalar CALR mutasyonlarının bu hastalıklardaki etkisini anlamayı ve hastalıkların yönetiminin daha iyi yapılmasını sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: JAK2, MPL, Kalretikulin, Esansiyel trombositemi, Primer miyelofibroz

ABSTRACT

The myeloproliferative neoplasms are chronic myeloid cancers characterized by the overproduction of mature and immature blood cells. Essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are two of the BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms. JAK2 and MPL mutations are being used for the diagnosis of ET and PMF, but 30-40% of the patients do not carry any mutations at these genes. Recently, another gene called Calreticulin is thought to be involved in the development of ET and PMF. In this study, we investigated the CALR mutation frequency, mutation types and their relevance with clinical findings.

16 ET and 4 PMF patients were enrolled in this study. All patients were negative for JAK2V617F, MPL W515K/L and S505N mutations. We investigated CALR mutation status with sanger sequencing method.

The mutation rate was 25% in general. However, we did not find any mutations in patients with PMF. We detected three different mutations (31.25%) in 5 patients with ET. Three of the mutations were 52 base pairs (bp) deletion (Type I mutation, c.1092_1143del), one was 5 bp insertion (Type II mutation, c.1154_1155insTTGTC) and the last one was 46 bp deletion (c.1094_1139del). All patients with Type I mutation were women and the mean age (23.3y) was found to be significantly lower compared to all groups (p=0.003).

The results of the study showed us that the mutation rate and mutation types were similar with the previous studies. New prospective studies with larger cohort will help us to understand the effect of CALR mutations in the development and prognosis of myeloproliferative neoplasms.

Keywords: JAK2, MPL, Calreticulin, Essential thrombocythemia, Primary myelofibrosis

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
ÖZET	iii
İNGİLİZCE ÖZET	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hematopoetik Hücre Fizyolojisi	2
2.2 Trombosit Oluşumunun Fizyolojisi	3
2.3 Trombositlerin Genel Özellikleri	3
2.4. Trombositoz	3
2.5. Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar ve Sınıflandırılması	4
2.6. Esansiyel Trombositemi	6
2.6.1. Patofizyoloji	6
2.6.2. Klinik	7
2.6.3. Laboratuvar	8
2.6.4. Tanı	8
2.6.5. Tedavi	9
2.7. Primer Myelofibrozis	10
2.7.1. Patofizyoloji	11
2.7.2. Klinik	11
2.7.3. Laboratuvar	12
2.7.4. Tanı	12
2.7.5. Tedavi	13
2.8. JAK2 Mutasyonu	14
2.9. MPL Mutasyonu	16
2.10. CALR Mutasyonları	18

3. MATERYAL VE METOD	24
3.1 Etik Kurul Onayı	24
3.2 Hasta Grubu	24
3.3 Metod	24
3.3.1 DNA Örnekleri	24
3.3.2 DNA'nın Konsantrasyon ve Saflığının Ölçümü	25
3.3.3 PCR Reaksiyonu	25
3.3.4 PZR sonrası ürünlerin saflaştırılması	26
3.3.5 Sekans Reaksiyonu	27
3.3.6 Sekans ürünlerinin saflaştırılması	27
3.3.7 Kapiller elektroforez ve analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1 Hasta Grubunun Özellikleri	29
4.2 CALR Ekzon 9 Dizi Analizi Sonuçları	31
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
ALP	: Alkale fosfataz
BCR-ABL	: <i>Break cluster region-abelson</i>
BFU-MK	: <i>Burst-forming unit-megakaryocyte</i>
CALR	: Kalretikülin
CFU-MK	: Megakaryosit koloni oluşturu birim (<i>Colony-forming unit-megakaryocyte</i>)
CMP	: <i>Common myeloid progenitor</i>
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EPO	: Eritropoetin
ET	: Esansiyel trombositemi
FGF-β	: Fibroblast büyüme faktörü Beta
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (<i>Granulocyte-macrophage stimulating factor</i>)
Hb	: Hemoglobin
HSC	: Hematopoietik kök hücre
IL-3	: İnterlökin-3
IL-6	: İnterlökin-6
IL-11	: İnterlökin-11
JAK2	: Janus Kinaz 2
Kİ	: Kemik iliği
KML	: Kronik myeloid lösemi
KMML	: Kronik myelomonositik lösemi
KMPH	: Kronik myeloproliferatif hastalık
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MDS	: Myelodisplastik sendrom
MEP	: Megakaryosit-eritroid öncül (<i>Megakaryocyte-erythroid progenitor</i>)
MPH	: Myeloproliferatif hastalıklar
MPL	: Myeloproliferatif Lösemi Virüs Onkogeni
MPN	: Myeloproliferatif neoplazm

PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
Ph	: <i>Philadelphia</i> kromozomu
PK	: Periferik kan
PMF	: Primer myelofibroz
PV	: Polisitemi vera
RARS-T	: Halka sideroplastlı inatçı anemi-trombositoz
SCF	: Kök hücre faktörü (<i>Stem cell factor</i>)
SF3B1	: <i>Splicing factor 3B subunit 1</i>
TGF- β	: Transformingbüyüme faktörü Beta
TPO	: Trombopoetin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 Kan hücrelerinin kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerden farklılaşması	2
Şekil 2.2 Miyeloproliferatif hastalıklarda JAK2V617F sinyal mekanizması	15
Şekil 2.3 Trombopoetin reseptörü olan MPL'nin ve ekzonlarının şekilsel gösterimi.	17
Şekil 2.4 CALR domainleri ve sık görülen mutasyonları	19
Şekil 2.5 CALR mutasyonları ve ekzon 9 üzerindeki yerleşimleri	22
Şekil 4.1 Tip II mutasyon (c.1154_1155insTTGTC)	31
Şekil 4.2 Tip I mutasyon (c.1092_1143del)	32
Şekil 4.3 46 bç'lik delesyon (c.1094_1139del)	33

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1 Trombositoz nedenleri	4
Tablo2.2. Miyeloproliferatif neoplazilerin (MPN) 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırma şeması	6
Tablo 2.3. DSÖ 2008 ET tanı kriterleri	9
Tablo 2.4 DSÖ 2008 PMF tanı kriterleri	13
Tablo 3.1 CALR geni ekzon 9 primer dizileri ve özellikleri	25
Tablo 3.2 PCR bileşenleri	25
Tablo 3.3 PCR reaksiyonu	26
Tablo 3.4 ExoSap yöntemi ile PZR ürünlerinin saflaştırılma yöntemi	26
Tablo 3.5 ExoSap yönteminde kullanılan ısı döngüsü	26
Tablo 3.6 PZR reaksiyon programı	27
Tablo 3 .7 Sekans reaksiyonu bileşenleri	27
Tablo 4.1 Hastalara ait demografik ve klinik veriler	30

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Myeloproliferatif hastalıklar (MPH), matur ve immatur kan hücrelerinin aşırı yapımı ile karakterize kronik myeloid kanserlerdir. *BCR-ABL1* (+) Kronik Myeloid Lösemi (KML) ile beraber en sık görülen üç tipi Polisitemia Vera (PV), Esansiyel Trombositemi (ET) ve Primer Myelofibrozis (PM) 'dir. *BCR-ABL1* (-) MPH'lar olarak da adlandırılan bu üç hastalığın tanısında kullanılan *JAK2* V617F mutasyonu hastaların yaklaşık dörtte üçünde tespit edilmekle beraber PV'daki sıklığı %95, ET ve PMF'da %60-65 civarındadır. *JAK2* ekzon 12 mutasyonları PV hastalarının kalan %5'inde ve *MPL* ekzon 10 mutasyonları ise ET ve PM hastalarının yaklaşık %5'inde tespit edilmektedir. ET ve PM hastalarının %30 – 40'lık bir kısmında ise genetik düzensizliğin ne olduğu bilinmemektedir.

*JAK2*V617F mutasyonun tanımlanmasını, *JAK2* ekzon 12 mutasyonları ve myeloproliferatif lösemi virus onkogenindeki (*MPL*) mutasyonların tanımlanması takip etmiştir ve böylece ET ve PMF hastalarının %60-65'inin tanısı mümkün olmuştur ve JAK-STAT yolağının daha iyi anlaşılması sağlanmıştır.

Alttan yatan genetik temellerin aydınlatılması bu hastalıkların daha iyi anlaşılmasını ve aynı grupta yer alan bu hastalıkların daha doğru biçimde birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır. Bu da erken tanı, prognozun belirlenmesi, ve doğru tedavi uygulamalarının yapılması açısından çok önemlidir.

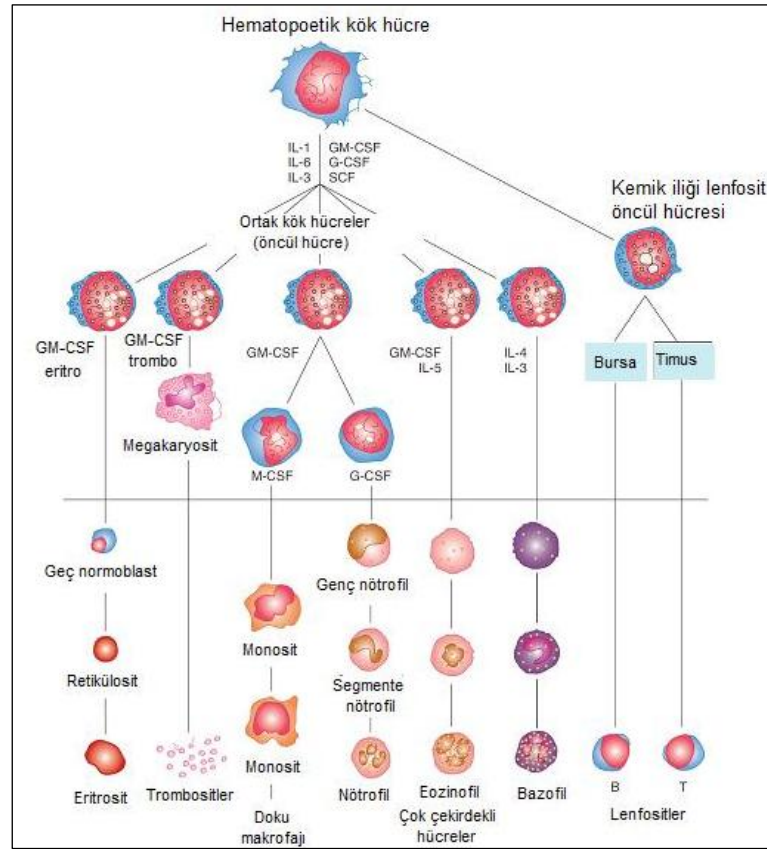
2013 yılında birbirinden bağımsız yapılan iki çalışma ile kalretikulin (*CALR*) genindeki mutasyonlar ile ET ve PMF hastalıkları arasındaki ilişki ortaya konmuştur. *JAK2* ve *MPL* mutasyonu olmayan hastalarda *CALR* geninde yüksek oranda mutasyon saptanmıştır.

Biz de çalışmamızda MPH'da tanı algoritmasını değiştirebilecek, prognoz ile ilgili öngörü yapılmasını sağlayabilecek ve ileride yeni tedavi modellerinin gelişmesini sağlayabilecek *CALR* genindeki mutasyon sıklığı, mutasyon tipleri ve klinikle olan ilişkilerini belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoetik Hücre Fizyolojisi

Dolaşımdaki tüm kan hücrelerinin kaynağı erişkinde kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücredir. Hematopoetik pluripotent hücre özelliğine sahiptir; kendini yenileyebilir ve birçok farklı hücreye dönüşebilir. Bu kök hücreden gelişen öncül hücreler farklı serilerdeki kan hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşırlar. Hücreler morfolojik olarak farklılaşıp olgunlaştıkça, kendilerini yenileme özellikleri azalır. Kan hücreleri lenfoid ve myeloid olarak ikiye ayrılır ve öncelikle ortak lenfoid öncül ile ortak myeloid öncül oluşur. Bu öncül hücrelerden megakaryositler, lenfositler, eritrositler, bazofiller, eozinofiller, nötrofiller ve monositler sentezlenir (1, 2). (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Kan hücrelerinin kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerden farklılaşması (2)

2.2 Trombosit Oluşumunun Fizyolojisi

Trombositler megakaryositlerden köken alır. Megakaryositler, poliploid çok loblu nükleusa sahip büyük hücrelerdir. Megakaryositler sırasıyla hematopoietik kök hücre (HSC), multipotent öncül hücre (MP), ortak myeloid öncül hücre (common myeloid progenitor, CMP), ortak megakaryosit-eritroid öncül hücre (megakaryocyte-erythroid progenitor, MEP), hızla ortaya çıkarıcı birim (burst-forming unit-megakaryocyte, BFU-MK), megakaryosit koloni oluşturucu birim (colony-forming unit-megakaryocyte, CFU-MK) köken alırlar (3).

Megakaryosit ve trombosit üretiminin düzenlenmesi, humoral faktörlerin, hücre yüzey reseptörlerinin, hücre içi sinyal yollarının ve nükleer transkripsiyon faktörlerinin yol aldığı hücre sistemleri tarafından kontrol edilir (3, 4)

2.3 Trombositlerin Genel Özellikleri

Trombositler, büyük çok çekirdekli hücreler olan megakaryositlerin parçalarıdır. Bu parçaların kendilerine ait çekirdekleri yoktur (5). Kan dolaşımı içerisindeki diğer hücrelerden daha küçüktürler ve ömürleri 7-10 gündür (6). İnsanlarda ortalama normal kabul edilen trombosit sayısı litrede 150×10^9 ile 400×10^9 arasındadır (7). Trombosit üretimini birçok sitokin (IL-3, IL-6, IL-11 ve TPO (trombopoietin) ve büyüme faktörü (PDGF, FGF) tarafından uyarılır fakat başlıca uyaran TPO'dur. Trombopoezi uyaran başlıca faktör ise trombosit sayısının düşmesidir (5, 7).

2.4. Trombositoz

Trombositoz, erişkinlerde trombosit sayısının 450×10^9 /litre değerini aşması olarak tanımlanır. Trombositoz 4' ayrılır: Hafif trombositoz ($450-700 \times 10^9$ /litre), orta trombositoz ($700-900 \times 10^9$ /litre), ağır trombositoz ($900-1500 \times 10^9$ /litre) ve uç (extreme) trombositoz (1500×10^9 /litre üzeri değerler). (8). Yeni yayınlarda uç trombositoz sınıflaması 1000×10^9 /litre üzerindeki değerler olarak ifade edilmiştir (19, 20). Trombositlerin artmasına neden olan durum hematopoetik hücreleri hedef alan değişiklikler nedeniyle gerçekleşmişse bu durumda "primer trombositoz" tanımı kullanılırken, sebep olan akut veya kronik enfeksiyon veya inflamasyon, akut kan

kaybı, kanser, demir eksikliği veya splenektomi sonrası tepki gibi dışsal bir neden ise “sekonder trombositoz” (reaktif trombositoz) olarak tanımlanır. Sekonder trombositoza primer trombositozdan daha sık rastlanır ve nadiren komplikasyona neden olur. Sekonder trombositozun yönetimi genellikle altta yatan hastalığın tedavisine yöneliktir (9). Trombositoz nedenleri Tablo 2.1’de verilmiştir (10).

Tablo 2.1 Trombositoz nedenleri

Primer trombositoz	Sekonder trombositoz	Yalancı trombositoz
Esansiyel trombositemi	Enfeksiyon	Mikrosferosit (örn: ciddi yanıklar)
Polisitemia vera	Enflamasyon	Krioglobulinemi
Primer myelofibroz	Doku hasarı	Neoplastik hücre sitoplazmik parçaları
Myelodisplazi del(5q)	Hiposplenizm	Şistosit
İnatçı anemi	Operasyon sonrası	Bakteri
KML	Kanama	Pappenhemier cisimcikleri
KMML	Demir eksikliği	
AKML	Malignansi	
MDS/MPN-U	Hemoliz	
	İlaç tedavisi (adrenalin, kortikosteroidler vs)	
	Sitokin verilmesi (örn: TPO)	
	Myelosupresif kemoterapi	

2.5. Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar ve Sınıflandırılması

Kronik miyeloproliferatif hastalıklar multipotent kök hücrelerin bir veya birkaç kan hücre serisinde aşırı çoğalması ile karakterize hastalıklardır (11). Miyeloproliferatif hastalıklar ilk kez 1951’de William Dameshek tarafından tanımlanmıştır. Kronik miyelositik lösemi (KML), Polisitemia Vera (PV), esansiyel trombositemi (ET), primer miyelofibrozis (PMF) ve eritrolösemi (Di Guglielmo sendromu) bu gruptaki hastalıklar olarak değerlendirmiştir (12). Kronik miyeloid neoplazmların revize edilmiş 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasında ‘hastalık’ terimi, ‘neoplazm’ tanımı ile yer değiştirmiştir (13). Bununla birlikte KML, Philadelphia (Ph) kromozomu, BCR/ABL1 füzyon geninin varlığı ve kendine özgü klinik özellikleri ile ayrı bir hastalık olarak görülmektedir (14). KML dışı miyeloproliferatif hastalıklar için 2008 DSÖ tanı kriterlerindeki değişikliklere Janus Kinaz 2 (JAK2) mutasyonlarının bulunması öncülük etmiştir (15). JAK2 mutasyonu miyeloid neoplazmlara spesifiktir (16). JAK2 mutasyonu PV hastalarının %90-95’ inde, ET

hastalarının %50-70'inde PMF hastaların %40-50'sinde gösterilmiştir (17, 18). MPL ekzon 10 mutasyonları ise ET ve PMF hastalarının yaklaşık %5'inde tespit edilmektedir (19). CALR mutasyon sıklığı ET ve PMF'da sırasıyla %25 ve %35 bulunmuştur (69).

Miyeloproliferatif hastalıklarda tromboembolik ve hemorajik olaylar morbidite ve mortaliteden sorumlu önemli ve sık görülen komplikasyonlardır. Arteriyel veya venöz tromboembolik olaylar görülebilir. En sık görülen arteriyel olaylar arasında, iskemik serebrovasküler olay, geçici iskemik atak, miyokard infarktüsü, anjina pectoris, periferik arteriyel hastalık ve eritromelalji sayılabilir. Sık görülen venöz tromboembolik olaylar arasında derin ven trombozu, pulmoner emboli, splenik ven trombozu, portal ven trombozu, budd-chiari sendromu ve yüzeysel tromboflebitler sayılabilir (20-22). Tromboembolik ve hemorajik komplikasyonların dışında daha nadir olarak sekonder miyelofibrozis ve sekonder lösemik dönüşüm görülebilir. PV'de %10-12, ET'de %3-4 oranında sekonder miyelofibrozis görülür (18, 20, 21). ET'de %1'in altında, PV'de %6, PMF'de %10 oranında da sekonder lösemik dönüşüm görülür (23,24).

Miyeloproliferatif hastalık geleneksel olarak 'klasik' ve 'atipik' olarak sınıflandırılır. Klasik MPH; Philadelphia (Ph) translokasyonu ve *BCR/ABL* füzyon geni taşıyan KML ve Ph negatif PV, ET ve PMF'den oluşur. Atipik MPH ise, daha nadir görülen kronik miyelomonositik lösemi, juvenil miyelomonositik lösemi, kronik nötrofilik lösemi, kronik bazofilik lösemi, kronik eozinofilik lösemi, hipereozinofilik sendrom, sistemik mastositoz ve sınıflandırılmamış MPH'tan oluşur. (Tablo 2.2) (25)

Tablo2.2. Miyeloproliferatif neoplazilerin (MPN) 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırma şeması

I. Klasik Miyeloproliferatif Hastalıklar
1. BCR-ABL pozitif A. Kronik miyeloid lösemi 2. BCR-ABL negatif A. Polisitemia vera B. Esansiyel trombositemi C. Primer miyelofibrozis
II. Atipik Miyeloproliferatif Hastalıklar
1. Kronik miyelomonositik lösemi 2. Juvenil miyelomonositik lösemi 3. Kronik nötrofilik lösemi 4. Kronik eozinofilik lösemi 5. Hipereozinofilik sendrom 6. Kronik bazofilik lösemi 7. Sistemik mastositoz 8. Miyelodisplazi/miyeloproliferatif hastalık birlikteliği 9. Sınıflandırılmamış miyeloproliferatif hastalık

2.6. Esansiyel Trombositemi

Esansiyel trombositemi, megakaryositlerin proliferasyonu ve dolaşımdaki trombositlerin artışı ile karakterize kronik miyeloproliferatif bir hastalıktır. Periferik dolaşımdaki trombosit sayısı $600.000/\text{mm}^3$ üzerindedir. Kemik iliğinde megakaryositler seride hiperplazi saptanır. Fizik muayenede splenomegali dikkati çeker. Klinik tabloda hemorajik ve trombotik epizodlar görülür. Klinik tablo oldukça heterojendir ve hastaların 2/3'ünden daha fazlası tanı esnasında asemptomatiktir (26). Epidemiyolojik çalışmalarda ET nin yıllık insidansı 100.000 popülasyonda 2,5 yeni vaka olarak saptanmıştır. Ortalama tanı yaşı 60 olup kadın hastaların sayısı erkek olanlardan yaklaşık iki kat daha fazladır (27).

2.6.1. Patofizyoloji

Yapılan araştırmalar ET tanılı hastaların yaklaşık %50-70 kadarında JAK2 mutasyonunun varlığını ortaya koymuştur (17). JAK2 mutasyonunun ET patogenezindeki mekanizmaları araştırılmaktadır. JAK2 mutasyonu olmayan klonal

hücrelerde, DNA hasarı olduğu zaman Bcl-x1 proteininde deaminasyonla sonlanan bir modifikasyon meydana gelmektedir. Bunun sonucunda hasarlı hücrenin apoptozisle ölümü meydana gelmektedir. Mutant JAK2 olduğunda klonal hücrelerde DNA hasarı artmakta bununla birlikte normal Bcl-x1 proteininde deaminasyon cevabı inhibe edilmektedir. Sonuçta apoptozis mekanizmasının çalışmaması ile klonal hücrede proliferasyon meydana gelmektedir (28). Trombositozu olan bir olguda bu mutasyonun gösterilmesi miyeloproliferatif bozukluk ilişkili trombositoz ile reaktif trombositozun ayırımı için oldukça değerli bir veri olmakla birlikte ET, PV ve PMF arasındaki bir ayırımı katkıda bulunamaz. JAK2 pozitif ET hastalarının PV'ye benzer fenotip; daha fazla hemoglobin ve lökosit seviyesi varken, daha düşük trombosit seviyesinin olması tipiktir. ET veya PV'nin gelişmesi JAK2 mutasyon tipine, yüküne, hastanın demir homeostazına ve kazanılmış veya herediter genetik düzenleyicilere göre değişmektedir (29). Kromozomal anormallik olguların %5,3'ünde görülmüştür. Kromozomal anormalliklerden 1q, 20q, 21q anormallikleri görülürken, ET'a özgül kromozomal anomali saptanmamıştır (30).

2.6.2. Klinik

Esansiyel trombositemi hemorajik ve trombotik epizodlar ile seyreden kronik bir hastalıktır. Trombotik komplikasyonlar sıklıkla yaşlı ve daha önce trombotik olay geçirmiş hastalarda, hemorajik komplikasyonlar ise trombosit sayısı 1,000.000/mm³ üzerinde olan hastalarda daha fazla görülür (31). ET de trombosit sayısı artışı ve buna eşlik eden kalitatif trombosit bozukluklar tromboz veya kanama komplikasyonlarının gelişmesine neden olur. Esansiyel trombositemili hastaların yaklaşık yarısında hastalık rutin kan sayımlar esnasında yüksek trombosit düzeyine rastlanması ile tanınır. Semptomatik hastalarda en sık yakınmalar küçük veya büyük damarlarda trombozlar veya minör kanamalardır. Trombotik olaylar öncelikle mikrovasküler sistemde gelişse de büyük damarlarda da tromboz görülebilir. En sık görülen nörolojik semptom baş ağrısıdır. Bunun yanında pareteziler, trans iskemik ataklar, görme bozuklukları ve konvülziyonlar görülen diğer semptomlardır (32,33). Mikrovasküler oklüzyonlar genellikle el ve ayak parmaklarında görülür. Bunların sonucunda parmakta ağrı, ısı artışı, distal ekstremitelerde gangrenleri ve eritromelalji

görülebilmektedir. Eritromelalji, ekstremitelerde yanıcı tarzda ağrı ve kızarıklıkla seyreden bir sendromdur. Ağrının günde tek doz aspirin ile rahatlaması eritromelalji için tanısaldır. ET de büyük ven ve arterlerde de tromboz oldukça sık görülür. Bacak arterleri, koroner arterler ve renal arterler sıklıkla tutulurken, karotik, mezenterik ve subklavian arterler ise nadir olarak tutulurlar. Splenik ven, hepatik venler (Budd-Chiari sendromu) veya bacak ve pelvis venleride trombozların görüldüğü bölgelerdir (33,34).

2.6.3. Laboratuvar

Tanım olarak trombosit sayısının $450 \times 10^3 / \text{mm}^3$ 'den fazla olması gerekmektedir. Bazı vakalarda trombosit sayısı $1.000 \times 10^3 / \text{mm}^3$ 'ün üzerindedir (13). Periferik kan yaymasında lökoeritroblastik tablo ve gözyaşı hücreleri gözlenmez. Hastaların üçte birinden daha fazlasında hafif eozinofili ve bazofili görülür. Hafif nötrofilik lökositoz görülür (35). Dev, garip görünümlü trombositler, çekirdekli megakaryosit fragmanları gözlenebilir. Biyokimyasal inceleme de LDH ve ürik asit yüksekliği ve belirgin trombositozu olan olgularda yalancı hiperkalemi görülebilir (30). Kanama zamanı hastaların %10-20'sinde uzamıştır. Trombosit agregasyon çalışmaları sıklıkla anormaldir. Epinefrin, ADP ve kollajene agregasyon yanıtı bozulmuştur, fakat araşidonik asit ve ristosetin yanıtı normaldir. Kemik iliği hipersellülerdir. Hastaların üçte ikisinde belirgin megakaryosit hiperplazisi ile beraber morfolojik olarak nükleer pleomorfizm olan ve kümeleşme eğiliminde olan megakaryositler sıktır. Multilobüle büyümüş megakaryositler ve sinüsler boyunca uzanan küçük gruplar halinde kümeler oluşturma eğiliminde olan megakaryositler ET'nin temel bulgusudur. Kemik iliğinde retikülün lif artışı gözlenebilir, fakat belirgin fibrozis yoktur (36).

2.6.4. Tanı

ET bir dışlama tanısıdır; trombositozun diğer nedenlerinin ekarte edilmesi gerekir. Bilinen reaktif ve klonal trombositoz yokluğunda ve persistan trombositoz varlığında ET tanısı konabilir. Trombositozla seyreden ama farklı bir prognoz ve tedaviye sahip olan diğer miyeloproliferatif hastalıklardan ayırt etmek gereklidir. 2008 yılına kadar

Polisitemia Vera Çalışma Grubu'nun tanı kriterleri kullanılmıştır (36). JAK2 mutasyonun keşfi ile birlikte ET tanı kriterleri de 2008 yılında DSÖ tarafından yeniden tanımlanmıştır. Tanı için aranan en düşük trombosit değeri $600 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'den $450 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'e indirilmiştir. JAK2 mutasyonu tanı kriterleri arasına girmiştir (Tablo 2.3.). ET dışlama tanısı olduğu için belirlenen 4 kriterin de karşılanması gereklidir (13).

Tablo 2.3. DSÖ 2008 ET tanı kriterleri

1- Trombosit sayısının $450 \times 10^3/\text{mm}^3$ ve üzeri olması.
2- Büyük ve matür morfoloji ile birlikte megakaryosit proliferasyonu. Granulosit veya eritroid proliferasyon olmaması veya az olması.
3- KML, PV, PM, MDS veya diğer miyeloid neoplazmlar için DSÖ kriterlerini karşılamaması.
4- JAK2 V617F veya diğer klonal markırların gösterilmesi veya reaktif trombositoz kanıtı olmaması

2.6.5. Tedavi

60 yaş altındaki asemptomatik hastalara tedavi önerilmemektedir. Semptomatik olanlar ve yüksek tromboz riski olanlar (60 yaş ve üzeri, eritromelalji, trans iskemik atak, büyük damar trombozu gibi geçirilmiş trombotik epizodu olan hasta grubu) tedavi edilmeyi hak eder (36).

Aspirin: Düşük doz aspirin (100 mg/gün) tekrarlayıcı trombotik komplikasyonlar, özellikle digital ve serabrovasküler iskemi geçiren hastalarda efektif tedavi şeklidir. Kanama riskini artırabileceğinden dikkatli kullanılmalıdır (36).

Hidroksiüre: Trombosit sayısını azaltmak için 60 yaş üstü hastalarda ilk seçilecek ilaç hidroksiüre olmalıdır (37). Trombosit sayısını kontrol altına almak için gerekli olan doz 10-30 mg/kg arasında değişir. Tedaviye başladıktan 2-6 hafta sonra trombosit sayısını düşürür. En önemli yan etkisi lökopenidir. İlacın kesilmesi ile geri döner. Kan sayımına göre idame dozu belirlenir (38).

Anagrelid: Anagrelid seçici olarak trombositleri baskılar. Trombosit sayısını kemik iliğinde megakaryositlerin olgunlaşmasını engelleyerek azaltır. Başlangıç dozu günde 2-4 kez alınan 0,5 mg Anagrelid şeklinde önerilmektedir. Trombosit sayısı kontrol altına alınana kadar doz 0,5 mg/hafta olacak şekilde artırılır. Anagrelid genellikle iyi tolere edilen, yan etkileri hafif ve kısa süreli olan bir ilaçtır. En sık karşılaşılan yan etki vazodilatasyona bağlı baş ağrısı, taşikardi, anjina ve baş dönmesidir. Karşılaşılabilecek diğer komplikasyonlar arasında karın ağrısı, diyare, bulantı - kusma ve deri döküntüsü sayılabilir (39).

İnterferon: Anagrelid ve hidroksiüre tedavisini tolere edemeyen hastalara 3.000.000 ünite üç kez/hafta subkutan interferon tedavisi başlanır. İnterferon anormal megakaryosit klon proliferasyonunu baskılar ve megakaryosit sayısını azaltır. Eğer gebe olan hastada trombotik komplikasyon gelişirse interferon alfa tedavisi tercih edilmelidir. İnterferon plasentadan geçmez ve teratojenik etki oluşturmaz (38).

2.7. Primer Myelofibrozis

Primer myelofibrosis (PMF) kemik iliği fibrozisi, anormal sitokin salınımı, anemi, splenomegali, ekstramedullar hematopoez ile karakterize klonal bir myeloproliferatif hastalıktır. PMF ilk olarak Heuck G. tarafından 1879'da tanımlanmış, ancak "Myeloproliferatif hastalıklar" tanımı 1951 yılında Dameshek W. tarafından yapılmıştır. Hastalığın isimlendirilmesinde kronik idiopatik miyelofibrosis, agnojenik miyeloid metaplazi gibi farklı ülkelerde 20'den fazla tanım kullanılmış olsa da uluslararası myelofibroza araştırma ve tedavisi çalışma grubu tarafından "Primer Myelofibrosis" ismi kabul edilmiş ve DSÖ' nün 2008'de yayımlanan myeloid neoplazilerin sınıflamasında bu isimle yer almıştır (40,41).

PMF her yaşta görülmekle birlikte hastaların çoğunluğu 50 yaş üzerinde olup, ortalama görülme yaşı 65-70'dir. Kadın erkek oranı eşit ve hastalık insidansı 0,4-1,5/100.000 arasında değişmektedir. Çocukluk çağında nadir olmakla birlikte ailesel geçiş gösteren vakalar bildirilmiştir. Genç ve orta yaş erişkinlerde sessiz seyreden vakalar daha sık olarak izlenmektedir. Nadir olmakla birlikte benzen veya yüksek

doz iyonize radyasyon gibi çevresel etkenlere maruz kalan kişilerde gelişebilmektedir (27,42).

2.7.1. Patofizyoloji

Anormal sitokin salınımı PMF patofizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Klonal megakaryositler, granüositler ve stromal hücrelerce anormal miktarlarda transforming büyüme faktörü beta (TGF- β), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü beta (FGF- β) salınmaktadır. Bu sitokinler özellikle kemik iliği fibrozisi, angiogenez ve osteosklerozdan sorumludurlar. Diğer iki önemli sitokin ise IL-2 ve IL-6'dır. Bu sitokinler konstitüsyonel semptomlar, transfüzyon bağımlılığı, kemik iliğinde yeni damar oluşumu ve lösemik dönüşüm ile ilişkilidir. Sitokin salınımındaki dengesizlikler, CD34+ progenitör hücrelerin dolaşıma geçmesine ve dolayısı ile çeşitli ekstramedüller hematopoez odaklarının gelişmesine ve bununla birlikte dalakta yeni damar oluşumuna yol açarak hepatosplenomegaliye neden olmaktadır (43, 44).

2.7.2. Klinik

PMF'li hastalar genellikle anemi ve splenomegaliye bağlı olarak gelişen halsizlik, nefes darlığı, çarpıntı, karında dolgunluk hissi gibi semptomların yanında, kilo kaybı, gece terlemesi, hafif ateş gibi konstitüsyonel şikayetlerle de başvurabilirler. Ayrıca kaşıntı, osteoskleroza bağlı kemik ağrıları, kolay morarma, ödem ve lenfadenopati de daha nadir olarak izlenmektedir. Bununla birlikte hastaların dörtte biri tanı anında asemptomatik olabilmektedir. Trombositozla seyreden bazı vakalarda ise tromboz yada kanama ile ilgili bulgular saptanabilir. Bu bulguların dışında ekstramedüller hematopoez odaklarına bağlı olarak semptomatik portal hipertansiyon ve asit, plevral effüzyon, spinal kord basısı, pulmoner hipertansiyon ve yaygın ekstremitte ağrıları gelişebilmektedir. Başvuru sırasında fizik muayenede hastaların %80'inde dalak palpe edilebilir, %30 hastada ise kot altında 10 cm'den daha büyük bir dalak saptanabilir. Hepatomegali hastaların yarısında mevcuttur (40,45).

2.7.3. Laboratuvar

Çevresel kan yaymasında miyeloid seri öncülleri ile eritroid öncüllerinin birlikte görüldüğü lökoeritroblastik kan tablosu ve eritrositlerin gözyaşı şeklinde görülmesi PMF'nin karakteristik laboratuvar bulgularıdır. Ancak prefibrotik aşamada bu bulgular belirgin olmayabilir. Anemi tanı anında hastaların 2/3'ünde saptanır ve hastaların yarısından fazlasında hemoglobin 10 g/dL'nin altındadır. Hastaların yaklaşık %40'ında transfüzyon gereksinimi mevcuttur. Hastalığın hipersellüler ya da fibrotik aşamada olmasına bağlı olarak, lökositoz, lökopeni, trombositoz veya trombositopeni görülebilir, laktat dehidrogenaz (LDH) ve alkalin fosfataz (ALP) yüksekliği saptanabilir (46,47).

Kemik iliği aspirasyonu genellikle fibrozis nedeni ile alınamayabilir (dry tap). Kemik iliği sellüler fazda hipersellüler iken, fibrotik aşamaya gelmiş hastalarda hiposellüler olarak izlenebilir. Myeloid ve megakaryositer seri hakimiyeti mevcuttur. Eritroid seri elemanları ise azalmıştır. Tipik olarak değişik büyüklüklerde dismorfik megakaryosit kümeleri izlenmektedir. Hastalığın sellüler fazında belirgin fibrozis izlenmeyebilir ancak genellikle tanı sırasında retikülin ya da kollajen fibrozis saptanır (40).

2.7.4. Tanı

PMF tanısında DSÖ tarafından belirlenmiş, klinik ve laboratuvar bulguları içeren tanı kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 2.4) (46,47).

PMF ile diğer miyeloid neoplaziler ve MDS ayırımı yapılmalıdır. KML'den ayırımında BCR- ABL'nin moleküler ve sitogenetik olarak bulunmadığı gösterilmeli, kemik iliğinde fibrozis saptanan hastalarda PV tanı kriterleri değerlendirilmelidir. Prefibrotik aşamada PMF ile ET karışabileceğinden, kemik iliği örnekleri incelendiğinde ET'de matür megakaryositlerin artışı, PMF'de küçükten büyüğe değişen atipik displastik değişiklikler izlenen megakaryositlerin varlığı ayırıcı tanıda önemlidir. Tanı esnasında periferik kanda 1000/mm³'den fazla monosit varlığında kronik miyelomonositer lösemi düşünülmeli ve tanısal değerlendirme yapılmalıdır.

PMF'nin ayrıca akut miyelofibrosis (miyelofibrosis ile birlikte akut panmiyelozis veya akut megakaryoblastik lösemi) tablosu ile ayrımı önemli olup, akut miyelofibrosis tablosunda şiddetli konstitüsyonel semptomlar, pansitopeni, periferik kanda artmış blastlara rağmen splenomegalinin belirgin olmamasına dikkat edilmelidir (46,48,49).

Tablo 2.4 DSÖ 2008 PMF tanı kriterleri

Major Kriterler
1-Kemik iliği biyopsisinde retikülin ve/veya kollajen fibrozisin eşlik ettiği megakaryosit proliferasyonu ve atipi varlığı veya fibrozisin olmadığı durumda megakaryositlerdeki proliferasyon ve atipi ile birlikte kemik iliğinde selülarite artışı, granülositik proliferasyon ve azalmış eritropoez olması
2- Dünya Sağlık Örgütü tanı kriterlerine göre KML, PV, MDS veya başka myeloid neoplazi tanısını karşılamaması
3- JAK2 V617F veya başka bir klonal belirtecin (MPL W515K/L gibi), gösterilmesi veya reaktif kemik iliği fibrozisi kanıtının olmaması
Minor kriterler
1. Lökoeitroblastik kan tablosu
2. LDH düzeyinin artması
3. Anemi
4. Palpabl splenomegali

2.7.5. Tedavi

Androjenler ve kortikosteroidler: Anemi tedavisinde androjenler (fluksimesteron 10 mg günde iki veya üç defa) ve kortikosteroidler (prednizolon 0,5 mg/kg) kullanılabilir. Hemoliz varlığında steroidler tek başına yeterli olabilir. Bazı hastalarda Danazol (600-800 mg/gün) ve Eritropoetin (EPO, 40.000 Ünite/hafta) anemi kontrolünde yardımcı olabilir (50).

Hidroksiüre: Lökositoz, trombositoz ve bazı hastalarda splenomegali kontrol altına alınabilir. Busulfan, Melfelan da kullanılabilir (50).

Splenektomi: Kemoterapotiklere cevap vermeyen masif splenomegali, transfüzyona bağımlı anemi, portal hipertansiyon ve ağır trombositemi varlığında splenektomi yapılabilir (50) .

Radyoterapi: Splenektomi için uygun olmayan hastalarda uygulanabilir. Karaciğer ve dalak dışındaki ekstramedüller hematopoezisin tedavisinde de kullanılabilir (50).

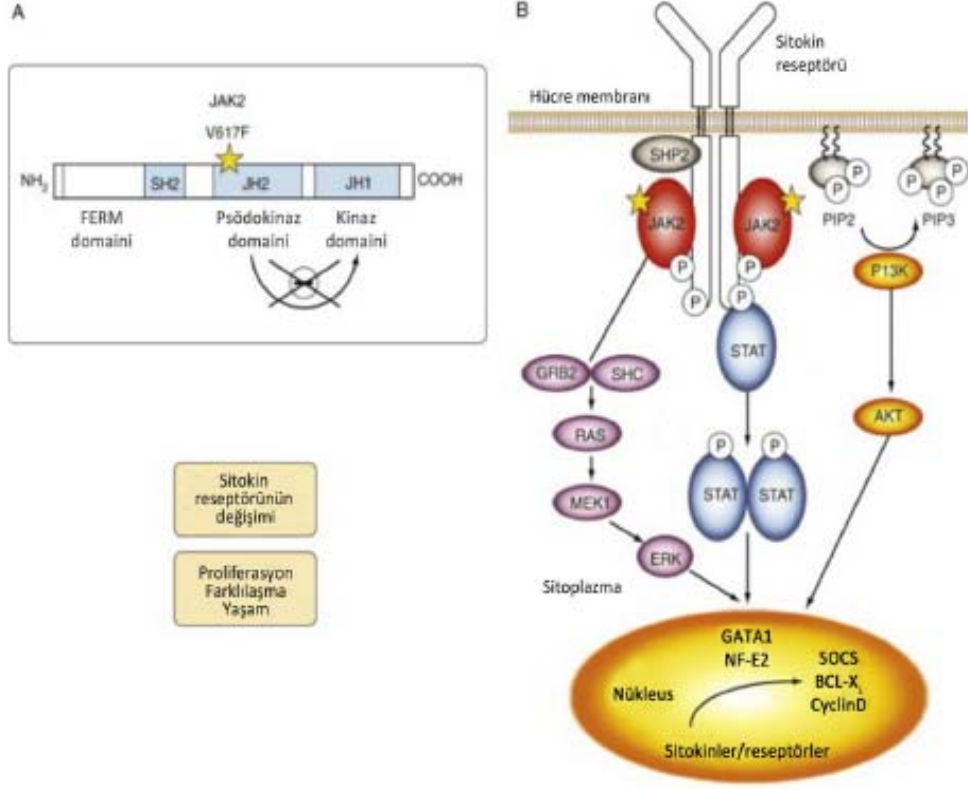
Talidomid: Talidomid, 200 mg/gün dozunda kullanıldığında hastaların önemli bir kısmında anemi ve splenomegalide düzelme sağlamıştır (50).

Kemik iliği nakli: Kemik iliği nakli tek küratif tedavi yöntemidir. Erken morbidite ve mortalite oranlarının yüksek olmasından dolayı 45 yaş altı, uygun vericisi olan, genel durumu elverişli az sayıda hastada yapılmaktadır (81).

2.8. JAK2 Mutasyonu

JAK2 geninin kodladığı protein bir sitoplazmik tirozin kinazdır ve bu gen 9. kromozom üzerinde (9p24.1) yer alır (51). Bu protein eritropoetin ve diğer hematopoetik uyarıcı faktörler tarafından aktive olan sitoplazmik bir sinyal dönüştürücüdür (52). JAK2, sayıları dört tane olan (JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2) reseptör olmayan tirozin kinazlardan birisi olup sitokin ve büyüme faktörü sinyallesinin tamamlayıcı bir parçasıdır (53). JAK2 proteinleri birçok reseptörün hücre içi bölgesine 4.1-ezrin radiksin moezin benzeri [FERM (4.1 Ezrin Radixin Moesin) like] bölgesiyle bağlanarak hücre içi sinyal akışını sağlar (54). JAK proteinleri 2 tane birbirine komşu kinaz benzeri bölge içermekle birlikte (JH1 ve JH2 bölgeleri), sadece JH1 bölgesi enzimatik aktiviteye sahiptir (Şekil 2.). JH2 bölgesi veya yalancı kinaz (psödokinaz) bölgesi kinaz aktivitesinin negatif yönde düzenleyicisidir (55). JAK2 proteini, EPO, TPO, G-CSF ve granülosit-makrofaj koloni stimulan faktörün (GM-CSF) ve interlökinlerin (IL) hücre yüzey reseptörleri için hücre içi sinyal iletiminde kritik rol oynar. JAK2'nin bağlı bulunduğu bu reseptörler genellikle kendisinde tirozin kinaz aktivitesi bulunmayan Tip-I homodimerik reseptörlerdir. Sitokinin membran reseptörüne bağlanması konformasyon değişikliğine neden olarak JAK2'nin fosforilasyonu ve aktivasyonuna

neden olur. Aktive JAK2, reseptörün sitoplazmik parçasını fosforiller ve bu fosforillenme, yolağın aşağısındaki proteinlerin bu noktalara kenetlenmesini kolaylaştırarak sinyal iletimini başlatır (Şekil 2.2) (51).



Şekil 2.2 Mieloproliferatif hastalıklarda JAK2V617F sinyal mekanizması.

A. JAK2V617F yapısı: mutasyon JH2 bölgesinde yerleşmiştir. Mutasyon, düzenleyici bölgenin otoinhibisyonunu bozarak JH1 bölgesine karşılık gelen tirozin kinazı aktifler. **B.** Homodimerik sitokin reseptörü varlığında (örn. EPOR), transfosforilat reseptörünün intrasellüler bölümüne bağlı JAK2V617F proteinleri, tirozin kalıntılarının fosforillenmesini sağlar. Takiben STAT5, fosfotidil 3-kinaz (PI3K) ve renin-angiotensin sistemi (RAS) sinyal yolları aktiflenerek hücre döngüsü, proliferasyonu ve apoptoz ilişkili faktörlerin transkripsiyonu regüle olur. Bcl-XL, Çok büyük B hücre lenfoması; ERK, Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz; GATA, GATA-bağlayıcı faktör; GRB, Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein; MEK1, Karşılıklı hassas mitojen aktive protein kinaz 1; NF, Nükleer faktör; P, Fosfat; PIP2, Fosfotidil inositol bifosfat ve PIP3, Fosfotidil inositol trifosfat; SH2, Src homoloji 2; SOCS, Sitokin sinyal baskılayıcısı.

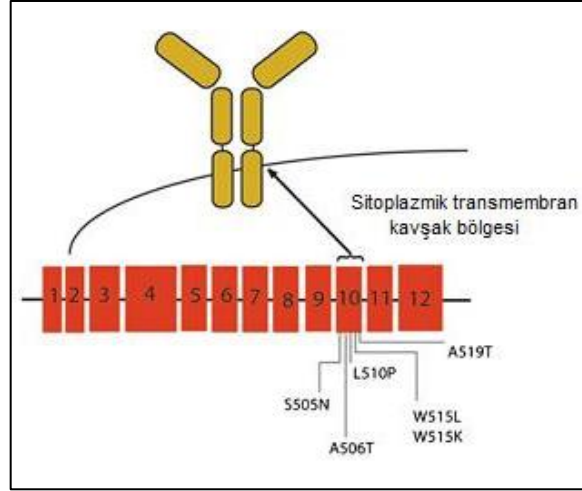
2005 yılında JAK2 ekzon 14'te edinsel bir mutasyon tanımlanmış olup 617. kodonda valin aminoasitinin yerine fenilalanin değişiminin meydana geldiği tespit edilmiştir (c.1849G>T; p.Val617Phe). Bu kodon JH2 yalancı kinaz bölgesinde yer almaktadır. Meydana gelen mutasyonla kinaz aktivitesinin otoinhibisyonunda görev alan bu bölgenin etkinliğini gösterememesi neticesinde sürekli bir aktivasyon halinin ortaya çıkmasıyla, JAK/STAT, PI3K/AKT ve MAPK/ERK gibi birçok yolağın aşağı yönde aktiflenmesine neden olduğu tespit edilmiştir. JAK2 V617F mutasyonu PV'li hastaların %98'inden fazlasında ve ET ve PMF'li hastaların %50-60'ında saptanmıştır. Bu mutasyona RARS-T dışında kalan (bu grubun yaklaşık %50'sinde JAK2 V617F mutasyonu saptanır) MDS (%3-5), KMML (%3-13), AML (%5'ten az sıklıkta, bunların çoğu da MPN sonrası gelişmiştir) gibi diğer myeloid hastalıklarda nadiren rastlanır (56, 57).

JAK2 V617F mutasyonu tek olarak herhangi bir MPN'ye özgü değildir. Fakat bununla birlikte bu mutasyonun varlığı myeloid proliferasyonun neoplastik zeminli olduğunu gösterir (51). ET'de JAK2 V617F mutasyonu çoğunlukla heterozigot formdadır (yaklaşık %2-4 oranında homozigot mutant formdadır) (58). İlginç olarak akut lösemik faza dönüşüm sırasında JAK2 V617F pozitifliği kaybolmaktadır (57). Genellikle JAK2 V617F pozitif ET, PV, PMF hastalarında bu mutasyon açısından negatif olanlara göre yüksek hemoglobin (Hb), hematokrit, lökosit sayısı saptanırken; ET'de ilave olarak daha düşük trombosit sayısı ve venöz tromboza daha fazla yatkınlık tespit edilmiştir (47, 57).

2.9. MPL Mutasyonu

1p34 lokusunda bulunan MPL geninin kullanılan eş anlamlı ifadeleri MPLV, TPOR, c-MPL ve CD110' dur. İlk olarak 1990 yılında sıçan (murine) myeloproliferatif lösemi virüsünde bulunan v-MPL tespit edilmiştir. Bu protoonkogenin, kemik iliğindeki farklı kökenden gelen hematopoietik hücrelerde, ölümsüzlük yeteneği kazandırdığı tespit edilmiştir. 1992'de c-MPL olarak adlandırılan insanlardaki homoloğu klonlanmıştır. Dizi analizi, MPL'nin hematopoietik reseptör süper ailesinin bir üyesi olduğunu göstermiştir. (59). 1999 yılında konjenital

amegakaryositik trombositopeni hastalığında (congenital amegakaryocytic thrombocytopenia-CAMT) iki heterozigot MPL nokta mutasyonu tanımlandığından bu yana, kalıtsal trombositemide (hereditary thrombocythemia-HT), MPN'lerde, RARS-T'de ve AML'de MPL mutasyonları tanımlanmıştır (60). Günümüze kadar MPL geninde bildirilmiş mutasyon sayısı 218'dir (61). Bunlardan ET ve PMF ile ilişkili mutasyonlar ilk olarak 2006 yılında yayınlanmıştır. MPL mutasyonları ET ve PMF hastalarının % 5-10'unda saptanmış olmakla birlikte herhangi bir PV hastasında saptanmamıştır. ET ve PMF hastalarında trombopoetin reseptörü olan MPL'de S505 ve W515 kodonlarını ilgilendiren en az 5 farklı mutasyon (W515L; W515K; S505N; W515R; W515A) tanımlanmıştır (56). Bu MPL mutasyonları 10. ekzonda bulunmakta olup en sık görüleni MPL W515L ve MPL W515K'dır (Şekil 2.3) (62). 12 ekzonu bulunan MPL geninde bu mutasyonların dışında MPL mutasyonları saptanmış olsa da bu mutasyonların patogeneze açısından anlamı net değildir (51, 56).



Şekil 2.3. Trombopoetin reseptörü olan MPL'nin ve ekzonlarının şekilsel gösterimi. MPL'nin en çok tekrarlayan mutasyonları ekzon 10'da yer alır ve reseptörün sitoplazmik-transmembran kavşağını kodlar (51).

Tespit edilmiş olan diğer somatik mutasyonlar W515-P518delinsKT, Y591D, A519T, L510P, A506T, T487A, Y252H, S204P, S204F, IVS 11/12 ve IVS 10/11'dir. Bazı bilim adamları bu mutasyonlardan A519T, L510P, A506T mutasyonlarının hematolojik hastalıklarla ilişkisi olmadığını öne sürmüşlerdir. Yine

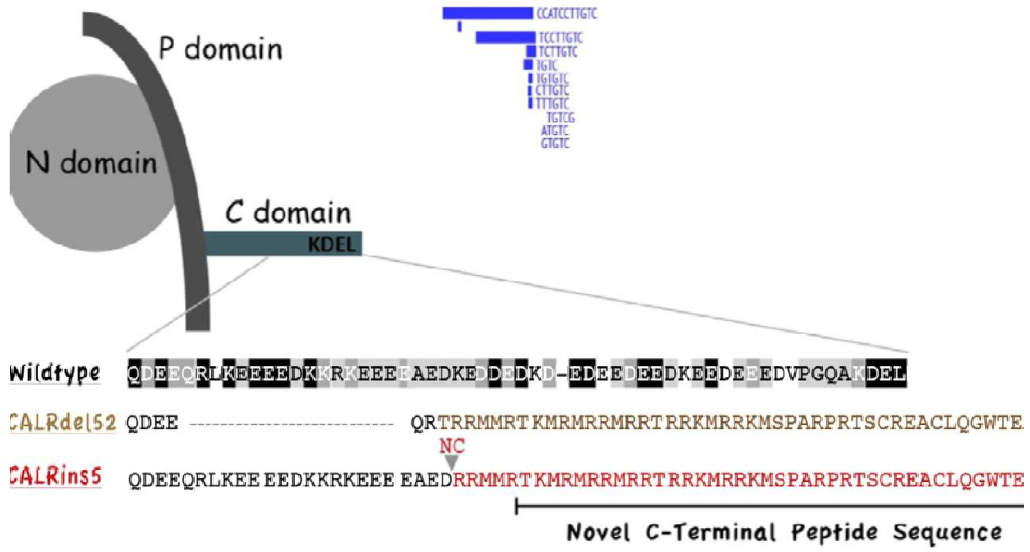
W515-P518delinsKT, Y591D, S204P, S204F, IVS 11/12 ve IVS 10/11 mutasyonlarının etkisinin ne yönde olduğu net olarak aydınlanmış değildir (60).

MPL S505N mutasyonu hem germ hücre hattında (kalıtsal trombositemi) hem de somatik hücrelerde bulunabilen bir mutasyondur. Bu mutasyon etkinleştirici bir mutasyon olup ilk olarak Ding ve arkadaşları tarafından tüm aile üyelerinde herediter trombositemi saptanmış olan bir Japon ailesinde tespit edilmiştir (62). Kalıtsal trombositemide saptanan diğer MPL mutasyonları K39N, P106L mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar tam penetre olmayan otozomal dominant ve otozomal ressesif kalıtım kalıpları olmak üzere çok çeşitli yollarla kalıtılırlar (60).

Bazı yayınlarda ET'de MPL mutasyonunun daha ileri yaş, düşük Hb seviyeleri, artmış trombosit sayısı mikrovasküler belirtilerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (63). Artmış trombosit seviyesi W515K mutasyonu ile daha fazla ilişkili bulunurken, Hb düşüklüğü W515L mutasyonu ile daha fazla ilişkili bulunmuştur. *MPL* mutasyonu *MPL*'nin sürekli uyarılmasına bağlı aşırı aktivitesi sonucunda olduğu düşünülen mekanizmayla mikrovasküler bozukluklara bağlı vazomotor semptomlarla belirgin derecede ilişkili bulunmuştur. *MPL* açısından mutant bireyler, *MPL* ve *JAK2* açısından yabancıl tipte genotipe sahip kişilerle karşılaştırıldığında arteriyel tromboz ile anlamlı ilişki tespit edilmiştir. *MPL* mutasyonlarının venöz trombozla, kanamayla, daha ağır miyelofibroza dönüşümle veya yaşam beklentisiyle arasında ilişki saptanmamıştır (7, 51, 64).

2.10. CALR Mutasyonları

CALR geni 19. kromozom üzerinde 19p13.2'de localize 9 ekzondan oluşan bir gendir ve uzunluğu 4.2 kb'dır (65). CALR proteini 46 kDa büyüklüğünde bir proteindir ve N-terminal domain, C-domain, P-domain olarak adlandırılan 3 farklı yapısal domainden oluşur (66) (Şekil 2.4). CALR proteininin en iyi bilinen fonksiyonu endoplazmik retikulumda (ER) kalsiyum (Ca^{+2}) bağlayıcı şaperon olarak fonksiyon göstermesidir (67).



Şekil 2.4 CALR domainleri ve sık görülen mutasyonları.

Prolinden zengin P-domaini kalsiyum için yüksek afiniteli, düşük kapasiteli bağlanma bölgesi sağlar. N-terminal domain endoplazmik retikulumu tanıyan sinyal sekansından oluşur ve lektini bağlar. C-terminal domain ise düşük afiniteli, yüksek kapasiteli kalsiyum bağlanma bölgesidir ve hücrel kalsiyum dengesinden esas sorumlu bölgedir. Defektif CALR mutasyonu olan hücrelerin kalsiyum depolama kapasiteleri azalır. CALR'nin fazla ifadenmesi ise Ca^{+2} retansiyonunu artırır (66).

C-domaini KDEL sekansı ile sonlanır, KDEL reseptörleri de KDEL sekansı içeren proteinlerin cis-Golgi'den ER'a alımında görev alırlar (66). C-terminal domain mutasyonlarının bu yüzden hücrede yanlış lokalizasyona yol açabileceği düşünülebilir fakat yapılan araştırmalar mutant CALR proteininin büyük oranda ER'daki lokalizasyonunu koruduğunu göstermektedir (69, 70). Bu CALR'in KDEL'den bağımsız olarak da ER'a alındığını gösteren mekanizmaları destekler. ER retansiyonun CALR'nin asidik bölgesi tarafından belirlenebileceğini gösteren verilerin elde edildiği çalışmalar da mevcuttur (71).

CALR, diğer şaperon proteinlerle birlikte uygun protein ve glikoprotein katlanmasında rol oynar. Calneksin ile yapısal olarak homologtur ve proteinlerin

doğru katlanması, degradasyonu gibi fonksiyonlarda calneksin/calreticulin siklusunda beraber görev alır (66).

CALR'nin ER'daki esas görevi olan Ca^{+2} dengesi ile ilişkili görevleri yanında; moleküler şaperonlama, oksidatif streslere yanıt, immun system yanıtı, hücre çoğalması ve ölümü, fibrozis gibi birçok farklı mekanizmalarda görev aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (72,73)

Ca^{+2} bağlama kapasitesinin bozulmasıyla sonuçlanan mutant CALR proteinin oluşumu birçok hücrel fonksiyonda kayba neden olabilmektedir. CALR ve calneksin, ER'dan geçen proteinlerin postranslasyonel modifikasyonunu ve katlanmalarını direk olarak etkiler. Bunun yanında hücre iletişimi, immun cevap, hücrel metabolitlerin üretiminin düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonları vardır. Hematopoietik progenitor hücreler için alternatif bir yolda görev alıyor olabilen calreticulin/calneksin defektleri magakaryositik hücre serilerinde artışa yol açıyor olabilir (65, 68). Hücre yüzey kalretikülünü apoptotik hücrelerin ve kanser hücrelerinin fagositozuna yardımcı olur (74).

Somatik CALR mutasyonları 2013 yılında iki bağımsız grup tarafından eş zamanlı olarak yayınlanmıştır. Her iki grubun çalışması da JAK2 ve MPL negatif ET ve PMF hasta gruplarında CALR mutasyonlarının bu hastalıklarla yüksek ilişkisini ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda JAK2 ve MPL negatif ET ve PMF'lu hastalarda CALR mutasyon sıklığı %50-70 olarak bulunmuştur (69,70). Yayınlanan yeni makaleler ET, PMF ve CALR mutasyonları arasındaki bu ilişki ve görülme sıklığından dolayı ve ayrıca trombositoz ve myelofibrozun klonal olmayan reaktif formlarının ayırımında getireceği katkıdan dolayı ET ve PMF'un DSÖ tarafından belirlenen major tanı kriterlerine JAK2 ve MLP ile beraber CALR mutasyonunun eklenmesini önermektedir (78).

Myeloproliferatif hastalığı olan 1107 vaka ile yapılan çalışmada CALR mutasyon sıklığı ET'da %25, PMF'da %35 bulunmuştur. Bu çalışmaya ait hiç bir PV hastasında CALR mutasyonu saptanmamıştır (69). Yapılan çalışmalar ET ve PMF'da

CALR'in JAK2'den sonra en sık mutasyonu gözlenen gen olduğunu göstermektedir (69, 70, 75). JAK2 ve MPL negatif ET hastalarında CALR mutasyon sıklığı %25-49, PMF hastalarında %35-74 bulunmuştur (69, 76, 77). CALR mutasyonları bu hastalıklar dışında; PV, belirgin trombositoz ilişkili halka sideroblastlar olan refrakter anemi (RARS-T), diğer lösemiler ve solid tümörlerde çok nadir bildirilmiştir (69). Ayrıca JAK2 ve CALR mutasyonlarının birlikteliği çok az vakada bildirilmiştir (81).

Altta yatan mekanizma bilinmemekle beraber CALR mutasyonları JAK-STAT yolunu aktiflemektedir. Miyeloproliferatif hastalıklarla ilişkisi gösterilen JAK2, MPL ve CALR genlerinin dikkat çekici ortak özelliği üçünün de JAK-STAT yolunu aktiflemesidir (69). JAK2, MPL ve CALR mutasyonlarının patojenitedeki ortak rolünün JAK2 sinyalizasyonunda upregülasyon olduğu düşünülmektedir (80).

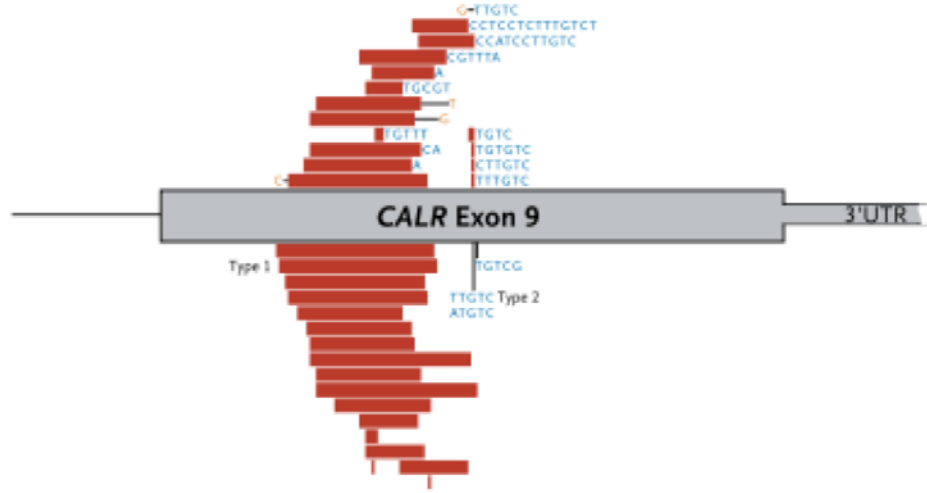
Yapılan bazı çalışmalar MPN genotipi ile hastalığın gidişatı arasında ilişki ortaya koymaktadır. JAK2 mutasyonu olan MPN'lerin klonal evriminde önce ET'dan PV'ya sonra PV'dan MF'e dönüşüm gözlenirken, MPL ve CALR mutasyonu olan MPN'ler ET'dan direk MF'a dönüşüm gösterebilir. CALR mutasyonu ve/veya eşlik eden ikincil mutasyonların ET'dan myelofibroza dönüşümde sorumlu olduğu düşünülmektedir (75).

CALR mutasyonlarının ET ve PMF dışında RARS-T hastalarında görülmesi CALR mutasyonu ile trombositoz arasında ilişki olduğunu ve CALR mutasyonlarının megakaryosit biyolojisini etkilediğini düşündürmektedir (79).

Günümüze kadar bildirilen CALR mutasyon sayısı 181'dir (80). CALR mutasyonlarının tamamı 9. ekzona lokalize olmuş mutasyonlardır, birçoğu farklı büyüklükteki delesyon, insersiyon, kompleks delesyon ve/veya insersiyonları içermektedir (75). En sık görülen iki mutasyon Tip I ve Tip II olarak adlandırılmaktadır ve bu mutasyonların görülme sıklığı %80-90'dır. Tip I mutasyon 52 bç'lik delesyon (c.1092_1143del), Tip II mutasyon 5 bç'lik insersiyon

(c.1154_1155insTTGTC) ‘dur (65). Sık görülen mutasyonlar ve yerleşimleri Şekil 2.5’da verilmiştir (69).

A Genomic Position of the 36 Mutation Types Detected in CALR



Şekil 2.5. CALR mutasyonları ve ekzon 9 üzerindeki yerleşimleri.

CALR genindeki mutasyonlar proteinin C-domaininde yeni bir dizi oluşması ve normalde negatif yüklü olan proteinin yükünün pozitifçe değişmesine yol açar. Oluşan bu değişiklikler kalretikulinin kalsiyum bağlama aktivitesini, CALR’in hücre lokalizasyonunu, stabilitesini ve fonksiyonlarını etkiler. Ayrıca KDEL dizisinin değişmesiyle C-domainindeki ER retansiyon motifi de bozulduğu için mutant kalretikulinin hücresel lokalizasyonunda da değişikliğe neden olur (69).

Somatik CALR mutasyonu taşıyan hastalardaki bozuk kalsiyum bağlama kapasitesi ve megakaryositlerdeki hücresel yanlış lokalizasyon anormal trombosit üretiminin nedeni olabilir (75). Ayrıca mutant koloniler üzerinde yapılan araştırmalar CALR mutasyonlarının hastalığın gelişiminin erken evrelerinde oluşma eğiliminde olduğunu düşündürmektedir. CALR mutasyonlarının progenitör hücrelerde gözlemlenmesi ve hastalık seyri boyunca sabit kalması bu bilgiyi desteklemektedir.

CALR mutasyonlarının fonksiyonel çalışmaları hem sitokin bağımlı hem de sitokin bağımsız hücre büyümesini artırdığını göstermektedir (69, 70).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje No: KA14/318) ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.

3.2 Hasta Grubu

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'nda planlanmış ve yürütülmüştür. Hasta grubunun seçimi Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Hematoloji Bilim Dalı ile ortak olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya Başkent Üniversitesi bünyesindeki hastanelerde tanı almış ve Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik AD'na JAK2V617F ve MPLW515K/L, S505N mutasyon analizi için aydınlatılmış onam formu alınarak kemik iliği veya periferik kan materyalleri gönderilmiş 20 hasta dahil edilmiştir. 20 hastanın 16'sı Esansiyel Trombositemi, 4'ü Primer Myelofibrozis hastasıdır (Hastalara ait demografik, hematolojik ve genetik veriler tablo 4.1 de verilmiştir). Hastaların tamamı JAK2V617F ve MPLW515K/L, S505N mutasyonları negatif olan hastalardır.

3.3 Metod

3.3.1 DNA Örnekleri

Çalışmada daha önce JAK2V617F ve W515K/L, S505N mutasyon analizi için izolasyonu gerçekleştirilmiş ve arşivlenmiş DNA örnekleri kullanılmıştır.

3.3.2 DNA'nın Konsantrasyon ve Saflığının Ölçümü

DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflığı Nanodrop 2000c (Thermo Scientific,USA) spektrofotometre ile 2 µl DNA örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.3.3 PCR Reaksiyonu

Kullanılan primerler, PCR bileşenleri ve reaksiyon koşulları aşağıda tablolar halinde verilmiştir.

Tablo 3.1 CALR geni ekzon 9 primer dizileri ve özellikleri

Primer dizileri	Primer Uzunluğu (bç)	Erime ısısı (C ⁰)	GC (%)	Ürün uzunluğu (bç)
F: 5' CTG GCA CCA TCT TTG ACA ACT T 3'	22	58.4	45.5	377
R: 5' GGC CTC TCT ACA GCT CGT C 3'	19	61.0	63.2	

bç: Baz çifti, F: Forward, R: Reverse

Tablo 3.2 PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (1rxn)
5x Buffer	5.0 µL
10X Buffer	2.5 µL
MgCl ₂	0.5 µL
dNTP (2.5 µmol/µL)	1.0 µL
Taq DNA Polimeraz	0.15 µL
Primer F (20pmol/µL)	1.0 µL
Primer R (20pmol/ µL)	1.0 µL
DNA	5 µL
dH ₂ O	8.85 µL
Toplam hacim	25 µL

Tablo 3.3 PCR reaksiyonu

Program	İşlem	Hedef ısı	Süre
İlk denatürasyon		95 °C	15 dk.
Çoğaltma (35 döngü)	Denatürasyon	94 °C	30 sn.
	Bağlanma	59 °C	30 sn.
	Uzama	72 °C	1 dk.
Uzama	Uzama	72 0C	7 dk.
Soğutma	Soğutma	4 0C	∞

3.3.4 PCR sonrası ürünlerin saflaştırılması

Agaroz jel elektroforezinde PZR reaksiyonlarının başarılı olduğu gösterildikten sonra PZR ürünleri, karışımlarındaki kullanılmayan nükleotidlerden ve primerlerden arındırmak amacıyla saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi için tablolardaki protokollere göre ExoSAP bileşeni (GML, Switzerland) kullanıldı.

Tablo 3.4 ExoSap yöntemi ile PZR ürünlerinin saflaştırılma yöntemi

Bileşenler	Miktar (1rxn)
ExoSAP	2.0 µL
PZR Ürünü	5.0 µL

Tablo 3.5 ExoSap yönteminde kullanılan ısı döngüsü

Program	Hedef Isı	Süre
İnkübasyon	37 °C	15 dk.
Enzim İnaktivasyonu	80 °C	15 dak

3.3.5 Sekans Reaksiyonu

PCR ürünü saflaştırıldıktan sonra her örnek için forward ve reverse primerler kullanılarak iki adet sekans reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon protokolleri aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 3.6 PCR reaksiyon programı

Program	İşlem	Hedef ısı	Süre
İlk denatürasyon		94 °C	5 dak.
Çoğaltma (35 döngü)	Denatürasyon	94 °C	10 sn.
	Bağlanma	50 °C	5 sn.
	Uzama	60 °C	2.5 dak.
Uzama	Uzama	60 °C	1 dak.
Soğutma	Soğutma	4 °C	∞

Tablo 3.7 Sekans reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	Miktar (1rxn)
Big dye V3.1	2,0 µl
Buffer (5x)	2,0 µl
Primer (F veya R) (5 pmol)	1,0 µl
PZR ürünü (20 ng/ µl)	2,0 µl
dH ₂ O	3,0 µl
Toplam hacim	10,0 µl

3.3.6 Sekans ürünlerinin saflaştırılması

Elde edilen sekans ürünleri Sephadex G50 (GML, Switzerland) kullanılarak kolon purifikasyon yöntemi ile saflaştırıldı. Yöntemin aşamaları aşağıda verilmiştir.

1. 2 gr Sephadex G50 28 ml su içinde çözüldü.
2. Receiver column (kolon) içine 750 ul konularak 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

3. Kolonlar 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alındı.
3. Kolon içerisindeki katı halde bulunan Sephadex G50 üzerine dikkatlice sekans reaksiyonu ürünleri eklendi.
4. 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
5. Eppendorf tüplerinde elde edilen saflaştırılmış sekans ürünleri ABI 3500 Genetic Analizör cihazına yüklendi.

3.3.7 Kapiller elektroforez ve analiz

Saflaştırılan sekans ürünleri ABI 3500 ve kapiller elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Sequencing Analysis v5.4 ve Chromas Lite programları kullanılarak analiz edildi. Elde edilen diziler NCBI web sitesinde bulunan *Basic Local Alignment Search Tool* kullanılarak genomla karşılaştırıldı ve varyasyonlar incelendi.

4. BULGULAR

4.1 Hasta Grubunun Özellikleri

Çalışmaya JAK2 ve MPL mutasyonu negatif 16 ET ve 4 PMF hastası alınmıştır. Hastaların ortalama yaşı 53.9(\pm 20.7), ortalama beyaz küre sayısı 8.8(\pm 7.3), ortalama Hb değeri 12.2(\pm 1.4), ortalama trombosit sayısı 630bin (\pm 397) olarak bulundu. Hastalara ait cinsiyet, yaş, materyal, tanı anında veya takipteki hemoglobin, beyaz küre (Wbc), trombosit (Plt) sayıları, tanıları ve CALR ekzon 9 mutasyon analizi sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir. (Tablo 4.1)

Tablo 4.1 Hastalara ait demografik ve klinik veriler

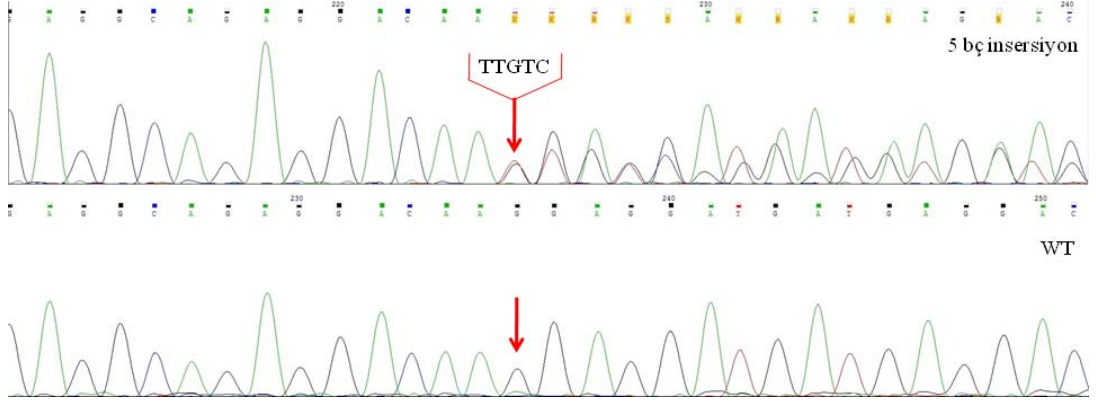
Hasta	Cinsiyet	Yaş	Örnek	Hb	Wbc	Plt	TANI	CALR Ekzon 9 genotipi
1	K	71Y	PK	BU	4.49	BU	ET	WT
2	K	28Y	PK	11.9	9.28	1458	ET	WT
3	K	72Y	PK	10.9	30.86	106	PMF	WT
4	E	61Y	Kİ	8.9	1.4	115	PMF	WT
5	K	70Y	PK	12.9	4.13	876	ET	WT
6	K	74Y	PK	10.8	BU	769	ET	WT
7	E	32Y	PK	14.0	6.53	463	ET	WT
8	E	66Y	Kİ	11.4	2.31	101	PMF	WT
9	K	34Y	PK	12.80	7.94	435	ET	WT
10	E	62Y	PK	12.0	11.6	547	ET	Tip II İNSERSİYON
11	K	32Y	PK	BU	BU	BU	ET	WT
12	K	49Y	PK	13.4	15.0	944	ET	WT
13	K	35Y	PK	12.6	7.75	1016	ET	Tip I DELESYON
14	K	79Y	PK	BU	BU	BU	ET	WT
15	E	64Y	PK	13.0	8.7	555	ET	46 bç DELESYON
16	K	70Y	PK	11.3	6.7	476	ET	WT
17	K	17Y	PK	14.2	6.51	961	ET	Tip I DELESYON
18	E	74Y	PK	BU	BU	BU	PMF	WT
19	E	69Y	PK	BU	BU	BU	ET	WT
20	K	19Y	Kİ	BU	BU	BU	ET	Tip I DELESYON

BU:Bilgiye ulaşılamadı

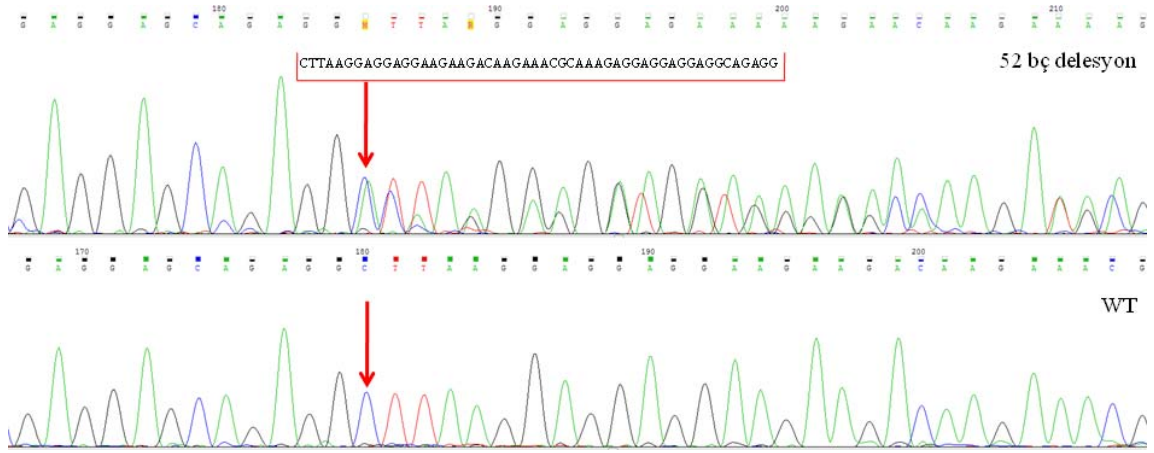
Hastaların %80'i ET, %20'si PMF hastasıydı. Çalışmaya alınan hastaların 13 tanesi kadın 7 tanesi erkek hastaydı. Mutasyon saptanan hastaların yaş ortalaması 39.4 olarak bulundu. Tip I mutasyon saptanan 3 hasta ET tanılı kadın hastaydı ve yaş ortalamaları 23.6 idi. Tip II mutasyon saptanan tek hasta ET tanılı 62 yaşında erkek hastaydı. 64 yaşındaki erkek bir ET hastasında ise 46 bç'lik delesyon saptandı.

4.2 CALR Ekzon 9 Dizi Analizi Sonuçları

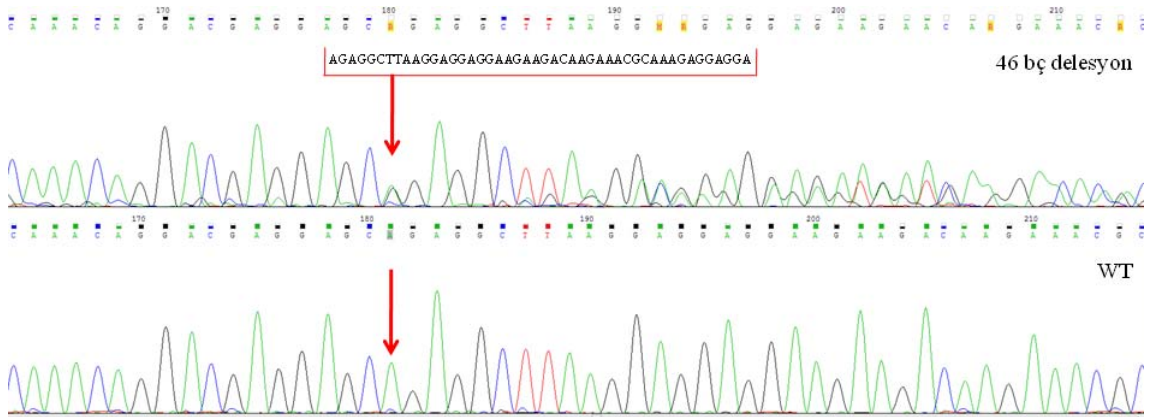
Yapılan dizi analizi sonucunda 11 ET (1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 19 no'lu hastalar) hastası ve 4 PMF hastasında (3, 4, 8, 18 no'lu hastalar) dizi analizleri normal olarak bulundu, mutasyon saptanmadı. 10 numaralı hastada 5 bç'lik insersiyon (c.1154_1155insTTGTC) (Tip II mutasyon) saptandı (Şekil 4.1). 13, 17 ve 20 numaralı hastalarda 52 bç uzunluğunda (c.1092_1143del) (Tip I mutasyon) saptandı (Şekil 4.2). 15 no'lu hastada 46 bç'lik delesyon (c.1094_1139del) saptandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.1 Tip II mutasyon (c.1154_1155insTTGTC)



Şekil 4.2 Tip I mutasyon (c.1092_1143del)



Şekil 4.3 46 bç'lik delesyon (c.1094_1139del)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik AD'na KMPH ön tanısı için JAK2 ve MPL genlerinin mutasyon analizi yapılmış ve mutasyon saptanmamış 20 hasta dahil edilmiştir. Bu hastalar CALR mutasyon sıklığı, mutasyon tipleri ve mutasyonların klinikle olan ilişkisi açısından değerlendirilmiştir. Hastaların 16 tanesi ET hastası, 4 tanesi PMF hastasıdır.

DSÖ'nün 2008 tanı kriterlerine göre ET ve PMF hastalarına kesin tanı koyabilmek için JAK2 veya MPL genlerindeki mutasyonların gösterilmesi gerekmektedir. Ancak bu hastalıklara sahip bireylerin %30-45'i bu genlerde mutasyon taşımamaktadır. CALR genindeki mutasyonların tanımlanması ile diğer genlerde mutasyon taşımayan hastalara tanı koyma imkanı doğmuştur. CALR genindeki mutasyonlar JAK2 ve MPL mutasyonu olmayan hastalarda görülmektedir (82).

Yapılan çalışmalara göre ET'da saptanan CALR mutasyon sıklığı %15-25'dir. Bu oranlar CALR genindeki mutasyonların JAK2'den sonra en sık görülen mutasyonlar olduğunu göstermektedir (69,70, 75).

2013 yılında yayınlanan ve CALR mutasyonlarını ilk kez tanımlayan iki çalışmadan birisinde CALR mutasyonu çalışmaya alınan 382 PV hastasının hiçbirinde saptanmamıştır. Buna karşın ET hastalarının %25'inde PMF hastalarının %35'inde CALR geninde mutasyon gösterilmiştir (69).

CALR mutasyon sıklığının daha düşük bulunduğu çalışmalar da mevcuttur. Yapılan bir çalışmada tüm KMPH'larda CALR mutasyon sıklığı %12.6, ET'da %17.7 ve PMF'da %14.8 bulunmuştur (83).

436 ET hastası ile yapılan bir çalışmada JAK2 ve MPL negatif grupta CALR mutasyon sıklığı %52.7 olarak bulunmuştur. Bu çalışmadaki 159 sağlıklı kontrol hastasının hiçbirinde JAK2 ve CALR mutasyonu saptanmamıştır (84).

357 PMF hastası ile yapılan bir çalışmada ise tüm hastalarda CALR mutasyon sıklığı %21 olarak bulunurken JAK2 ve MPL negatif grupta CALR mutasyon sıklığı %43 olarak bulunmuştur (85).

300 ET hastası ile yapılan bir çalışmada ise mutasyon sıklıkları JAK2 için %53, MPL için %3, CALR için %32 olarak bulunmuştur. %12 hasta her üç gen için de mutasyon taşımamaktadır (86).

Bu çalışmada ise CALR genindeki mutasyon sıklığı 16 ET, 4 PMF toplam 20 hasta için (5/20) %25 olarak bulunmuştur. ET hastalarındaki mutasyon sıklığı (5/16) %31.25 olarak bulunmuştur. 4 PMF hastasında ise mutasyon saptanmamıştır (%0). Yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında ET hastaları için diğer çalışmalara yakın fakat biraz düşük oranlarda mutasyon saptandığı belirlendi. PMF hastaları için ise hiç mutasyon saptanmaması diğer çalışmalarla paralellik göstermemektedir. Saptanan oranların düşük olmasının ana nedeni hasta hasta sayısının az olmasına bağlandı. Ayrıca Sanger dizileme yönteminin %10-15 hata payının olması bazı hastalarda mutasyon saptanamamasının bir nedeni olabilir. İkinci bir yöntemle mutasyonların doğrulanamaması çalışmamızın zayıf bir yönünü ortaya koymaktadır.

CALR ekzon 9 delesyon ve insersiyonları ET ve PMF'daki en sık mutasyonlardır, sıklıkları farklı çalışmalarda ET için %15-32, PMF için %25-35 olarak bulunmuştur (69,70, 87).

Yapılan bir çalışmada ET'da Tip I mutasyon sıklığı %46, tip II mutasyon sıklığı %38 olarak bulunmuştur (88). PMF'lu hastalarda yapılan bir çalışmada ise Tip I mutasyon sıklığı %72, tip II mutasyon sıklığı %12 olarak bulunmuştur (89).

CALR mutasyonlarının sıklığı başka bir çalışmada Tip I mutasyon için %72, Tip II mutasyon için %12.6 olarak bulunmuştur. Tip I mutasyon sıklığının PMF'da ET'a göre daha yüksek olması bu mutasyonun myelofibrotik transformasyon ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (90).

Yapılan bir çalışmada diğer çalışmaların aksine Tip II mutasyon daha sık bulunmuştur. Bu çalışmaya göre PMF'lu hastalarda Tip II mutasyon sıklığı %64 iken Tip I mutasyon sıklığı %32 bulunmuştur (85). Başka bir çalışmada ise PMF'lu hastalarda Tip I mutasyon sıklığı ve Tip II mutasyon sıklığı sırasıyla %80 ve %11 olarak bulunmuştur (92).

Bizim çalışmamızda ise PMF'lu dört hastanın hiçbirisinde mutasyon saptanmadı (%0). ET'lu 16 hastanın 5 tanesinde mutasyon saptandı (%31.25). Tüm hasta grubunda CALR mutasyon sıklığı %25 olarak bulundu. Bulunan mutasyonlar içerisinde Tip I mutasyon sıklığı %60, Tip II mutasyon sıklığı %20 ve 46 bç'lik delesyon (c.1094_1139del) sıklığı %20 olarak saptandı. 46 bç'lik delesyonun literatüre göre çok yüksek oranda saptanmasının nedeninin toplam mutasyon sayısının az olmasına bağlı olduğu düşünüldü. PMF hastalarında hiç mutasyon görülmemesi ise hasta grubunun çok az sayıda olmasına ve/veya yanlış klinik tanı konmuş olabileceğine bağlandı. Tip I mutasyon ve Tip II mutasyon sıklığı ise diğer çalışmalara paralel oranlarda saptandı.

Dokuz yeni mutasyonun tanımlandığı bir çalışmada ise mutant allel yükünün PMF'lu hastalarda ET'lu hastalara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ve CALR mutasyonlu PMF hastalarının ET hastalarına göre farklı klinik özellikler gösterdiği belirtilmiştir (82).

Laboratuvar verilerinin CALR mutasyonlarıyla ilişkisinin değerlendirildiği bir çalışmada erkek cinsiyet Tip I mutasyonları ile, genç yaş Tip II mutasyonları ile ilişkili bulunmuştur (91).

PMF'lu hastalardaki CALR mutant olgularla JAK2 mutant olguların karşılaştırıldığı bir çalışmada CALR mutant olgularda düşük hemoglobin seviyesi, düşük beyaz küre sayısı, yüksek trombosit sayısı saptanmıştır. Bu olgularda splenomegali saptanmamıştır (85).

CALR mutasyonlarının ilk kez tanımlandığı iki çalışmadan bir tanesinde JAK2 mutasyonlu hastalarla karşılaştırıldığında CALR mutant hastalar daha yüksek trombosit sayısı, düşük lökosit sayısı, düşük hemoglobin düzeylerini, yüksek fibrotik transformasyon sıklığı, düşük tromboz riski ve daha uzun sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Hem PMF hem ET’da CALR mutasyonlarının daha genç yaş ve daha iyi prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (69).

PMF’lu hastalarda yapılan bir çalışmada CALR mutasyonları daha genç yaş, düşük hemoglobin düzeyi, yüksek platelet sayısı, düşük lökositozla ilişkili bulunmuş ve bu hastaların transfüzyon ihtiyacının daha az olduğu belirtilmiştir (81).

Her üç mutasyonun da değerlendirildiği bir çalışmada CALR mutasyonu olan hastalar JAK2 mutasyonu olanlara göre daha yüksek trombosit sayısı ve daha düşük splenomegali insidansı ile ilişkili bulunmuştur. Üç mutasyonun da negatif olduğu hastalar JAK2V617F mutasyonu olanlara göre daha yüksek trombosit sayısına sahip olarak bulunmuştur. CALR mutant hastaların daha düşük trombotik olay insidansına sahip olduğu belirtilmiştir (93).

Başka bir çalışmada ise CALR mutasyonlarıyla genç yaş, yüksek trombosit sayısı, düşük hemoglobin, hematokrit ve lökosit değerleriyle ilişki saptanmasının yanında artmış myelofibrozis riski ile ilişkili bulunmuştur (94).

Bizim çalışmamızda yer alan hastaların 13 tanısı kadın ve 7 tanesi erkek idi. Tip I mutasyon saptanan hastaların tamamı genç yaş kadın hastalardı. Bu hastaların yaş ortalaması 23.6 olarak bulundu. Tip II mutasyon saptanan tek hasta ET tanılı 62 yaşında erkek hastaydı. 64 yaşındaki erkek bir ET hastasında ise 46 bç’lik delesyon saptandı. Tip I mutasyon yapılan diğer çalışmaların aksine kadın hastalarda daha sık bulundu. Bu veri hasta grubunun az olmasına bağlandı. Çalışmamızın dikkat çekici bir verisi Tip I mutasyon saptanan hastaların yaş ortalamasının çok düşük saptanmasıydı. Bu yaş grubundaki daha fazla sayıda hasta ile daha büyük ölçekli çalışmalar bu ilişkiyi daha net ortaya koyabilir.

Hastalarımızın hemoglobin ve beyaz küre değerleri ile CALR mutasyonları arasında belirgin bir ilişki gözlenmemiştir. Tip I mutasyon saptanan hastalarda literatürle uyumlu olarak platelet sayısı dikkat çekici şekilde yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda splenomegalinin varlığı, tromboz öyküsü ve sağkalım gibi parametreler değerlendirilememiştir, bu durum çalışmamızın en zayıf yönü olarak düşünülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda JAK2 ve MPL negatif ET ve PMF hastalarında literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak yüksek CALR mutasyon sıklığı belirlenmiştir. CALR geni JAK2 ve MPL negatif olgulara tanı konmasını sağlayabilecek yeni bir genetik belirteç olarak tanı algoritmalarında yerini alabilir.
- CALR mutasyon sıklığı ET ve PMF hastalarında JAK2 mutasyonlarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. MPL mutasyonlarından belirhin olarak daha siktir. Bu nedenle JAK2V617F mutasyonundan sonra CALR mutasyonlarının taranması hasta yönetimi ve maliyet açısından daha doğru olacaktır.
- CALR mutasyonları ile klinik ve laboratuvar verileri arasında kurulan ilişki klinisyenlere tanı koymada, hasta takibinde, prognozu öngörmeye ve tedavi algoritmalarının belirlenmesinde yardımcı olacaktır.
- İleride yapılacak daha büyük ölçekli ve prospektif çalışmalar, PMF ve ET hastalıklarındaki genetik mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesini, bu mekanizmalar ile hastaların klinik bulguları arasında ilişki kurulabilmesini, yeni terapötik ajanların keşfedilmesini sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Guyton AC, Hall JE. Blood Cells, Immunity and Blood Clotting. Textbook of Medical Physiology. (Guyton AC, Hall JE, ed) Tenth edition. ABD, W.B. Saunders Company. 382-401, 2000.
2. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Ganong's Review of Medical Physiology, 23. Edition, New York, The McGraw, 2012
3. Lambert JR. Investigations into the molecular pathogenesis of Et. Doktora tezi, UCL cancer Institute, University College London, London 2011
4. Deutsch VR, Tomer A. Advances in megacaryocytopoiesis and trombopoiesis: from bench to bedside, Br J Hematol. 161(6): 778-793, 2013
5. McPhee SJ, Hammer GD. Pathophysiology of Disease, 6th edition, USA, McGraw-Hill Medical, 2009
6. Michelsen AD. Platelet structure. 3rd edition, China, ACAademic Press, 2013
7. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. J Clin Invest 115: 3339-3347, 2005.
8. Teofili L, Larocca LM. Advences in understanding the pathogenesis of familial thrombocythemia. British Journal of Haematology 152: 701-712, 2011
9. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferini PR, Rambaldi A, Guerini V, Bosi A, Barbui T. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2V617F allele burden, Leukemia 21: 1952-1959, 2007.
10. Harrison CN, Bareford D, Butt N, Campbell P, Conneally E, Drummond M, Erber W, Everington T, Green AR, Hall GW, Hunt BJ, Ludlam CA, Murrin R, Nelson-Piercy C, Radia DH, Reilly JT, Walt JW, Wilkins B, McMullin MF. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis. British Journal of Haematology 149: 352-375, 2010.
11. Lichtman MA, Liesveld JL. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, (eds). Williams Hematology. 6th Edition. McGraw-Hill; 2001. 1085-123.
12. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood 1951;6:372-5.
13. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia 2008;22:14-22.

14. Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukaemia: A therapeutic challenge. *Ann oncol* 1995;6:637-44.
15. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-61.
16. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutations screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol* 2005;131:166-71.
17. Tefferi A. JAK2 mutations in myeloproliferative disorders. Molecular mechanisms and clinical applications. *N Engl J Med* 2007;356:444-5.
18. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366:1945-53.
19. Elisa Rumi et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes *Blood* December 23, 2013; DOI 10.1182/blood-2013-11-539098.
20. Colombi M, Radaelli F, Zocchi L, Maiolo AT. Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia. A retrospective study of 103 patients. *Cancer* 1991;67:2926-30.
21. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 1990;8:556-62.
22. Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995;123:656-64.
23. Schafer AI. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Blood* 1984;64:1-12.
24. Gangat N, Strand J, Li CY. Leukocytosis in polycythemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2007;138:354-8.
25. Wadleigh M, Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol* 2010;91:174-9.
26. Den Genderen PJJ, Michiel JJ. Primary thrombocythaemia, diagnosis, clinical manifestations and management. *Ann Hematol* 1993; 67:57-62.
27. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen, SJ et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol* 1999;61:10-5.

28. Beer AP, Green AR. Pathogenesis and management of essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;621-8.
29. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006;107:4139-41.
30. Finazzi G Xu M, Barbui T, Hoffman R. Essential Thrombocythemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al (eds). *Hematology, Basic Principles and Practice*. Pennsylvania: Churchill-Livingstone; 2009. 1149-66.
31. Wehmeir A, Baudaun I, Jamin H, Schneidr W. Incidence and clinical risk factors for bleeding and thrombotic complications in myeloproliferative disorders. *Ann Hematol* 1991;63:101-4.
32. Michiels JJ, van Genderen PJ, Lindemans J, van Vliet HH. Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic manifestations in 50 cases of thrombocythemia. *Leuk Lymphoma* 1996;22:47-56.
33. Long MW, Hoffman R. Thrombocytopoiesis. In: Hofman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ (eds). *Hematology Basic Principles and Practice*. New York: Churcill Livingstone; 2000. 245-59.
34. Rodgers GM, Bithell TC. The diagnostic approach to dhe bleeding disorders. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN (eds). *Wintrobe s Clinical Hematology*. Egypt: Williams and Wilkins; 1999. 1563-4.
35. Iland HJ, Laszlo J, Peterson P, et al. Essential thrombocythaemi: Clinical and laboratory characteristics at presentation. *Trans Assoc Am Physicians* 1983;96:165-74.
36. Murphy S, Iland H, Rosenthal D, Laszlo J. Essential thrombocythaemi: An interim report from Polycythemia Vera Study Group. *Semin Hematol* 1986;23:177-82.
37. Van Genderen PJJ, Mulder PGH, Waleboer M et al. Prevention and treatment of thrombotic complications in essential thrombocythemia: efficacy and safety of aspirin. *Br J Haematol* 1997;97:179-84.
38. Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2006;107:4214-22.
39. Pettit RM, Silverstein MN, Petrone M. Anagrelide for kontrol thrombocythemia in polycythemia and other myeloproliferative disorders. *Sem Hematol* 1997;34:51-4.

40. Tefferi A. Primary Myelofibrosis. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, et al (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12th edition. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2009. 2045-53.
41. Thiele J, Kvasnicka HM, Tefferi A. Primary myelofibrosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL (eds). *WHO Classification of Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2008. 44-7.
42. Visani G, Finelli C, Castelli U, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol* 1990;75:4-9.
43. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010;24:1128-38.
44. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol* 2011;29:1356-63.
45. Cervantes F, Pereira A. Advances in the understanding and management of primary myelofibrosis. *Curr Opin Oncol* 2011;23:665-71.
46. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2013;88:141-50.
47. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms 2012: the John M. Bennett 80th birthday anniversary lecture. *Leuk Res* 2012;36:1481-9.
48. Gregory SA, Mesa RA, Hoffman R, Shammo JM. Clinical and laboratory features of myelofibrosis and limitations of current therapies. *Clin Adv Hematol Oncol* 2011;9:1-16.
49. Orazi A, O'Malley DP, Jiang J, et al. Acute panmyelosis with myelofibrosis: an entity distinct from acute megakaryoblastic leukemia. *Mod Pathol* 2005;18:603-14.
50. Dingli D, Mesa R, Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: New developments in Pathogenesis and Treatment. *Internal medicine* 2004;43:540-7.
51. Verstovsek S, Tefferi A. *Myeloproliferative Neoplasms Biology and Therapy*. USA Humana press. 2011.
52. Kim J, Haddad RY, Atallah E, Myeloproliferative neoplasms. *Disease of Month* 58: 177-194, 2012.
53. Provan D, Gibben JG. *Molecular hematology*, 3rd edition. Wiley-Blackwell publishing, Singapore, 2010.

54. Delhommeau F, Jeziorowska D, Marzac C, Casadevall N. Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* 91: 165-173, 2010.
55. Klcó JM, Vij R, Kreisel FH, Hassan A, Frater JL. Molecular pathology of myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol* 133: 602-615, 2010.
56. Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard G, Akiki S, Awan A, Carter I, Goday-Fernandez A, Langabeer SE, Clench T, Clark J, Evans PA, Grimwade D, Schuh A, McMullin MF, Green AR, Harrison CN, Cross NCP. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *British Journal of Haematology*, 160(1): 25-34, 2012.
57. Tibes R, Mesa RA, Myeloproliferative neoplasms 5 years after discovery of JAK2V617F: what is the impact of JAK2 inhibitor therapy. *Leukemia & Lymphoma* 52(7): 1178-1187, 2011.
58. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 22: 1299-1307, 2008.
59. MPL myeloproliferative leukemia virus oncogene [Homo sapiens (human)]. Erişim: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4352>). Erişim tarihi: 11.10.2015
60. He X, Chen Z, Jiang Y, Qiu X, Zhao X. Different mutations of the human c-MPL gene indicate distinct haematopoietic diseases. *Journal of Hematology & Oncology* 6: 11-18, 2013.
61. Catalogue of somatic mutations in cancer. Erişim: (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=MPL#histo>). Erişim tarihi: 11.10.2015.
62. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 88: 508-516, 2013.
63. Vakil E, Tefferi A. BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms: a review of molecular biology, diagnosis, and treatment. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 11: 37-45, 2011.
64. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T. Characteristics and clinical correlates of MPL 515WL/K mutation in essential Thrombocythemia. *Blood* 112: 844-847, 2008.
65. Guglielmelli P., Bartolucci N., Rotunno G., Vannucchi AM. Calreticulin; a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms *Expert Rev Hematol.* 2014;7(4):423-425

66. Guglielmelli P., Nangalia J., Green AR., Vannucchi AM. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: Hidden behind the reticulum American Journal of Hematology. 2014;89:5:453-456
67. Gold LI., Eggleton P. Calreticulin: non-endoplasmic functions in physiology and disease FASEB J. 2010;24:665-683
68. Michalak M., Robert Parker JM., Opas M. Ca^{+2} signalling and calcium binding chaperons of endoplasmic reticulum. Cell Calcium 2002;32(5-6),269-278
69. Klampfl T., Harutyunyan AS. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. N Eng J Med 2013;369:2379-2390
70. Nangalia J., Massie C. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 N Eng J Med 2013;369:2391
71. Carmello JJ., Parodi AJ. Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. J Biol Chem 2008;283:10221-10225
72. Jethmalani SM., Henle KJ., Calreticulin associates with stress proteins: implication of chaperone function during heat stress. J Cell Biochem 1998;69:30-43
73. Michalak M., Corbett EF. Calreticulin: one protein, one gene, many functions Biochem 1999;344:281-292
74. Obeid M., Tesniere A. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death Nat Med 2007;13:54-61
75. Cazzola M., Kralovicks R. From janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms Blood 2014;123-124
76. Tefferi A., Lasho T., CALR vs JAK2 vs MPL- mutated or triple negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia 2014;28(7):1472-1477
77. Rattunno G., Barbui T., Novel insights into the biology and treatment of chronic myeloproliferative neoplasms Leukemia&Lymphoma 2014
78. Tefferi A., Thiele J., Vannucchi AM. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. Leukemia 2014:1-7
79. Luca M., Rumi E., Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Italy Haematology 2014:113944
80. Catalogue of somatic mutations in cancer. (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=CALR>). Erişim tarihi: 11.10.2015.

81. Tefferi A., Lasho T., CALR vs JAK2 vs MPL- mutated or triple negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28(7):1472-1477
82. Li N., Yao QM., Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2V617F or MPL mutations. *Leukemia research* 2014;39:510-514
83. Kim SY., Im K., CALR, JAK2, and MPL mutation profiles in patients with four different subtypes of myeloproliferative neoplasms: primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, polycythemia vera and myeloproliferative neoplasms unclassifiable. *Am J Clin Pathol* 2015;5:143:635-644
84. Fu R., Xuan M., Analysis of calreticulin mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia: clinical implications in diagnosis, prognosis and treatment. *Leukemia* 2014;28:1912-1914
85. Li B., Xu J. Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis. *Hematologica* 2014;99(11):1697-1700
86. Gangat N., Wassie EA., Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia: prognostic interaction with age and thrombosis history. *Eur J Haematol.* 2015;94(1):502-509
87. Tefferi A., Guglielmelli P. Long term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Blood* 2014;24(16):2507-2513
88. Rumi E., Pietra D. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014;123(10):1544-1551
89. Cabagnols X., Defour J. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* 2014
90. Rumi E., Pietra D. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014;124(7):1062-1069
91. Tefferi A., Wassie E. Type 1 vs Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hem* 2014;89(8):121-124
92. Tefferi A., Lasho T. Type 1 vs Type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: difference in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* 2014;28(7):1568-1570

93. Nunes DP., Lima L. CALR mutations screening in wild type JAK2V617F and MPL W515K/L Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2015;55-236-240
94. Al Assaf C., Van Obberg F. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations *Haematologica* 2015;100(7)893-897