

## Miyeloproliferatif Neoplazilerde *JAK2V617F* Mutasyonunun Endotel Hücrelerine Etkisi ve *SOCS1-4* Gen Anlatımlarına Yansıması

### *The effect of JAK2V617F Mutation to the Endothelial Cells and the Expression Profiles of SOCS1-4 Genes in Myeloproliferative Neoplasms*

Ahmet Göksu<sup>1</sup>, Hilal Hekimoğlu<sup>2</sup>, Selçuk Sözer Tokdemir<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi, Edebiyat Fakültesi, Bilim Tarihi, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Doktora Programı, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup> İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: A.G. 0000-0002-2035-4050;  
H.H. 0000-0002-6234-3469;  
S.S.T. 0000-0002-5035-4048

#### Corresponding author/Sorumlu yazar:

Selçuk Sözer Tokdemir,  
İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp  
Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye  
E-mail: ssozer@istanbul.edu.tr

Submitted/Geliş tarihi: 06.09.2020

First Revision Received/İlk revizyon: 10.09.2020

Last Revision Received/Son revizyon: 06.10.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 06.10.2020

Citation/Atf: Göksu A, Hekimoğlu H, Tokdemir SS. The effect of *JAK2V617F* mutation to the endothelial cells and the expression profiles of *SOCS1-4* genes in myeloproliferative neoplasms. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 135-147.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-790117>

#### ÖZ

**Amaç:** Miyeloproliferatif neoplazi (MPN)'li hastalar morbidite ve mortalitesi yüksek tromboz riski taşırlar. Tromboza olan bu yatkınlık, artmış kan hücre sayısı ile bağdaştırılmış olsa da, endotel hücre (EH) fonksiyon bozukluğu gibi faktörler de önemli rol oynamaktadır. EH'nin miyeloproliferatif bozukluklarla olan bağlantısını göstermek üzere yapılan önceki çalışmalarda EH'nin MPN kan hücrelerinde %50-95 oranında mevcut olan *JAK2V617F* mutasyonunu taşıdığı gösterilmiş, ancak sitozolik tirozin kinaz olan Janus kinase 2 (*JAK2*) de meydana gelen bu mutasyonun EH üzerinde göstermiş olduğu morfolojik ve fonksiyonel değişiklik gösterilmemiştir. Ayrıca epigenetik faktörlerden Sitokin Sinyal Süpresör (*SOCS*) proteinleri'nin MPN'deki etkisi de tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışma ile *JAK2V617F* mutasyonunun EH'de yapmış olduğu etkileri epigenetik açıdan önemli olan, *SOCS 1-4* gen anlatımları ve metilasyon durumları incelenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** *In vitro* yeşil floresan proteini (GFP) ile işaretlenmiş *JAK2* (yabanil formu) veya *JAK2V617F* mutasyonu taşıyan lentivirüsün insan kordon veni endotel hücreleri (HUEVC) içine transdüksiyon metodu kullanılmıştır. Genetik olarak modifiye edilmiş EH popülasyonunda, akımlölçer cihazı ile GFP tespit edilmiş ve analizleri yapılmıştır. Ardından hücre ayırıcı ile seçilmiş olan GFP+ hücrelerde DNA ve RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *SOCS1-4* genlerinin anlatım değerleri gerçek zamanlı RT-PZR tespit edilmiş ve bisülfid modifikasyona maruz bırakılan DNA yardımıyla metilasyona özgü PZR yapılmıştır.

**Bulgular:** *JAK2*, *JAK2V617F* ve *GFP* taşıyan lentiviral vektörlerle başarılı bir şekilde EH enfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Genetiği modifiye edilmiş EH'ler birbirleri ile kıyaslandığında morfolojik bir farklılık saptanmamıştır. *SOCS1-4* genlerinde, mutant EH de *JAK2* ve *GFP*'e göre gen anlatım düzeyinde anlamlı artış tespit edilmiştir. *GFP* ve *JAK2* de tespit edilen *SOCS1-4* gen anlatım baskılanmasında bu genlerde oluşması muhtemel bir metilasyon olmadığı tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Bu konuda gelecekte yapılacak çalışmalar, *JAK2V617F*'in EH'ler üzerindeki etkilerini ve trombotik olaylarla bağlantısını açıklamamıza yardımcı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Miyeloproliferatif Neoplazi (MPN), *JAK2V617F*, Endotel Hücre, Lentivirüs, *SOCS*

#### ABSTRACT

**Objective:** Patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) are at an increased risk of developing thrombosis which leads to significant levels of morbidity and mortality. Although this propensity for thrombosis has been attributed to increased blood counts, other factors such as endothelial cell (EC) dysfunction likely play an important role. Previous studies have provided evidence of EC involvement by *JAK2V617F* which is known to be present in blood cells of 50-95% of patients with MPN. Furthermore, the morphological and functional changes of this mutation, a single nucleotide mutation in the cytosolic tyrosine kinase, Janus kinase 2 (*JAK2*) has not been shown in EC. In addition, the role of epigenetic factors including suppressors of cytokine signaling (*SOCS*) proteins is also unknown for MPN. In

this study, the effects of the *JAK2V617F* mutation on EC and the *SOCS 1-4* genes expression and their methylation profiles were investigated.

**Materials and Methods:** The *in vitro* transduction method of green fluorescent protein (GFP) labeled lentivirus carrying the *JAK2* (wild form) or *JAK2V617F* mutation into human cord vein endothelial cell (HUVEC) was applied. GFP was determined and analyzed with the flow cytometer. Afterwards, the genetically modified EC population was isolated, gating for GFP signal by cell sorter and then DNA and RNA isolations were performed. Gene expressional changes of *SOCS1-4* genes were determined in real time RT-PCR and methylation specific PCR was performed with bisulfite modification of DNA.

**Results:** The successful infection of *JAK2*, *JAK2V617F* and *GFP* vectors into EC were achieved. The comparison of the genetically modified EC revealed no morphological differences. A significant increase in the expressions of *SOCS1-4* were detected in mutant EC compared to *JAK2* and *GFP*. It was determined that methylation had no effect on suppression of *SOCS1-4* expression detected in *GFP* and *JAK2* EC.

**Conclusion:** Future studies will further enlighten the effects of *JAK2V617F* on EC and its role in thrombotic events.

**Keywords:** Myeloroliferative Neoplasm (MPN), *JAK2V617F*, Endothelial Cells, Lentivirus, SOCS

## GİRİŞ

Philadelphia kromozom negatif (Ph<sup>-</sup>) olan miyeloproliferatif neoplaziler (MPN) polistemia vera, esaslıy trombositemi ve Primer miyelofibrozis'den oluşur. Ph<sup>-</sup> MPN'ler, sitozolik tirozin kinaz olan Janus kinaz 2 (JAK2) de meydana gelen mutasyonlar ile bağdaştırılmıştır. Oluşan bu mutasyon, eritroid, miyeloid ve megakaryosit progenitorlerin büyüme hormonuna karşı hassaslaşmasına neden olur. Bu kazanılmış mutasyonlar içerisinde en sık görüleni *JAK2V617F* ise PV' de >95%, ET'de ~50% ve PMF ~50% oranlarında görülür (1-3). MPN'li hastalarda görülen çok sayıda komplikasyon artmış trombotik olaylar neticesindedir(4,5). Yakın bir tarihte yüksek *JAK2V617F* allel yoğunluğuna bağlı artmış trombotik olaylar bildirilmiştir(6). Mevcut olan bu trombotik olaylar etiolojisinde kesin bir etmen saptanamamış olmasına rağmen artmış kan hücreleri düşünülmektedir (7-12). Endotel hücre (EH) fonksiyon bozukluğu ise trombotik olaylarda büyük rol oynayan bir etmendir (13-15). Bu konuda yapılan önceki çalışmalarda MPN endotel hücresinde MPN hastalarının kan hücrelerinde mevcut olan *JAK2V617F* mutasyonunu taşıdığı tespit edilmiştir (16). EH'nin MPN'deki rolü ile ilgili çalışmalarda farklı bir grup tarafından doğrulanmış ve MPN de EH'nin önemi bir kez daha kanıtlanmıştır (17).

MPN' de *JAK2V617F* gibi genetik mutasyonların önemli hastalık başlatıcı etkileri olsa da primer deoksiribonükleik asit (DNA) dizisini değiştirmeden gen anlatımını değiştiren epigenetik değişimler de mevcuttur. Bu epigenetik değişimler kromatinin yeniden şekillendirilmesi ve DNA'nın metilasyonunu içeren temel iki yoldan etkinlik gösterirler (18).

Sitokin Sinyal Süpresör (SOCS) proteinleri sitokin sinyalinin inhibitörleridir, JAK-STAT yolağı ile indüklenirler ve JAK-STAT yolağının negatif regülasyonunda rol alırlar. Sekiz CIS/SOCS proteini mevcuttur: CIS, SOCS 1, SOCS 2, SOCS 3, SOCS 4, SOCS 5, SOCS 6 ve SOCS 7. SOCS 1 ve SOCS 3' te diğerlerinden farklı olarak SH2- domaine bitişik kinaz inhibitör bölgesi (Kinase inhibitory Region; KIR) bulunmaktadır. SH2 bölgesi JAK'larla etkileşerek tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder (19). SOCS'lar aynı zamanda proliferasyon, farklılaşma ve hemato-

poz'de de görevlidir. SOCS proteinlerinin kanser gelişiminde rol oynayabilecekleri birçok merkez tarafından bildirilmiştir. Büyüme faktörlerine aşırı duyarlılık göstermeleri ve onkogenizde rol alan çeşitli sitokinler tarafından modüle edilmeleri sonucu kansere neden oldukları düşünülmektedir. SOCS'ların anlatımının susturulması sitokin sinyalinin bozulmasına yol açan epigenetik bir düzenlemedir (20). SOCS1 ve SOCS3' ün SH2 bölgeleri direkt JAK'ların aynı bölgesi ile etkişime girerek onları inhibe ettikleri bilinmektedir. Bu direkt bağlantıdan dolayı metilasyon çalışmaları daha çok bu iki protein üzerine yoğunlaşmıştır. Birçok Ph<sup>-</sup> MPN vakasında değişen oranlarda SOCS metilasyonları tesbit edilmiştir (21-24). SOCS4-7' nin fonksiyonları hakkında diğer SOCS' lara nazaran daha az bilgi ve çalışma vardır. Fakat bu grup içinden SOCS4' ün JAK/STAT yolağı ile ve metilasyonunun gastrik kanserle ilişkisine dair çalışmalar mevcuttur (25,26).

Bu çalışmada lentiviral vektörler aracılığıyla JAK2 geninin yabanil formu (WT) ve mutasyon taşıyan *JAK2V617F* formunun EH' ye enfeksiyonu sağlanarak EH'de genetik değişiklik hedeflenmiş ve bu aktarım sonucu oluşan epigenetik etki araştırılmıştır. Bu amaçla başarılı bir şekilde genetiği değiştirilmiş EH üzerinde, *SOCS1* ve *SOCS3* 'ün yanında, benzer özellikler taşıyan *SOCS2* ve *SOCS4* 'ün gen anlatım değişimleri ve metilasyon profili incelenmiştir. *JAK2V617F* mutasyonu homozigot olarak taşıyan HEL (Human Erythroleukemia Cell Line) hücre hattı ile kıyaslanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Plazmit DNA'larının Çoğaltılması

Daha önceden tasarlanarak istenilen genler içersine sokulmuş olan FIV tabanlı lentiviral plazmitler pCDF1-GFP, pCDF1-JAK2wt-GFP, pCDF1-JAK2V617F-GFP ve yardımcı vektörler pCI-VSVG, pCPRDEnv Dr. C. Iancu-Rubin (Mount Sinai School of Medicine, New York, ABD) tarafından bu çalışmayı yapmak üzere hediye edildi.

### Transformasyon (Aktarım)

Bakteriyel transformasyonda, önceden hazırlanmış olan kompetan hücreler olan *E.coli* DH5a trans-

formasyon için kullanıldı. Öncelikle, kompetan hücreler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den alınarak buz üzerinde erimeye bırakıldı. Lentiviral vektörler (1-2  $\mu\text{l}$ ) ile kompetan hücreler (100  $\mu\text{l}$ ) karıştırılarak 30 dakika buz üzerinde tutuldu. Hücreler 1-1,5 dakika (dak) kadar  $42^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildikten sonra tekrar 2 dak buzda bekletildi. Bakteri hücreleri ile transforme olmuş ligasyon ürünlerini içeren tüpler oda sıcaklığında 900  $\mu\text{l}$  lik SOC besiyeri ile karıştırılarak 60 dakika  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki çalkalayıcıda 200 rpm' de tutuldu. Önceden hazırlanmış olan Ampisilinli LB Agar petrilere yayma yapıldı. Petriler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah petrilere koloni seçilip LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. 8-10 saat sonra 1 ml alınarak 1 ml %60' lik gliserol ile karıştırıldı ve örnekler  $-80^{\circ}\text{C}$  saklandı.

### Plazmit DNA İzolasyonu

Ampisilinli 5ml LB içine petrilere seçmiş olduğumuz bir koloni eklendi ve yaklaşık 10 saat çalkalamalı inkübatörde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de (220 rpm) çoğaltılması için bekletildi. Çoğalan bu hücrelerden 1 ml alınıp 250 ml ampisilinli LB içerisine konularak gece boyu çalkalamalı inkübatörde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de (220 rpm) çoğaltılması sağlandı. Ardından, elde edilen kültürden plazmit izolasyon kiti (Endofree Maxiprep Plasmid Mini Kit, QIAGEN) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Kısaca, çalkalamalı inkübatörden alınan örnekler 10 dak 3200 rpm'de santrifüj edildi. Çöken hücrelerden kit içerisindeki buffer'lar kullanılarak DNA elde edildi ve en son 1/5 ml %70 etanol ile yıkanarak TE tamponunda çözülmeye bırakıldı.

### Enzim Kesimi

Elde edilen plazmit DNA sının doğruluğunu test etmek için enzim kesimi yapıldı. XbaI 10 U/ul (Thermo Fisher) , NotI-HF 3000U/ul (NEB), BamHI 10 U/ul (Thermo Fisher), EcoRI 10 U/ul (Thermo Fisher) enzimler kullanıldı ve her bir enzimin uygulama protokolü tatbik edildi.

### Hücre Transfeksiyonları

Transfeksiyondan 3 gün önce 293T hücreleri 100 mm tabaklara  $3 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Transfeksiyon esnasında hücre yoğun-

luğu %90-95 civarında olmasına özen gösterildi. Steril bir tüpte 60  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000 (Invitrogen) kullanılarak transfeksiyon protokolü uygulandı. Kısaca, 12  $\mu\text{g}$  yapısal vektör (CPRD), 7  $\mu\text{g}$  transfer vektörü ( GFP, JAK2wt, JAK2mut), 5  $\mu\text{g}$  zarf vektörü (VSVG) 1.5 ml serum-free, DMEM içerisinde 5 dak inkübe edildi. Dilüe edilmiş DNA ve Lipofectamine karıştırıldı ve 30 dak oda ısısında bekletildi. Ardından bu karışım tabaklardaki hücrelerin üzerine eklendi ve hücre yüzeyine eşit oranda dağılmasına özen gösterilerek kültüre edildi. Kontrol tabakları vektör eklenilmemiş olarak bırakıldı veya sadece transfer ve envelope vektörleri transfekte edildi. Hücreler 6-7 saat  $37^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe edildi. Analizden 6-8 saat önce tabaklar  $32^{\circ}\text{C}$ 'ye alındı. Transfeksiyondan sonra 48-72 saat içerisinde kültüre edilmiş hücrelerden supernatant toplandı. Lentivirüsleri içeren supernatant toplandıktan sonra 5 dak 1500 rpm'de santrifüj edilerek hücre kalıntıları ve debristen arındırılma işlemi gerçekleştirildi. Ardından, 0,45  $\mu\text{m}$  filtreden geçirildi ve kullanıma kadar  $-80^{\circ}\text{C}$  saklandı.

### Endotel Hücre Enfeksiyonu

Enfeksiyon için Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) hücre hattı (ATCC Firması) kullanıldı. Enfeksiyon için kısaca; 12 kuyucuklu tabaklara kuyu başına  $18 \times 10^5$  hücre olacak şekilde %10 FBS, DMEM, %1 Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) besiyeri kullanılarak ekim yapıldı. Ekim enfeksiyon işleminden en az 24 saat önce yapılmış olmalıdır. Enfeksiyon ajanı olan 5 mg Polybrene (Sigma-Aldrich) 1 ml distile suda iyice çözüldürüldü ve 0,45  $\mu\text{m}$  filtre ile filtrelendi. 24 saat önce ekilmiş olan hücrelere bu çözeltiden 1  $\mu\text{l}$  polybrene eklendi. Önceden elde edilmiş olan 200  $\mu\text{l}$  hacimdeki lentivirüsler sırası ile kuyulara eklendi. 2500 rpm'de 90 dk  $30^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası  $32^{\circ}\text{C}$ 'ye alındı ve 12-13 saat sonrası medyası %10 FBS-DMEM, %1 Pen/Strep içeren medya ile değiştirildi. Hücreler  $32^{\circ}\text{C}$ 'de 6-36 saat bekletildi.

### Genomik Entegrasyon Kontrolü

Virüs DNA'sının HUVEC genomuna entegre olup olmadığını tespit etmek amacı ile primerler tasarlandı; JAK2 ve JAK2V617F için tasarlanan primerler

Forward 5'CGA AGA GAA GTA GGA GAC TAC G3', Reverse 5' TCT CCT GAA GAA TGT CCT TTG GC3', GFP için ise, Forward 5'GAC GCC ACC ATG GAG AG3'; Reverse 5'GAT TGT CGA CTT AGC GAG ATC3' primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyon bileşenleri AccuPrime Taq DNA Polimeraz (High Fidelity) (Invitrogen) tavsiye edilen protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonunun koşulları ise 94°C 3 dak , 30 Siklus, (94°C 30 saniye, 57°C 60 saniye, 72°C 50 saniye) ve 72°C 2 dak' dir. MUT ve WT için V671F mutasyonunu da içeren 454 baz çifti (bç), GFP için ise 800 bç uzunluğunda bir alan çoğaltıldı. Yapılan PZR ile istenen bantın görüldüğü örneklerin (WT, MUT, GFP) PZR ürünlerinin dizilenmesi için Sentromer (İstanbul) firmasından dizileme hizmeti satın alındı. Dizileme sonuçları CLC Genomic Workbench analiz programında incelendi.

#### Akım Ölçer ve Hücre Ayırımı

Tripsin ile muamele edilen hücreler kültür tabağından kaldırıldı ve PBS ile yıkandı. Analize hazır hale getirilen hücreler Akım Ölçer (FACS Calibur, BD BioScience) cihazına okutuldu. Hücrelerdeki ana popülasyon belirlendi ve bu popülasyon üzerinden PI ile canlı/ölü hücre ayırımı sağlandı. Canlı hücreler GFP pozitif ve GFP negatif olarak incelendi. İlgili deneylerde kullanılmak üzere ayrıca hücre ayırıcı (FACS Aria, BD BioScience) kullanılarak GFP<sup>+</sup> hücreler izole edildi.

#### Enfekte Hücrelerde Morfolojik Analiz

GFP anlatımına göre enfeksiyon sonrası hücreler ışık mikroskopunda (10X, Olympus CKX41) ve immüno Floresans (Olympus, U-RFLT50) altında gözlenerek morfolojik olarak incelendi.

#### Gerçek zamanlı RT-PZR

Yukarda belirtilen yöntemlerle izole edilen saf *JAK2V617F*, *JAK2* ve *GFP* içeren EH grupları RNA izolasyonuna tabi tutuldu ve RNA Purification Kit (Jena Bioscience) yardımıyla izole edildi. cDNA sentezi SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience) yardımıyla gerçekleştirildi. *SOCS1-4* genlerinin trans-

kript değişimlerini görmek maksadıyla SYBR Green (RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix, Qiagen) kullanılarak gerçek zamanlı RT-PZR ile karşılaştırmalı ölçümler LightCycler 480 (Roche) cihazında yapıldı. Bu metot kullanılarak tüm bu genlerin anlatımlarının *JAK2* ve *JAK2V617F* etkisiyle EH'de oluşturdukları değişimler tespit edildi. Bunun sonucunda birer Ct değeri elde edildi. Bu Ct değerleri kullanılarak, mutant ve yabanil tip gen anlatım oranları *GAPDH* referans geni kullanılarak araştırıldı. Yapılan gerçek zamanlı kantitatif PZR deneyi 2 kez tekrarlandı ve Ct değerlerinin aritmetik ortalaması alındı.

#### Metilasyon Spesifik PZR (MSP)

Metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MSP) epitect fast DNA bisülfidit kit (Qiagen) ile tavsiye edilen koşullar sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında *SOCS1*, *SOCS2*, *SOCS3* ve *SOCS4* genlerinin metilasyon profilleri MSP yöntemi ile tespit edilmesi için kullanılan primer dizileri ve verdikleri bant uzunlukları şu şekildedir: *SOCS-1* metile için: 5'-TTC GCG TGT ATT TTA GGT CGG TC- 3' ve 5'-CGA CAC AAC TCC TAC AAC GAC CG-3' (160 bç); *SOCS-1* unmetile için: 5'-TTA TGA GTA TTT GTG TGT ATT TTA GGT TGG TTC-3' ve 5' -ACT AAC AAC ACA ACT CCT ACA ACA ACC A-3' için (175 bç); *SOCS-2* metile için: 5'-TTT TAG GAT TTG ATT AAG GGG ATC-3' ve 5'-TAC GAA AAA TAA ACG TAC AAA AAC G-3'(147 bç); *SOCS-2* unmetile için: 5'-TTT TTT AGG ATT TGA TTA AGG GGA TT-3' ve 5'-CAA AAA ATA AAC ATA CAA AAA CAA-3' (148 bç); *SOCS-3* metile için: 5'-TAT ATA TTC GCG AGC GCG GTT T-3' ve 5' CGC TGC GCC CAG ATG TT-3'(268 bç); *SOCS-3* unmetile için: 5'TG TGG TGG TTG TTT ATA T-3' ve 5'-ATT TGT GAG TGT GGT T-3' ve 5'CAA CCA ACA ATA ACC CAC ACT ACA CCC A-3' (298 bç); *SOCS-4* metile için: 5'TCG GGT GAT CGA GTT TTC GT-3' ve 5'-ACG AAT CGA CGC AAA CAC AA-3' (90 bç); *SOCS-4* unmetile için: 5'-GTG GAT GTG GGT AGT TGG AT-3' ve 5'AAC ACC ACC ACC CAA CAA CC-3' (166 bç) primerler kullanıldı.

PZR' de kalıp materyal olarak genomik DNA'ları izole edilen enfekte HUVEC kullanıldı. Transdükte



olmayan HUVEC dahili kontrol olarak kullanıldı. İkinci bir kontrol olarak H2O kullanıldı. *JAK2V617F* mutasyonunu homozigot olarak taşıyan HEL hücre hattı (Human Erythroleukemia), DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)' den temin edildi ve diğer örneklerle kıyasa tabi tutulmak için kullanıldı.

### DATA Analizi

*JAK2*, *JAK2V617F* ve *GFP* taşıyan lentiviral vektörler ile genetiği değiştirilmiş EH RNA'larına uygulanan gerçek zamanlı kantitatif PZR ve SOCS gen amplifikasyonları neticesinde elde edilen Ct değerleri ile hesaplamalar yapıldı. Bu amaçla  $\Delta Ct$  hesaplama yöntemi kullanıldı.  $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{Deney} - Ct_{Referans})}$  yöntemi ile hesaplandı (27) ve her bir anlatım içerisinde en düşük anlatıma göre normalize edilerek HeatMap haritası oluşturuldu. Grafikleri oluşturma ve istatistiksel analizler için by *GraphPad Prism v.8* (*GraphPad Prism Inc.*) yazılımı kullanıldı.

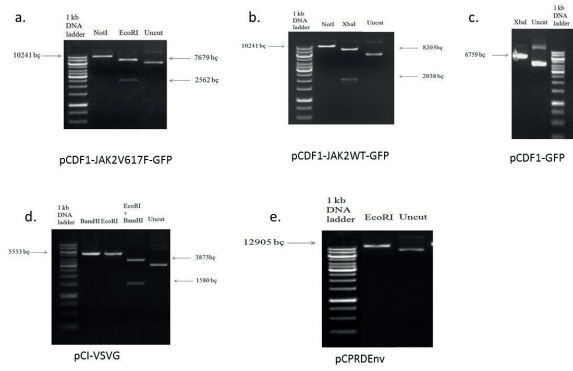
### BULGULAR

#### Horizontal transfer için kullanılan *JAK2*-Yabanıl Tip ve *JAK2V617F* Plazmitler'in doğruluğu tespit edildi

Tüm deneylerde kullanılmak üzere beş farklı plazmit, *E.coli* temelli DH5 $\alpha$  ırkına ait hücrelere ısı şoku metodu kullanılarak transforme edildi ve çoğaltıldı. Akabinde her bir plazmit için gerçekleştirilen DNA izolasyonu ve bunu takiben elde edilen plazmit DNA'larının doğrulanması için enzim kesim işlemi uygulandı (Şekil 1).

*JAK2V617F*-mutant, NotI, EcoRI enzimleri ile muamele edildi (Şekil 1a). *JAK2* – yabanıl tip ' e ise, NotI, XbaI ve NotI ve XbaI ile ikili kesim uygulandı. Sonuçta, 6720-2038-1483 bç uzunluğunda bantlar elde edildi (Şekil 1b). GFP plazmiti ise XbaI enzime tabii tutularak lineer plazmit elde edildi (Şekil 1c). VSVG ve pCPRD plazmitlerine EcoRI ile lineer, BamHI ve XbaI enzimleri ile çoklu kesimler yapıldı ve beklenen bant uzunlukları elde edildi (Şekil 1d ve e).

Enzim kesimleri neticesinde, bundan sonra yapılacak tüm deneylerde kullanılacak olan GFP-Kontrol, *JAK2*- yabanıl tip ve *JAK2V617F* ve VSVG ve pCPRD kontrol plazmitlerin doğruluğu tespit edildi. Enfek-

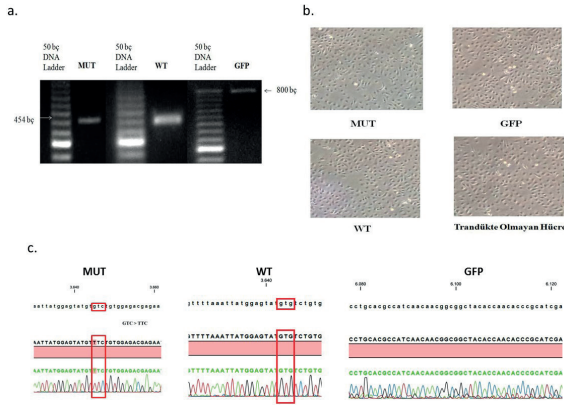


**Şekil 1.** Plazmitlerin doğruluğunun Tespiti. DNA izolasyonları sonucunda elde edilen *GFP*, *JAK2*-yabanıl tip, *JAK2V617F*- mutant, VSVG ve pCPRD plazmitlerine spesifik enzimler kullanılarak kesimleri yapıldı ve %1'lik Etidium Bromid'li jel üzerinde yürütülüp UV ışığı altında görüntüsünün alındı. Resimlerde görülen her bir kolon da yürütülen resmin sağ alt köşesinde adı yazılı plazmit DNA'sı kolonların üzerinde belirtilmiş enzimlerle muamele edilmiştir. Görülmesi beklenen plazmit parçaları ise şöyledir: Sırasıyla; a. *JAK2V617F*-mutant (10241 bp): (1) NotI: lineer,(2) EcoRI:2562-7679 , (3) Uncut; b. *JAK2* – yabanıl tip (10241 bp) : NotI: lineer, XbaI: 8203-2038, NotI ve XbaI (İkili kesim): 6720-2038-1483, (3)Uncut; c. GFP : (1) Uncut, (2) XbaI: lineer; d. VSVG ( 12905 bp): (1) EcoRI: lineer, (2)BamHI: 7313-4889-703, (2) XbaI 6727-2577-1801,(3) Uncut. M: Marker; e. pCPRD ( 5553 bp): (1): EcoRI: lineer, (2): BamHI: lineer, (3)EcoRI ve BamHI ( ikili kesim): 1580-3973, (4) Uncut.

siyon sonrası *JAK2*-yabanıl tip ve *JAK2V617F* taşıyan lentivirüslerin endotel hücrelerine genomik entegrasyonu gerçekleştirdi

Endotel hücre (EH) 'lerine uygulanan *GFP*-Kontrol, *JAK2* yabanıl tip ve *JAK2V617F* mutant lentiviral süpernatantlar kullanılarak EH enfeksiyona maruz bırakıldı. Ardından enfeksiyon sonrası genomik entegrasyonun kontrolü için farklı yaklaşımlar uygulandı. Her bir enfeksiyona karşı EH' nin göstermiş olduğu enfeksiyon başarısı ve tepkisi PZR, akım ölçer ve ışık mikroskobu yardımıyla gözlemlendi. Öncelikle enfekte EH'sinde *JAK2* geni için tasarlanmış primerler ile PZR gerçekleştirildi. Bu PZR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri Şekil 2a' de gösterildi. Burada *JAK2* geni ile uyumlu bant görüntüsü görülmektedir. *JAK2V617F* mutasyonu nokta mutasyon olduğu için tek aşamalı PZR da bu mutasyonun tespiti beklenmemektedir.

Işık mikroskobu ile gerçekleştirilen analizler neticesinde, fenotipik ve morfolojik değişim tespitleri yapıldı. Bu gözlemler sonucunda, hücreler sağlıklı



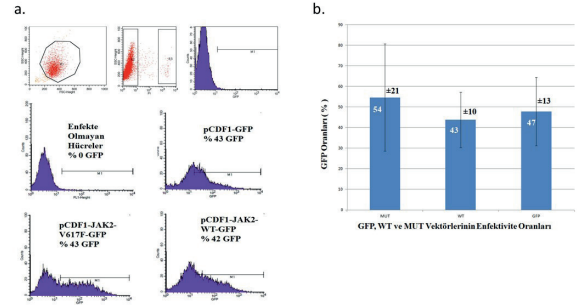
**Şekil 2.** Genomik entegrasyonun tespiti: a. Enfeksiyon sonucu genetiği değiştirilmiş endotel hücre DNA ları ile yapılan PZR' nin ürünlerinin agaroz jel görüntüsü, JAK2wt ve JAKV617F bant uzunluğu: 454 bç. ve GFP bant uzunluğu 800bç 'dir. b. Transfekte endotel hücrelerin ışık mikroskobu altındaki(10X) morfolojik analizi. MUT: JAK2V617F plazmi ile; WT: JAK2-wt ile ve GFP: vektör kontrol transfekte edilmiş endotel hücreler. Olympus CKX41 ile mikroskopik analiz gerçekleştirilmiştir. c. Dizileme sonuçları. CLC Genomic Workbench analiz programında incelenmiştir.

bulundu, kopma veya şekil değişikliği tespit edilmedi. Üç farklı lentiviral vektörün enfeksiyonları neticesinde oluşturdukları morfolojik etki, enfekte olmayan hücrelerle kıyaslandığında, ne kendi aralarında ne de kontrol grubunda fark gözlenmedi (Şekil 2b). Enfeksiyon sonrası genomik entegrasyon kontrolü, genetiği değiştirilmiş EH DNA'sının dizilenmesi ile gerçekleştirildi ve mutant lentivirus süpernatantıyla enfekte EH 'de mutasyon tespit edildi (Şekil 2c).

### Endotel Hücre Genom Entegrasyon Başarısının Değerlendirilmesi

Lentiviral aktarım sonucu enfekte olan EH'nin GFP anlatımı yapması beklenir. Bu parametreye bağlı olarak aktarmak istenilen ilgili genin enfeksiyon oranları ölçülebilir ve analiz edilebilir. Şekil 3'de farklı zamanlarda yapılan transfeksiyonlar sonucu elde edilen MUT, WT ve GFP lentivirüslerin, EH enfeksiyonları sonucunda akımölçer yardımıyla elde edilen GFP analiz stratejisi gösterilmiştir (Şekil 3a). Farklı zamanlarda yapılan bu enfeksiyonların GFP oranları Şekil 3b'de gösterilmiştir. Hata barları standart sapmayı göstermektedir. Grafiği oluşturan veriler Lipofektamin ile toplamda 16 transfeksiyondan üretilen lentivirüslerle yapılan enfeksiyonları kapsamaktadır.

Şekil 3'de görüldüğü gibi üç lentivirüs tipi için de GFP'ye bağlı enfeksiyon oranları MUT için ortalama % 54 ±21, WT için % 43 ±10 ve GFP için % 47±13.



**Şekil 3.** Endotel Hücrelere entegre olmuş Lentiviral vektörlerin enfeksiyon oranları.a. Akım ölçerde kullanılan hücre canlılığı ve enfeksiyon başarısını gösteren GFP pozitif temelli kapılama stratejileri b. Lentivirus vektörlerinin endotel hücre enfeksiyon sonucu 5 ayrı deneyden elde edilen endotel hücre entegrasyonu gerçekleşmiş GFP+ hücre yüzdelikleri (%). Hata barları standart sapmayı göstermektedir.

Her bir enfeksiyon grupları arasında istatistiksel bir fark görünmedi (MUT- WT arasında p=0.3, WT-GFP arasında p=0.6, MUT-GFP p=0.5' tir).

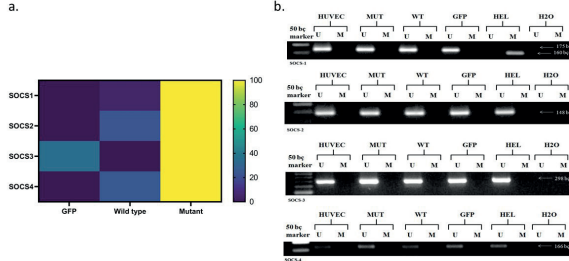
### Endotel Hücrelerinde SOCS1-4 genlerinin Gen Anlatımlarının Değerlendirilmesi

JAK2, JAK2V617F ve GFP içeren EH'ler enfeksiyondan 72 saat sonra hücre ayırıcı yardımıyla EH içerisinde GFP pozitif olanlar seçildi ve her bir durum için hücre RNA izolasyonu yapılarak RT-PCR reaksiyonu ile SOCS genlerinin anlatımlarına bakıldı.

Elde edilen sonuçlarda özellikle JAK2V617F EH' inde SOCS1-2 ve SOCS4 gen anlatım ifadelerinde JAK2 ve GFP 'ye göre anlamlı bir artış olduğu tespit edildi. JAK2V617F EH ile GFP-EH arasında tespit edilen kat farkı SOCS1 için 4.5, SOCS3 için 3.2 ve SOCS4 için 3.3 'tür. SOCS3 te ise GFP entegre olmuş EH' de JAK2'ye göre daha fazla anlatım tespit edildi (Şekil 4a).

JAK2, JAK2V617F ve GFP entegre olmuş EH 'inde SOCS1-4 genlerinde bulunan epigenetik modifikasyonların tespiti amacıyla epigenetik metilasyon spesifik pzs metilasyon profilleri (MSP) yapılmış ve her reaksiyonda HUVEC (enfekte olmayan), MUT, WT, GFP ve HEL birlikte incelendi. Sonuçlar iki kez tekrarlandı. Jel görüntüleri aşağıdaki şekillerde belirtil-

miştir (Şekil 4b). SOCS2-4 analizinde enfekte olan hücre hatları ve enfekte olmayan HUVEC HEL unmetile bant verdi. SOCS1 de ise, hücre hatları ve enfekte olmayan HUVEC unmetile çıkarken, HEL metile bant verdi (Şekil 4b).



**Şekil 4.** SOCS1-4 Gen anlatımı ve metilasyon profili. a. Genetiği değiştirilmiş EH'de gerçek zamanlı RT-PCR ile yapılan SOCS1-4 genlerinin anlatım karşılaştırması, b. Genetiği değiştirilmiş EH'de SOCS1-4 genlerinin metilasyon profilleri.

## TARTIŞMA

MPN' ler klonal hematopoietik kök hücre hastalığıdır. 2005 yılında keşfedilen JAK2V617F mutasyonu MPN' ler ile ilişki kurulabilen ve şu ana kadar tanımlanan ilk genetik markerdir. Hastalığın patolojisinin izinin sürülmesinde önemli bir yeri vardır. Oluşturulan hayvan modellerinde JAKV617F mutasyonunun bariz bir şekilde MPN karakterini oluşturduğu gösterilmiştir. MPN' ler aynı zamanda trombotik olaylar ve bunun sonucu meydana gelen ölümlerin sıkça yaşandığı bir hastalık grubudur. Bunun sebebi olarak artan kan hücresi sayısı düşünülse de MPN hastalarının endotel hücrelerinde tespit edilen V617F mutasyonu bizi bu hücrelerin tromboz ve MPN ile olan ilişkisini daha detaylı bir biçimde araştırmaya yöneltmiştir. Bu çalışma iki aşamadan oluşur: (1) in vitro kültür ortamında mutasyonun EH'leri üzerindeki etkilerini tespit etmek ve (2) JAK2V617F mutasyonunun endotel hücresi üzerinde yapmış olduğu değişimleri SOCS1-4 genlerin anlatım analizlerini yaparak incelemek.

İlk aşama olan (1) in vitro kültür ortamında mutasyonun EH'leri üzerindeki etkilerini tespit etmek amacıyla yaptığımız çalışmalarda, V617F mutasyonun taşıyan formu, yabancı formu ve JAK2 genini taşımayan lentiviral vektörler kullanılarak HUVEC' e enfeksiyon yapıldı.

Lipofektamin transfeksiyon ajanı kullanılarak elde edilen lentivirüslerle gerçekleştirilen enfeksiyonların sonucunda gözlenen GFP yüzdeleri sonucunda Lipofektamin' in yeterli enfeksiyon kabiliyetini sağladığını gösterdik. Lipofektamin deneylerde kullandığımız üç lentivirüs tipi için de GFP' ye bağlı enfeksiyon oranları MUT için ortalama %54 ±21, WT için %43 ±10 ve GFP için %47 ±13 oranında enfekte olabilen lentivirüsler üretilmesini sağladı.

Enfeksiyon sonrasında ışık mikroskopu altında morfolojik gözlem yapıldı. Lentiviral vektörlerin birbirleri ile ve kontrol olarak kullanılan enfekte olmayan hücreler ile kıyaslanması sonucu herhangi bir farklılık saptanmadı.

Morfolojik gözlem sonrası akım ölçer cihazında PI ile canlı olduğu tespit edilen hücreler GFP anlatımı yapması özelliğine göre enfeksiyon oranları ölçüldü. Bu deneylerde yaklaşık % 40 hedeflenerek gerçekleştirilen enfeksiyonlarda MUT için %43 ±21, WT için %42 ±10 ve GFP için %43 ±13 oranında enfeksiyon yüzdesine sahip hücreler elde edilmiştir. Bu hücrelerin genomik DNA' ları izole edildi. Lentiviral entegrasyonun başarısını test etmek için spesifik olarak tasarlanan primerler ile PZR yapıldı. Jel görüntüsü üzerinden çalışılacak materyal doğrulandı. Akabinde enfekte edilerek genetiği GFP, JAK2 ve JAK2V617F vektörleriyle modifiye edilen endotel hücrelerle yapılan fonksiyonel deneylere geçildi.

Mikroskop altında görsel olarak yapılan analizlerde ise her bir vektör enfeksiyonları arası büyüme ve çoğalmalarda farklılık bulunmaması mutasyonun morfolojik olarak endotel hücresini pek etkilemediğini belki de belli süre sonunda hücrelerde morfolojik tahribata yol açtığı fikrini akla getirmektedir. Nitekim hastalığın prognozu dikkate alındığında uzun ve yavaş ilerleyerek ileri yaş düzeyinde semptomatik olduğu bilinmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar kliniği destekler niteliktedir. Deneysel çalışmalarımızda enfeksiyon protokolünde kullandığımız 72 saat hücre genomuna entegre edilmek istenen genin stabil entegrasyonunu sağlaması için gerekli süredir. Başarılı enfeksiyon sonucunda kültür süresinin uzatılarak belli zaman aralıklarında hücre morfolojisini yeniden tespit etmek bu soruya açıklık getirebilir. İleriki çalışmalarımızda bu konuyu dikkate alacağız.



Birçok farklı araştırma grubu da EH fonksiyon bozukluğunun MPN'li hastalarda görülen artmış trombotik olaylara neden olduğu hipotezini savunmuştur (13-15). JAK2 aktivasyonu ateroskleroz (28), anjiojeneze (29) ve oksidatif strese bağlı aortik endotel hücre (30), vasküler düz kas hücreleri ve astrosit apoptozuna neden olduğu geçmiş yıllarda gösterilmiştir (30-32). Neria ve arkadaşları, JAK2 inhibitörlerinin, kültür endotel hücrelerinin serum eksikliğine bağlı yapışma özelliklerini kaybetmesi ile oluşan hücre ölümlüne karşı endotel hücrelerini koruduklarını ve yeniden yapışıp çoğalabilme özelliklerini artırdığını bildirmiştir (33). Ayrıca, renal endotel hücrelerinin oksidatif strese bağlı hücre ölümünden JAK2 inhibisyonu ile kurtuldukları bulunmuştur (34). Tawfik ve arkadaşları aortik endotel hücrelerde hiperglisemi ve reaktif oksijen species aracılı apoptozun JAK2 inhibitörü ile korunduğunu göstermiştir (30). Günümüzde de birçok araştırmacı JAK2 ve *JAK2V617F* nin tromboz oluşumundaki rolü hakkında araştırmalarını sürdürmektedir (14,35,36). Bunun yanında, yapılan bir çalışmada, kullandığımız model sistem kullanılarak HUVEC hücreleri JAK2wt ve *JAK2V617F* mutant içeren lentivirus ile enfekte edilmiş ve gen ekspresyonları incelenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre JAK2V617F mutant enfekte hücrelerde JAK2, *STAT3* and *STAT1* genlerinin JAK2 yabanil tip'e göre daha fazla arttığı yönündedir. Ardından yapılan RNAseq analizinde ise serine protease inhibitor B2 (*SERPINB2*), early growth response protein 1 (*EGR1*), ve chemokine ligand 2 (*CCL2*) artış bulunmuş ancak bu çalışmada *SOCS1-4* genleri hakkında bilgi verilmemiştir (37).

*SOCS* lar JAK/STAT yolağının negatif regülasyonunda rol oynarlar. *SOCS* metilasyonu değişimleri bu yolağı etkiler. Yapılan çalışmalar MPN vakalarının bir kısmının aynı zamanda *SOCS* metilasyon farklılıklarına sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar daha çok *SOCS-1* ve *SOCS-3* üzerine odaklanmış hatta *SOCS-3* için terapötik stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır (38). *SOCS-2* üzerine kısmen eğilinmiş fakat belirgin ve anlamlı metilasyon profilinine rastlanılmamıştır (39). Bu şartlar göz önüne alınarak, epigenetik bir farklılığın fonksiyonel bozukluk da yapabileceği düşüncesiyle elde edilen hücreler epige-

netik açıdan incelendi. İnceleme *SOCS 1,2,3,4* genlerinin metilasyonları üzerinden yapıldı.

Bulgularımıza göre *SOCS-1* metilasyon profili enfekte olmuş hücreler ile olmamış hücreler arasında fark yok iken *JAK2V617F* mutasyonunu homozigot olarak barındıran HEL hücre hattında metile olarak tespit edilmiştir. Bu durum *JAK2V617F* mutasyonunun hücreler üzerinde oluşturduğu farklı etki mekanizmalarından kaynaklanabilir. HUVEC'lerin tamamında enfekte olsun olmasın, metilasyon görülmemesine rağmen HEL' de görülmesi hücrelerin kökensel farklılığına işaret ediyor olabilir. HEL bir kan, HUVEC endotel hücre hattıdır. EH'de mutasyonun etkilediği farklı yolların ve/veya farklı etkileşimlerin sonucu etkisini gösteriyor olabilir. Aynı zamanda HEL' in *V617F* mutasyonunu homozigot olarak bulundurması da bu farklılıkta rol oynayan nedenlerden bir diğeri olabilir. Zira hastalığın patogeneğinde allel yükü ve patolojinin şiddeti ilişkisine dair birçok yayın mevcuttur. Bunun yanında bazı çevresel uyarılar, bu deney platformunda kullanılmamıştır ve bunlar *SOCS* metilasyon profillerini etkileyebilir. Sonucu etkileyen nedenler arasında, *JAK2* ve *JAK2V617F* geni enfekte olmuş hücrelerin hücre ayırıcı ile seçilmesi sonucu elde edilen *JAK2V617F* mutasyonunu % 90' dan fazla taşıyan hücreler üzerinden analiz yapılmış olması da olabilir. Diğer bir açıdan lentivirüslerin genoma rastgele bir biçimde entegre olması da bu sonuca neden olmuş olabilir. Zinc-finger rekombinaz gibi farklı plasmidleri daha spesifik şekilde hedefe yönlendiren metotlar kullanılarak daha etkili sonuçlar alınabilir. Nitekim son dönemlerde bu çeşit çalışmalar artmaktadır. Tüm bunlara ek olarak unutulmamalıdır ki, kısa süreli enfeksiyon neticesinde yapılan bu analizler hastalığın uzun süreli oluşum tablosunu tam yansıtmıyor olabilir. Enfekte EH'ni daha uzun süreler kültüre ederek göstermiş oldukları değişime bakabilecek bir platform oluşturmak daha sağlıklı sonuçlar elde etmemizi sağlayabilir.

*SOCS-2,3* ve 4 genleri için tüm örnekler unmetile bir tablo çizmesi yorum yapmamızı zorlaştırırsa da farklı grupların yapmış olduğu tüm genom düzeyinde yapılan çalışmalarda kontrol bireylerde bu sonuca benzer bir sonuç bulunmuş, belirgin ve ayırt edici bir farklılık kaydedilememiştir (40) Ayrıca NF-κB gibi

bazı yollarla ilişki saptanmıştır. NF-Kb' nin inflamasyonla tetiklenen karsinogenezde anahtar rolü vardır ve ileri miyeloproliferatif hastalık gelişiminde etkindir (41). Bu durum göz önüne alındığında SOCS' ların böyle bir sonuç vermesinde farklı yollarında olası rolü hesaba katılmalıdır (42).

Bu çalışmada literatürde pek bilgi içermeyen JAK-2V617F mutasyonun EH' i üzerinde yapmış olduğu etki ile SOCS gen anlatımlarına etkisini irdelemiştir. Daha önce yapılmış EH metilasyon çalışmaları vardır (43,44). Fakat bu çalışmalarda JAK2V617F mutasyonunun SOCS metilasyonu üzerindeki etkisi incelenmemiştir. Çalışmamız bu açıdan özgündür.

## SONUÇ

Sonuç olarak, EH üzerinde JAK2V617 mutasyon etkisi ile meydana gelen SOCS1-4 gen anlatım artış bağlantısı henüz bilinmemektedir. Burada SOCS genleri metilasyon rolü olmadığı anlaşılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak gelecekte SOCS benzeri, kanserogeneze rolü olan birçok genin ve mutasyonun varlığından hareketle bu genlerin metilasyon profillerinin incelenmesi MPN patogeneze ışık tutacaktır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- S.S.T.; Veri Toplama- A.G., H.H.; Veri Analizi/Yorumlama- S.S.T, A.G., H.H.; Yazı Taslağı- S.S.T.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.S.T, A.G.,H.H.; Son Onay ve Sorumluluk- S.S.T, A.G.,H.H.; Malzeme ve Teknik Destek- S.S.T.; Süpervizyon- S.S.T

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- S.S.T.; Data Acquisition- A.G., H.H.; Data Analysis/Interpretation- S.S.T, A.G., H.H.; Drafting Manuscript- S.S.T.; Critical Revision of Manuscript- S.S.T, A.G., H.H.; Final Approval and Accountability- S.S.T, A.G., H.H.; Technical or Material Support- S.S.T.; Supervision- S.S.T

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi

tesisi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 27570)

**Financial Disclosure:** This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP). (Project No: 27570)

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Levine RL, Wadleigh M, Cools J. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387-97.
2. James C, Ugo V, Le Couedic JP. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434(7037):1144-8.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS.. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-90.
4. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:313-20.
5. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 2006;81(2):159-66.
6. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007;110(4):1092-7.
7. Wehmeier A, Daum I, Jamin H, Schneider W. Incidence and clinical risk factors for bleeding and thrombotic complications in myeloproliferative disorders. A retrospective analysis of 260 patients. *Ann Hematol* 1991;63:101-6.

8. Craig MK. Propensity for hemorrhage and thrombosis in chronic myeloproliferative disorders. *Seminars in hematology* 2004;41(2 Suppl3):10-4.
9. Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin Hematol* 2005;42(4):239-47.
10. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000; 96(13):4261-6.
11. Blann A, Caine G, Bareford D. Abnormal vascular, platelet and coagulation markers in primary thrombocythaemia are not reversed by treatments that reduce the platelet count. *Platelets* 2004;15(7): 447-9.
12. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91(2):169-75.
13. Robertson B, Urquhart C, Ford I, Townend J, Watson HG, Vickers MA, Greaves M. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V617 F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2007;5(8):1679-85.
14. Bellucci S, Michiels JJ. The role of JAK2 V617F mutation, spontaneous erythropoiesis and megakaryocytopoiesis, hypersensitive platelets, activated leukocytes, and endothelial cells in the etiology of thrombotic manifestations in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32(4 Pt 2):381-98.
15. Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol Med* 2004;10(4):143-5.
16. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of *JAK2V617F* mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood* 2009;113(21): 5246-9.
17. Teofili L, Martini M, Iachininoto MG, Capodimonti S, Nuzzolo ER, Torti L, Cenci T, Larocca LM, Leone G. Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit *JAK2V617F* mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;117(9):2700-7.
18. Mascarenhas J, Roper N, Chaurasia P, Hoffman R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. *Clin Epigenetics* 2011;2(2): 197-212.
19. Kazi JU, Kabir NN, Flores-Morales A, Rönstrand L. SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(17): 3297-310.
20. Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002;17(2): 83-90.
21. Qin W, Li LL, Lu HN, Huang BB, Xiu B, Bo LJ, Gao QM, Zhang WJ, Fu JF. [Study of hypermethylation of SOCS gene in typical myeloproliferative disease]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2011;32(11):772-6.
22. Quentmeier H, Geffers R, Jost E, Macleod RA, Nagel S, Röhrs S, Romani J, Scherr M, Zaborski M, Drexler HG. SOCS2: inhibitor of *JAK2V617F*-mediated signal transduction. *Leukemia* 2008;22(12):2169-75.
23. Haan S, Wüller S, Kaczor J, Rolving C, Nöcker T, Behrmann I, Haan C. SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. *Oncogene* 2009;28(34):3069-80.
24. Jost E, do ON, Dahl E, Maintz CE, Jousten P, Habets L, Wilop S, Herman JG, Osieka R, Galm O. Epigenetic alterations complement mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2007;21(3): 505-10.
25. Guo W, Li W, Yuan L, Mei X, Hu W. MicroRNA-106a-3p Induces Apatinib Resistance and Activates Janus-Activated Kinase 2 (JAK2)/Signal Transducer and Activator of Transcription

- 3 (STAT3) by Targeting the SOCS System in Gastric Cancer. *Med Sci Monit* 2019;25:10122-8.
26. Bullock AN, Rodriguez MC, Debreczeni JE, Songyang Z, Knapp S. Structure of the SOCS4-ElonginB/C complex reveals a distinct SOCS box interface and the molecular basis for SOCS-dependent EGFR degradation. *Structure* 2007;15(11):1493-504.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. *methods* 2001;25(4):402-8.
28. Gharavi NM, Alva JA, Mouillesseaux KP, Lai C, Yeh M, Yeung W, Johnson J, Szeto WL, Hong L, Fishbein M, Wei L, Pfeffer LM, Berliner JA. 2007. Role of the JAK/STAT Pathway in the Regulation of Interleukin-8 Transcription by Oxidized Phospholipids in Vitro and in Atherosclerosis in Vivo. *J. Biol. Chem.* 282: 31460-8.
29. Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin MT, Kuo ML, Lin JT. 2004. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* 11: 517-27.
30. Tawfik A, Jin L, Banes-Berceli AKL, Caldwell RB, Ogbi S, Shirley A, Barber D, Catravas JD, Stern DM, Fulton D, Caldwell RW, Marrero MB. Hyperglycemia and reactive oxygen species mediate apoptosis in aortic endothelial cells through Janus kinase 2. *Vascular Pharmacology* 2005;43(5):320-6.
31. Sandberg EM, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase mediates oxidative stress-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2004;279(13):34547-52.
32. Gorina R, Petegnief V, Chamorro A, Planas AM. AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J Neurochem* 2005;92(3):505-18.
33. Neria F, Caramelo C, Peinado H, Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, de Solis AJ, Fernandez-Sanchez R, Penate S, Cano A, Castilla MA. Mechanisms of endothelial cell protection by blockade of the JAK2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(3): C1123-31.
34. Neria F, Castilla MA, Sanchez RF, Gonzalez Pacheco FR, Deudero JJ, Calabria O, Tejedor A, Manzarbeitia F, Ortiz A, Caramelo C. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int* 2008;75(2):227-34.
35. Santilli F, Romano M, Recchiuti A, Dragani A, Falco A, Lessiani G, Fioritoni F, Lattanzio S, Mattoscio D, De Cristofaro R, Rocca B, Davi G. Circulating endothelial progenitor cells and residual in vivo thromboxane biosynthesis in low-dose aspirin-treated polycythemia vera patients. *Blood* 2008;112(4):1085-90.
36. Cucuianu A, Stoia M, Farcas A, Dima D, Zdrenghea M, Patiu M, Olinic D, Petrov L. Arterial stenosis and atherothrombotic events in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Rom J Intern Med* 2006;44(4):397-406.
37. Cosgrove ME, Suman R, Harrison HJ, Jackson GE, Howard MR, Hitchcock IS. Endothelial JAK2V617F Expression Drives Inflammation and Cellular Senescence; New Evidence for the Roles of Endothelial Cells in MPN-Related Clotting Abnormalities? *Blood* 2016;128(22):3134-3134.
38. Pedroso JAB, Ramos-Lobo AM, Donato J, Jr. SOCS3 as a future target to treat metabolic disorders. *Hormones (Athens)* 2019;18(2):127-36.
39. Kim WS, Kim MJ, Kim DO, Byun JE, Huy H, Song HY, Park YJ, Kim TD, Yoon SR, Choi EJ, Jung H, Choi I. Suppressor of Cytokine Signaling 2 Negatively Regulates NK Cell Differentiation by Inhibiting JAK2 Activity. *Sci Rep* 2017;7:46153.
40. Nischal S, Bhattacharyya S, Christopheit M, Yu Y, Zhou L, Bhagat TD, Sohal D, Will B, Mo Y, Suzuki M, Pardanani A, McDevitt M, Maciejewski JP, Melnick AM, Grealley JM, Steidl U, Moliterno A, Verma A. Methylome Profiling Reveals Distinct Alterations in Phenotypic and Mutational Subgroups of Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Research* 2013;73(3):1076-85.
41. Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol* 2006;6(2):111-30.



42. Pérez C, Pascual M, Martín-Subero JI, Bellosillo B, Segura V, Delabesse E, Álvarez S, Larrayoz MJ, Rifón J, Cigudosa JC, Besses C, Calasanz MJ, Cross NCP, Prósper F, Agirre X. Aberrant DNA methylation profile of chronic and transformed classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2013;98(9):1414-20.
43. Izzi B, Noro F, Cludts K, Freson K, Hoylaerts MF. Cell-Specific PEAR1 Methylation Studies Reveal a Locus that Coordinates Expression of Multiple Genes. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):1069.
44. Han S, Tan C, Ding J, Wang J, Ma'ayan A, Gouon-Evans V. Endothelial cells instruct liver specification of embryonic stem cell-derived endoderm through endothelial VEGFR2 signaling and endoderm epigenetic modifications. *Stem Cell Res* 2018;30: 163-70.