

CEMAL ÇAĞIL KOÇANA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2020



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİ KÖKENLİ HÜCRE
DIŞI GENOMİK MATERYALLERİN ENDOTEL
HÜCRELERE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

CEMAL ÇAĞIL KOÇANA

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

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

BEYAN

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

Cemal Çağıl Koçana

TEŞEKKÜR

Akademik bilgi ve deneyimini paylaştığı için, her türlü sorunda hep destek olduğu için değerli danışmanım Doç. Dr. Selçuk Sözer Tokdemir’e teşekkür ederim.

Laboratuvarda oluşturdukları keyifli ortam ve destekleri için ekip arkadaşlarım Berkay Tokcan, Büşra Yaşa Çevik, Hilal Hekimoğlu, İlideniz Uslu Bıçak’a teşekkür ederim. Özellikle bana ve deneylerime verdiği destekle bu geçirdiğim süreci kolaylaştıran ekip arkadaşım Selin Fulya Toprak’a teşekkür ederim.

İhtiyaç duyduğumda desteklerini esirgemeyen Genetik bölümü öğretim üyelerine, çalışanlarına ve bölümdeki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Farklı alanlar üzerine zihin açıcı sohbetler edebildiğim, her konuşmamızdan yeni bir şey öğrendiğim, zorlu dönemlerde desteklerini eksik etmeyen değerli arkadaşlarım Ahmet Zühtüoğulları, A. Alper Bülbül, Ali Kaan Poyraz, Oğuzhan Akpınar, Özgürcan Kabalak ve Şahin Yıldız’a teşekkür ederim.

Bu zorlu yolculukta hiçbir beklentileri olmadan her zaman, her konuda destekleyici olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, her zaman yanımda olduğunu bildiğim, karşılaştığım tüm sorunlarda bana her türlü desteği veren, hayatımızı kolaylaştıran, her zaman güçlü hissettiren, iyileştiren, hayallerime eşlik eden, huzur veren, hayattaki en büyük şansım, en değerlim, teşekkürü en çok hak eden kişi, hayatı paylaşmaktan keyif aldığım Sedef Oral’a sonsuz kez teşekkür ederim. Seninle birlikte üstesinden gelemeyeceğimiz hiçbir şey yok.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33725

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Kanser Oluşumu.....	3
2.1.2. Kanser Çeşitleri.....	3
2.2. Miyeloproliferatif Neoplazi (MPN).....	4
2.2.1. BCR-ABL1 pozitif KML	4
2.2.2. Polisitemia Vera (PV)	5
2.2.3. Primer Miyelofibroz (PMF)	6
2.2.4. Esansiyel Trombositemi (ET)	6
2.2.5. Kronik Nötrofilik Lösemi (CNL).....	7
2.2.6. Kronik Eozinofilik Lösemi	7
2.3. MPN ve Mutasyon	7
2.4. Metastaz	10
2.5. Endotel Hücre	11
2.6. Endotel Hücre Kökeni.....	12
2.6.1. Hemanjiyoblast Teorisi	13
2.6.2. Hemojenik Endotelyum Teorisi	13
2.6.3. Mezodermal Prehematopoetik Öncül Teori.....	13
2.7. Hücre Dışı Genomik Materyal (HDGM).....	13
2.8. Genometastaz.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15

3.1. Gereç	15
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	15
3.1.2. Kullanılan Kitler	16
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	16
3.1.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler.....	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Hücre Kültürü	17
3.2.1.1. Dondurulmuş Hücre Eritme ve Ekme	18
3.2.1.2. Hücre Büyütme/Pasajlama	18
3.2.1.3. Hücre Dondurma.....	19
3.2.1.4. Hücre Sayımı.....	19
3.2.2. Serum Toplama	20
3.2.3. Serumdan DNA İzolasyonu	20
3.2.4. Allel Spesifik Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ASN-PCR)	21
3.2.5. <i>BCR-ABL1</i> Genomik DNA(gDNA) PCR	22
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi	22
3.2.7. Transfeksiyon.....	23
3.2.8. Hücre Proliferasyon Analizi.....	23
3.2.9. Hücre Apoptoz Analizi	23
3.2.10. gDNA İzolasyonu	24
3.2.11. RNA İzolasyonu.....	24
3.2.12. Hücre Yüzey Boyama	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. JAK2V617F ve <i>BCR-ABL1</i> Mutasyon Analizleri	26
4.1.1. Serumda JAK2V617F Mutasyonu Görüldü.....	26
4.1.2. HEL Serumu İle Muamele Sonucunda Transfekte HUVEC’lerde JAK2V617F Mutasyonu Tespit Edildi.....	27
4.1.3. Pasajlanan tHUVEC Mutasyonu Korumaktadır	28
4.1.4. Transfeksiyon sonrası HUVEC <i>BCR-ABL1</i> pozitif görüldü.....	28
4.2. Proliferasyon Analiz Sonuçları	29
4.3. Apoptoz Analiz Sonuçları.....	32
4.4. Endotel Hücre Yüzey Protein Değişim Analizleri.....	33
5. TARTIŞMA	37

KAYNAKLAR	42
HAM VERİLER	60
FORMLAR	61
ETİK KURUL KARARI	62
PATENT HAKKI İZNİ	63
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	64
ÖZGEÇMİŞ	65



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Deneyler sırasında kullanılmış cihazların listesi.	15
Tablo 3.2. Deneyler sırasında kullanılmış kitlerin listesi.	16
Tablo 3.3. Deneylerde kullanılmış kimyasal maddelerin listesi.	16
Tablo 3.4 Kullanılan hücre hatlarının besiyeri içeriği.	18
Tablo 3.5. Allel Spesifik Nested-PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları.	21
Tablo 3.6. Allel Spesifik Nested-PCR adımları.	22



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kanserin ayırt edici özellikleri	2
Şekil 2.2. MPN oluşumunda etkili farklı yollar.	10
Şekil 3.1. Deneyin kısaca dizaynı gösterilmektedir.....	25
Şekil 4.1. HEL hücre serumundan elde edilen DNA için mutasyon analizi.....	26
Şekil 4.2. HEL hücre serumu ile muamele edilen HUVEC'lerin gDNA analizi.....	27
Şekil 4.3. Pasajlanan tHUVEC'lerin gDNA mutasyon analizi.....	28
Şekil 4.4. <i>BCR-ABL1</i> mutasyon analizi için jel görüntüsü	29
Şekil 4.5. Hücre İndisi-Zaman Grafiği	30
Şekil 4.6. Hücre indisi için 161. saatte alınan verinin sütun grafiği görünümü.....	31
Şekil 4.7. Anneksin V – 7AAD boyaması akım sitometrisi	32
Şekil 4.8. Akım sitometride hesaplanan değerlerin sütun grafiği görünümü	33
Şekil 4.9. Hücre yüzey proteini boyama akım sitometre analizi	35
Şekil 4.10. Hücre yüzey protein boyama analizlerinin sütun grafiğinde gösterilmesi ...	36

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

7-AAD:	7-Aminoaktinomisin D
AF:	Akselere Faz
AML:	Akut Miyeloid Lösemi
APC:	Allofikosiyenin
ASN-PCR:	Allel Spesifik Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu
BCR:	Kırık Noktası Küme Bölgesi
BF:	Blast Faz
CNL:	Kronik Nötrofilik Lösemi
DF:	Doku Faktörü
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DTH:	Dolaşan Tümör Hücreleri
ECM:	Ekstrasellüler Matriksi
EDTA:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EH:	Endotel Hücre
ET:	Esansiyel Trombositoz
exoDNA:	Eksozomal DNA
FBS:	Fetal Sığır Serum
fhdDNA:	Fetal hdDNA
gDNA:	Genomik DNA
hdDNA:	Hücre Dışı DNA
hdGM:	Hücre Dışı Genomik Materyal
HEL:	İnsan Eritrolösemi Hücresi
HKH:	Hematopoetik Kök Hücre
HUVEC:	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi
ICAM-1:	Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1
IL-1:	İnterlökin-1
IMDM:	Iscove's Modified Dulbecco's Medium

JAK: Janus Kinaz

KML: Kronik Miyeloid Lösemi

MCAM: Melanoma Hücre Adezyon Molekülü

MDS: Miyelodisplazi

MPN: Miyeloproliferatif Neoplaziler

PBS: Fosfat Tampon Çözeltilisi

PE: Fikoeritrin

PECAM-1: Platelet-Endotel Hücre Adhezyon Molekülü 1

Ph: Philadelphia Kromozomunun

PI: Propidyum İyodür

PMF: Primer Miyelofibroz

PV: Polisitemiya Vera

STING: Interferon Genlerin Stimülatörü

TAE: Tris-Asetik Asit-EDTA

tHUVCE: Transfekte HUVCE

TM: Trombomodülin

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör-Alfa

VCAM-1: Vasküler Hücre Adezyon Protein 1

VEGFR2: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü 2

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

WT: Yabancıl Tip

ÖZET

Koçana, C.Ç. (2020). Miyeloproliferatif Neoplazi Kökenli Hücre Dışı Genomik Materyallerin Endotel Hücrelere Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Miyeloproliferatif Neoplaziler (MPN) kan hücre oluşumunu etkileyen hematopoetik kök hücrelerin (HKH) sebep olduğu bir hastalık grubudur. Bu hastalık farklı HKH hatlarını etkileyebilir ve farklı alt gruplarda incelenebilir. MPN için en kritik mutasyonlar *BCR-ABL1* ve *JAK2V617F*'dir. Bu mutasyon MPN hasta endotel hücreler (EH)'de tespit edilmiş ve hastalıkta sıklıkla görülen trombo-embolik olaylarda rolü olduğu düşünülmüştür. Ancak henüz oluş mekanizması tam bilinmemektedir. Genometastaz, bir onkogenin kanser hücresinden salınarak dolaşım yoluyla farklı bir bölgeye taşınması ve bu bölgede bulunan bir hücreye girmesiyle metastaza sebep olmasını temel almaktadır. Bu çalışma, EH'de tespit edilmiş mutasyonun genometastaz yoluyla oluştuğunu ve genometastaz sonrasında EH'de bir takım değişikliklere sebep olduğunu göstermeyi amaçlamaktadır. Bunun için ilk olarak biallelik *JAK2V617F* taşıyan insan eritrolösemi(HEL) ve *BCR-ABL1* taşıyan K562 hücre hatlarından toplanan serumlardan DNA izolasyonu yapıldı ve hücrelere ait mutasyonlar tespit edildi. Ardından, insan umbilikal ven EH(HUVEC) hattı, toplanan serumlar ile ayrı ayrı 48 saat süresince kültür edildi. Kültür sonucunda transfekte HUVEC hücreleri toplanarak DNA izolasyonu yapıldı ve EH'lerde *JAK2V617F* ve *BCR-ABL1* mutasyonları tespit edildi. Mutant HUVEC'ler; apoptoz, proliferasyon ve trombotik olaylarda rolü olan EH yüzey proteinleri (CD106, CD141, CD146, CD309, CD54, CD31 ve CD142) açısından akım ölçerinde incelendi. Mutant EH'lerde kontrole göre CD141 (Trombomodulin)'de azalma ve CD142 (Doku faktörü)'de artma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Mutant HUVEC'ler çoğaltıldı ve pasajlanarak her iki mutasyonun hücre genomuna entegrasyonu tespit edildi. Sonuç olarak, literatürde ilk defa serumda bulunan *JAK2V617F*, EH genomuna entegre oldu ve EH'lerde fonksiyonel değişikliklere neden oldu. Bu çalışma ile genometastazın kanserogenezdeki önemine ışık tutulmuştur.

Anahtar Kelimeler : Hücre Dışı Nükleik Asitler, Miyeloproliferatif Neoplazi, Endotel Hücre, *JAK2V617F* Mutasyonu, Transfeksiyon, *BCR-ABL1*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33725

ABSTRACT

Koçana, C.Ç. (2020). An Analysis of the Effect of Myeloproliferative Neoplasm-derived Extracellular Genomic Materials On Endothelial Cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master's Thesis. İstanbul.

Myeloproliferative Neoplasm(MPN) is basically a group of hematopoietic stem cell(HSC) caused disease affecting blood cell formation. This disease can affect different HSC lines and can be examined in different subgroups. JAK2V617F and *BCR-ABL1* mutations are critical mutations for MPNs. These mutations were detected in MPN patient endothelial cells(EH) and were thought to play a role in thrombo-embolic events frequently seen in the disease. However, the exact mechanism of its occurrence is not yet known. Genometastasis is based on release of an oncogene from a cancer cell to circulation for transportation, transfection of a susceptible cell, and becoming malignant of the cell. This study aims to show that the detected mutation in EH occurs through genometastasis and causes some changes in EH after genometastasis. Firstly, DNA from sera collected from biallelic JAK2V617F mutation carrier Human Erytroleukemia(HEL) cells and *BCR-ABL1* carrier K562 cell line was isolated; mutation was detected in HUVECs. Mutant HUVECs were examined for apoptosis, proliferation, and surface proteins(CD106, CD141, CD146, CD309, CD54, CD31 ve CD142). Although there were no significant changes for apoptosis, proliferation and some surface proteins, the decrease and increase in CD141 and CD142 proteins compared to control, respectively, were statistically significant. Mutant HUVEC was cultivated and both mutations were detected again despite sub-culturing. As a result, extracellular genomic materials in the circulation can integrate into the genome of the endothelial cells and cause changes in the protein level of the cells. This study sheds light on the importance of genometastasis in carcinogenesis.

Key Words: Cell-Free Nucleic Acids, Myeloproliferative Neoplasm, Endothelial Cell, JAK2V617F Mutation, Transfection, *BCR-ABL1*

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2019-33725

1. GİRİŞ VE AMAÇ

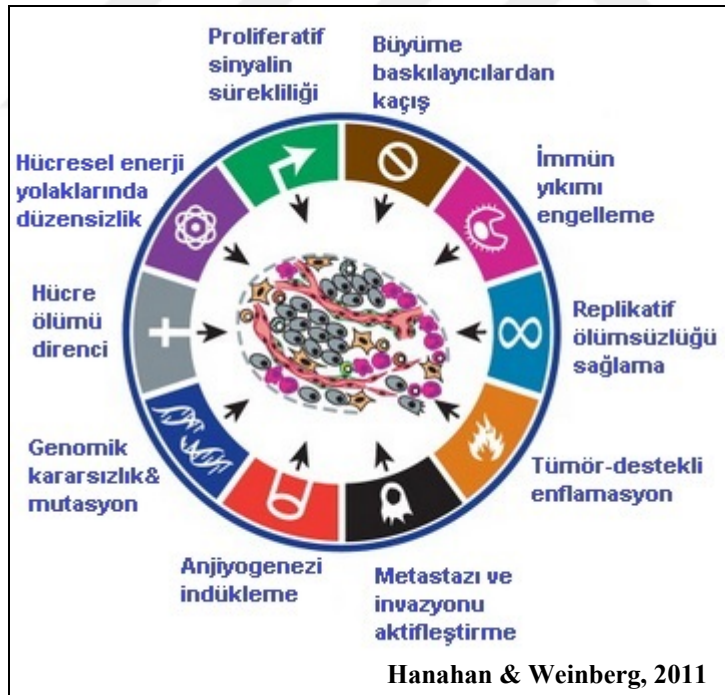
Miyeloproliferatif Neoplazi (MPN) kan hücrelerinin artmış çoğalma hızıyla nitelendirilmiş klonal hematopoetik kök hücre (HKH) bozukluklarıdır¹. Temel gruplandırma Philadelphia kromozomunun (Ph) varlığına dayandırılır. Ph kromozomu üzerinde *BCR-ABL1* füzyon genini bulundurur. Polisitemiya Vera (PV), Esansiyel Trombositoz (ET) ve Primer Miyelofibroz (PMF) en sık rastlanan Ph negatif MPN alt gruplarıdır². Bu alt gruplar için en kritik öneme sahip mutasyon JAK2V617F mutasyonudur. Bunun sebebi üç alt grupta görülmesi ve yüksek oranda (PV için >%95, ET ve PMF için yaklaşık %50) tespit edilmesidir³. Bu mutasyon JAK-STAT yolğunun sürekli aktif kalmasını sağlayarak sürekli çoğalmaya sebep olmaktadır. HKH kökenli bu hastalıkla ilişkilendirilmiş JAK2V617F ve *BCR-ABL1* mutasyonları, endotel hücreler (EH)'de de görülmüştür⁴⁻⁶. Bu durum hemanjiyoblast teorisi'ni gündeme getirmiştir^{5,7}. Kanser ayırt edici özelliklerinden biri metastaz yapabilmesidir⁸. Metastaz, kanser hücresinin kendi ortamından ayrılarak farklı bir bölgeye yerleşmesi ve burada büyümesiyle açıklanabilir⁸. Yapılan çalışmalar farklı bir yaklaşımı ortaya atmıştır. Bu yaklaşım genomastaz hipotezi olarak isimlendirilir ve metastazın hücre olmaksızın sadece genetik materyal üzerinden de gerçekleşebileceğini açıklamaktadır⁹. Bu açıklamaya göre kanser hücresinden ayrılan onkogen lenf/kan dolaşımı ile başka bir bölgeye taşınarak orada bir hücre içerisine alınması ile o hücrede fonksiyonel bozukluklara yol açarak yeni bir kanser hücresi oluşturmaktadır¹⁰. Bu onkogen dolaşım sırasında hücre dışı tümör DNA olarak tanımlanır ve çıplak bir şekilde dolaşabileceği gibi eksozom veya benzeri bir yapının içinde de dolaşabilir^{11,12}.

Hematopoietik hücrelerde varlığı ispatlanmış olan JAK2V617F ve *BCR-ABL1* mutasyonlarının EH'de tespitinin genomastaz mekanizmasıyla oluşabileceği düşünülerek bu çalışma oluşturuldu. Bu çalışma için hipotezimiz “mutasyon taşıyan kan hücrelerinden ortama salınan mutant *JAK2* geni ve/veya *BCR-ABL1* füzyon geni EH'nin içine girerek hücrenin genomunu entegre olur ve hücrenin fonksiyonel değişimine sebep olur” şeklindedir. Bu çalışma MPN hastalarının EH' de görülen onkogenik (*JAK2V617F* ve/veya *BCR-ABL1*) mutasyonun oluşumunu genomastaz yaklaşımı ile açıklamayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, gen anlatımındaki çoklu değişimlerin sebep olduğu hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin proliferasyon yönüne kaymasıyla sonuçlanan anormal hücre büyümesi ve bu hücrelerin farklı dokuları istila etme özelliği kazanmasıdır¹³. Çok sayıda kanser tipi olmasına rağmen tüm kanserler için 2000 yılında Hanahan & Weinberg tarafından ortak özellikler gösterilmiş; 2011 yılında bu özellikler güncellenmiş ve günümüzde de kabul görmektedir^{8,14}. Bu özellikler şu şekilde sıralanabilir: Genomik kararsızlık ve mutasyon, hücre ölümüne direnç, hücresel enerji yollarında düzensizlik, proliferatif sinyallerin sürekliliği, büyüme baskılayıcılardan kaçış, immün yıkımı engelleme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, tümör-destekli enflamasyon, metastazı ve invazyonu aktiveleştirme, anjiyogenezi indüklemeye.



Şekil 2.1. Kanserin ayırt edici özellikleri⁸.

2.1.1. Kanser Oluşumu

Kanser oluşumunda farklı sayıda ve yapıda mutasyon görülebilmektedir¹⁵. Temel olarak iki grupta incelenen bu mutasyonlar yolcu ve sürücü mutasyonlar olarak adlandırılırlar. Sürücü mutasyonlar kanser oluşumunda kritiktir. Farklı kanser tiplerinde aynı sürücü gen mutasyonları görülebildiği gibi aynı kanser tiplerinde farklı sürücü mutasyonlara rastlanabilir. Sürücü mutasyonların gerçekleştiği iki farklı fonksiyonel kategori vardır: proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler. Proto-onkogenler hücre proliferasyonunu tetikleyici etkisi olan genlerdir ve mutasyon sonucu onkogenlere dönüşerek hücrelerin kanser özellik kazanmasına sebep olur. Proto-onkogen üzerinde oluşacak monoallelik mutasyon, geni aktif onkogene dönüştürmeye yeterlidir. Genin aşırı anlatımı; ürünün yapısal, sayısal, fonksiyonel düzensizliğine ve hiperaktivitesine neden olabilir. Tümör baskılayıcı genler ise hücre proliferasyonunu düzenleyen veya hücre ölümünü tetikleyen genleri kapsamaktadır. Genellikle tümör baskılayıcı genlerde biallelik mutasyon gereklidir ve bu olay Knudson'ın çift vuruş hipotezi olarak isimlendirilir¹⁶.

Bu mutasyonlar, nokta mutasyonu şeklinde olabileceği gibi translokasyon, delesyon, insersiyon gibi kromozomal mutasyonlardan da oluşabilir. *BRCA1* ve *TP53* gibi genler üzerinde iyi çalışmalar yapılmış tümör baskılayıcı genlerken *RAS* geni proto-onkogene örnek gösterilebilir ve çeşitli çalışmalarda bu genlerde nokta mutasyonları gösterilmiştir¹⁷⁻²⁰. *BRC-ABL1* ise translokasyon sonucu oluşmuş bir kromozomal mutasyondur²¹.

2.1.2. Kanser Çeşitleri

Oluştugu dokulara göre isimlendirilen kanser birçok dokudan köken alabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2018 verilerine göre yaklaşık 18.1 milyon görülme sıklığı olan kanser, 9.6 milyon ölüm ile dünyanın en ölümcül ikinci hastalığıdır²². Bu verilere göre en sık görülen kanserler sırasıyla akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve mide kanseri şeklindedir. Ölümle sonuçlanmaya bakıldığında ise meme kanseri beşinci sıraya gerilemektedir. Bu da kanser sonucu ölümün engellenebildiğini göstermektedir. Kanser köken aldığı organ isimlendirmede kullanılsa da bir organda farklı doku ve yapılar olduğu için çeşitli isimlendirmelere ihtiyaç duyulmuştur. Örneğin; karsinoma epitel hücrelerden köken alan kanserler için, sarkoma bağ doku kökenli kanserler için, blastoma olgunlaşmamış

öncül hücreler için kullanılmaktadır. Bunun dışında gelişim süreçlerine göre de isimlendirme yapılabilmektedir. Akut miyeloid lösemi (AML) ve kronik miyeloid lösemi (KML) buna örnek gösterilebilir. Kan kanserleri iki temel kategori içinde incelenmektedir: lösemi ve lenfoma. Ancak bunun dışında kan hücrelerinin artmasıyla oluşan miyeloproliferatif neoplaziler 2008 yılından itibaren WHO tarafından kanser alt grubuna dahil edilmiştir.

2.2. Miyeloproliferatif Neoplazi (MPN)

Bir veya daha fazla miyeloid kökenli kan hücrelerinin artmış proliferasyonu ile karakterize edilen klonal hematopoetik kök hücre (HKH) bozukluklarıdır. Özellikle 50-70 yaşlar arasında görülme sıklığı fazla olsa da bazı tipleri çocuklarda da bildirilmiştir²³. MPN, WHO tarafından yayınlanan sınıflandırmanın revize edilmesiyle yedi alt gruba ayrılmıştır: *BCR-ABL1* pozitif KML, kronik nötrofilik lösemi, polisitemiya vera, primer miyelofibroz, esansiyel trombositoz, kronik eozinofilik lösemi ve gruplandırılmayan MPN²⁴.

2.2.1. *BCR-ABL1* pozitif KML

Philadelphia (Ph) kromozomunda *BCR-ABL1* füzyon genini taşıyan anormal kemik iliği pluripotent kök hücrelerinden köken almaktadır^{25,26}. KML insidansı dünya genelinde yıllık 1-2/100.000 şeklindedir²⁷. Her yaşta görülebilmektedir ancak medyan olarak 50-60 yaş aralığı belirlenmiştir. Yeni tanıların yaklaşık %50'si semptom göstermemektedir²⁸. Genel bulgular kilo kaybı, yorgunluk, gece terlemesi, splenomegali ve anemi şeklindedir^{29,30}. Küratif tedavi yokluğunda KML kronik fazdan blast faza (BF) direk veya akselere faz (AF) üzerinden geçiş olabilir³¹. Tedavi ve prognoz için faz geçişlerini ayırt etmek önemlidir. Ancak fazlar arasında klinik ve morfolojik sınırlar çakışabilmektedir. Vakaların %90-95'inde Ph kromozomuyla sonuçlanan karakteristik t(9;22)(q34;q11.2) resiprokal translokasyonu görülmektedir. Kalan vakalarda bu translokasyona üçüncü ve hatta dördüncü bir kromozom eşlik edebilmektedir veya rutin sitogenetik analizlerde tanımlanamayan 9q34 ve 22q11.2'nin gizli translokasyonu görülmektedir³². Bu durumda *BCR-ABL1* geni FISH analizi, RT-PCR veya Southern blot teknikleriyle saptanabilir. *BCR* genindeki kırık nokta bölgesi hastalığın fenotipini etkileyebilir. KML'de, *BCR*'deki kırık noktası çoğunlukla 12. ve 16. ekzonları kapsayan M-*BCR* bölgesinde görülmekle birlikte bu durum artmış tirozin kinaz aktivitesi olan anormal füzyon proteininin oluşmasına sebep olmaktadır^{32,33}. Nadiren,

kırılma noktası 17. ve 20. ekzonları kapsayan μ -BCR bölgesinde olur ve daha büyük bir füzyon proteinin oluşmasına sebep olur. μ -BCR bölgesinde oluşan kırıklar Ph pozitif ALL ile ilişkilendirilen daha kısa füzyon proteinine sebep olmaktadır ve bu protein KML hastalarının %90'ından çoğunda az miktarda da olsa saptanmaktadır³⁴. Buna alternatif uç birleştirme sebep olarak gösterilmiştir. KML tedavisinde tirozin kinaz aktivitesini hedefleyen imatinib kullanılmaktadır³⁵. Imatinib, BCR-ABL1 kinaz bölgesine bağlanmak için ATP ile yarışmaktadır. Böylelikle tirozin rezidülerinin substrat üzerindeki fosforilasyon yeteneği engellenir. Özellikle kronik fazın erken dönemlerinde bu sinyalin engellenmesi hastalığın kontrol altında tutulması için çok etkili bir yöntemdir. Ancak, özellikle AF ve BF evrelerinde nokta mutasyonu taşıyan lösemi öncül hücrelerinde inhibitörün kinaz bölgesine bağlanması engellenebilir ve bu ilaç direncine sebep olabilir³⁶. Bu nedenle nilotinib ve dasatinib gibi ikinci nesil bileşenler geliştirilmiştir³⁷. Hastalık transformasyonunun moleküler temelleri tamamen anlaşılamamıştır. Hastalığın ilerlemesi klonal evrim ile bağdaştırılmaktadır. Kronik fazdan AF veya BF'ye geçiş sürecinde hastaların %80'inde Ph kromozomuna ek olarak +8, +19, i(17q) veya ekstra Ph gibi sitogenetik değişimler görülmüştür³⁸. Transformasyonlarda *MYC*, *RBf*, *RAS*, *AMLf*, *EVI*, *TP53* gibi genlerde bozulmalar olduğu görülmüştür ancak bu durumun transformasyondaki rolü bilinmemektedir^{39,40}. Tüm genom anlatım profillemesi ileri evrelerle ilişkilendirilen diğer aday genleri ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca AF ile BF arasındaki benzer anlatım motiflerini ortaya koymaktadır ve bu çalışmalar, AF ve BF transformasyonuna öncülük eden genetik olayların geç kronik fazda veya erken AF' da meydana geldiğini önermektedir⁴¹.

2.2.2. Polisitemia Vera (PV)

Artmış kırmızı kan hücre miktarı ile karakterize bir MPN'dir. Hastaların >%95'inde JAK2V617F mutasyonu tespit edilmektedir⁴². Bu mutasyonları sadece eritroid soyda değil aynı zamanda granülosit ve megakaryosit soylarında da artmış proliferasyona sebep olmaktadır^{43,44}. Üç fazda tanımlanabilmektedir; bunlar polisitemik faz öncesi olan prodormal faz, polisitemik faz ve propolisitemik miyelofibroz fazdır. Tanıda klinik, laboratuvar ve kemik iliği histolojisi birlikte kullanılır⁴⁵. Temelde yatan sebep çoğu vakada bilinmemekle birlikte bazı ailelerde genetik yatkınlık raporlanmıştır⁴⁶. İyonize radyasyon ve toksinlere maruz kalmak bazı hastalarda olası sebep olarak gösterilmiştir⁴⁷. Kan ve kemik iliği ana tutulum bölgeleridir ancak

karaciğer ve dalak etkilenen organlardır. Bunların yanında artmış kırmızı kan hücreleri dolayısıyla herhangi bir organ etkilenebilmektedir. Hastalık için medyan yaş 60 olmasına rağmen nadiren 20 yaştan genç hastalara da rastlanmaktadır. Hastaların genellikle ölüm sebebi tromboz veya hemarojidir ancak %20'ye kadar AML veya miyelodisplazi (MDS) ölüm sebebi olabilmektedir⁴⁸. Tromboz veya hemaroji için risk faktörlerinin öngörüsü iyi belirlenememiştir. Sitotoksik ajanlarla tedavi görmemiş hastalarda MDS ve AML insidansı %2-3 olmasına rağmen, kemoterapi alanlar için bu oran terapi tipine göre %10 ve üzerine ulaşmaktadır^{49,50}.

PV hastalarında JAK2V617F mutasyonu hematopoetik kök hücrelerde oluşmaktadır ve tüm miyeloid soydan gelen hücrelerde görülmektedir⁵¹. Bunun dışında işlevsel benzerlik gösteren JAK2 12. ekzonunda görülen mutasyon da raporlanmıştır⁵². Ancak henüz PV 'ye özel bir mutasyon tanımlanamamıştır. Hastalıkta *BCR-ABL1* füzyon genine rastlanan olgular görülmüştür ancak bunların klinik önemli henüz tespit edilememiştir^{53,54}. Bunun dışında bazı kromozomal mutasyonlar görölse de bu mutasyonların frekansının ileri fazlarda arttığı görülmüştür. Özellikle post-PV MF fazdaki hastaların %80-90'ında bu kromozomal anormallikler görülmektedir⁵⁵. MDS ve AML gelişmiş hastaların neredeyse tamamında kromozomal anormalliklerin görülmektedir⁵⁶.

2.2.3. Primer Miyelofibroz (PMF)

Megakaryositlerin ve granülositlerin kemik iliğinde proliferasyonu ile fibrozis oluşumu ve ekstrapredüller hematopoez ile karakterize edilen klonal MPN çeşididir⁵⁷. Hastaların %30'a kadarı tanı sırasında semptom göstermemektedir ve rutin muayene sırasında splenomegalinin farkedilmesi veya rutin kan sayımlarının anemi, lökositoz veya trombositozla benzemesiyle bulunmaktadır⁵⁸. Hastaların yaklaşık %50'sinde JAK2V617F mutasyonu, %30'unda *CALR* mutasyonu, %8'inde *MPL* mutasyonu ve %12'si ise üçlü-negatif olarak görülmektedir⁵⁹⁻⁶¹. Üç gende de negatif olan hastalarda yapılan tüm ekzom analizleri sonucunda *MPL* S204P ve *MPL* Y591N gibi mutasyonlar tespit edilmiştir⁶². Bunun dışında *MPL* W515K/L mutasyonu PMF hastalarının %5'inde görülmektedir⁶³. Farklı kromozomal mutasyonlar görülebilmektedir⁶⁴⁻⁶⁶.

2.2.4. Esansiyel Trombositemi (ET)

Birincil olarak megakaryosit soyu içeren kronik MPN çeşididir. Kanda artmış trombosit miktarı ile kemik iliğinde artmış büyük, olgunlaşmış megakaryosit miktarı ve

klirik olarak hemaroji ve tromboz oluşunu ile karakterize edilmektedir⁶⁷. ET için genetik veya biyolojik işaretçi olmadığı için tanıda trombositoz için tüm sebepler dışlanmalıdır ve *BCR-ABL1* füzyon geninin varlığı ET diagnozunu engeller. Hastaların %40-50'sinde *JAK2V617F* mutasyonu gzlemlenmektedir⁶⁸. Hastarın %1'inde *MPL* *W515K/L* mutasyonu bildirilmiřtir⁶³. Anormal karyotip hastların %5-10'unda gsterilmiřtir⁶⁹.

2.2.5. Kronik Nötrofilik Lösemi (CNL)

Philadelphia kromozomu negatif nadir görülen bir MPN'dir. Kanda nötrofil hücrelerinin sürekli artışı, nötrofilik granülosit proliferasyonuna bağlı olarak hipersellüler kemik iliği ve hepatosplenomegali ile karakterize edilmektedir. Tanısı için reaktif nötrofili ve diğer MPN'lerin dışlanması gerekmektedir. *JAK2* mutasyonu taşıyan hastalar rapor edilmiştir ve bazen biallelik *JAK2V617F* mutasyonu görülmektedir. Köken aldığı hücre bilinmemektedir. Genellikle yavaş ilerleyen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır⁷⁰.

2.2.6. Kronik Eozinofilik Lösemi

zonofil prekürsor hücrelerinin klonal proliferasyonu sonucu perifer kanda, kemik iliğinde ve perifer dokularda artmış zonofil miktarı ile oluşan MPN eřididir⁷¹. Lösemik infiltrasyon sonucu veya zonofiller tarafından salınan sitokinler, enzimler ve diğer proteinler tarafından organ hasarı oluşmaktadır. Spesifik moleküler genetik veya sitogenetik anormallik belirlenmemekle birlikte *PDGFRA*, *PDGFRB* ve *FGFR1* yeniden düzenlemeleri tanıda kronik zonofilik löseminin dışlanması için sebeptir. Bazı hastalarda *JAK2* mutasyonu grlmektedir⁶⁸.

2.3. MPN ve Mutasyon

Mutasyon çeşitli şekillerde ele alınsa da temel olarak bir canlının genomunda meydana gelen kalıcı değişiklikler olarak tanımlanabilmektedir⁷⁰. Bu değişiklikler kromozom boyutundaki değişikliklerden tek bir nükleotidde görülen değişikliklere kadar geniş bir yelpaze göstermektedir. Mutasyon sonucu işlev kazanımı veya işlev kaybı grlebilmektedir⁷². Mutasyon ve kanser ilişkisi diğer bir bölümde açıklandığı için bu bölümde sadece MPN oluşumunda etkili mutasyonlar üzerinde durulacaktır. MPN'lerde görülen en kritik mutasyon Philadelphia kromozomunun oluşmasıdır. Ph kromozomu *t(9;22)(q34;q11.2)* resiprokal translokasyonu sonucu oluřmaktadır⁷³. Bu

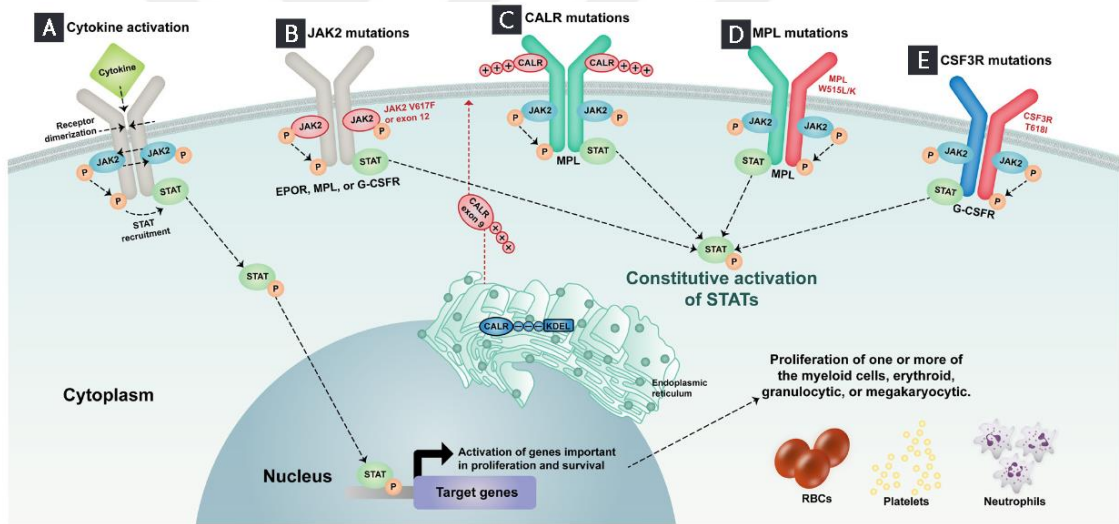
translokasyon sonucu 22. Kromozomdaki *BCR* geni ile 9. Kromozomdaki *ABL1* geninin füzyonu gerçekleşmektedir. ABL bir sitoplazmik tirozin kinazdır. Sitoplazmik tirozin kinazlar, sitoplazmada bulunan ve bir donör nükleozit trifosfattan aldığı fosfat grubunun proteinlerin tirozin rezidülerine transferini katalizleyen enzimlerdir. ABL1 proteini hücre farklılaşmasında, çoğalmasında, adhezyonunda ve stres yanıtında etkilidir⁷⁴. Bu proteini üreten *ABL1* geninin *BCR* geni ile transloke olmasıyla üretilen BCR-ABL1 füzyon proteini sitokinler tarafından regüle edilmeksizin proliferasyona sebep olmaktadır⁷⁵.

Ph negatif MPN'lerde sıklıkla karşılaşılan mutasyon ise JAK2V617F mutasyonudur. Bu mutasyon sonucu JAK2 proteininin 617. pozisyonundaki valin amino asidi yerini fenilalanine bırakmaktadır⁷⁶. JAK2, Janus Kinazların 4 üyesinden biridir ve sitoplazmik tirozin kinaz çeşididir. JAK/STAT yolağında görev almaktadır. JAK/STAT yolağı temel olarak bir ligandın reseptörüne bağlanarak bu reseptörün multimer oluşturmaya sebep olmasıyla başlar⁷⁷. Bu reseptörün yolağı aktive edebilmesi için monomerlerinin JAK ile birleşik olması gerekmektedir⁷⁸. Reseptör multimer oluşturduktan sonra JAK'lar transfosforile olabilecek yakınlığa gelir ve birbirlerini fosforile eder⁷⁹. Fosforile olan JAK'lar bağlı olduğu reseptörü fosforile eder. Fosforile olan JAK'lar STAT moleküllerini fosforile eder ve böylelikle aktive olan STAT'lar nükleusa giderek transkripsiyonu başlatır⁸⁰. Bu yolak proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve enflamasyonda etkilidir⁸¹. Bu nedenle bu yolda oluşan hatalar kanser ve bağışıklık sistemini etkileyen hastalıklara sebep olabilir⁸². JAK2'de gerçekleşen mutasyon liganttan bağımsız olarak yolağın aktif kalmasına sebep olur ve bu da kan hücrelerinde proliferasyonu artırır⁸³.

Bunun dışında aynı genin 12. ekzonunda, *MPL* geninde, *CALR* geninin 9. ekzonunda ve *CSF3R* geninde görülen mutasyonlar MPN ile sonuçlanabilmektedir. Bunların dışında JAK-STAT yolağının negatif düzenleyicilerinde gerçekleşmiş mutasyonlar nadir de olsa MPN ile sonuçlanabilmektedir⁸⁴. *JAK2* ekzon 12 mutasyonları çoğunlukla çerçeve içi küçük insersiyon ve delesyonlardır⁸⁵. Ekzon 12 mutasyonu JAK2V617F mutasyonu görülmeyen PV hastalarının %1-2'sinde görülmektedir; ET ve PMF ile ilişkilendirilmemiştir⁸⁶. Bu ekzon üzerinde en sık görülen mutasyonlar N542-E543del, K539L, E543-D544 del ve F537-K539delinsL mutasyonlarıdır⁸⁵. *JAK2* ekzon 12 mutasyonları JAK2V617F mutasyonuna göre JAK2 ve STAT için artmış fosforilasyon göstermektedir⁸⁶. Ayrıca bu mutasyona sahip hastalar daha genç yaşlarda daha belirgin

eritrositoz göstermektedir⁸⁶. Bir diğer mutasyon, trombopoetin reseptörü olan *MPL* üzerinde gerçekleşmektedir. *MPL* geninin 10. ekzonunda fonksiyon kazanma mutasyonu gerçekleşir ve sitokinlerden bağımsız büyümeye götürür⁸⁷. W515 konumunda görülen mutasyonlar ET vakalarının %3'ünde PMF vakalarının ise %5'inde görülür ve genellikle W515L ve W515K yer değiştirmesi şeklindedir⁸⁸. Bunların dışında W515R, W515A ve W515G gibi farklı yer değiştirmeler de bildirilmiştir⁸⁹. Ayrıca *MPL* geninin üzerinde gerçekleşen S505N trombozun kalıtsal formu için tanımlanmıştır⁹⁰. Diğer bir gen calreticulin kodlayan *CALR* genidir. MPN hastalarında ikinci en sık görülen mutasyon olan *CALR* ET hastalarında %20-25, PMF hastalarında ise %25-30 oranında görülmektedir; PV'de ise nadiren görülür⁹¹. Calreticulin JAK-STAT yolağında görev almasa da *MPL* ile etkileşime girebilmektedir⁹². Mutasyon sonucu oluşan yeni protein *MPL* ile etkileşime daha güçlü girmektedir⁹³. Bu güçlü etkileşim sonucu *MPL*'de TPO'dan bağımsız aktivasyon görülmektedir ve JAK-STAT aktifleşmiş olur¹. *CALR*'de görülen mutasyonlar iki tipe ayrılmıştır; tip-1 52bç uzunluğunda delesyon iken tip-2 5 bç uzunluğunda bir insersiyondur. PMF için tip-1 %70, tip-2 %13 oranında görülürken ET için bu oran sırasıyla %51'e %39'dur⁹⁴. Tip-1 benzeri mutasyonlar miyolofibrozu fenotipi ile ilişkilendirilmektedir ve ET'lerde tip-1 görülmesi miyelofibrotik dönüşüm riskinin fazla olduğu anlamına gelmektedir⁹⁵. Tip-2 benzeri mutasyonlar ise ET fenotipi ile ilişkilendirilmektedir⁹⁵. Bu mutasyonların protein yapısına yansımaları da oldukça farklıdır. Tip-1 mutasyonu çoğu yabancı tip dizisinin ve kalsiyum bağlama bölgelerinin kaybına sebep olsa da tip-2 yabancı tip dizilime daha yakındır⁹¹. *CSF3R* ise G-CSFR kodlayan genidir ve üzerinde görülen bir mutasyon yakın zamanda CNL sürücü mutasyonu olarak tanımlanmıştır⁹⁶. Özellikle *JAK2*, *CALR* ve *MPL* genleri MPN için kritik öneme sahip genler olsalar da üç mutasyonun da görülmediği vakalar söz konusudur⁹⁷. Bu vakalarda *MPL* ekzon 10 ve *JAK2* ekzon 14 bölgeleri dışında kanonik olmayan mutasyonlar görülebilmektedir⁶². Bu mutasyonlar somatik olarak kazanılmış veya kalıtılmış olabilir. *MPL* geninde kanonik olmayan T119I, S204F/P, E230G ve Y591D/N mutasyonları, *JAK2* geninde ise V625F ve F556V kanonik olmayan mutasyonları görülebilmektedir^{62,98}. Bu genlerin bazı yolcu mutasyonlar da görülmektedir. Temel olarak bu mutasyonlar epigenetik düzenleme, mRNA uç birleştirme, transkripsiyonel mekanizma ve sinyal iletiminde önemli olan genleri etkilemektedir.

Epigenetik düzenleyici proteinleri olan TET2 ve DNMT3A CpG adacıklarında DNA metilasyonundan görevlidir⁹⁹. TET2 aktif demetilasyon sürecinde etkilidir ve bunun özellikle kök hücre gen düzenlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir⁹⁹. DNMT3A ise sitozin metillenmesinden sorumludur¹⁰⁰. TET2, DNMT3A mutasyonlarına göre daha sık gözlemlenir. Bu iki mutasyon da JAK2V617F mutasyonuna sahip HKH'lerin kendini yenilemesini artırır ve hastalık başlangıcı için önemli rolü vardır¹⁰¹. *ASXL1* ve *EZH2* histon modifikasyonunda görevli faktörleri kodlamaktadır. *ASXL1* mutasyonları MPN'lerde ikinci en sık görülen epigenetik düzenleyici mutasyonlarıdır¹⁰². Bu mutasyonlar zayıf prognoz ve daha sık lökemik dönüşüm ile ilişkilendirilmiştir¹⁰³. MPN'lerde gösterilen *EZH2* genindeki işlev kaybı mutasyonları onkogenlerin de dahil olduğu bir gen setinde baskılamının ortadan kalkması ile sonuçlanarak HKH kendini yenilemesini artırır¹⁰⁴.



Şekil 2.2. MPN oluşumunda etkili farklı yollar. En sık gözlenen mutasyonların yolağa etkisi görselleştirilmiştir¹⁰⁵.

2.4. Metastaz

Metastaz kanser ölümlerinin % 90'ına sebep olan önemli bir faktördür¹⁰⁶. Kanser hücrelerinin vücudun diğer bölümlerine yayılmasıdır. Bu olay altı adımda sınıflandırılabilir: Bölgesel istila, damar içine geçme, yer değiştirme, damar dışına çıkma, mikrometastas oluşumu ve kolonileşme. Bölgesel istila, kanser hücrelerinin çevresini kaplayan sağlıklı dokuları istila etmesidir¹⁰⁷. Bu adımda kanser hücreleri hareket etmek için ekstrasellüler matriksi (ECM) kullanır ve ayrıca komşu dokuya girebilmek için ECM'ye zarar verir¹⁰⁸. Bölgesel istila bir kanser hücresi tarafından da

bir grup kanser hücresi tarafından da yapılabilir ve duruma göre hareket yöntemi fokal adezyon veya amiboid hareket şeklinde değişebilir. İkinci adım olan, damara içine geçme kanserin uzak bölgelere taşınabilmesi için çok kritik bir adımdır çünkü bu adımda kanser hücresi lenf veya kan dolaşımına geçer¹⁰⁹. Kanser hücreleri öncelikle damarları çevreleyen ECM'yi istila eder, sonra damarlardaki endotel hücreler arasındaki hücre-hücre etkileşimlerini kırar ve son olarak formasyonunu değiştirerek tahrip olan damar duvarından geçer. Lenf veya kan dolaşımına geçen bu hücreler “dolaşan tümör hücreleri”(DTH) olarak isimlendirilir¹¹⁰. DTH'ler damarlarda hayatta kalabilmek için doğal öldürücü hücreler gibi bağışıklık hücrelerinden kaçabilmeli. Bunun için DTH'ler trombositleri kullanarak bağışıklık hücrelerine, türbülans ve hematojenik kesme kuvvetine karşı kalkan oluştururlar¹¹¹. DTH'ler aktif veya pasif olarak yani endotelyum üzerinde yuvarlanarak veya akıntıyla birlikte rastgele hareket edebilirler¹¹². DTH kılcal damara sıkıştığı zaman damar dışına çıkma gerçekleşir. Damar dışına çıkma migrasyonun son adımıdır ve damardan yeni bir dokuya geçirir¹¹³. Bu adımdan sonra kanser hücreleri proliferasyon mekanizmalarını yeniden aktive eder ve böylece çoğalarak metastatik doku oluşturabilir. Bu doku çok geniş olmadığı için mikrometastaz olarak isimlendirilir¹¹⁴.

2.5. Endotel Hücre

Endotel hücreler damar içi ve doku arasında bariyer görevi görmektedir¹¹⁵. Kan ve lenf damarlarını oluşturmaktadırlar. Bu nedenle dokuya geçişi regüle etmektedir. Bu regülasyona sadece oksijen, karbon dioksit gibi moleküller değil çeşitli hücreler de dahildir¹¹⁶. Bu hücreler damarlanmada görevli olduğu için tümörün büyümesi için gerekli besini sağlamak adına veya kanserin yayılımı için ulaşım kanalı sağlamak adına çok değerlidirler. Farklı görevleri yerine getirebilmek adına yüzeyinde kendine has proteinler bulundurmaktadır¹¹⁷⁻¹¹⁹. Bunlardan bazıları bu çalışma içerisinde de incelenmiştir. Vasküler Hücre Adezyon Protein 1 (VCAM-1 veya CD106) lenfosit, monosit, eozinofil ve bazofillerin vasküler endotele tutunmasını sağlar¹¹⁹. VCAM-1 anlatımı, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinlere cevap olarak artabilir^{120,121}. Melanoma hücre adezyon molekülü (MCAM veya CD146) EH için marker olarak kullanılan bir proteindir. MCAM normalde melanositler tarafından eksprese edilmezken ilk kez melanoma hücrelerinde tespit edilmiştir¹²². İşlevleri çok iyi bilinmese de yardımcı T-17 hücrelerinin adezyonunu sağlamaktadır¹²³. Vasküler

endotelial büyüme faktör reseptörü 2 (VEGFR2 veya CD309) endotelial migrasyon ve proliferasyonu düzenleyen bir moleküldür¹²⁴. Vasküler malign tümörler için önemli bir marker olabilir¹²⁵. Hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1 veya CD54) EH'de veya bağışıklık hücrelerinde eksprese olabilen bir proteindir¹²⁶. Lökositler üzerinde bulunan FLA-1 molekülü ICAM-1 için liganddır ve FLA-1/ICAM-1 etkileşimi lökositin dokulara geçişini sağlar¹²⁷. Platelet-endotel hücre adhezyon molekülü 1 (PECAM-1 veya CD31) EH' de ve birçok bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde bulunur. Lökosit transmigrasyonunda, anjiyogeneze ve integrin aktivasyonunda etkilidir¹²⁸. Doğal öldürücüler üzerinde bulunan CD38 reseptöre bağlanarak hücrelerin EH'ye bağlanmasını sağlar¹²⁹. Trombomodülin (TM veya CD141) endotel hücre yüzeyinde bulunan trombin için kofaktör görevi gören bir yüzey proteindir. TM, trombini prokoagülan enzimden antikoagülan enzime dönüştürerek kan pıhtılaşmasını azaltır¹³⁰. Doku faktörü (DF veya CD142) ekstrinsik kan pıhtılaşma mekanizmasının birincil başlatıcısıdır¹³¹. Bunun dışında DF anjiyogeneze, yara iyileşmesi, apoptoz, proliferasyon ve hemaostazda gibi önemli süreçlere dahil olmaktadır¹³²⁻¹³⁴. Koagülasyon kontrolünün bozulması tromboz oluşumunda görülmektedir. Tromboz, damar içinde artmış pıhtı oluşumu nedeniyle akışın azalması veya damarın tıkanmasıdır¹³⁵. Bu durum besin ve oksijen iletimini azaltacağı için lokalize doku ve organ nekrozlarıyla sonuçlanır. Bu durumun kontrolü EH üzerindedir¹¹⁸.

EH'de de JAK2V617F mutasyonu gözlemlenebilir. MPN hastalarının ölümünden yüksek oranda sorumlu olan trombozu arttıran faktörün mutant EH olup olmadığı araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda EH'in MPN'lerde pıhtılaşma anormalliklerini sağladığı bulunmuştur^{136,137}. Yapılan bir çalışma JAK2V617F pozitif EH'in artmış P-selektin ekspresyonu sebebiyle protrombotik etkisinin arttığını bildirmiştir¹³⁸. KML hastalarından elde edilen mononükleer hücrelerden *BCR-ABL1* pozitif EH farklılaşabilmiştir⁵. Ancak çalışmadaki amaç hemanjiyoblast hipotezi için kanıt sunmak olduğu için *BCR-ABL1* pozitif EH'nin davranışı çalışılmamıştır.

2.6. Endotel Hücre Kökeni

EH kökenini araştırmak için, anatomik, genetik ve biyokimyasal çalışmalar yapılmakla birlikte bazı teoriler ön plana çıkmaktadır¹³⁹. Genel olarak endotel ve

hematopoetik sistemin gelişim sürecinde birbirleriyle yakınlığı üzerinde bu teoriler birleşse de ontojenik yollar farklılık göstermektedir¹⁴⁰.

2.6.1. Hemanjiyoblast Teorisi

Hemanjiyoblast hem endotel hem de hematopoetik hatlara farklılaşma kabiliyeti olan bir öncül hücre tipidir ve teori ismini bu hücreden almaktadır¹⁴¹. Embriyogenez süresince bu hücrenin varlığını kanıtlayan çok sayıda çalışma mevcuttur ve bu teorinin primitif hematopoez fazıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir¹⁴². Ancak, yetişkinlerde henüz kanıtlanmamış olsa da *in vitro* ortamda yapılan çalışmalar bulunmaktadır¹⁴³.

2.6.2. Hemojenik Endotelyum Teorisi

Bu teori HKH'lerin aort-gonad-mezenfos bölgesinde bulunan özelleşmiş vasküler endotelyum olan hemojenik endotelyumdan köken aldığını ileri sürmektedir¹⁴⁴. Yapılan bazı çalışmalarda EH işaretlenmiş ve bu işaretler daha sonra hematopoetik öncül hücrelerde görüntülenmiştir^{145,146}.

2.6.3. Mezodermal Prehematopoetik Öncül Teori

Bu teori yukarıda bahsedilen iki teorinin kombinasyonu olarak ortaya çıkmıştır ve her iki durumun aynı zamanda ardıl adımlar olarak gerçekleşebileceğini savunmaktadır. Bu teoriye göre hemanjiyoblast, hemojenik endotelyumu oluşturur, ondan da hematopoetik hücreler farklılaşır¹⁴⁷.

2.7. Hücre Dışı Genomik Materyal (HDGM)

Hücrenin dışına aktif olarak salınarak veya hücrenin parçalanmaya başlaması sonucu pasif olarak dışarı sızan DNA veya RNA temelli moleküllerdir¹⁴⁸. RNA kendi başına hücre dışında görevli olabildiği için (mikro RNA gibi) özellikle DNA temelli çalışmalar bu kategori altına daha sık alınmaktadır. Bunun sebebinin DNA'nın hücre dışında beklenmemesi olabilir. Sıklıkla hücre dışı DNA(hdDNA), fetal hdDNA (fhdDNA), eksozomal DNA (exoDNA) gibi çeşitleri çalışılmaktadır. Özellikle kanser tanı ve prognozu için çok fazla çalışma yapılmaktadır ancak trizomi 21 gibi kromozomal hastalıklar için de girişimsel olmayan tanı yöntemi olarak geliştirilmektedir^{149,150}. Hücreden pasif olarak sızması durumunda apoptoz veya nekroza bağlı olarak hdDNA boyutu değişebilmektedir¹⁵¹. Bunun yanında salındığı hücrenin ait olduğu dokuya dair epigenetik bilgiler taşıyabilmektedir^{152,153}. Bu özelliği tanı için çok

faydalı olabilir. hdDNA kan dolaşımında olabileceği gibi lenf dolaşımında da bulunabilir veya diğer tüm biyolojik sıvılarda bulunabilir. Eksozom içindeki hüce dışı DNA, çevreden daha az etkilenir ve bu nedenle daha stabildir¹⁵⁴.

2.8. Genometastaz

Genometastaz uzak bir dokudaki hedef hücrenin primer tümör kökenli dolaşımda olan dominant onkogen ile transfeksiyonu sonucu gerçekleşen bir metastaz oluşumdur. DNA lenf veya kan dolaşımında hücreden bağımsız şekilde gözlemlenebilir. Hücre dışı DNA (hdDNA) ilk olarak 1948 yılında Mandel ve Metais tarafından keşfedilmiştir¹⁵⁵. Daha sonra, 1965 yılında Bendich ve ark. metastazın cfDNA ile kolaylaştığına dair bir hipotez ortaya koymuştur ancak bu DNA tümör tetikleyen polyoma virüsün DNA'sıdır¹⁵⁶. cfDNA sonraki yıllarda sistemik lupus eritematozus gibi farklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir¹⁵⁷. Kanseri hastalarında yapılan araştırmalar, hastaların kanındaki cfDNA seviyelerinin kontrol grubuna göre çok fazla olduğunu göstermiştir ancak dönemin DNA dizileme teknolojisi kanda çok seyrek halde bulunan cfDNA'nın dizilenmesini engellemiştir¹⁵⁸. Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte cfDNA dizilenmiş ve bazılarının tümöre spesifik mutasyon taşıdığı görülmüştür^{159,160}. 1999 yılında García-Olmo ve meslektaşları genometastaz hipotezini ortaya atmıştır⁹.

DNA parçaları temel olarak iki şekilde salınmaktadır; bunlar aktif ve pasif salınımdır. Pasif salınım hücre ölümleri sebep olmaktadır ve cfDNA'lar nükleozom şeklinde hücreden dışarı çıkar¹⁶¹. Nükleozomlar, DNA'nın paketlenmesiyle oluşan DNA-Histon protein kompleksleridir. Bu kompleksler DNA stabilizasyonu ve ekspresyonun düzenlenmesi için kullanılır. Apoptoz bazı endonükleazları aktifleştirebilir ve nükleozomlar linker DNA'dan kesilebilir. Nükleozomlar apoptotik cisimlere salınır ancak bazen bu süreç yarıda kalabilir ve nükleozomlar dolaşıma karışabilir. Bu da cfDNA boyutunun hücre ölüm şekli hakkında bilgi verebileceği anlamına gelmektedir¹⁶². Aktif salınım canlı hücreler tarafından eksozom, mikrovezikül veya virtozomlar gibi yapılar aracılığı ile gerçekleşir¹⁶³. Bu yapılar DNA'nın yolculuk sırasında daha korunaklı bir ortamda olmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu yapıların *in vitro* ortamdaki hücrelerden de salgılandığı gösterilmiştir¹⁶⁴. Literatürde, bu hücre dışı genetik materyallerin metastatik etkisinden tanı ve prognozda kullanımı üzerine yapılan araştırmalara daha çok ulaşılabilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlar Tablo 3.1 içinde gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Deneyler sırasında kullanılmış cihazların listesi.

Laminer hava akım kabini(Nuaire)
PCR cihazı; Thermo-Cycler T-100 (Bio-Rad)
Masaüstü mini santrifüj; Microfuge 16 (Beckman Coulter)
Soğutmalı Santrifüj; Allegra X15-R (Beckman Coulter)
Spektrofotometre; Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)
Işık mikroskobu (Olympus)
Akım sitometresi; FACSCalibur (BD Biosciences)
İnkübatör (Thermo Scientific)
Jel görüntüleme sistemi; UVP (Analytik Jena)
Gerçek zamanlı PCR cihazı; LightCycler 480 II (Roche)
Buz makinesi (Cornelius)
Vorteks karıştırıcı (Scientific Industries, Inc.)
+4°C soğutucu, -20°C ve -80°C dondurucular (Haier, Haier, Samsung)
Otomatik pipet (Axygen, Eppendorf)

Su banyosu (Mettler)

Elektroforez sistemi (Bio-Rad)

3.1.2. Kullanılan Kitler

Deneylerde kullanılan kitler Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Deneyler sırasında kullanılmış kitlerin listesi.

Quick-DNA miniprep Plus Kit (Zymo Research)

Extract-N-Amp Blood PCR Kits (Sigma-Aldrich)

QIAseq cfDNA Extraction Kit (Qiagen)

PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences)

BrdU Flow Kit (BD Biosciences)

Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience)

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Deneyler sırasında kullanılmış kimyasallar Tablo 3.3 içerisinde listelenmiştir.

Tablo 3.3. Deneylerde kullanılmış kimyasal maddelerin listesi.

DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium)

RPMI 1640 (RPMI)

IMDM (Iscoe’s Modified Dulbecco’s Medium)

Fetal sıgır serumu (FBS)

50bp DNA Ladder

Agaroz

Etidyum bromür

Etanol

İzopropanol

Fosfat tampon çözeltisi (PBS)

Nükleaz içermeyen steril su

Dimetil sülfoksit (DMSO)

Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA)

Propidyum İyodür (PI)

Antikorlar (CD106-PE, CD141-PE, CD146-PE, CD309-PE, CD54-PE, CD31-PE, CD142-APC)

3.1.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

MACS solüsyonu

500 ml PBS, %0,5 (7,5 M) BSA, 2Mm (0,5 M) EDTA karıştırıldı ve karışım 0,2µm boyutlu filtreden geçirilerek sterilizasyonu yapıldı.

Propidyum İyodür

10µl Propidyum İyodür 10 ml'ye kadar MACS solüsyonu ile tamalanarak seyreltildi.

1X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA)

50X TAE satın alındı ve bu solüsyondan 10ml çekilerek 490ml dH₂O ile karıştırıldı ve 1X TAE elde edildi.

3.2. Yöntem

Deneylerde kullanılan yöntemler bu bölümde açıklanmıştır.

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücrelerin çoğaltılması için yapılan bu işlemler bütününde aksi belirtilmedikçe inkübasyon için 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ konsantrasyonu kullanılmıştır.

3.2.1.1. Dondurulmuş Hücre Eritme ve Ekme

Kullanılacak hücre, sıvı azot tankından alındıktan sonra 37°C sıcaklıktaki su banyosunda eritilerek hızlı bir şekilde 15ml’lik konik tüpe aktarıldı. Üzerine 10 ml besiyeri eklendikten sonra karıştırıldı ve 2000 rpm hızda 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı; pellet tekrar 7 ml besiyeri ile çözüldü ve tekrar 2000 rpm hızda 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı pellet 5 ml taze medyumda çözülerek T25 flaska ekildi. Medyum hücreden hücreye değişebilmektedir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 Kullanılan hücre hatlarının besiyeri içeriği.

Hücre Hattı	Besiyeri	FBS(%)	Pen/Strep(%)
HUVEC	DMEM	10	1
HEL	RPMI	10	1
K562	IMDM	10	1

3.2.1.2. Hücre Büyütme/Pasajlama

Hücreler ekildikten sonra besiyeri tazelenmesi gerektiğinde medyum tazelenmesi genellikle 2 günde bir şekilde gerçekleşti. Hücreler flask tabanının %80-90’ını kapladığında pasajlama yapıldı. Pasajlama sonrası hücrelerin miktarına bağlı olarak flask sayısı artırıldı veya T75 flaska geçildi. Pasajlama için flastaki medyum çekilip PBS ile yıkama yapıldıktan sonra tripsin/EDTA eklenerek inkübatörde 5dk inkübe edildi. İnkübatörden alınan flastlara Tripsin/EDTA miktarının 3 katı taze medyum eklendi ve toplanan hücreler hacme bağlı olarak 15ml veya 50ml konik tüplere aktarılıp 2000 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet halindeki hücreler 5ml veya 12ml besiyeri ile çözülüp sırasıyla T25 veya T75 flaska aktarıldı.

HEL hücre hattı için RPMI (%10 FBS, %1 Pen/Strep), K562 hücre hattı için IMDM (%10 FBS, %1 Pen/Strep) besiyeri kullanıldı. Ekildikten sonra her 2 günde medya değiştirildi. Medya değişimi, hücrelerin içinde bulunduğu eski medyanın çekilip 15ml konik tüpe aktarılması ve bunu takiben 2000 rpm’de 5dk santrifüj yapıp süpernatantın uzaklaştırılması ve pellet halindeki hücrelerin taze besiyerinde çözülüp yeni flaska ekilmesiyle gerçekleştirildi. Hücre sayısına bağlı olarak flask boyutu artırıldı veya flask sayısı artırıldı. T25 flask için 5ml besiyeri, T75 flask için 12ml besiyeri kullanıldı.

3.2.1.3. Hücre Dondurma

Hücre miktarının fazla artışıyla hücreler donduruldu. Dondurma işlemi HUVEC için şu şekilde gerçekleştirildi: Flasktaki hücreler tripsin/EDTA ile muamele edilerek kaldırıldı. Toplanan hücrelere tripsin/EDTA hacminin 2-3 katı kadar DMEM besiyeri eklendi. 15ml veya 50ml konik tüpe aktarılıp 2000 rpm’de 5dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 5ml PBS ile çözüldü. Hücre sayımı yapıldı. Tekrar santrifüj yapıp süpernatant uzaklaştırıldı. Dondurmak için gerekli iki medya hazırlandı. Birinci medyum %80 DMEM %20 FBS şeklinde hazırlandı ve santrifüj sonrası hücreler bu medyuma çözüldü. İkinci medyum (dondurma medyum) ise %80 FBS %20 DMSO şeklinde hazırlandı ve hazırlandıktan sonra buzda en az 20dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 1:1 olacak şekilde hazırlanan medya karıştırıldı. Dondurma medyum damla damla şekilde hücrelerin çözüldüğü medyuma eklendi. Karışım dondurma tüplerine aktarıldı. Tüpler 2 gece -80°C’de bekletildikten sonra sıvı azota kaldırıldı. HEL ve SET-2 hücreleri için ise şu şekilde gerçekleştirildi: Flasktan sıvı konik tüpe aktarıldı; tüpler 2000rpm’de 5dk santrifüj edildi; süpernatant uzaklaştırıldı pellet PBS’te çözüldü ve sayıl yapıldı. Sayım sonrası yeniden santrifüj yapıp süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet %80 RPMI+%20 FBS içeren medyuma çözüldü. Dondurma medyum (%80 FBS %20 DMSO) hazırlanıp en az 20dk buzda inkübe edildikten sonra hücrelerin çözüldüğü medyuma 1:1 oranı olacak şekilde damla damla eklendi. Karışım dondurma tüplerine aktarıldı; 2 gece -80°C’de bekletildikten sonra sıvı azota kaldırıldı.

3.2.1.4. Hücre Sayımı

Hücre sayımı yapmak için toplanan hücreler santrifüj yapılarak (2000rpm 5dk) pellet haline getirildi. Süpernatant uzaklaştırılıp 5ml PBS’te pellet çözüldü. Boş mikrosantrifüj tüplerine 90µl PBS eklendi. İlk tüpe hücrelerin çözüldüğü PBS’ten 10µl aktarıldı. Sonrasında gereken miktar kadar seri dilüsyon yapıldı. Son tüpten 10µl karışım alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 10µl tripan mavisi boya eklenerek karıştırıldı. Karışımdan 10µl çekilerek hemasitometreye yüklendi ve hücre sayısı hesaplandı (Denklem 3.1).

Denklem 3.1. Hücre sayılarını teorik olarak hesaplandı.

$$\text{Mikrosantrifüjdeki Hücre Sayısı} = \frac{\text{Sayılan hücre}}{5} * 10^{\text{dillüsyon miktarı}} * 10^4 * 2$$

Bu hesaplama yapılırken sayılan hücre sayımın yapıldığı bölme sayısına (5) bölünerek ortalama alınır. Hazırlık sırasında yapılan dilüsyon miktarı işleme dahil edilir. Hemasitometrenin kendi sabiti de işleme dahil edilir. Son olarak boya ile seyreltme oranı (2) da dahil edilerek hesap yapılır.

3.2.2. Serum Toplama

Hücre kültüründe, hücrelerin kullanmış olduğu atık durumundaki besiyeri içindeki hücre dışı genetik materyallerin kullanılması için mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. İçindeki hücre dışı genetik materyal miktarının artması için besiyeri tazeleme işlemi bazen 72. ve 96. Saatlerde gerçekleştirildi. Bu toplanan kullanılmış besiyeri serum olarak isimlendirildi.

3.2.3. Serumdan DNA İzolasyonu

Toplanan serumlardan DNA izolasyonu için iki farklı kit kullanıldı. Bu iki kitten biri *QIAseq cfDNA Extraction Kit* (Qiagen) cfDNA izolasyonu için özel olarak üretilmiş bir kittir; ancak bunun dışında genomik DNA izolasyonu için üretilmiş olan *Quick-DNA Miniprep Plus Kit* (Zymo Research) kullanıldı. *Quick-DNA Miniprep Plus Kit* araştırmada genomik DNA izolasyonu için de kullanıldığı ve o bölümde anlatılacağı için bu bölümde sadece örnek farklılığından kaynaklanan değişiklik belirtilecektir. *Quick-DNA Miniprep Plus Kit* için üreticinin önerdiği protokol kullanıldı. Belirtilen bu protokolde, kullanılacak örnek 200µl PBS’de çözülür. Bu nedenle biz de 200µl serum ile çalışmaya başladık ve önerilen protokole uygun olarak devam ettik. Diğer kit için de üreticinin önerdiği protokol takip edildi. Başlamadan önce ileride kullanmak için inkübatör 60°C, kuru blok ısıtıcı 56°C sıcaklığa ayarlandı. Hazırlık yapıldıktan sonra 500µl Proteinaz K 50ml’lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 5 ml serum eklendi. Karışımın üzerine 4 ml *ACL Buffer* eklendi ve 30 saniye vorteks yardımıyla homojen bir karışım haline getirildi. Bu işlemten sonra santrifüj tüpü 60°C’de 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyondan sonra lizatın içine 9 ml *ACB Buffer*’ı eklendi ve 15-30 saniye vorteks ile karıştırıldı. Bu karışım 5 dakika buzda bekletildi. *QIAamp Mini* kolon vacum sistemine yerleştirildi ve üzerine hacim 20 ml’lik hacim genişletici tüp yerleştirildi. Karışım buzdan alındıktan sonra kolona döküldü. Vakum çalıştırıldı ve karışımın kolondan tamamen geçmesi sağlandı. Karışımın tamamı geçince vakum durduruldu. Kolona 600µl *ACW1 Buffer* uygulanarak ilk yıkama işlemi gerçekleştirildi. Vakum çalıştırıldı ve tüm solüsyonun kolondan geçmesi sağlandı; sonrasında vakum tekrar

kapatıldı. İkinci yıkama için 750µl ACW2 *Buffer* kolona eklendi ve vakum çalıştırıldı. Tüm çözelti geçince vakum kapatıldı. Kolona 750µl etanol (%96-100) eklendi; vakum çalıştırıldı; çözelti geçince vakum kapatıldı. Kolon temiz toplama tüpüne yerleştirildi ve en yüksek hızda 3 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi; kolonun kapağı açılarak 56°C sıcaklıktaki blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kolon mikro santrifüj tüpüne aktarıldı ve kolon membranının üzerine 40-60 µl *AVE Buffer* eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrasında en yüksek hızda 1 dakika santrifüj yapıldı ve böylece serumdan DNA elde edildi.

3.2.4. Allel Spesifik Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ASN-PCR)

ASN-PCR iki aşamalı olarak tamamlanan bir PCR yöntemidir. JAK2V617F mutasyonunun allel düzeyindeki durumunun analizi hedeflendi. Bunun için ASN-PCR'ın ilk adımında JAK2 geninde mutasyon bölgesini geniş bir alanda hedefleyen iki farklı primer kullanıldı. Biri “forward” diğeri “reverse” dizi için dizayn edilmiş olan primerlerin sekansları sırasıyla P1 5'- GAT CTC CAT ATT CCA GGC TTA CAC A-3' ve P1r 5'-TAT TGT TTG GGC ATT GTA ACC TTC T-3' şeklindedir. Bu adım sonunda oluşan PCR ürünü 512bç uzunluğundadır. Mutasyon ayırımını sağlayan ikinci adımda ise 4 farklı primer kullanıldı. Bu primerler mutant veya yabanıl tip diziyi “forward” veya “reverse” olarak hedeflemektedir. Bu primerler P2 5'- CCT CAG AAC GTT GAT GGC A-3', P2r 5'-ATT GCT TTC CTT TTT CAC AAG A-3', Pnf 5'-AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATG-3', Pmr 5'- GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA AAA-3' şeklindedir. Bu adım sonunda iki çeşit PCR ürünü oluşabilir; bunlar 279bç uzunluğundaki mutasyon taşıyan JAK2 gen parçası ve 229bç uzunluğundaki yabanıl tip JAK2 gen parçasıdır. Bu ürünlerin ikili kombinasyonları elde edilen DNA'nın mutasyon durumu hakkında (yabanıl tip, monoallel, biallel) bilgi vermektedir.

Tablo 3.5. Allel Spesifik Nested-PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Birinci adım		İkinci adım	
Mix	10µl	Mix	10µl
Primerler	1µl	Primerler	0,8µl
dH ₂ O	6µl	dH ₂ O	4,8µl

DNA	2µl	DNA	2µl
Toplam	20µl	Toplam	20µl

İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları ilk adım için başlangıç miktarı yaklaşık 20 ng/µl olacak şekilde hesaplandı. Son hacim 20µl olacak şekilde DNA hacmi arttırılıp dH₂O miktarı azaltıldı. Birinci adım öncesi DNA miktarları normalize edildiği için ikinci adımda tabloda verilen değerler değiştirilmeden kullanıldı (Tablo 3.5).

Hazırlanan solüsyon PCR cihazına verildi ve her iki adım için ayrı ayarlanmış program kullanılarak işlem tamamlandı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Allel Spesifik Nested-PCR adımları.

	Birinci Adım	İkinci Adım
	94 °C 1 dakika	94 °C 1 dakika
	95 °C 30 saniye	95 °C 30 saniye
34x	60 °C 30 saniye	59 °C 25 saniye
	72 °C 30 saniye	72 °C 25 saniye
	72 °C 2 dakika	72 °C 2 dakika
	6 °C Sonsuz	6 °C Sonsuz

3.2.5. *BCR-ABL1* Genomik DNA(gDNA) PCR

Hücreleri *BCR-ABL1* mutasyonunun genomda bulunması durumu üzerine analiz yapmak için PCR yöntemi kullanıldı. Bunun için iki adet primer kullanıldı İleri yönlü primer sekansı 5'-TCCACTCAGCCACTGGATTTAAGCA geri yönlü primer sekansı 5'-GGTGAATTGGAAAGAAGCAGCAAGGT şeklindedir ve PCR ürünü 418bp uzunluktadır¹⁶⁵. Cihaz 94°C sıcaklıkta 5 dakika inkübasyon sonrasında 40 döngü sırasıyla 94°C'de 30 sn, 58°C'de 45 sn ve 72°C'de 45 sn olacak şekilde ayarlandı ve döngü bitimine 6°C sıcaklık sonsuz zamanlama olarak eklendi.

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel görüntüsü için %2 konsantrasyonda agaroz jel hazırlandı. 1g agaroz 50ml 1xTAE içinde mikrodalgada ısıtılarak çözüldü ve 2,5µl Etidyum Bromür eklenerek jel tepsisine döküldü ve kuyu oluşturmak için taraklar yerleştirildi. Jel donduktan sonra

elektroforez tankına alınarak tank gerekli hacimde yürütme tamponu olarak 1xTAE ile dolduruldu. İlk kuyuya 4,5 µl DNA 50bp Ladder yüklendi. Sonraki kuyulara 6,5µl örnek 2,5µl boya ile karıştırılarak yüklendi. 75 voltta 40-45dk yürütüldü. Görüntüleme cihazı ile görüntü alındı.

3.2.7. Transfeksiyon

96-kuyulu platelere 10^3 hücre/kuyu olacak şekilde HUVEC hücreleri ekildi. Ekilen hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra kuyulara 72 saat inkübe edilen HEL/K562 hücre hattından alınan serumdan 20µl eklendi; bunun dışında kontrol oluşturmak amacıyla bir gruba müdahale edilmedi veya temiz medya eklendi. Plateler 48 saat inkübe edildikten sonra hücreler toplandı. Bu aşamada fazladan hiçbir uyarıcı kullanılmadı.

3.2.8. Hücre Proliferasyon Analizi

Bu çalışmada xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz sistemi(ACEA Biosciences, Inc.) kullanıldı. Cihazda 96-well e-plate kullanılmaktadır. Bu tabakların farkı elektrik akımı ölçebilmek adına kuyu diplerinde metal kullanılmasıdır. Cihazda program kurulumu için ilk olarak deney ismi girildi ve sonrasında plate düzeni girildi. Düzen belirtildikten sonra çalışma planı oluşturuldu. Çalışma planına eklenen ilk basamak arka plan ölçümü için gerekli ve zorunludur sonrasında yeni bir adım eklendi. Bu adım 25 saat olarak ayarlandı. 1 saatlik aralıklarla ölçüm alınacak 25 saatlik üçüncü bir basamak oluşturuldu. Son basamak 120 saat olarak 1 saatlik aralıklarla veri toplanacak şekilde ayarlandı. Program kurulduktan sonra programı başlatmak için e-plate kuyularına medya eklendi. E-plate cihaza yerleştirildi ve ilk basamak başlatıldı. Bu basamak tamamlanınca e-plate alınıp içine hücre eklendi ve e-plate geri yerleştirilip ikinci basamak başlatıldı. 24 saat sonunda e-plate alındı ve kuyulara serum eklendi; e-plate geri yerleştirildi; yeni basamak başlatıldı. 24 saat sonunda e-plate alındı serumlu medya uzaklaştırılıp taze medya verildi. E-plate cihaza geri yerleştirildi ve son basamak başlatıldı. 120 saat sonunda deney sonlandırıldı.

3.2.9. Hücre Apoptoz Analizi

Transfekte olan hücrelerin apoptoza yöneliminin analizi için yapılan çalışmada *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences) kullanıldı. Analiz için üreticinin protokolü uygulandı. Bunu için inkübasyon sonrasında toplanan hücrelere

100µl *1X Binding Buffer* (10^5 hücre/ml) eklenerek hücreler çözüldü. Çözülen hücrelere 5µl Annexin-PE ve 5µl 7-AAD eklenerek vortekslenerek karıştırıldı. Çözelti 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 400µl *1X Binding Buffer* eklendi ve akım sitometri kullanılarak analiz yapıldı.

3.2.10. gDNA İzolasyonu

Toplanan hücrelerde mutasyon analizi yapabilmek için DNA izolasyonu yapıldı. Bunun için *Quick-DNA Miniprep Plus Kit* (Zymo Research) kullanıldı. Üreticinin önerdiği protokol deneyde takip edildi ve protokolde aksi belirtilmedikçe santrifüj 13,000xg hızda 2 dakika sürmektedir. *Elution Buffer* 65 °C sıcaklıkta daha verimli çalıştığı için ilk olarak solüsyon bu sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Toplanan hücreler 200µl PBS ile çözülür. Çözeltiye 200µl *Biofluid and Cell Buffer* ve 20µl Proteinaz K eklenip karışması için vorteks yapıldı. Çözelti 55°C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında 420µl (1:1 oranında) *Genomic Binding Buffer* eklendi ve vortekslendi. Karışım spin kolona aktarıldı, santrifüj yapıldı ve toplama tüpü değiştirildi. Spin kolona 400µl *DNA Prewash Buffer* eklendi; santrifüj yapıldı ve toplama tüpü değiştirildi. Spin kolona 700µl *gDNA Wash Buffer* eklendi; santrifüj yapıldı ve toplama tüpü değiştirildi. Spin kolona 200µl *gDNA Wash Buffer* eklenip santrifüj yapıldı. Spin kolon mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 60µl *DNA Elution Buffer* eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında en yüksek hızda 1 dakika santrifüj yapıldı ve bu adım *DNA Elution Buffer* eklenmesiyle tekrarlandı. Elde edilen DNA -20° sıcaklıkta saklandı.

3.2.11. RNA İzolasyonu

Transfeksiyon deneyinden sonra toplanan hücrelerden RNA izole etmek için *Total RNA Purification Kit* (Jena Bioscience) kullanıldı. Üreticinin önerdiği protokol kullanıldı ve bu protokolde aksi belirtilmedikçe santrifüj 10,000xg hızda 30 saniye sürmektedir. Bunun için toplanan hücreler 500µl *Lysis Buffer* ile çözüldü ve vorteks uygulandı. Kullanılacak spin kolon üzerine 100µl *Activation Buffer* eklenip santrifüj yapıldı ve toplama tüpü boşaltıldı. Böylece verim arttırıldı. Hücrelerin olduğu solüsyona 300µl izopropanol eklendi ve solüsyon spin kolona aktarılıp santrifüj yapıldı. Spin kolona 350µl *Primary Washing Buffer* eklenip santrifüj yapıldı ve toplama tüpü değiştirildi. Spin kolona 350µl *Secondary Washing Buffer* eklendi ve santrifüj yapıldı. Toplama tüpü boşaltıldı ve ardından spin kolonda kalanları uzaklaştırmak için spin

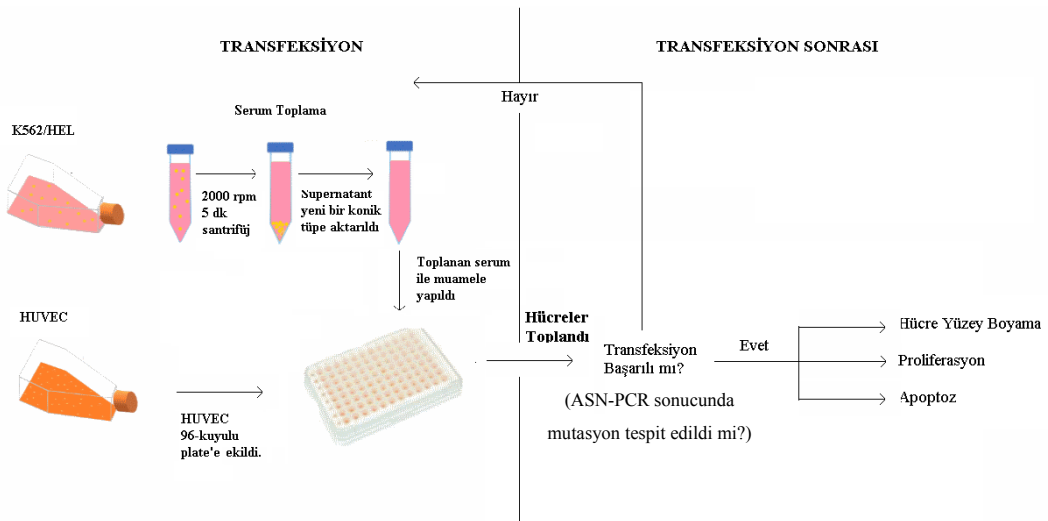
kolona bir şey eklemeyen aynı hızda 2 dakika santrifüj yapıldı. Spin kolon bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Spin kolona 50µl *Elution Buffer* eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 10,000xg hızda 1 dakika santrifüj yapıldı. Elde edilen RNA -20 °C sıcaklıkta saklandı.

3.2.12. Hücre Yüzey Boyama

Transfeksiyon sonrasında hücrelerin bazı önemli yüzey proteinleri hedeflendi ve bu proteinler boyandıktan sonra akım sitometresi ile ölçümler yapıldı. Bunun için ilk olarak çalışmada kullanılacak örnek hücreler toplandı. Hücrelerden her bir boyama grubu için 1×10^5 hücre tüplere ayrıldı. Her tüpe, kullanılacak boyaya göre boyanın üzerinde belirtilen konsantrasyon miktarında boya eklendi (5-10µl). Tüpler 15-30 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüplere 1 ml önceden hazırlanmış MACS solüsyonu eklendi ve 1800 x g hızda santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 500µl MACS ile çözündürülerek akım sitometre ile analiz edildi.

CD106 (VCAM-1), CD141 (trombomodülin), CD146 (MCAM), CD309 (VEGFR2), CD54 (ICAM-1) ve CD31 (PECAM-1) proteinleri fikoeritrin (PE) CD142 (doku fakötrü) ise allofikosiyanin (APC) bağlı antikorlar ile hedeflendi. Antikorlar Biolegend firmasından temin edildi.

Bu tez çalışmasında oluşturmuş olduğumuz deney basamakları şematik olarak gösterilmektedir (Şekil3.1).



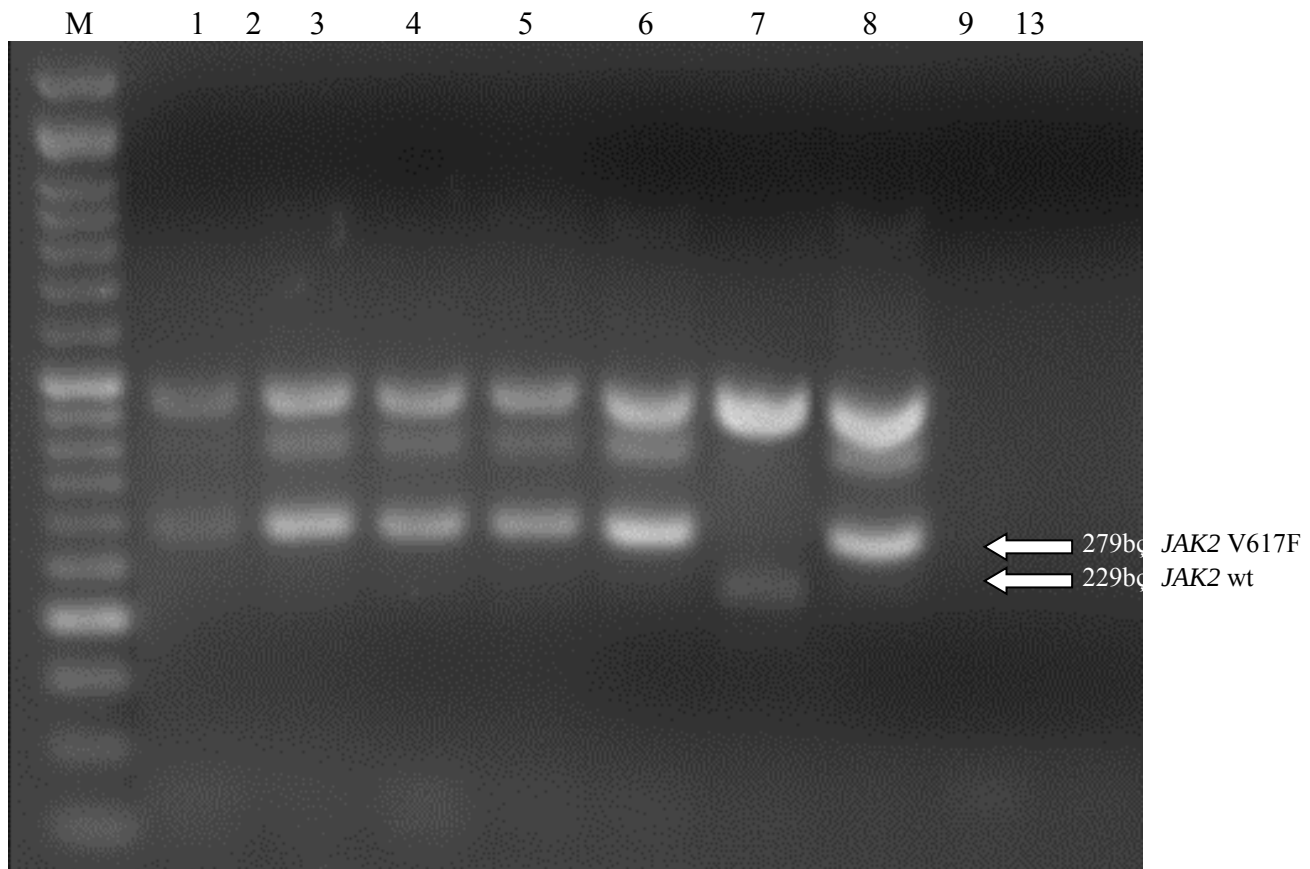
Şekil 3.1. Deneyin dizaynı şematik olarak gösterilmektedir.

4. BULGULAR

4.1. JAK2V617F ve BCR-ABL1 Mutasyon Analizleri

4.1.1. Serumda JAK2V617F Mutasyonu Görüldü

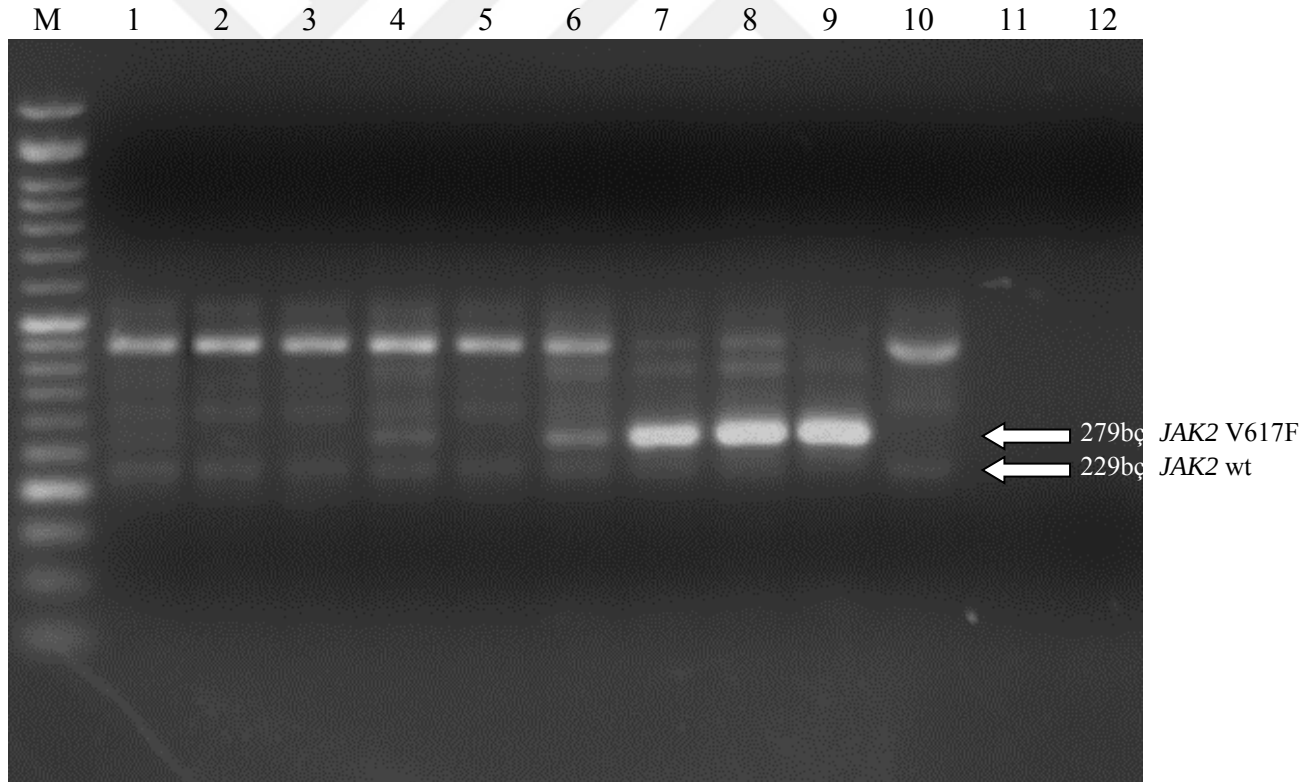
İlk aşamada, JAK2V617F mutasyonunun, hücre dışı olarak HEL hücre serumunda varlığı incelendi. Bunun için öncelikle HEL hücreleri kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücre kültür serumundan DNA izole edilerek Allel Spesifik Nested-PCR yapıldı ve jelde JAK2V617F mutasyonu varlığı tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. HEL hücre serumundan elde edilen DNA için mutasyon analizi. HUVEC'leri muamele etmek için kullanılacak serumlarda mutasyon taşıyan DNA parçaları olduğu tespit edildi. M: DNA Ladder (50bp), 1-5: HEL rastgele toplanan serumunlardan izole edilen DNA'lar, 6: HUVEC gDNA, 7: HEL gDNA, 8: Allel Spesifik Nested-PCR 1.Basamak kontrol 9: Allel Spesifik Nested-PCR 2. Basamak kontrol, wt: yabancı tip.

4.1.2. HEL Serumu İle Muamele Sonucunda Transfekte HUVEC'lerde JAK2V617F Mutasyonu Tespit Edildi

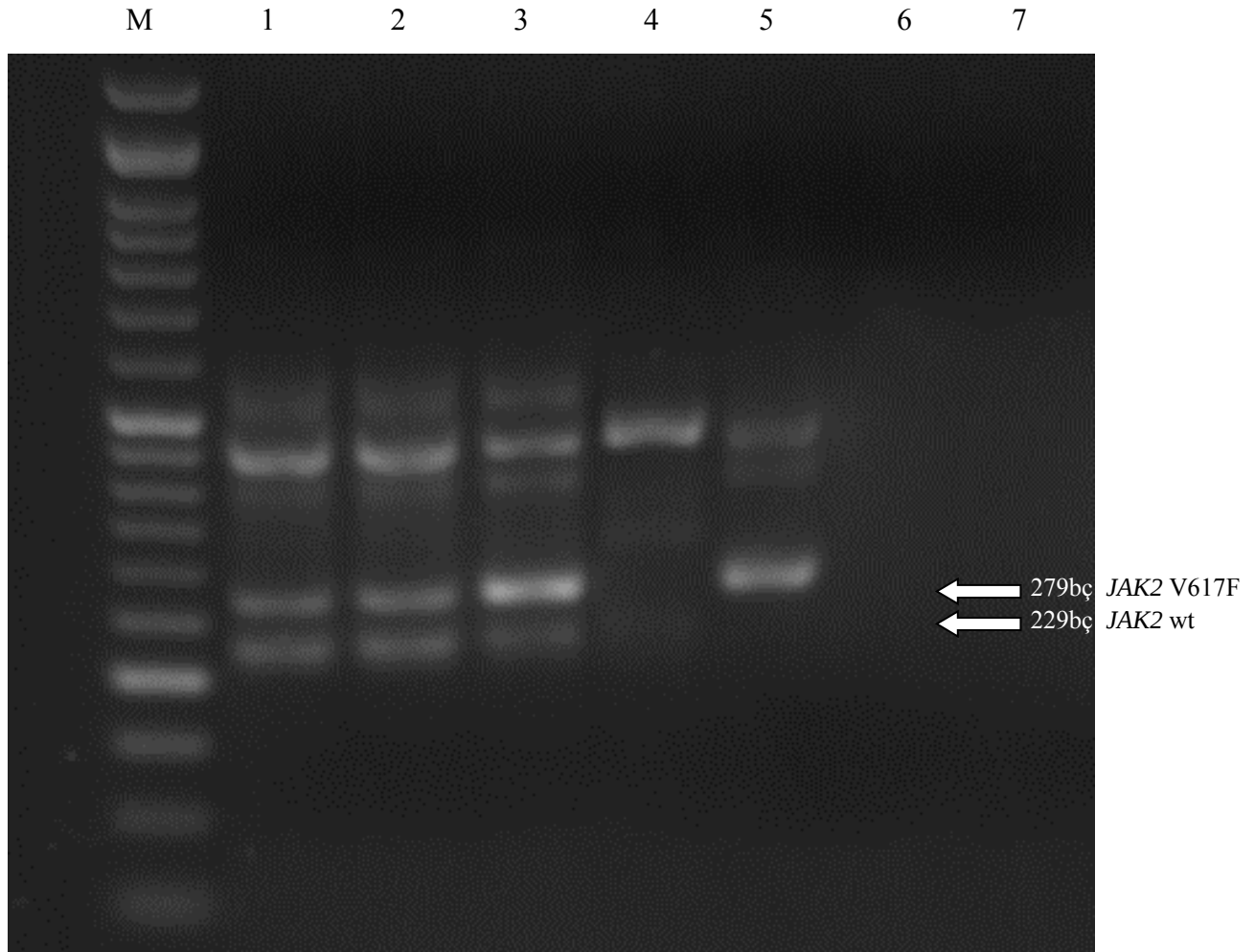
Serumda mutasyonun tespit edilmesi sonucunda bir sonraki aşamaya geçildi. HUVEC JAK2V617F mutasyonu içeren serum ile 24 ve 48 saat muamele edildi. Bu deney ile herhangi bir vektör olmadan (lentivirüs v.b. gibi) serumda bulunan DNA parçalarının HUVEC genomunda tespit ederek *in vitro* ortamda genomastazın ilk adımını gerçekleştirmek hedeflendi. Yapılan deneyler neticesinde 20µl serum ve 48 saat muamele daha verimli olduğu görüldü. Bununla birlikte 24 saatte de transfeksiyonun gerçekleşebileceği ve 10µl serumun da yeterli olabileceği görüldü. Bu aşamada endotel hücrelerin transfekte olabildiği görüldü ve bir sonraki adıma geçildi. Transfekte olan HUVEC (tHUVEC)'ler büyütülerek pasajlama yapıldı. Bununla, bölünmeler sonunda genomdaki değişikliğin kalıcı bir mutasyon olarak hücrede kaldığını görmek hedeflenmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. HEL hücre serumu ile muamele edilen HUVEC'lerin gDNA analizi. ASN-PCR ürünleri elde edildikten sonar jelde yürütüldü ve görüntü alındı. M: DNA Ladder (50bp), 1-2: 10µl HEL serum 24 saat muamele, 3-4: 20µl HEL serum 24 saat muamele, 5-6: 10µl HEL serum 48 saat muamele, 7-8: 20µl HEL serum 48 saat muamele, 9: HEL gDNA, 10: HUVEC gDNA 11: 1. Basamak Negatif Kontrol, 12: 2. Basamak Negatif Kontrol, wt: yabanıl tip.

4.1.3. Pasajlanan tHUVCE Mutasyonu Korumaktadır

Mutasyon taşıyan serum ile muamele edilen HUVCE'lerin gDNA analizinde mutasyona rastlanması bu mutasyonun genoma entegre olup olmadığı sorusunu ortaya koydu. Bunu anlamak için en kolay yol bölünme sonrasında hücrelerde aynı mutasyonun korunmasıdır. Bu nedenle tHUVCE'lerden transfeksiyon sonrasındaki 2. ve 3. pasajdan gDNA izolasyonu gerçekleştirildi ve mutasyon analizi yapıldı. Bu çalışma sonucunda pasajlama sonrasında mutasyonun korunduğu tespit edildi (Şekil 4.3).

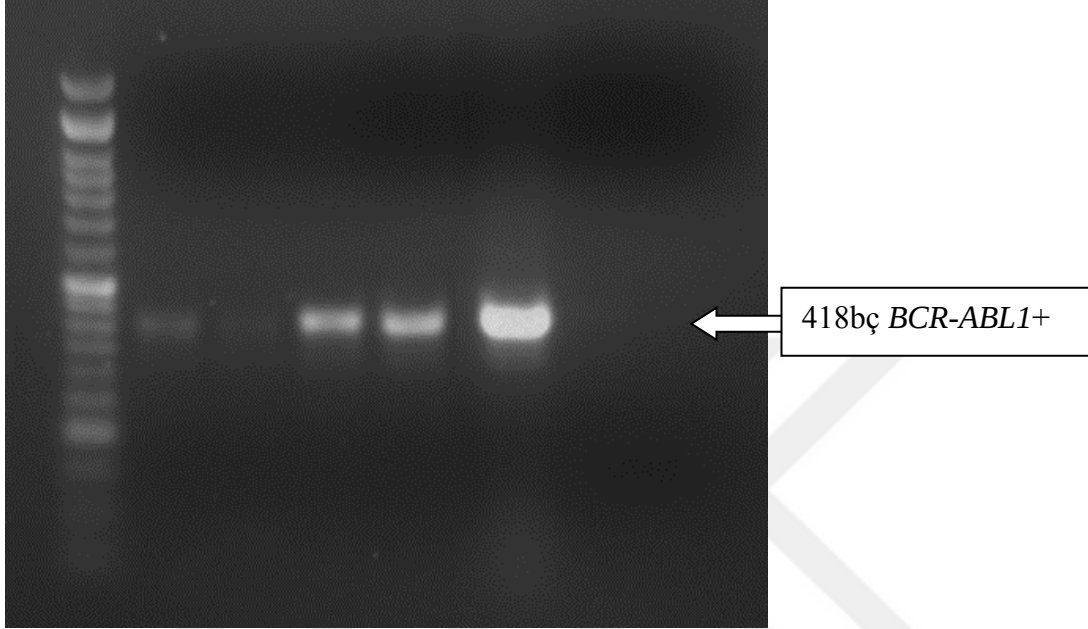


Şekil 4.3. Pasajlanan tHUVCE'lerin gDNA mutasyon analizi. M: DNA Ladder (50bp), 1: tHUVCE ilk pasaj, 2: tHUVCE pasaj 2, 3: tHUVCE pasaj 3, 4: HUVCE gDNA, 5: HEL gDNA, 6-7: ASN-PCR negatif kontroller, wt: yabanıl tip.

4.1.4. Transfeksiyon sonrası HUVCE *BCR-ABL1* pozitif görüldü.

Transfeksiyonun JAK2V617F mutasyonu için HUVCE'lerde boyut açısından veya yapısal olarak özel olup olmadığını HUVCE'leri yapısal ve boyutsal olarak farklı bir mutasyon olan *BCR-ABL1* ile muamele ederek analiz ettik. Bunun için K562 hücre hattı

kullanıldı ve yine önce K562 serumu *BCR-ABL1* mutasyonu için analiz edildi. Sonra HUVEC'ler bu serum ile muamele edildi ve hücrelerin gDNA'sı mutasyon açısından incelendi. Hem serumda hem de hücrelerde görülen mutasyon bantları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *BCR-ABL1* mutasyon analizi için jel görüntüsü. PCR ürünleri elde edildikten sonra jelde yürütülmüştür. Sırasıyla DNA Ladder (50bp), K562 serum DNA örnek#1, örnek#2, transfekte HUVEC gDNA örnek#1, örnek#2, K562 gDNA, HUVEC gDNA, Negatif Kontrol.

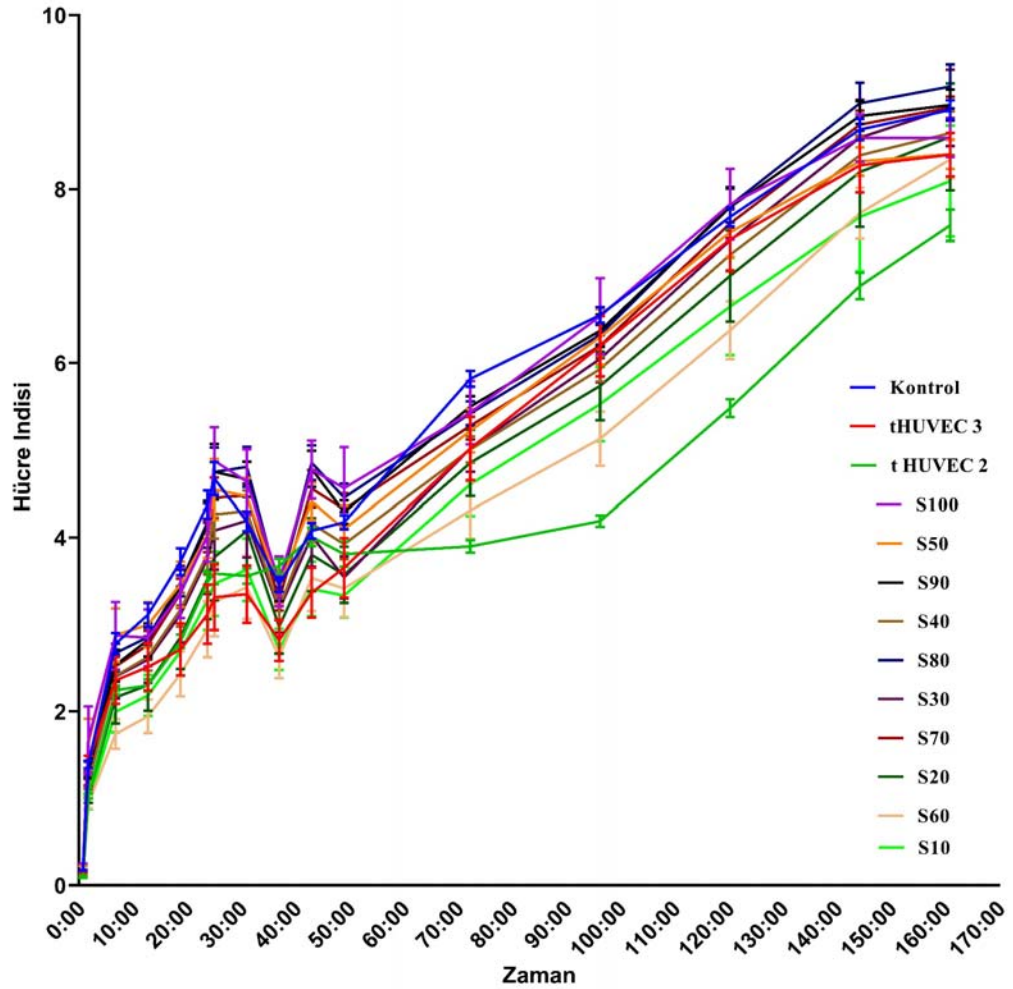
HUVEC'lerin transfeksiyonu gösterildikten sonra fonksiyonel deneylere geçildi.

4.2. Proliferasyon Analiz Sonuçları

HUVEC'ler bir onkogen ile transfekte edildiği ve JAK-STAT yolağının proliferasyona etkisi olduğu bilindiği için HEL serumu ile transfeksiyon sonucunda HUVEC'lerde proliferasyon anlamında bir değişim olup olmadığını incelemek adına bu deney yapıldı. Proliferasyon analizleri için xCELLigence cihazı kullanıldı. Cihazın çalışma prensibi hücre miktarının artmasıyla bozulan elektron akımının ölçümüne dayanmaktadır. Analizler sırasında belirli bir zaman aralığı için cihazın 15 dakikada 1 ölçüm alması için kurulum yapıldı ve o süre zarfında grafikte her örnek için indis değerinde azalma görüldü. Cihazın çalışması için gerekli yazılım aynı zamanda verilerin elde edilmesi için kullanılmaktadır. Bu veriler, istenilen süre boyunca ve istenilen aralıklarla elde edilebilmektedir (bkz. 3.2.8). Veriler yazılım ile excel dosyası olarak dışa aktarılıp R ve *GraphPad* yardımıyla analiz edildi(Şekil 4.5).

Cihazda kullanılan örneklerden transfekte edilmemiş HUVEC referans değeri olarak kullanıldı. HEL serumu ile transfekte edilmiş HUVEC, 2. pasaj (tHUVEC 2) ve HEL serumu ile transfekte edilmiş HUVEC, 3. pasaj (tHUVEC 3) transfeksiyon sonrasında geçen sürenin JAK2V617F mutasyonun proliferasyona etkisini incelemek için kullanıldı. Transfeksiyon süreci hem 2. pasajdan alınan hem de 3. pasajdan alınan örnekler için aynıdır (bkz. 3.2.7).

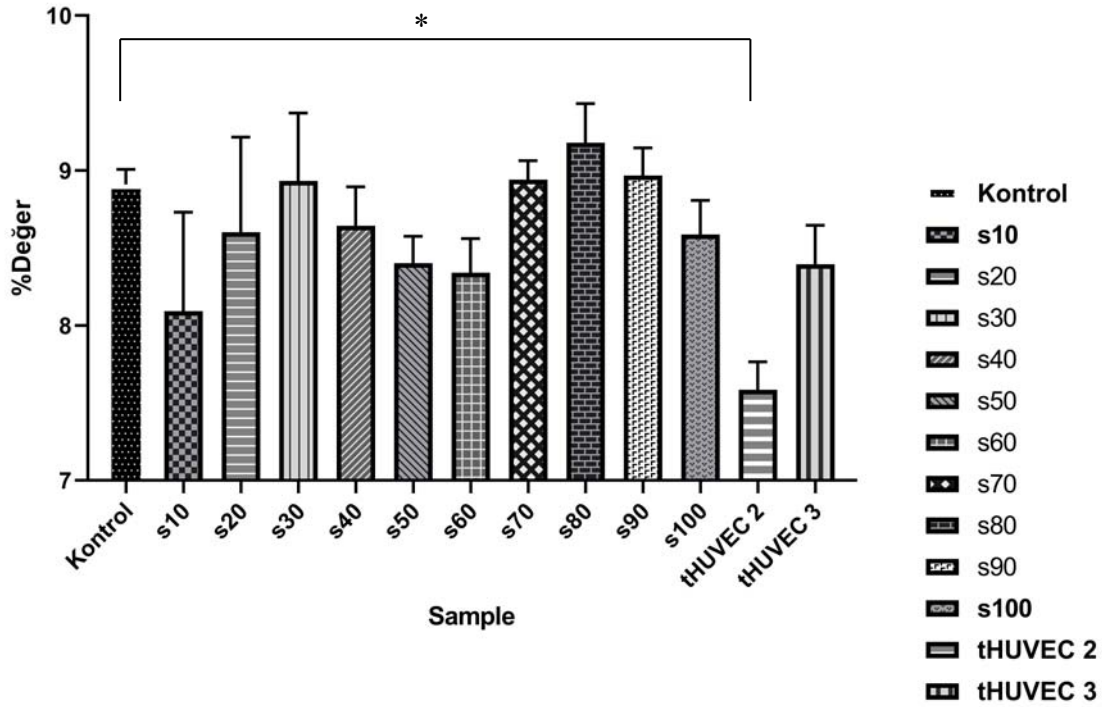
HUVEC'ler 10µl, 20µl, 30µl, 40µl, 50µl, 60µl, 70µl, 80µl, 90µl ve 100µl HEL serumu ile transfekte edildi ve bu örnek grupları serum ve hacmi sembolize edecek şekilde isimlendirildi (Örn.: 10µl serum için S10 ismi). Bu grupların kullanım sebebi farklı hacimlerde kullanılan serumun proliferasyona etkisini incelemek ve etkinliğini ölçmektir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Hücre İndisi-Zaman Grafiği. X-celligence cihazından alınan sonuçlar verilmiştir. Kontrol: HUVEC hücre hattı, tHUVE3: Transfekte edilmiş HUVEC pasaj #3, tHUVEC 2: Transfekte edilmiş HUVEC pasaj #2, S100: 100µl serum, S90: 90µl serum, S80: 80µl serum, S70: 70µl serum, S60: 60µl serum, S50: 50µl serum, S40: 40µl serum, S30: 30µl serum, S20: 20µl serum, S10: 10µl serum.

Bu analizlerde hücre indisinde her grup kendi içinde zamanla anlamlı artış gösterdi($p<0.05$). Farklı serum miktarları arasında 161 saatlik sürede anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.5).

Deneyde alınan son veriler (161. saat), tüm süreci değil son durumdaki hücre miktarını tespit ederek gruplar arasındaki farkı analiz edebilmek için kullanıldı(Şekil 4.6).

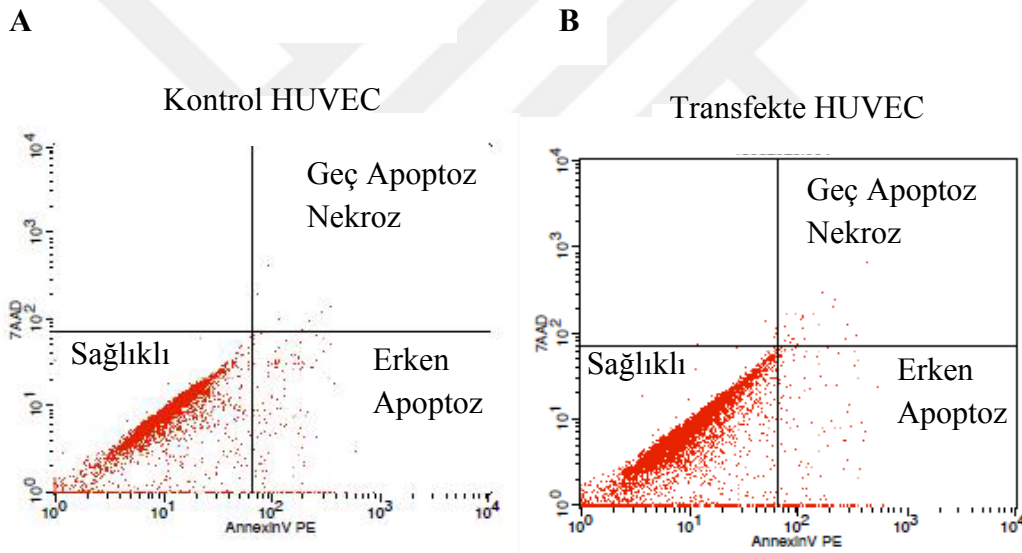


Şekil 4.6. Hücre indisi için 161. saatte alınan verinin sütun grafiği görünümü. Hücre indisinin deney bitiminden önceki son durumu görülmektedir. 161. Saatte değerler alınmıştır. Kontrol: HUVEC, s #: besiyerine # µl hacimde serum eklenen grup, tHUVEC#: # kez pasajlanmış transfecte edilmiş HUVEC (* : $p<0.05$).

Analiz sonuçlarına göre Kontrol ve tHUVEC 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. tHUVEC 2 ile kontrol arasında yapılan t-test anlamlı fark olduğunu göstermiştir($p<0.05$). İstatistiksel analizler 50µl-70µl, 50µl-80µl, 60µl-70µl ve 60µl-80µl serum kullanılan örneklerde anlamlı bir değişim vermiştir($p<0.05$). Analizlerde negatif değerler ve aykırı değerler dışlandı. İstatistiksel yöntem olarak ANOVA ve t-test kullanıldı (Şekil 4.6).

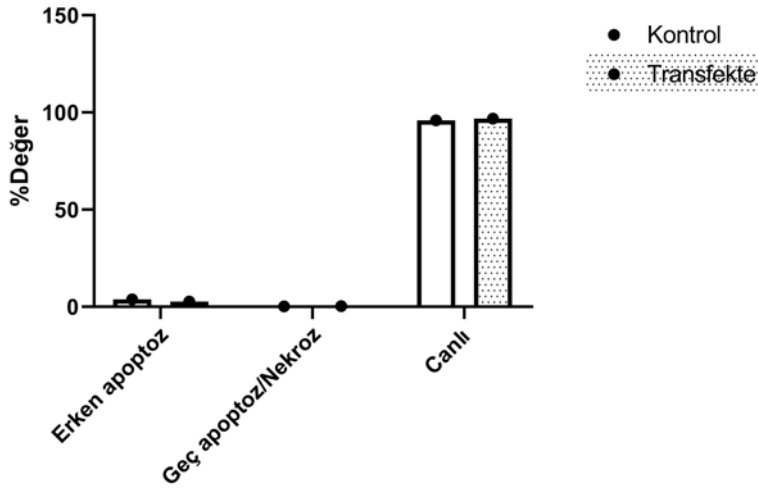
4.3. Apoptoz Analiz Sonuçları

Bu deney ile transfekte olmuş hücrelerde apoptoza yönelim olup olmadığı incelendi. Bunun için anneksin V temelli bir kit kullanıldı. Anneksin V normalde hücre sitoplazmasında bulunan fosfatidilserine bağlanmaktadır; ancak apoptoz durumunda bu moleküller hücrenin dış kısmına geçebilirler bu sayede floresan molekül ile etiketlenen anneksin V molekülü hücreye bağlanarak bu hücrenin erken apoptotik dönemde, geç apoptotik/nekrotik dönemde veya apoptoza gitmediğini gösterebilir¹⁶⁶. Ayrımı yapabilmek adına 7AAD (7-Aminoaktinomisin D) de kullanılır. 7AAD hücre zarından geçemeyen ve DNA ile kuvvetli bağ kurabilen bir moleküldür¹⁶⁷. Bu nedenle 7AAD sinyali parçalanmış hücre zarına veya ortamda ulaşılabilir DNA'ya işaret edebilir. Akım ölçerden alınan grafikte, iki molekülün hücrelerde görülme durumu analiz edilebilmektedir.



Şekil 4.7. Anneksin V – 7AAD boyaması akım sitometrisi. A. HUVEC anneksin V – 7AAD boyaması. B. tHUVEC anneksin V – 7AAD boyaması. UL: Sol üst, UR: Sağ üst, LL: Sol alt, LR: Sağ alt.

Bu dört bölmeli grafik için sağ bölgede bulunan hücrelerde anneksin V tespit edilmektedir ve üst bölgede 7AAD tespit edilmektedir. Sağ-alt bölge erken apoptoz, sağ-üst bölge geç apoptoz/nekroz, sol-alt bölgede sağlıklı hücreler görülmektedir. Transfekte hücrelerde geç apoptoz/nekroz görülme oranı sağlıklı hücreye göre artmış olmakla birlikte erken apoptoz oranı azalmıştır. Fakat yaşayan hücre oranı transfekte hücre grubunda daha fazladır.

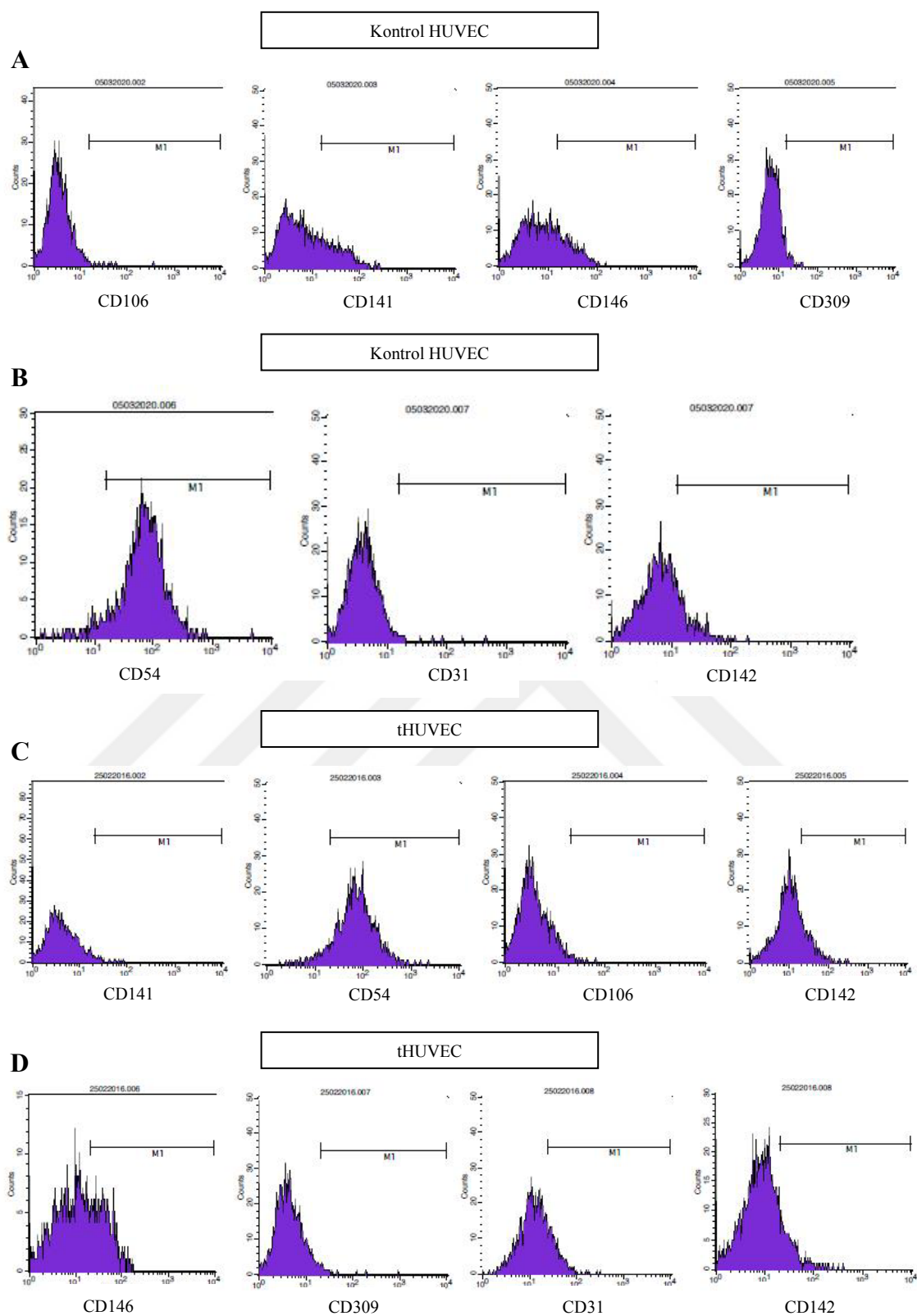


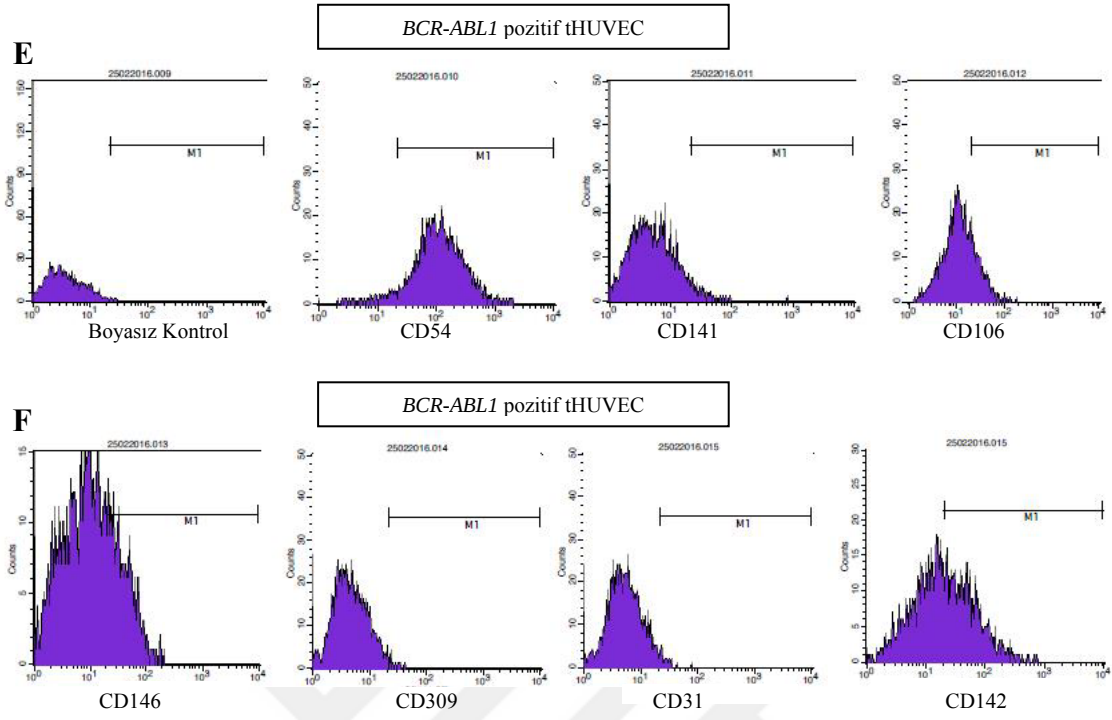
Şekil 4.8. Akım sitometride hesaplanan değerlerin sütun grafiği görünümü.

Transfekte olan hücreler çok az bir oranda apoptozdan kaçmaktadır ancak yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.8) .

4.4. Endotel Hücre Yüzey Protein Değişim Analizleri

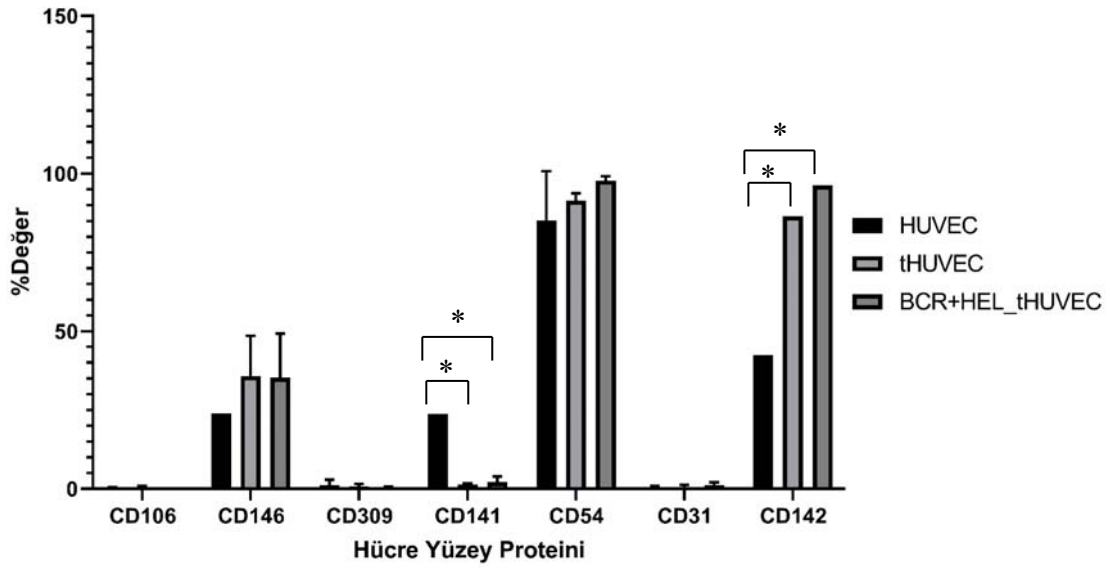
Deneyde EH için önemli bazı hücre yüzey proteinleri analiz edildi. Bu yüzey proteinleri EH markerları olmakla birlikte farklı görevleri bulunmaktadır (Detaylı bilgi için bkz 2.8). Bu deneylerde ayrıca *BCR-ABL1* ve *JAK2V617F* mutasyonlarını bir arada bulunduran hücreler de kullanılmıştır. Bunun sebebi sistemdeki işlev değişikliğine sebep olan bu yüzey proteinlerinin iki mutasyonun aynı anda bulunmasından nasıl etkilendiğini anlamaktır. Bununla birlikte *BCR-ABL1* mutasyonu sonradan oluşturulduğu için nadir de olsa iki mutasyonun ortak birlikteliği için ön veri niteliği de taşımaktadır. Analizler akım ölçer aracılığı ile gerçekleştirildi (Şekil 4.9).





Şekil 4.9. Hücre yüzey proteini boyama akım sitometre analizi. **A.** HUVEC için sırasıyla CD106, CD141, CD146, CD309 boyama histogramları. **B.** HUVEC için sırasıyla CD54, CD31, CD142 boyama histogramları. **C.** tHUVEC için sırasıyla CD141, CD54, CD106, CD142 boyama histogramları. **D.** tHUVEC için sırasıyla CD146, CD309, CD31, CD142 boyama histogramları. **E.** tHUVEC+*BCR-ABL1* pozitif hücreler için sırasıyla boyasız kontrol ve CD54, CD141, CD106 boyama histogramları. **F.** tHUVEC+*BCR-ABL1* pozitif hücreler için sırasıyla CD146, CD309, CD31, CD142 boyama histogramları.

Boyalarda etiket olarak kullanılan florofor maddeler aynı olduğu için tekli boyama yapıldı bu nedenle histogram analizi yeterli oldu. Histogram grafiklerinin altında bulunan analiz sonuçları Graphpad ile birleştirilerek istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Bu sonuçlardan, kapılama yapılan alandaki yüzdesi (%) baz alınarak istatistiksel hesaplama yapıldı.



Şekil 4.10. Hücre yüzey protein boyama analizlerinin sütun grafiğinde gösterilmesi. Bu değerler akım sitometri analizindeki %Gated kısmını göstermektedir. BCR+HEL_tHUVEC: HUVEC hücreleri öncelikle HEL serumu ile transfeke edildikten sonra transfeke olanlar K562 serumu ile de transfeke edilerek iki farklı mutasyonu taşıması sağlandı. tHUVEC: HEL serumu ile transfeke olan hücreler (*: $p < 0.05$).

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda CD142 ve CD141 moleküllerinin HUVEC grubu diğer iki gruba göre anlamlı bir fark gösterdiği görülmektedir; bu farklar sırasıyla azalış ve artış şeklindedir ($p < 0.05$). Bunların dışında CD146 ve CD54 için kontrole göre artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. İki mutasyonu bir arada bulundurmak istatistiksel olarak bir anlam taşımamaktadır (Şekil 4.10).

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, öncelikle MPN hasta EH'de tespit edilmiş olan JAK2V617F mutasyonu veya *BCR-ABL1* füzyon geninin EH'de oluşma mekanizması ile ilgilenmektedir. Bu konuda literatürde farklı çalışmalar bulunmakla birlikte EH'de mutasyonun görülmesini temel olarak EH'ye farklılaşan hemanjiyoblast öncül hücrelerinin halihazırda mutasyonu taşıdığını ve bu nedenle EH'de de bu mutasyonun görülebileceğini savunmaktadır^{5,168}. Ancak, bu tez çalışmasıyla birlikte yeni bir oluşum mekanizması ortaya atılmıştır. Bu mekanizma, ilk olarak 1999 yılında ortaya atılmış olan genomastaz hipotezi ile ilişkilidir. Yukardaki bölümde (bkz. 2.8) açıklandığı üzere genomastaz kavramı kanser yapan bir genin kanser hücresi dışına çıkıp farklı bir bölgedeki hedef hücreye yerleşmesi ve onu kanser hücresine dönüştürmesiyle hastalığın yayılabileceğini savunur⁹. Bu çalışma, MPN hastalarında hastalığa sebep olan JAK2V617F ve/veya *BCR-ABL1* mutasyonlarının hücre dışına atılabileceğini ve bu hücre dışı materyalin bir EH girerek onun davranışının değişmesine sebep olabileceğini kanıtlamayı hedeflemiştir.

İlk olarak, mutasyonları taşıyan hücre hatları büyütülüp serumları toplanıp serumdan DNA izolasyonu yapıldığında, beklenildiği gibi hücre dışı DNA parçalarına rastlandı ve bu DNA parçalarında mutasyonlar da tespit edildi. Literatürde de farklı mutasyonlar in vivo/ in vitro ortamlarda hücre dışı genomik materyal olarak tespit edilmiştir¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Literatürde farklı zamanlarda ve koşullarda gösterilmiş olan bu bulguya ulaştıktan sonra bu genomik materyalin tespit edildiği serum kullanılarak sağlıklı hücre genomunda değişiklik olup olmayacağı araştırıldı. Sonuçlar gösteriyor ki, herhangi bir müdahale olmadan sadece HEL ve/veya K562 hücre hatlarından elde edilen serum, HUVEC besiyerine eklendiğinde HUVEC' te genetik değişiklik gerçekleşebilmektedir. Literatürdeki genomastaz hipotezini destekleyen bu sonuç farklı hastalık gruplarında (kolorektal kanser, karaciğer kanseri, pankreas kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer metastazı vb.) gösterilmiştir^{11,172}. Bununla birlikte transfekte olan hücreler pasajlandı. Burada amaç hücreye giren DNA parçalarının genoma bir şekilde entegre olup olmadığını yorumlamaktır. Pasajlamalar sonrasında gDNA mutasyon analizinde yine mutasyona rastlanması mutasyonun hücre bölünmesi ve çoğalması sırasında kaybolmadığını yani genoma entegre olduğunu göstermektedir. Genom entegrasyonu

literatürde de *in vitro* olarak fare fibroblast hücrelerinde FISH ve yeni nesil dizileme kullanılarak; *in vivo* olaraksa Balb/c farenin kalp, beyin, karaciğer ve akciğer hücrelerinde FISH yöntemi kullanılarak gösterilmiştir¹⁷³.

Çalışmanın ikinci hedefi, mutasyonu alan EH'de davranışsal değişim olup olmayacağını analiz etmektir. Bunun için proliferasyon, apoptoz ve hücre yüzey protein analizleri yapıldı. Proliferasyon analizi için x-celligence cihazı kullanıldı. Hem cihazın analiz yaptığı sırada hücelere farklı hacimlerde HEL serumu ekleme işlemi yapıldı hem de hâlihazırda HEL serumu ile transfekte edilmiş (böylece JAK2V617F mutasyonu taşıyan) 2. ve 3. pasajlardaki hücrelerde analiz gerçekleştirildi. Bununla transfeksiyon sonrasında hücre proliferasyonunda artış olup olmadığı ve serum miktarının proliferasyonu nasıl etkilediği incelenmek istendi. Pasajlanmış transfekte hücrelerde proliferasyon hızında kontrole göre farklılık 2. pasajdan alınan örnek için görülmüşken pasaj 3'ten alınan örnekte görülmedi. Pasaj 2, hem kontrole hem de pasaj 3'e göre daha az proliferasyon gösterdi. Pasaj 3 için kontrole göre azalma olsa da istatistiksel olarak anlamsızdır. Bu, hücrede yaşanan DNA değişimlerinin hücrenin döngüsünü etkileyip sonrasında hücrenin farklı bir döngüye giriş sürecinden kaynaklanabilir. Ancak bu fikrin hatalı olabileceğini gösteren veriler deney sırasında serum eklenen grupların verileridir. Bu gruplar için indis değerinde serum eklendiğinde anlık azalma olsa da kısa bir süre sonra değerler kontrol grubunu yakalamaktadır. Bu da döngü bozulsada hızlıca normale döndüğünü göstermektedir. Anlık azalmanın sebebi ortama eklenen madde ile konsantrasyonlardaki değişim ve bu değişimin cihazın ölçümüne etki etmesi olabilir. Serum verilen gruplarla aynı zamanda kontrol grubuna da besiyeri eklenmiştir ve o grupta da anlık azalma görülmüştür. Yukarıda bahsedilen anlamlı fark Şekil 4.6'da gösterilen 161. saat değerleri için geçerliken Şekil 4.5'te görülen tüm zamanda yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Bu da sürenin yeterince uzun olmamasından kaynaklanabilir. Transfeksiyon çalışmalarımızı 48 saatte sabitledik ve hatta literatürde çok daha kısa sürede bu durumun gerçekleştiğini gösteren çalışmalar olsa dahi, yaklaşık 5 günde mutasyonun hücresel yaşamı etkileyip etkilemeyeceğinden emin değiliz. Yapılan bir çalışmada hücrelerin kanser hasta serumlarıyla muamelesi için 3 hafta kullanılmıştır ve bu çalışmada proliferasyon hızında artış gözlemlenmiştir¹⁷⁴. Çalışmanın süresi uzatılarak daha anlamlı sonuçlar alınabilir.

Kanser hücrelerinin apoptoza karşı direnç kazandığı bilinmektedir; bu nedenle genomuna onkogen yerleştirilen mutant HUVEC hücreleri Anneksin V ve 7AAD boyaları ile apoptoz açısından incelendi. Beklentimiz, mutant HUVEC'lerin canlılık oranının daha yüksek olması ve daha az apoptotik özellik göstermesiydi. Bu çalışmada transfekste HUVEC hücrelerinin nekroz/geç apoptoz oranı biraz daha fazla olsa da toplamda canlılık oranının daha fazla olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, erken apoptoz gösteren hücre oranı kontrollerde daha fazla tespit edildi. Bu sonuçlar hipotetik düşüncemiz ile örtüşse de istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşamadı. Deneylerin tekrar edilmesi ve özellikle transfeksiyon sonrasında geçen sürenin uzatılması daha anlamlı sonuçlar alınmasını sağlayabilir. Transfeksiyon sonucunda bazı hücreler genomik değişiklik sebebiyle strese girmiş olabilir veya inflamasyon oluşmuş olabilir. Nekroz veya geç apoptozun gerçekleşmesi üzerine deneyler tekrarlandıktan sonra bunun altında yatan sebepler üzerine çalışmalar yapılmalıdır. Bunun ötesinde nekroz/apoptozun artışı hücre dışı genomik materyallerin ortama sızmasına sebep olabilir ve bu da döngünün baştan başlamasına sebep olabilir.

Son olarak HUVEC hücreleri yüzey proteinleri açısından incelendi. Bu çalışmada CD106 (VCAM-1), CD141 (trombomodülin), CD146 (MCAM), CD309 (VEGFR2), CD54 (ICAM-1) ve CD31 (PECAM-1) ve CD142 (doku faktörü) proteinleri analiz edildi. Bu proteinler EH için marker proteinlerdir ve EH'in sistemde anjiyogenez, koagülasyon regülasyonu/tromboz, adhezyon, bağışıklık hücrelerinin transmigasyonu gibi önemli görevleri yerine getirmesinde etkilidirler. CD146 bir adezyon molekülüdür ve anjiyogenez, damar geçirgenliği ve lökosit transmigasyonunda etkili bir proteindir¹⁷⁵. Kanser metastatik kapasitesini arttırmak için anjiyogenez büyük bir öneme sahiptir. Yapılan bir çalışmada CD146 hedefleyen bir antikor anjiyogenez ve tümör büyümesini engellediği görülmüştür¹⁷⁶. Bu protein mutant HUVEC'lerde kontrole göre artmıştır ve bu beklenebilir bir sonuçtur ancak istatistiksel olarak anlamlı bir artış değildir. CD141 (trombomodülin) antikoagulan yolakta görev alan bir glikoproteindir. Hastalığın ilerleyişinde tromboz gelişimi çok sık rastlanmaktadır. Trombozun patogenezi etkileyen farklı faktörler vardır^{118,177}. Kan hücre sayısının artışı veya protrombin gen mutasyonları bunlara verilebilecek iki örnektir¹⁷⁸. Bunların dışında JAK2V617F mutasyonu çok kritik bir özelliktir; JAK2V617F mutasyonunun hematolojik hücre hatlarında proliferasyona sebep

olabileceği bilinmektedir. Bu çalışma ile tespit etmiş olduğumuz Trombomodülin proteinlerinde görülen azalma tromboz oluşumunu arttırıcı etki gösterebilir.

CD142 (Doku faktörü) en önemli koagülasyon başlatıcı moleküllerden biridir. Mutasyon taşıyan örneklerde kontrole göre anlamlı bir artış görülmektedir; bunu yanında hem JAK2V617F mutasyonunu hem de *BCR-ABL1* mutasyonlarını birlikte taşıyan grup anlamlı olmasa sadece JAK2V617F mutasyonu taşıyan gruba göre de hafif bir artış göstermiştir. Yapılan bir çalışma da CD142 artışını PV ve ET hastalarının tromboz oluşumunda etkili olabileceğini göstermiştir¹⁷⁹. Bu molekülün artışının sebebi olarak veriye göre mutasyon görülebilir. Fakat bunun dışında CD142 anlatımı için TNF- α , IL-1 β önemli indükleyicilerdir ve IL-8, IL-6, interferon γ , VEGF gibi moleküller de etkili indükleyicilerdir¹⁸⁰. Mutasyonun hücrelerde oluşum sürecinde hücre dışı DNA girdiği hücre içindeki *Interferon Genlerin Stimülatörü* (STING) yolağını uyarıp veya kanser hücrelerinde oluşan mikro çekirdek STING yolağını uyarıp hücrenin bu yolak aracılığıyla IL-6, TNF- α ve INF- α/β üretimini arttırabilir¹⁸¹. STING doğuştan gelen bağışıklık sistemi için önemli bir rol oynar. Hücre içi patojenlerle enfekte olan hücrelerde Tip 1 İnterferon üretimini indükler¹⁸². Dolaylı yoldan CD142 artışı bu şekilde de gerçekleşmiş olabilir.

Yapılan bir çalışma KML'den köken alan eksozomlarla muamele edilen HUVEC'lerde IL8 ve VCAM1 seviyelerinde artış gözlemlenmiştir ve bunun dışında yüksek miktarda mir-21 içeren eksozomlarla muamelesi sonucu HUVEC *RhoB* anlatımı azalmıştır¹⁸³. Başka bir çalışmada yine KML kökenli eksozomlarla muamele olan HUVEC'lerde ICAM1, VCAM1 ve IL8 moleküllerinde artış gözlemlenmiştir ve bununla birlikte EH yüzeyindeki VE-Kaderin ve β -katenin moleküllerinin kaybıyla EH hareketliliğinin artışına sebep olmuştur¹⁸⁴. Ancak bu çalışmada KML hücrelerinden salınan eksozomun EH'yi etkilemesi üzerinde durulmuş *BCR-ABL1* geninin EH'de varlığı ve genoma entegrasyonu irdelenmemiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada *BCR-ABL1* füzyon geni ve JAK2V617F birlikte taşıyan hücrelerde sadece JAK2V617F mutasyonu taşıyan hücrelere göre ICAM-1 (CD54) molekülü için artış görüldü ancak istatistiksel anlamlılık tespit edilememiştir.

Yapılan bu çalışma ile MPN hastalarında rastlanan mutasyon taşıyan EH'in o mutasyonu nasıl geliştirdiğine dair yeni bir yaklaşım ortaya atılarak *in vitro* ortamda bu yaklaşımın potansiyeli gösterilmiştir; ancak *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir.

JAK2V617F mutasyonu taşıyan EH’de anjiyogenez analizleri de yapılmalıdır. Burada tespit edilecek mutasyonla birlikte proliferasyon artışı damarlanmaya yönelebilir. Bunun dışında hücre yüzey boyama analizleri E- ve P-selektin için de gerçekleştirilmeli ve tüm proteinler mRNA seviyesinde de bakılmalıdır. P-selektin hem EH’de hem de plateletlerin üzerinde bulunan bir adezyon molekülüdür. Ligandıyla etkileşime girdikten sonra doku faktörünün, prokoagulan mikropartiküllerin ve çeşitli sitokinlerin ekspresyonunu artırır; böylelikle trombozu destekler^{138,185}. E-selektin ise sadece endotel hücre yüzeyinde bulunan bir proteindir. Özellikle metastazda etkili olduğu düşünülmektedir ve farklı kanser tiplerinde çalışmalar yapılmıştır¹⁸⁶. E-selektin’in ekspresyonunu incelemek belki prognoz açısından faydalı sonuçlar sağlayabilir. Bu çalışmada ise süre ve maddi kaynak yetersizliği nedeniyle gerçekleştirilememiştir.

Bunların dışında, sitozola sızan DNA, STING yollarıyla tanınarak inflamasyon oluşturabilir¹⁸⁷. Aynı etkinin hücre dışı DNA’nın bir hücreye girmesinden sonra da gerçekleşip gerçekleşmediği irdelenmelidir. Çalışmanın hücre dışı genomik materyallerin alt gruplarına göre tekrarlanması bu materyallerin etkisinin detaylandırılması için faydalı olabilir. Bunun için DNaz I hücre dışı DNA’nın sindirilmesini sağlamaktadır ancak eksozom içindeki DNA için etkisi düşüktür¹⁸⁸. Bu da hücre dışı genomik materyallerin alt gruplarının etkisini ayırt etmek için kullanılabilir. In vivo çalışmalarla DNaz I kullanımının EH’ de görülen mutasyonu azaltıp azaltmadığı araştırılmalı ve sonuca göre tedavi çalışmaları yapılmalıdır. Mutasyon oluşturulan EH ile bu hücrelerin trombotik olaylara etkisi incelenerek tedavi için yeni yaklaşımlar geliştirilebilir.

Bu çalışma ile literatürde ilk defa, MPN hastalarının EH’de gözlemlenen onkogenik mutasyonun oluşumuna dair olan açıklamalara ek olarak yetişkinlerde belirtilen mutasyonların genometastaz ile oluşabileceği gösterildi. Bu teorinin hematoloji alanında da bilinirliği artırılarak tanı, prognoz ve tedavi üzerine yapılacak yeni çalışmalarda alana katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Marty, C. *et al.* Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* (2016). doi:10.1182/blood-2015-11-679571
2. Harrison, C. N. & Lee, J. S. Myeloproliferative neoplasms. *Med. (United Kingdom)* **45**, 275–279 (2017).
3. O’Sullivan, J. M. & Harrison, C. N. JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Mol. Cell. Endocrinol.* **451**, 71–79 (2017).
4. Sozer, S. *et al.* The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood* (2009). doi:10.1182/blood-2008-11-191544
5. Gunsilius, E. *et al.* Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* (2000). doi:10.1016/S0140-6736(00)02241-8
6. Yoder, M. C. *et al.* Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. in *Blood* (2007). doi:10.1182/blood-2006-08-043471
7. Fang, B. *et al.* Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood* (2005). doi:10.1182/blood-2004-07-2514
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
9. García-Olmo, D. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomastasis. *Histol. Histopathol.* (1999).
10. García-Olmo, D. & García-Olmo, D. C. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomastasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **945**, 265–75 (2001).
11. Abdouh, M. *et al.* Exosomes isolated from cancer patients’ sera transfer malignant traits and confer the same phenotype of primary tumors to

- oncosuppressor-mutated cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 1–15 (2017).
12. Dominguez, C. *et al.* Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3513
 13. Evan, G. I. & Vousden, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* (2001). doi:10.1038/35077213
 14. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* (2000). doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
 15. Gariglio, P. in *Molecular Oncology Principles and Recent Advances* (2012). doi:10.2174/978160805016111201010064
 16. Knudson, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1971).
 17. Holstege, H. *et al.* High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1 -related breast cancer. *Cancer Res.* (2009). doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3426
 18. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (2010). doi:10.1101/cshperspect.a001008
 19. Welsh, P. L. & King, M. C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics* (2001). doi:10.1093/hmg/10.7.705
 20. Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. & Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* (2011). doi:10.1038/nrc3106
 21. Quintás-Cardama, A. & Cortes, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* (2009). doi:10.1182/blood-2008-03-144790
 22. IARC. *Latest Global Cancer Data, 2018. World Health Organization* (2018).
 23. Ianotto, J. C. *et al.* Characteristics and outcomes of patients with essential thrombocythemia or polycythemia vera diagnosed before 20 years of age: A systematic review. *Haematologica* (2019). doi:10.3324/haematol.2018.200832
 24. Swerdlow, S. H. *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and

- Lymphoid Tissues. Lyon, France. *World Heal. Organ. Classification Tumours Haematop. Lymphoid Tissue* (2017). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
25. Bartram, C. R. *et al.* Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* (1983). doi:10.1038/306277a0
 26. Melo, J. V. & Barnes, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nature Reviews Cancer* (2007). doi:10.1038/nrc2147
 27. Höglund, M., Sandin, F. & Simonsson, B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Annals of Hematology* (2015). doi:10.1007/s00277-015-2314-2
 28. Jabbour, E. J. & Kanterjian, H. CME Information: Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management □ Instructions on Receiving Credit. *Am. J. Hematol.* (2016). doi:10.1002/ajh.34
 29. Savage, D. G., Szydlo, R. M. & Goldman, J. M. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br. J. Haematol.* (1997). doi:10.1046/j.1365-2141.1997.d01-1982.x
 30. Hoffmann, V. S. *et al.* The EUTOS population-based registry: Incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia* (2015). doi:10.1038/leu.2015.73
 31. Cotta, C. V. & Bueso-Ramos, C. E. New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Annals of Diagnostic Pathology* (2007). doi:10.1016/j.anndiagpath.2006.12.002
 32. Melo, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* (1996). doi:10.1182/blood.V88.7.2375.bloodjournal8872375
 33. Asinari, M. B., Zeballos, M., Alicia, S., Ricchi, B. N. & Basquiera, A. L. A case of chronic myeloid leukemia with the m-bcr (p190) molecular rearrangement identified during treatment. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* (2015). doi:10.1016/j.bjhh.2014.07.024
 34. Van Rhee, F. *et al.* p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-

- positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood* (1996). doi:10.1182/blood.v87.12.5213.bloodjournal87125213
35. Druker, B. J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* (2001). doi:10.1056/NEJM200104053441401
 36. Apperley, J. F. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncology* (2007). doi:10.1016/S1470-2045(07)70342-X
 37. Weisberg, E., Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Hochhaus, A. & Griffin, J. D. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nature Reviews Cancer* (2007). doi:10.1038/nrc2126
 38. Farag, S. S. *et al.* Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia treated with interferon-alpha: a Cancer and Leukemia Group B study. *Int. J. Oncol.* (2004). doi:10.3892/ijo.25.1.143
 39. Makishima, H. *et al.* CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2010-06-292433
 40. Soverini, S., De Benedittis, C., Mancini, M. & Martinelli, G. Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* (2015). doi:10.1016/j.clml.2015.02.035
 41. Yong, A. S. M. & Melo, J. V. The impact of gene profiling in chronic myeloid leukaemia. *Best Practice and Research: Clinical Haematology* (2009). doi:10.1016/j.beha.2009.04.002
 42. Kralovics, R. *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* (2005). doi:10.1056/NEJMoa051113
 43. Zhan, H., Ma, Y., Lin, C. H. S. & Kaushansky, K. JAK2 V617F -mutant megakaryocytes contribute to hematopoietic stem/progenitor cell expansion in a model of murine myeloproliferation. *Leukemia* (2016). doi:10.1038/leu.2016.114
 44. Florensa, L. *et al.* JAK2 V617F mutation analysis in different myeloid lineages

- (granulocytes, platelets, CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) in essential thrombocythemia patients [9]. *Leukemia* (2006). doi:10.1038/sj.leu.2404341
45. McMullin, M. F. *et al.* Amendment to the guideline for diagnosis and investigation of polycythaemia/erythrocytosis [6]. *British Journal of Haematology* (2007). doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06741.x
 46. Miller, R. L., Purvis, J. D. & Weick, J. K. Familial polycythemia vera. *Cleve. Clin. J. Med.* (1989). doi:10.3949/ccjm.56.8.813
 47. Caldwell, G. G., Kelley, D. B., Heath, C. W. & Zack, M. Polycythemia Vera Among Participants of a Nuclear Weapons Test. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* (1984). doi:10.1001/jama.1984.03350050050026
 48. Marchioli, R. *et al.* Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J. Clin. Oncol.* (2005). doi:10.1200/JCO.2005.07.062
 49. Finazzi, G. *et al.* Acute leukemia in polycythemia vera: An analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood* (2005). doi:10.1182/blood-2004-09-3426
 50. Passamonti, F. *et al.* Leukemic transformation of polycythemia vera: A single center study of 23 patients. *Cancer* (2005). doi:10.1002/cncr.21297
 51. Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. A unique activating mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* (2005). doi:10.1182/asheducation-2005.1.195
 52. Lakey, M. A. *et al.* Bone marrow morphologic features in polycythemia vera with JAK2 exon 12 mutations. *Am. J. Clin. Pathol.* (2010). doi:10.1309/AJCP3Z2AKUWRGTNM
 53. Hussein, K. *et al.* Chronic myeloproliferative diseases with concurrent BCR-ABL junction and JAK2V617F mutation. *Leukemia* (2008). doi:10.1038/sj.leu.2404993
 54. Pingali, S. R. K., Mathiason, M., Lovrich, S. & Go, R. Emergence of chronic myelogenous leukemia from a background of myeloproliferative disorder: JAK2V617F as a potential risk factor for BCR-ABL translocation. *Clin.*

- Lymphoma Myeloma* (2009). doi:10.3816/CLM.2009.n.080
55. Andrieux, J. L. & Demory, J. L. Karyotype and molecular cytogenetic studies in polycythemia vera. *Current hematology reports* (2005).
 56. Sever, M. *et al.* Significance of cytogenetic abnormalities in patients with polycythemia vera. *Leuk. Lymphoma* (2013). doi:10.3109/10428194.2013.784970
 57. Mesa, R. A. *et al.* Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and. *Leuk. Res.* (2007). doi:10.1016/j.leukres.2006.12.002
 58. Cervantes, F. & Barosi, G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: Diagnosis, prognostic factors, and staging. *Semin. Oncol.* (2005). doi:10.1053/j.seminoncol.2005.04.011
 59. Tefferi, A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* (2010). doi:10.1038/leu.2010.69
 60. Tefferi, A. & Vainchenker, W. Myeloproliferative neoplasms: Molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *Journal of Clinical Oncology* (2011). doi:10.1200/JCO.2010.29.8711
 61. Tefferi, A. *et al.* Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* (2014). doi:10.1182/blood-2014-05-579136
 62. Milosevic Feenstra, J. D. *et al.* Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* (2016). doi:10.1182/blood-2015-07-661835
 63. Pardanani, A. D. *et al.* MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood* (2006). doi:10.1182/blood-2006-04-018879
 64. Dingli, D. *et al.* Der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3): A specific cytogenetic abnormality

- in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol.* (2005). doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05593.x
65. Reilly, J. T. Cytogenetic and molecular genetic aspects of idiopathic myelofibrosis. *Acta Haematologica* (2002). doi:10.1159/000064708
 66. Tefferi, A. *et al.* Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol.* (2001). doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02796.x
 67. Tefferi, A. & Pardanani, A. Essential thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* (2019). doi:10.1056/NEJMcp1816082
 68. Jones, A. V. *et al.* Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* (2005). doi:10.1182/blood-2005-03-1320
 69. Murphy, S., Peterson, P., Iland, H. & Laszlo, J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: A final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin. Hematol.* (1997).
 70. Menezes, J. & Cigudosa, J. C. Chronic neutrophilic leukemia: A clinical perspective. *OncoTargets and Therapy* (2015). doi:10.2147/OTT.S49688
 71. Weide, R. *et al.* Chronic eosinophilic leukaemia (CEL): A distinct myeloproliferative disease. *Br. J. Haematol. Suppl.* (1997). doi:10.1046/j.1365-2141.1997.d01-1991.x
 72. Li, Y., Zhang, Y., Li, X., Yi, S. & Xu, J. Gain-of-Function Mutations: An Emerging Advantage for Cancer Biology. *Trends in Biochemical Sciences* (2019). doi:10.1016/j.tibs.2019.03.009
 73. Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Druker, B. J. & Talpaz, M. Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Annals of Internal Medicine* (2003). doi:10.7326/0003-4819-138-10-200305200-00010
 74. Greuber, E. K., Smith-Pearson, P., Wang, J. & Pendergast, A. M. Role of ABL family kinases in cancer: From leukaemia to solid tumours. *Nature Reviews Cancer* (2013). doi:10.1038/nrc3563

75. Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature Reviews Cancer* (2005). doi:10.1038/nrc1567
76. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* (2005). doi:10.1016/S0140-6736(05)74230-6
77. Imada, K. & Leonard, W. J. The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology* (2000). doi:10.1016/S0161-5890(00)00018-3
78. Stark, G. R. & Darnell, J. E. The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity* (2012). doi:10.1016/j.immuni.2012.03.013
79. Rawlings, J. S., Rosler, K. M. & Harrison, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* (2004). doi:10.1242/jcs.00963
80. Levy, D. E. & Darnell, J. E. STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2002). doi:10.1038/nrm909
81. Murray, P. J. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J. Immunol.* (2007). doi:10.4049/jimmunol.178.5.2623
82. Shuai, K. & Liu, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology* (2003). doi:10.1038/nri1226
83. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* (2005). doi:10.1038/nature03546
84. de Freitas, R. M. & da Costa Maranduba, C. M. Myeloproliferative neoplasms and the JAK/STAT signaling pathway: An overview. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **37**, 348–353 (2015).
85. Passamonti, F. *et al.* Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2010-11-316810
86. Scott, L. M. *et al.* JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* (2007). doi:10.1056/NEJMoa065202
87. Staerk, J. *et al.* An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* (2006).

doi:10.1182/blood-2005-06-2600

88. Pikman, Y. *et al.* MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* (2006). doi:10.1371/journal.pmed.0030270
89. Defour, J. P., Chachoua, I., Pecquet, C. & Constantinescu, S. N. Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: Implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* (2016). doi:10.1038/leu.2015.271
90. Ding, J. *et al.* Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* (2004). doi:10.1182/blood-2003-10-3471
91. Klampfl, T. *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* (2013). doi:10.1056/NEJMoa1311347
92. Chachoua, I. *et al.* Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* (2016). doi:10.1182/blood-2015-11-681932
93. Elf, S. *et al.* Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. *Cancer Discov.* (2016). doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1434
94. Cabagnols, X. *et al.* Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: Relevance for disease evolution. *Leukemia* (2015). doi:10.1038/leu.2014.270
95. Pietra, D. *et al.* Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* (2016). doi:10.1038/leu.2015.277
96. Pardanani, A. *et al.* CSF3R T618I is a highly prevalent and specific mutation in chronic neutrophilic leukemia. *Leukemia* (2013). doi:10.1038/leu.2013.122
97. Rumi, E. & Cazzola, M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* (2017). doi:10.1182/blood-2016-10-695957

98. Cabagnols, X. *et al.* Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood* (2016). doi:10.1182/blood-2015-07-661983
99. Zhang, X. *et al.* DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *Nat. Genet.* (2016). doi:10.1038/ng.3610
100. Stegelmann, F. *et al.* DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* (2011). doi:10.1038/leu.2011.77
101. Ortmann, C. A. *et al.* Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* (2015). doi:10.1056/NEJMoa1412098
102. Grinfeld, J., Nangalia, J. & Green, A. R. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* (2017). doi:10.3324/haematol.2014.113845
103. Abdel-Wahab, O., Tefferi, A. & Levine, R. L. Role of TET2 and ASXL1 Mutations in the Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of North America* (2012). doi:10.1016/j.hoc.2012.07.006
104. Guglielmelli, P. *et al.* EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2011-06-363424
105. Jang, M. A. & Choi, C. W. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean J. Intern. Med.* (2020). doi:10.3904/kjim.2019.317
106. Seyfried, T. N. & Huysentruyt, L. C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* (2013). doi:10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40
107. Yilmaz, M. & Christofori, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Molecular Cancer Research* (2010). doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0139
108. Friedl, P. & Wolf, K. Proteolytic interstitial cell migration: A five-step process. *Cancer and Metastasis Reviews* (2009). doi:10.1007/s10555-008-9174-3
109. Chiang, S. P. H., Cabrera, R. M. & Segall, J. E. Tumor cell intravasation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (2016).

doi:10.1152/ajpccell.00238.2015

110. Ashworth, T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust. Med. J.* (1869). doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03138.x
111. Steeg, P. S. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine* (2006). doi:10.1038/nm1469
112. Bockhorn, M., Jain, R. K. & Munn, L. L. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncology* (2007). doi:10.1016/S1470-2045(07)70140-7
113. Stoleto, K. *et al.* Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J. Cell Sci.* (2010). doi:10.1242/jcs.069443
114. Pantel, K., Alix-Panabières, C. & Riethdorf, S. Cancer micrometastases. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2009). doi:10.1038/nrclinonc.2009.44
115. Aman, J., Weijers, E. M., van Nieuw Amerongen, G. P., Malik, A. B. & van Hinsbergh, V. W. M. Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* (2016). doi:10.1152/ajplung.00393.2015
116. Michiels, C. Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology* (2003). doi:10.1002/jcp.10333
117. Reglero-Real, N., Colom, B., Bodkin, J. V. & Nourshargh, S. Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2016). doi:10.1161/ATVBAHA.116.307610
118. Yau, J. W., Teoh, H. & Verma, S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovascular Disorders* (2015). doi:10.1186/s12872-015-0124-z
119. Cerutti, C. & Ridley, A. J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Experimental Cell Research* (2017). doi:10.1016/j.yexcr.2017.06.003
120. Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H. & Lee, S. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and

- cancer. *International Journal of Molecular Sciences* (2018). doi:10.3390/ijms19041057
121. Dinarello, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* (2002).
 122. Haass, N. K., Smalley, K. S. M., Li, L. & Herlyn, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research* (2005). doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00235.x
 123. Flanagan, K. *et al.* Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0040443
 124. Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes and Cancer* (2011). doi:10.1177/1947601911423031
 125. Miettinen, M., Rikala, M. S., Rys, J., Lasota, J. & Wang, Z. F. Vascular endothelial growth factor receptor 2 as a marker for malignant vascular tumors and mesothelioma: An immunohistochemical study of 262 vascular endothelial and 1640 nonvascular tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* (2012). doi:10.1097/PAS.0b013e318243555b
 126. Lawson, C. & Wolf, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. in *Pharmacological Reports* (2009). doi:10.1016/S1734-1140(09)70004-0
 127. Yang, L. *et al.* ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood* (2005). doi:10.1182/blood-2004-12-4942
 128. Jin, K., Luo, Z., Zhang, B. & Pang, Z. Biomimetic nanoparticles for inflammation targeting. *Acta Pharmaceutica Sinica B* (2018). doi:10.1016/j.apsb.2017.12.002
 129. Glaría, E. & Valledor, A. F. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells* (2020). doi:10.3390/cells9010228
 130. Loghmani, H. & Conway, E. M. Exploring traditional and nontraditional roles for

- thrombomodulin. *Blood* (2018). doi:10.1182/blood-2017-12-768994
131. Witkowski, M., Landmesser, U. & Rauch, U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends in Cardiovascular Medicine* (2016). doi:10.1016/j.tcm.2015.12.001
 132. Goldin-Lang, P. *et al.* Tissue factor expression pattern in human non-small cell lung cancer tissues indicate increased blood thrombogenicity and tumor metastasis. *Oncol. Rep.* (2008). doi:10.3892/or.20.1.123
 133. Eisenreich, A. *et al.* Regulation of pro-angiogenic tissue factor expression in hypoxia-induced human lung cancer cells. *Oncol. Rep.* (2013). doi:10.3892/or.2013.2413
 134. Boltzen, U. *et al.* Alternatively spliced tissue factor and full-length tissue factor protect cardiomyocytes against TNF- α -induced apoptosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2012). doi:10.1016/j.yjmcc.2012.01.015
 135. Nguyen, D. & Coull, B. M. in *Primer on Cerebrovascular Diseases: Second Edition* (2017). doi:10.1016/B978-0-12-803058-5.00021-7
 136. Etheridge, S. L. *et al.* JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014). doi:10.1073/pnas.1312148111
 137. Cosgrove, M. E. *et al.* Endothelial JAK2V617F Expression Drives Inflammation and Cellular Senescence; New Evidence for the Roles of Endothelial Cells in MPN-Related Clotting Abnormalities? *Blood* (2016). doi:10.1182/blood.v128.22.3134.3134
 138. Guy, A. *et al.* Vascular endothelial cell expression of JAK2 V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. *Haematologica* (2019). doi:10.3324/haematol.2018.195321
 139. Lacaud, G. & Kouskoff, V. Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. *Experimental Hematology* (2017). doi:10.1016/j.exphem.2016.12.009
 140. Majesky, M. W., Landerholm, T. E. & Lu, J. Origins of Endothelial Cells. *J. Vasc. Interv. Radiol.* (1999). doi:10.1016/s1051-0443(99)70148-x

141. The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Contain. Pap. a Biol. Character* (1932). doi:10.1098/rspb.1932.0070
142. Xiong, J. W. Molecular and developmental biology of the hemangioblast. *Developmental Dynamics* (2008). doi:10.1002/dvdy.21542
143. Ciraci, E. *et al.* Adult human circulating CD34-Lin-CD45⁻CD133⁻ cells can differentiate into hematopoietic and endothelial cells. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2010-10-316596
144. Gritz, E. & Hirschi, K. K. Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2016). doi:10.1007/s00018-016-2134-0
145. Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A. & Dieterlen-Lièvre, F. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* (1998).
146. Sugiyama, D. *et al.* Erythropoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells at the prelivar stage. *Blood* (2003). doi:10.1182/blood-2002-09-2799
147. Lancrin, C. *et al.* The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* (2009). doi:10.1038/nature07679
148. Kocana, C. C., Toprak, S. F., Yasa, B., Hekimoglu, H. & Tokdemir, S. S. Cell Free DNA and Genometastasis. *Experimed* (2019). doi:10.26650/experimed.2019.19015
149. Jung, A. & Kirchner, T. Liquid biopsy in tumor genetic diagnosis. *Deutsches Arzteblatt International* (2018). doi:10.3238/arztebl.2018.0169
150. Norton, M. E. *et al.* Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N. Engl. J. Med.* (2015). doi:10.1056/NEJMoa1407349
151. Heitzer, E., Auinger, L. & Speicher, M. R. Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living. *Trends in Molecular Medicine* (2020). doi:10.1016/j.molmed.2020.01.012
152. Gurioli, G. in *Methods in Molecular Biology* (2019). doi:10.1007/978-1-4939-8973-7_10

153. Lehmann-Werman, R. *et al.* Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2016). doi:10.1073/pnas.1519286113
154. Hyun, K. A., Gwak, H., Lee, J., Kwak, B. & Jung, H. Il. Salivary exosome and cell-free DNA for cancer detection. *Micromachines* (2018). doi:10.3390/mi9070340
155. MANDEL, P. & METAIS, P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* (1948).
156. Bendich, A., Wilczok, T. & Borenfreund, E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science* (80-.). (1965). doi:10.1126/science.148.3668.374
157. Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I. & Kunkel, H. G. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* (1966). doi:10.1172/JCI105479
158. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. & Yaros, M. J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res.* (1977).
159. Vasioukhin, V. *et al.* Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* (1994).
160. Sorenson, G. D. *et al.* Soluble Normal and Mutated DNA Sequences from Single-Copy Genes in Human Blood. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (1994).
161. Grunt, M., Hillebrand, T. & Schwarzenbach, H. Clinical relevance of size selection of circulating DNA. *Transl. Cancer Res.* (2018). doi:10.21037/tcr.2017.10.10
162. Mouliere, F. *et al.* High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0023418
163. Gahan, P. B., Anker, P., El Messaoudi, S., Stroun, M. & Thierry, A. R. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 347–376 (2016).
164. Bronkhorst, A. J. *et al.* Characterization of the cell-free DNA released by

- cultured cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* (2016). doi:10.1016/j.bbamcr.2015.10.022
165. Cai, J. *et al.* Transferred BCR/ABL DNA from K562 extracellular vesicles causes chronic myeloid leukemia in immunodeficient mice. *PLoS One* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0105200
 166. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutellingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* (1995). doi:10.1016/0022-1759(95)00072-I
 167. Philpott, N. J. *et al.* The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: Simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* (1996). doi:10.1182/blood.v87.6.2244.bloodjournal8762244
 168. Testa, U., Saulle, E., Castelli, G. & Pelosi, E. Endothelial progenitor cells in hematologic malignancies. *Stem Cell Investigation* (2016). doi:10.21037/sci.2016.06.07
 169. Necula, L. *et al.* Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World J. Gastroenterol.* (2019). doi:10.3748/wjg.v25.i17.2029
 170. Ulz, P. *et al.* Inference of transcription factor binding from cell-free DNA enables tumor subtype prediction and early detection. *Nat. Commun.* (2019). doi:10.1038/s41467-019-12714-4
 171. Nuzzo, P. V. *et al.* Detection of renal cell carcinoma using plasma and urine cell-free DNA methylomes. *Nat. Med.* (2020). doi:10.1038/s41591-020-0933-1
 172. Trejo-Becerril, C. *et al.* Cancer Progression Mediated by Horizontal Gene Transfer in an In Vivo Model. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0052754
 173. Mittra, I. *et al.* Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J. Biosci.* (2015). doi:10.1007/s12038-015-9508-6
 174. Abdouh, M. *et al.* Transfer of malignant trait to immortalized human cells following exposure to human cancer serum. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **33**, 1–12 (2014).

175. Leroyer, A. S. *et al.* CD146 (Cluster of Differentiation 146): An Adhesion Molecule Involved in Vessel Homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2019). doi:10.1161/ATVBAHA.119.312653
176. Yan, X. *et al.* A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. *Blood* (2003). doi:10.1182/blood-2002-04-1004
177. Martin, K. Risk Factors for and Management of MPN-Associated Bleeding and Thrombosis. *Current Hematologic Malignancy Reports* (2017). doi:10.1007/s11899-017-0400-3
178. Arachchillage, D. R. J. & Laffan, M. Pathogenesis and Management of Thrombotic Disease in Myeloproliferative Neoplasms. *Semin. Thromb. Hemost.* (2019). doi:10.1055/s-0039-1693477
179. B., R. *et al.* Upregulation of tissue factor may contribute to thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* (2018). doi:10.1182/blood-2018-99-117812 LK - http://bc-primo.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/BCL/services_page?&sid=EMBASE&isn=00064971&id=doi:10.1182%2Fblood-2018-99-117812&atitle=Upregulation+of+tissue+factor+may+contribute+to+thrombosis+in+polycythemia+vera+and+essential+thrombocythemia&stitle=Blood&title=Blood&volume=132&issue=&spage=&epage=&aulast=Reeves&aufirst=Brandi&aunit=B.&aufull=Reeves+B.&coden=&isbn=&pages=-&date=2018&auinit1=B&auinitm=
180. Ruf, W. & Riewald, M. in *Molecular Mechanism of Disseminated Intravascular Coagulation* (2003).
181. Wan, D., Jiang, W. & Hao, J. Research Advances in How the cGAS-STING Pathway Controls the Cellular Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology* (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.00615
182. Nakhaei, P., Hiscott, J. & Lin, R. STING-ing the antiviral pathway. *J. Mol. Cell Biol.* (2010). doi:10.1093/jmcb/mjp048
183. Taverna, S. *et al.* Curcumin modulates chronic myelogenous leukemia exosomes composition and affects angiogenic phenotype, via exosomal miR-21. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.8483

184. Taverna, S. *et al.* Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. *Int. J. Cancer* (2012). doi:10.1002/ijc.26217
185. Merten, M. & Thiagarajan, P. P-selectin in arterial thrombosis. *Zeitschrift fur Kardiologie* (2004). doi:10.1007/s00392-004-0146-5
186. Bendas, G. & Borsig, L. Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International Journal of Cell Biology* (2012). doi:10.1155/2012/676731
187. Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T. & Grinshpun, A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology and Therapy* (2019). doi:10.1080/15384047.2019.1598759
188. Thakur, B. K. *et al.* Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* (2014). doi:10.1038/cr.2014.44

HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİ KÖKENLİ HÜCRE DIŞI GENOMİK MATERYALLERİN ENDOTEL HÜCRELERE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

%6	%4	%2	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Selcuk Sozer, Ronald Hoffman. "Chapter 34 Laser-Capture Microdissection and Analysis of Liver Endothelial Cells from Patients with Budd– Chiari Syndrome", Springer Science and Business Media LLC, 2011 Yayın	%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Cemal Çağıl	Soyadı	Koçana
Doğ.Yeri	İzmir	Doğ.Tar.	02/01/1993
Email	cagil.kocana@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	-	-
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2020
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Escola Secundária de Monção	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok İyi		YDS:83,75
Portekizce	İyi	Orta	İyi		
İspanyolca	Orta	Zayıf	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi
R	Zayıf
Python	Zayıf
HTML5/CSS	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Koçana CÇ, Toprak SF, Yaşa B, Hekimoğlu H, Tokdemir SS. Cell Free DNA

and Genometastasis. Experimed 2019; 9(2): 69-74

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

