

# Señales de sobrevida inducidas por el complejo IL-6/IL-6sR en el linaje megacariocítico. Influencia de la mutación JAK2-V617F

C Chazarreta, N Goette, P Lev, J Salim, F Molinas, R Marta



????????

Hematología Investigación, UE IDIM-CONICET, Instituto Lanari, UBA

HEMATOLOGIA, Vol. ? Nº ? : 00-00  
Enero-Abril, 200?

## RESUMEN

La IL-6 actúa a través del receptor de membrana y del soluble (IL-6sR) que confiere sensibilidad a células sin receptor de membrana. Previamente reportamos aumento de IL-6sR en trombocitemia esencial (TE), una neoplasia mieloproliferativa (NM). En este trabajo se evaluó la acción del complejo IL-6/IL-6sR (COMP) comparado con la IL-6 en su capacidad de protección de la apoptosis de progenitores CD34+ normales y de NM y de activación de JAK/STAT en plaquetas normales y de NM. Se evaluó expresión de fosfatidilserina por marcación con anexina V y de caspasa 3 activada en células CD34+ de sangre periférica de NM y de cordón umbilical como control, y activación de JAK2 y STAT3 por western-blot con anticuerpos contra las proteínas fosforiladas y sin fosforilar. En conjunto, los progenitores CD34+ de pacientes y controles tuvieron menos apoptosis con COMP que con IL-6 (activación de caspasa 3  $p=0.001$ , 7 normales, 4 pacientes; expresión de anexina V  $p=0.029$ , 6 normales, 5 pacientes; Rangos señalados Wilcoxon) La activación de JAK2 y STAT3 en plaquetas se evaluó calculando la relación (Rel) de intensidad de la banda de la proteína fosforilada respecto del total estimulada por COMP (RelCOMP) y por TPO (RelTPO), obteniéndose el cociente (R COMP/TPO). Los pacientes JAK2V617F + tuvieron aumento de R COMP/TPO del STAT3, 2.03 (0.45-3.03) (mediana y rango) (n=4), respecto de controles 0.63 (0.014-0.8) (n=5) y pacientes no mutados, 0.75 (0.005-1.12) (n=5) (ANOVA  $p=0.018$ ). La activación de JAK2 siguió una tendencia similar a STAT3 aunque no alcanzó diferencias significativas.

Los resultados sugieren que el COMP es más efectivo que la IL-6 en la protección de la apoptosis de los progenitores CD34+. Esto junto al hallazgo de aumento de IL-6sR en TE, sugerirían que un mayor nivel de IL-6sR

favorece la sobrevida de los progenitores megacariocíticos en NM. La protección ocurriría a través de JAK2 y STAT3 siendo más eficiente en pacientes JAK2V617F+.

## INTRODUCCIÓN

La trombopoyetina (TPO) es la principal citoquina estimulante de la megacariopoyesis. Sin embargo, se han descrito algunos otros factores "TPO independientes" capaces de inducir el desarrollo megacariocítico, entre ellos la interleuquina 6 (IL-6)<sup>1</sup>.

La IL-6 actúa a través de su receptor específico (IL-6Ra) en la membrana de las células blanco que se asocia con una glicoproteína llamada gp130, encargada de la transducción de la señal intracelular. La activación y homodimerización de la gp130 induce fosforilación de Janus quinasas (JAKs), favoreciendo la activación de *signal transducers and activators of transcription* (STATs). Esta ruta de señalización es activada también por TPO y por otras citoquinas que utilizan la gp130 para la transducción de la señal intracelular. Existe además una forma soluble del receptor (IL-6sR) que al unirse a la IL-6 es capaz de desencadenar la transducción de la señal en células que no poseen IL-6R $\alpha$ , como las células endoteliales, y ampliar así el espectro celular sobre el que la IL-6 ejerce su acción. Este mecanismo se denomina transseñalización<sup>2</sup>. El IL-6sR se une a su ligando con afinidad similar al IL-6R $\alpha$ , actuando de manera agonista y siendo capaz de prolongar la vida media de la IL-

6. El mecanismo de trans-señalización a través del IL6sR se encuentra implicado en numerosas patologías en donde actúa facilitando la acción antiapoptótica de la IL6. La activación de las señales intracelulares inducida por IL-6 es de importancia en la producción de progenitores hematopoyéticos inmaduros y comprometidos con el linaje megacariocítico<sup>3</sup>.

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NM) son un grupo de enfermedades que se caracterizan por un aumento de la proliferación de alguno de los linajes mieloides. Así, la policitemia vera (PV) se identifica por una exacerbación de la serie eritroide, la trombocitemia esencial (TE) por un aumento de la serie megacariocítica y la mielofibrosis primaria (MP) por fibrosis medular y desarrollo mielode extramedular<sup>4</sup>. En los últimos años, el descubrimiento de la mutación V617F en la tirosinquinasa JAK2, con diferentes frecuencias en cada una de estas tres entidades, ha puesto en evidencia que son patologías con diferencias fenotípicas pero que comparten ciertas características genéticas. Los factores que determinan el desarrollo de cada uno de estos tres desórdenes no están totalmente dilucidados. La mutación V617F en el dominio autoinhibitorio de la quinasa, induce un aumento de la actividad de la misma, provocando activación constitutiva en líneas celulares<sup>5</sup> y crecimiento independiente de citoquinas *in vitro*<sup>6</sup>.

En un trabajo previo<sup>7</sup> describimos el aumento plasmático del IL-6sR en pacientes con TE. Dada la característica agonista del IL-6sR y la amplia participación de su ligando en la megacariocitopoyesis, en el presente trabajo se evaluó la actividad del complejo IL-6/IL-6sR (COMP) y de la IL-6 por sí sola en la protección de la apoptosis de células progenitoras CD34+ normales y de pacientes con NM, así como la activación de las rutas de señalización JAK/STAT en plaquetas normales y de pacientes con NM portadores de la mutación JAK2V617F y negativos para la misma (JAK2WT).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes y controles

Los pacientes se diagnosticaron de acuerdo a los criterios del PVSG, utilizándose únicamente muestras de pacientes libres de tratamiento. Se estudiaron 15 pacientes, 12 con TE, 2 con PV y uno con MP. Los progenitores hematopoyéticos CD34+ normales se obtuvieron de sangre de cordón umbilical humano de partos a término de embarazadas sin antecedentes de enfermedad hematológica. La recolección de estas muestras se realizó en el Hospital Materno Infantil de San Isidro. Las muestras de plaquetas normales se obtuvieron de individuos sanos que no habían ingerido medicación alguna en los últimos 8 días.

Este proyecto cuenta con la aprobación del comité de ética del Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, y del Hospital Materno Infantil de San Isidro. Tanto pacientes como controles normales firmaron el consentimiento informado correspondiente.

### Muestras biológicas

Progenitores hematopoyéticos CD34 positivos: los progenitores hematopoyéticos CD34+ normales se obtuvieron recogiendo la sangre de cordón umbilical en tubos estériles conteniendo buffer anticoagulante BAC (PBS, 1mM EDTA, 50 U/ml heparina). Los progenitores CD34+ de pacientes con MN se obtuvieron a partir de sangre periférica utilizando el mismo anticoagulante.

Plaquetas: las plaquetas de pacientes y controles normales se obtuvieron de sangre periférica anticoagulada con BAC suplementado con inhibidores de la activación plaquetaria y se aislaron por método convencional. El plasma rico en plaquetas fue filtrado por filtros desleucocitantes (Purecell PL, Pall Biomedical Products, East Hills, NY, USA) para descartar la presencia de glóbulos blancos.

### Purificación de progenitores CD34+

Los progenitores se purificaron por método inmunomagnético de selección positiva miniMACS utilizando un anticuerpo directo anti-CD34 unido a esferas metálicas (Mylteniy Biotec GMBH Alemania).

### Estudios de Apoptosis en células progenitoras CD34+

Activación de caspasa 3 por citometría de flujo: Para este ensayo se hizo proliferar a las células CD34+ cultivándolas por un periodo de 48 hs en medio IMDM suplementado con suero fetal bovino 2%, BSA 1.5%, transferrina saturada de hierro 200 µg/ml, Stem Cell Factor 25 ng/ml, lípidos sonicados, en presencia de penicilina y estreptomina. Después de la proliferación las células fueron lavadas con PBS/BSA/EDTA y cultivadas durante 12 hs en medio condicionado IMDM, deprivado de nutrientes, como base para inducir apoptosis, o bien el mismo medio con el agregado de 100 ng/ml de IL-6 o 100 ng/ml de IL-6 + 200 ng/ml de IL-6sR (citoquinas provenientes de R&D Systems, Minneapolis, USA). Después de este periodo se realizó la marcación de las células progenitoras con CD34 FITC y CD45 PerCP por 30 min. a temperatura ambiente para la selección de la población. Luego las células marcadas fueron lavadas y se procedió a la fijación y permeabilización utilizando un kit comercial (PharMingen TM), para la posterior marcación intracitoplasmática de caspasa

3 activada con un anticuerpo monoclonal unido a PE (Becton Dickinson). Los resultados se expresaron como porcentaje de marcación de caspasa 3 activada en las células expuestas a los distintos tratamientos (IL-6 sola o complejo IL-6 + IL-6sR) respecto a la marcación obtenida en las células cultivadas en IMDM sin el agregado de citoquinas, que fue considerada como el 100% de activación de caspasa 3.

**Expresión de fosfatidilserina:** las células CD34+ purificadas se cultivaron en medio privado de nutrientes como metodología para inducir apoptosis. Los cultivos se realizaron durante 16 hs a 37 °C en medio IMDM sólo y con el agregado de 100 ng/ml de IL-6 o 100 ng/ml de IL-6 + 200 ng/ml de IL-6sR. La concentración celular sembrada fue de 50000 células/well/ml. Pasado el tiempo de incubación las células fueron cosechadas, lavadas e incubadas con Anexina V unida al fluorocromo FITC e yoduro de propidio. La Anexina V se une a la fosfatidilserina que se expone en la cara externa de la membrana plasmática cuando la célula entra en apoptosis, mientras que el yoduro de propidio penetra en las células en las que la integridad de su membrana ha sido alterada, como es el caso de las células necróticas y apoptóticas tardías. Para este estudio se utilizó un kit comercial (Becton-Dickinson, San José, CA, USA) según las recomendaciones del fabricante. Los resultados se expresaron como porcentaje de células apoptóticas totales (apoptosis temprana representada por eventos anexina V positivos, yoduro de propidio negativos, más apoptosis tardía, representada por eventos anexina V positivos, yoduro de propidio positivos).

### Estudio de fosforilación de proteínas plaquetarias

Para el estudio de fosforilación de proteínas, las plaquetas filtradas se ajustaron a  $1.10^6$ /ul. Se estimularon 200 ul de esta suspensión plaquetaria con a) 100 ng/ml IL-6, b) 100 ng/ml IL-6 + 200 ng/ml IL-6sR, c) 100 ng/ml TPO. Las muestras se incubaron 10 minutos a 37°, se lisaron con buffer de lisis M-Per (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) y se agregaron inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las muestras fueron centrifugadas a 4 °C 10 min a 14000 rpm. Las proteínas plaquetarias se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se realizaron western-blots utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas JAK2 y STAT3 fosforiladas y sin fosforilar (Cell Signalling, Beverly, MA y Santa Cruz Biotechnology).

Para evaluar el grado de activación de JAK2 y STAT3 en plaquetas, se calculó la relación (Rel) dividiendo la intensidad de la banda correspondiente al JAK2 o STAT3 fosforilados por la del JAK2 o STAT3

total, tanto en la muestra estimulada con el complejo (RelCOMP) como en la estimulada por TPO (RelTPO) y luego se obtuvo el cociente entre ambas relaciones con el fin de relativizar el grado de fosforilación del complejo respecto a TPO (RelCOMP/RelTPO).

### Estadística

Los resultados se expresaron como mediana y rango. Para la comparación de la expresión de caspasa 3 activada y anexina V con los distintos tratamientos se utilizó el test de rangos señalados de Wilcoxon que compara muestras apareadas. Para analizar si la protección frente a la apoptosis era distinta entre pacientes y controles se utilizó el test de suma de rangos de Wilcoxon. La comparación del grado de activación de JAK2 y STAT3 entre pacientes JAK2V617F, JAK2WT y controles normales se realizó mediante el análisis de varianza.

## RESULTADOS

### Evaluación de la apoptosis de progenitores CD34+

#### Activación de caspasa 3

En conjunto, los progenitores hematopoyéticos de pacientes y controles mostraron una menor activación de caspasa 3 al ser estimulados con el COMP, mediana 82.9%, rango 47.7-103.8%, respecto a la IL-6, 100.0% (76.1-142.0) ( $p=0.001$ ; 7 normales, 4 pacientes). Al compararse los resultados entre pacientes y controles, se observó que no había diferencias en el grado de protección del COMP respecto de la IL-6 entre ambos grupos. En la Fig. 1A se muestran los resultados en el grupo de pacientes y controles normales por separado. En la Fig. 1B se muestra un ejemplo representativo de la activación de caspasa 3 obtenida en presencia del COMP y de IL-6.

#### Expresión de Anexina V

De forma similar a lo observado para caspasa 3 activada, la expresión de anexina V fue menor en las muestras estimuladas con COMP, 40.3% (12.9-83.7), que en aquellas estimuladas con IL-6 sola, 51.4% (22.4-77.3),  $p=0.029$ ; (6 normales y 5 pacientes). Tampoco se observaron diferencias en la respuesta de los pacientes respecto a los controles normales. En la Fig. 2A se muestran los resultados de los pacientes y controles y en el Fig. 2B un ejemplo de la distribución de los eventos anexina V positivos por cito-metría de flujo.

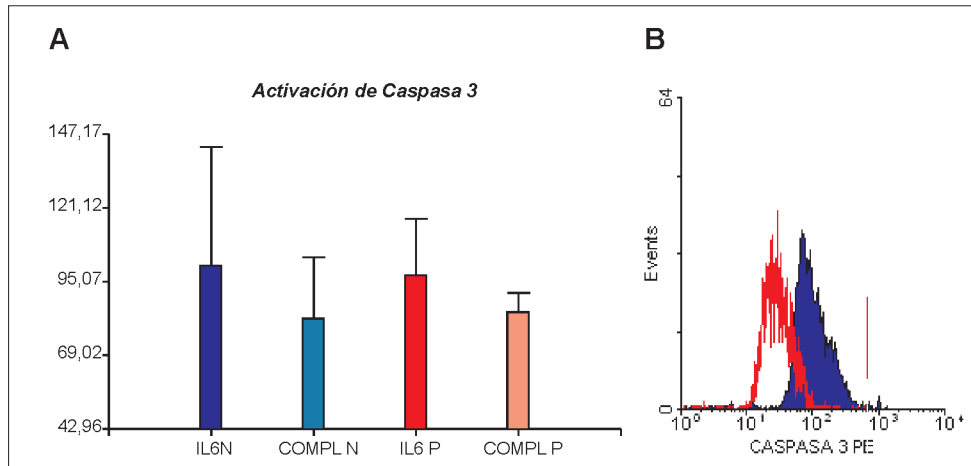


Fig. 1.- Caspasa 3 activada en progenitores hematopoyéticos CD34+. (A) Porcentaje de activación de caspasa 3 inducido por IL6 o complejo IL6/IL6sR (COMP) en pacientes (P) y controles normales (N) tomando como 100% de inducción de muerte la expresión de caspasa 3 activada en las células cultivadas sin citoquinas. (B) Histograma representativo de la expresión de caspasa 3 activada en una muestra tratada con IL6 (curva azul) y COMP (curva roja).

De los 8 pacientes estudiados para apoptosis de progenitores, solo uno fue portador de la mutación JAK2V617F. Esto imposibilitó la realización del análisis comparativo entre pacientes con y sin la mutación.

#### Activación de JAK2 y STAT3 en plaquetas

La activación de la ruta de señalización JAK2 y STAT3 se estudió en muestras de plaquetas evaluando las bandas de las proteínas fosforiladas en ausencia de citoquinas y en presencia de a) IL-6, b) Complejo IL-6/IL-6sR, c) TPO, citoquina estimulante de la vía JAK2/STAT3. Tanto las plaquetas enfrentadas con vehículo carente de citoquina como aquellas incubadas en presencia de IL-6 no presentaron activación de JAK2 ni STAT3, demostrando la incapacidad de la IL-6 por sí sola de transducir la señal en plaquetas. En cambio, la estimulación con TPO y COMP dió lugar a la aparición de bandas de proteína fosforilada tanto para JAK2 como para STAT3.

La fosforilación de JAK2 inducida por TPO fue semejante en los pacientes portadores de la mutación, 0.39 (0.20-0.80), en los pacientes no mutados, 0.59 (0.05-1.86), y en los controles normales, 0.38 (0.01-0.75), Fig. 3A. En cambio, se observó mayor activación de JAK2 inducida por COMP en los pacientes JAK2V617F, 0.33 (0.008-2.25) respecto de los no mutados, 0.007 (0.005-0.014) y los normales, 0.038 (0.004-0.07) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, Fig. 3B.

Cuando se analizó el nivel de fosforilación de STAT3 se observaron las siguientes tendencias: al inducir la activación con TPO los pacientes con la

mutación presentaron menor grado de fosforilación, 0.72 (0.009-2.10), que los no mutados, 1.08 (0.35-7.79) y que los controles normales, 11.52 (0.18-21.80), Fig. 3C. Por el contrario, la fosforilación inducida por el COMP fue mayor en pacientes JAK2V617F, 1.34 (0.69-4.61), que en los JAK2WT, 0.39 (0.005-2.80) y que los sujetos normales, 0.27 (0.11-1.84), Fig. 3D.

Al relativizar la activación inducida por el COMP respecto a la TPO observamos mayor R COMP/TPO para STAT3 en los pacientes JAK2V617F, 2.03 (0.45-3.03) (n=4), que en los pacientes negativos para la mutación, 0.75 (0.005-1.12) (n=5) y en los controles normales 0.63 (0.014-0.8) (n=5) (p=0.018), demostrando en el grupo mutado un aumento del nivel de fosforilación de STAT3 inducida por el COMP. Los niveles de fosforilación de JAK2 siguieron la misma tendencia: pacientes JAK2V617F 1.16 (0.02-2.81), pacientes JAK2WT 0.01 (0.01-0.14), normales 0.22 (0.1-0.34), Fig. 3E. En la figura 3F se muestra un ejemplo representativo de la activación de STAT3 en un paciente JAK2V617F y en uno JAK2WT.

#### DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo indican que el complejo IL-6/IL-6sR es más efectivo que la IL-6 por sí sola en la protección de la apoptosis de los progenitores hematopoyéticos tanto normales como de pacientes con NM. Esta diferencia podría basarse en el hecho de que la IL-6 requiere del receptor específico de membrana IL-6Ra, que, en los progenitores CD34+ de las muestras estudiadas en este trabajo, tuvo una expresión baja, no superando el 12% (datos no mostrados). En cambio, la expresión ubicua de

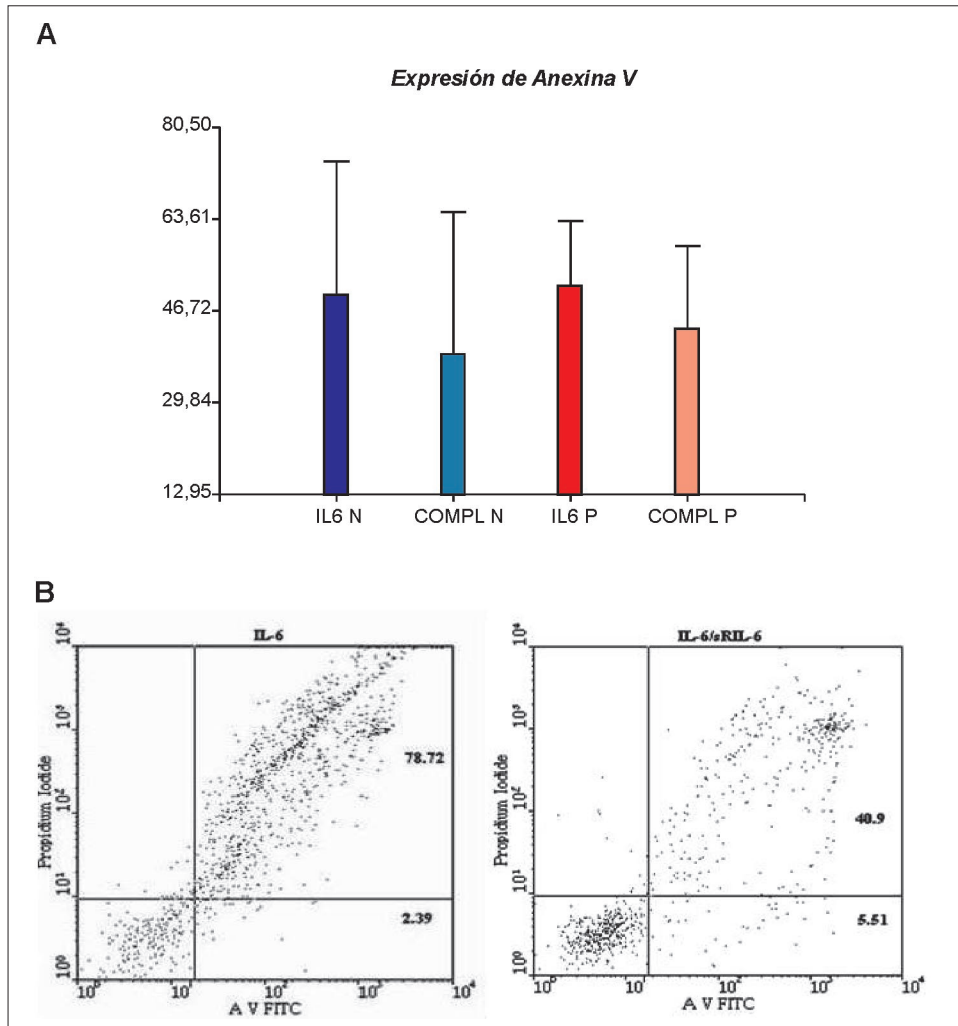


Fig. 2.- (A) Porcentaje de expresión de anexina V (apoptosis temprana y tardía) inducido por IL6 o complejo IL6/IL6sR (COMP) en pacientes (P) y controles normales (N). (B) Marcación para anexina V en el eje X y la incorporación de yoduro de propidio en el eje Y. Los eventos comprendidos en el cuadrante inferior derecho son AV+IP-, y representan las células en apoptosis temprana. Los eventos en el cuadrante superior derecho AV+IP+ corresponden a las células en apoptosis tardía.

la gp130 encargada de transducir la señal intracelular, posibilita la respuesta frente al complejo IL6/IL6sR. Las rutas de señalización involucradas en este efecto serían JAK/STAT y PI3K/AKT.

El aumento del IL6sR plasmático que describimos previamente en pacientes con TE (7) nos indujo a estudiar su repercusión en las vías de señalización de IL6. Debido a la dificultad en la obtención de la cantidad suficiente de progenitores CD34+ necesarios para realizar los estudios de activación de JAK/STAT utilizando esta metodología, se buscó otro tipo celular que perteneciera a la estirpe afectada y que fuera de fácil obtención. Las plaquetas presentan la ventaja de poder obtenerse fácilmente, en cantidad suficiente y podrían tomarse como reflejo de la transducción de la señal corriente abajo de la IL-6 en el linaje megacariocítico.

La fosforilación de STAT3 inducida por el complejo IL6/IL6sR fue mayor en las plaquetas de los pacientes JAK2V617F que en los no mutados y en los controles sanos, demostrando un aumento de la capacidad de activación de esta vía por el complejo. Contrariamente, la TPO indujo menor activación de STAT3 en los pacientes positivos para la mutación. Moliterno y colaboradores han demostrado que los pacientes con TE JAK2V617F+ tienen menor expresión del receptor Mpl en plaquetas que aquellos negativos para la misma, existiendo una correlación inversa entre la carga alélica de JAK2V617F y la expresión del receptor Mpl en NM<sup>8</sup>. Esto podría sugerir que el aumento relativo de la fosforilación de STAT3 inducida por el COMP respecto de TPO en pacientes con la mutación de JAK2 se deba también a una menor actividad de TPO por la disminución de

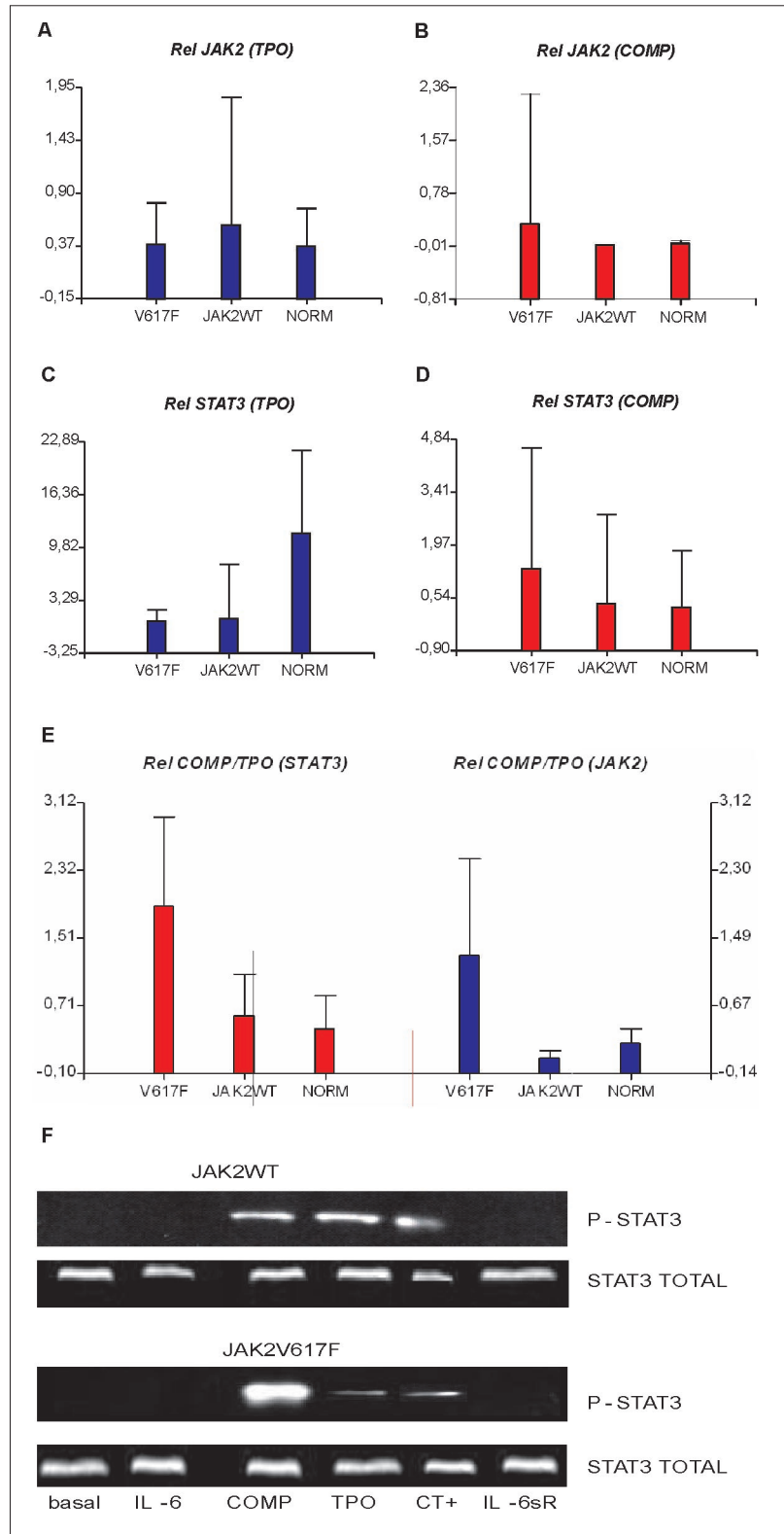


Fig. 3.- Fosforilación de JAK2 y STAT3 en plaquetas. (A-D) Mediana y rango de la relación de intensidad de las bandas fosforilada y total para cada proteína (JAK2 y STAT3) inducida por TPO y COMP en los pacientes portadores de la mutación JAK2V617F, no mutados (JAK2WT) y controles normales (NORM). (E) Mediana y rango de la relación de fosforilación inducida por COMP respecto a TPO (Rel COMP/TPO) para el STAT3 y el JAK2 en los distintos grupos. (\*) diferencia estadística entre el grupo JAK2V617F y los grupos JAK2WT y controles,  $p=0.018$ . (F) Western blot representativo de la fosforilación de STAT3 en una muestra incubada con medio carente de citoquinas (línea 1), IL6 (línea 2), complejo IL6/IL6sR (línea 3), TPO (línea 4), receptor soluble de IL6 solo (IL6sR, línea 6). En la línea 5 se muestra un control positivo de fosforilación.

su receptor Mpl. La evaluación de los niveles de Mpl plaquetario en todos los pacientes incluidos en el estudio está en curso para aclarar este punto. En conjunto, estos resultados sugieren que la señalización por JAK2/STAT3 en plaquetas de pacientes portadores de la mutación de JAK2 estaría más estimulada por el complejo IL6/IL6sR que por trombopoyetina.

Majka y colaboradores<sup>9</sup> describieron que la TPO y la IL-6 protegen de la apoptosis a los progenitores CD34+. En este trabajo demostramos que la presencia de IL-6sR junto a la IL-6 es más efectiva que la IL-6 sola en su capacidad antiapoptótica. Si el patrón de fosforilación que observamos en plaquetas fuera reflejo de lo que ocurre en los progenitores, los pacientes portadores de la mutación JAK2V617F podrían tener un aumento de STAT3 fosforilado mediado por el complejo IL6/IL6sR, lo que contribuiría, al menos en parte, a la disminución de la apoptosis que caracteriza al clon hematopoyético en estos pacientes.

Majka demuestra, además, la capacidad de IL-6 de inducir activación de STAT1, 3 y 5 en progenitores CD34+ y megacarioblastos pero no en plaquetas. Del mismo modo, nosotros tampoco obtuvimos fosforilación de JAK2 ni STAT3 inducida por IL-6 sola en ninguna de las muestras estudiadas. Este resultado concuerda con la ausencia de receptor de IL-6 (IL-6a) en la membrana plaquetaria descrita por nuestro grupo con anterioridad<sup>10</sup>. En cambio, el agregado de concentraciones equimolares de IL-6sR produjo una activación de JAK2 y STAT3 en las muestras de controles normales y pacientes, revelando que la transducción de la señal inducida por IL-6 en plaquetas ocurre exclusivamente a través del complejo IL-6/IL-6sR. En este contexto, el aumento de IL-6sR en TE cobra mayor importancia fisiopatológica, ya que podría aumentar la señalización intraplaquetaria mediada por IL6, potenciando así la activación plaquetaria inducida por otros agonistas.

En conclusión, el complejo IL6/IL6sR es más efectivo que la IL6 en la protección frente a estímulos apoptóticos, por lo que el aumento del nivel de IL6sR en trombocitemia esencial favorecería la supervivencia de los progenitores hematopoyéticos CD34+ que dan origen a los megacariocitos, contribuyendo al cuadro

característico de la enfermedad. Por otra parte, estimularía señales de activación intraplaquetaria con mayor eficiencia en pacientes JAK2V617F.

## REFERENCIAS

1. Zheng C, Yang R, Han Z, Zhou B, Liang L, Lu M. TPO-independent megakaryocytopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 65: 212-22.
2. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 227-36.
3. Jenkins BJ, Quilici C, Roberts AW, Grail D, Dunn AR, Ernst M. Hematopoietic abnormalities in mice deficient in gp130-mediated STAT signaling. *Exp Hematol* 2002; 30: 1248-56.
4. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 171-191.
5. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., Ebert B.L., Wernig G., Huntly B.J., Boggon T.J., Wlodarska I., Clark J.J., Moore S., Adelsperger J., Koo S., Lee J.C., Gabriel S., Mercher T., D'Andrea A., Froehling S., Döhner K., Marynen P., Vandenberghe P., Mesa R.A., Tefferi A., Griffin J.D., Eck M.J., Sellers W.R., Meyerson M., Golub T.R., Lee S.J. & Gilliland D.G. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-397.
6. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-61.
7. Marta R, Goette N, Lev P, Heller P, Kornblihtt L, Vassallu P, Glembofsky A, Pirola C, Molinas F. Increased soluble Interleukin-6 soluble receptor in patients with Essential thrombocythemia. *Haematologica* 2004; 89: 657-63.
8. Moliterno A, Williams D, Rogers O, Spivak J. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2V617F and Mpl expression. *Blood* 2006; 108: 3913-15.
9. Majka M, Ratajczak J, Villaire G, Kubiczek K, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Thrombopoietin, but not cytokines binding to gp130 protein-coupled receptors, activates MAPK42/44, AKT, and STAT proteins in normal human CD34+ cells, megakaryocytes, and platelets. *Exp Hematol* 2002; 30: 751-60.
10. Marta R, Goette N, Chazarreta CD, Pirola C, Molinas FC. Normal platelets possess soluble interleukin 6 receptor. *Cytokine* 2005; 29: 13-17.