

MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE MOLEKÜLER OLAYLARIN ÖNEMİ

THE IMPACT OF MOLECULAR EVENTS ON MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

İpek Yönel HİNDİLERDEN*, Fehmi HİNDİLERDEN**, Deniz SARGIN***

ÖZET

Kronik miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), hematopoetik kök hücreden köken alan, bir veya daha fazla miyeloid serinin anormal proliferasyonu ile karakterize hematopoetik sistemin klonal bir grup hastalığıdır. Philadelphia-negatif (Ph-negatif) klasik MPN, başlıca polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve primer miyelofibrozin (PMF) oluşmaktadır. 2005 yılında JAK2V617F mutasyonunun, ardından JAK2 ekzon 12 ve MPL gen mutasyonlarının tanımlanmasından sonra, farklı özellikler gösteren bu hastalık grubunun patogenezi anlaşılmaya başlamıştır. Fakat bu mutasyonların hiçbiri heterojeniteyi açıklamamaktadır. Bunu takiben, MPN tanılı hastalarda bir seri mutasyonlar keşfedilmiştir. Bunlar arasında sinyal yollarında negatif düzenleyici etkileri olan LNK geni mutasyonları, IKZF1 ve Tp53 gibi transkripsiyon faktörlerinin mutasyonları veya delesyonları, MAPK sinyal yolağının bir üyesi olan NRAS geni mutasyonları yanında TET2, ASXL1, EZH2 ve IDH1/2 gibi epigenetik düzenleyicilerdeki mutasyonlar vardır. JAK2V617F ve MPL mutasyonu olmayan ET ve PMF hastalarının çoğunda CALR mutasyonu bulunmaktadır. MPN'de JAK2, MPL veya CALR mutasyonunu taşıyan hastaların çoğuna eşlik eden epigenetik anormalliklerin varlığı, bu iki sınıf mutasyon grubu arasında ilişki olduğunu düşündürmektedir. Son yıllarda bu hastalık grubunda moleküler olaylar daha iyi anlaşılmuştur. Buna rağmen bu mutasyonların MPN'ye özgü olmadıkları bilinmektedir. Bundan yola çıkarak MPN gelişimine katkıda bulunan tanımlanmamış genetik olayların varlığı düşünülmektedir. Bu derlemede, MPN patogenezinde genetik ve epigenetik anormalliklerinin rolü hakkında güncel veri özetlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Birincil miyelofibroze; Esansiyel trombositemi; Miyeloproliferatif bozukluklar; Polistemia vera

ABSTRACT

Chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal disorders of hematopoiesis resulting from the transformation of a hematopoietic stem cell, with abnormal proliferation of one or more of the myeloid lineages. The Philadelphia-negative (Ph-negative) classical MPNs mainly comprise polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). The identification of JAK2V617F mutation in early 2005 followed by the discovery of JAK2 exon 12 and MPL gene mutations, have modified the understanding of the pathogenesis of these various disease entities. However, all these mutations fail to explain the heterogeneity of these entities. This has led to the discovery of a series of mutations in patients with MPN involving the negative regulators of signaling pathways, such as LNK, mutated or deleted transcription factors such as IKZF1 and Tp53, a member of the MAPK signaling pathway NRAS, and mutations in epigenetic regulators such as TET2, ASXL1, EZH2 and IDH1/2. Mutations in CALR were discovered in a majority of JAK2V617F- and MPL-negative ET and PMF patients. Among MPN patients, genetic abnormalities affecting epigenetic regulation are often expressed in those harboring JAK2, MPL or CALR mutations which imply a collaboration between these two classes of mutations in MPN pathogenesis. Despite the recent insights into the molecular events of these diseases, it has become increasingly clear that these mutations were not MPN specific. There are likely yet additional unidentified genetic events which contribute to MPN development. We review recent data on the impact of genetic and epigenetic abnormalities in MPN pathogenesis.

Key Words: Essential thrombocythemia; myeloproliferative disorders; polycythemia vera; primary myelofibrosis

GİRİŞ

Kronik miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), klonal miyeloid hücrelerin aşırı üretimi ile kendini gösteren ve sıklıkla akut miyeloid lösemiye (AML) transforme olan

heterojen bir grup hastalıktır (1). MPN'de hematopoezin bozulması ana unsurdur. Hematopoez hücre olgunlaşması ve çoğalmasının beraber devam ettiği dinamik bir süreçtir. Kazanılmış mutasyonlar bu süreci

Date received/Dergiye geldiği tarih: 13.07.2015– Date accepted/Dergiye kabul edildiği tarih: 08.12.2015

* İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı

** Bakırköy Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi, Hematoloji Kliniği

*** Medipol Üniversitesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul, TÜRKİYE

(Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: ipekyonal@yahoo.com.tr)

Istanbul Tıp Fakültesi Dergisi Cilt / Volume: 78 • Sayı / Number: 4 • Yıl/Year: 2015

bozarak miyeloid seriyi etkileyen kusurlara yol açabilir. Pluripotent hematopoietik kök hücrelerin bölünmesi sırasında ortaya çıkan somatik mutasyonların çoğunun fenotipik etkisi olmamakla beraber bazı mutasyonların proliferasyona yol açtığı bilinmektedir. Proliferasyona yol açan mutasyonu taşıyan kök hücrenin hücre döngüsüne daha sık girmesiyle çoğalan bir klon ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak ortaya çıkan monoklonal hematopoez, tüm miyeloid malignitelerin karakteristik bir özelliğidir. İnsanlarda klonal hematopoezin en sık fenotipik sonuçlarından biri MPN'nin ortaya çıkmasıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından MPN'nin güncel sınıflaması dokuz hastalık içermekle beraber bu derlemenin konusu sadece Philadelphia-negatif (Ph-negatif) klasik MPN'dir (1). Klasik MPN, polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve primer miyelofibrozisten (PMF) oluşmaktadır. ***Son dekadlarda genom bilimi, MPN patogenezinde çeşitli genlerin keşfine yol açmıştır. Sonuç olarak, kök hücrelerin klonal evölüsyonundan birçok farklı hücresel yolağın sorumlu olduğu düşünülebilir. MPN ile ilişkili somatik mutasyonlar başlıca iki büyük fonksiyonel kategoriye ayrılmıştır: 1) sitokin reseptör sinyalini etkileyen mutasyonlar ve 2) gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile ilişkili mutasyonlar.*** Bu derlemede, hastalığın moleküler temeli ve klonal evölüsyonundaki gelişmeler tartışılacaktır. Bunun yanında, çeşitli lezyonların hastalık progresyonuna katkısı ve prognostik belirteç olarak kullanımlarından bahsedilecektir.

JAK2V617F Mutasyonu

İki dekadan uzun süredir PV'nin altında yatan genetik kusur araştırılmaktadır. Birçok araştırmacı eritropoetin (EPO) reseptöründeki (EPOR) sinyal yolağında kusur olduğunu tahmin etmiştir. İlk mutasyonun keşfi Vainchenker ve arkadaşları tarafından gerçekleşmiş ve 2005'de yayımlanmıştır (2). Küçük bir molekül (AG490) veya siRNA tarafından JAK2'nin inhibisyonu sonucunda PV'da kemik iliği mononükleer hücrelerinden EPO bağımsız koloni oluşumunun azaldığı gözlenmiştir. Bu gözlem JAK2 geninde tekrarlayan nokta mutasyonunun keşfine neden olmuştur. Guanin-timin mutasyonu sonucunda JAK2 geninin psödokinaz domaini (JH2) içerisinde valin fenilalanin değişimi gerçekleşmiştir (Şekil 1). Başka bir çalışmada PV'da 9p kromozomu üzerinde heterozigotluk kaybı (LOH) bölgesi ve taranan tüm PV hastalarında ortak olan 6.2-Mbp bölgesi tanımlanmıştır (3). Bu bölge eritropoezde rol oynayan JAK2'yi içerdiği için mutasyonlar açısından taranmıştır ve benzer şekilde JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. PV'de eritroid öncül hücreler mutasyon için homozigot saptanmıştır. Kantitatif PZR'nun kullanımını sonucunda hastalar granülositlerde JAK2V617F mutasyonunun yüküne göre düşük allel yüklü (<%50) ve yüksek allel yüklü (>%50) olarak iki gruba ayrılmıştır. JAK2V617F mutasyonu için homozigotluğun, mutant allelin mitotik rekombinasyonu ve duplikasyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir. Hastaların klinik seyri sırasında mitotik rekombinasyon sonucunda heterozigot mutasyonun homozigot mutasyona dönüştüğü gösterilmiştir. Yüksek allel yükü olan bireylerde ortalama hastalık süresi 48 ay ve düşük allel yükü olanlarda 23 ay olarak gözlenmiştir.

Bu bulgular PV patogenezinin çok basamaklı olduğunu düşündürmektedir. İlk basamakta JAK2V617F geninde edinilmiş mutasyon düşük allel yüküne neden olmaktadır. İkinci basamakta homolog rekombinasyon, yüksek allel yükü ile beraber JAK2V617F homozigotluğu olan öncül hücrelerin ve granülositlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. JAK2V617F mutasyonu PV'lı hastaların %95'inden fazlasında görülmektedir. Tablo 1'de MPN'de değişik gruplar tarafından bildirilen JAK2V617F mutasyon sıklığı özetlenmiştir (4).

ET'li hastaların %40-60'ında JAK2V617F mutasyonu bulunmaktadır (4). JAK2, İL-3, EPO, G-CSF ve trombopoetini (TPO) içeren bir grup büyüme faktörünün intraselüler sinyalinde önemli rol oynamaktadır. Klonal hematopoezi olan ET hastalarında JAK2V617F allel yükü poliklonal hematopoezli gruba göre daha yüksek saptanmıştır. JAK2V617F mutasyon yükünün hem klonal hem poliklonal hematopoezli hastalarda stabil kaldığı gösterilmiştir. Yüksek allel yükü olan JAK2V617F mutasyonu PV'lı hastaların %70'inde bulunmakla beraber ET hastalarında daha az sıklıkta bulunmaktadır. JAK2V617F mutasyonu düşük allel yükü taşıyanlar dahil tüm PV olgularında homozigottur. Bunun tersine ET hastalarındaki hematopoetik kolonilerde nadiren JAK2V617F homozigotluğu bulunur. Bazı araştırmacılar ET'de trombositlerdeki JAK2V617F allel yükünün granülositlere göre daha fazla olduğunu, bunun tersine PV ve PMF'de granülositlerdeki allel yükünün daha fazla olduğunu bildirmiştir. ET'li hastalarda granülosit ve trombositler yanında eritroblastlarda da JAK2V617F mutasyonunun varlığı bildirilmiştir. JAK2V617F mutant allelleri için tek nükleotid polimorfizmi genotiplemesini kullanan bir çalışmada ET'nin kökeninde birbirinden bağımsız multipl anormal klonların varlığı gösterilmiştir (5). Bu çalışmada bazı araştırmacılar tarafından ET'de biallelik JAK2 mutasyonlarının gerçek prevalansının %5-10 olduğu bildirilmiştir.

PMF'li hastaların yaklaşık %50'sinde JAK2V617F mutasyonu bulunmaktadır (6). PMF hastalarının yaklaşık %13'ünde bu mutasyon homozigot olarak bulunur. PMF'de bu mutasyonun homozigotluğunun, kötü prognostik sitogenetik anormalliklerle ilişkisi olduğuna inanılmaktadır.

JAK2 ekzon 12 mutasyonu

JAK2'nin diğer mutasyonları eritrositlerle ilişkili olmakla beraber JAK2 kinaz aktivitesini aktif hale getirir. JAK2 ekzon 12'yi etkileyen birkaç fonksiyonel mutasyon JAK2V617F mutasyonuna komşu olarak bulunmaktadır. JAK2 ekzon 12 mutasyonları tüm PV'da %2.5-3.4 oranında bulunmakla beraber JAK2V617F-negatif PV hastalarının yaklaşık %30'unda bulunmaktadır (7, 8). JAK2 ekzon 12 mutasyonunu içeren hastaların 2/3'ünde izole eritrositöz, ayırt edici bir kemik iliği morfolojisi ve azalmış serum EPO seviyeleri bulunmaktadır. Geri kalan olgulara ek olarak lökositöz, trombositöz veya her ikisi birden eşlik etmektedir. JAK2 ekzon 12 mutasyonları, ET veya PMF'de bulunmamaktadır. Fakat nadiren refrakter anemi ve halka sideroblastlı refrakter anemi (RARS-T)

grubunda gösterilmiştir. JAK2 ekzon 12 mutasyonunun JAK2 aracılı intraselüler sinyal yolağının uzun süreli aktivasyonu sonucunda ortaya çıktığına inanılmaktadır. JAK2 ekzon 12 mutasyonuna sahip hastalarda trombotik olaylar görülebilir. Ayrıca PV'da miyelofibroz veya akut lösemiye dönüşüm görülebilir (9). Fare EPOR'nu ekspres eden ve JAK2 ekzon 12 mutasyonunu taşıyan BaF3 hücreleri ortama İL-3 eklenmeden proliferere olabilir. Bunun sonucunda eritrositozu içeren miyeloproliferatif hastalık fenotipi ortaya çıkar. Bazı serilerde PV'yı taklit eden klinik sendromu olan hastaların yaklaşık %2.7'sinde JAK2 mutasyonu bulunmamaktadır.

MPL mutasyonu

ET veya PMF hastalarının önemli bir kısmında JAK2V617F mutasyonunun bulunmadığı bilinmektedir. Bir çalışmada, EPOR veya trombopoetin reseptörünü (MPL) içeren hematopoetik-spesifik sitokin reseptörlerindeki aktivasyon sonucunda JAK-STAT yolağının aktif hale gelebileceği bildirilmiştir (10). TPO reseptörünü kodlayan MPL geninin dizileme analizi, JAK-2 mutasyonunu taşımayan MPN hastalarında yeni bir moleküler anormalliğin keşfine neden olmuştur. MPL mutasyonları reseptörün juksta membran bölgesinde yerleşmiştir. MPL mutasyonları %60 oranında W515L ve %40 oranında W515K mutasyonlarından oluşmaktadır (10-12). Bu mutasyonun sıklığı farklı serilerde PMF'de %0-10 ve ET'de %0-6 olarak bildirilmiştir (13-16). W515K mutasyonunu taşıyan hastaların %50'sinde ve W515L mutasyonunu taşıyan hastaların %17'sinde mutant allel yükü %50'den fazladır. MPL mutasyonları, hücre dizilerinde sitokinden bağımsız çoğalmaya ve trombopoetine (TPO) duyarlılığın artmasına neden olur. Bunun sonucunda JAK-STAT sinyal yolağı aktive olmaktadır. MPL W515L mutasyonunun splenomegali, lökositöz, belirgin trombositoz, ekstramedüller hematopoez ve miyelofibrozla karakterize miyeloproliferasyonu indüklediği gösterilmiştir. Buna ek olarak JAK kinaz inhibitörü, MPL W515L-transforme hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bundan yola çıkarak JAK-STAT sinyalinin inhibisyonunun JAK2V617F ve MPL W515L mutasyonunu taşıyan MPN için etkili bir tedavi olabileceği söylenebilir (10). MPL mutasyonu granülositlerde bulunmaktadır. Hematopoetik olmayan DNA'da gösterilmemiştir. Bu bulgular, MPL W515L mutasyonunun klonal hematopoetik hücrelerde bulunan somatik bir mutasyon olduğunu göstermektedir. Ayrıca MPL W515L allelinin normal bireylerde görülmemesi sık bir nükleotid polimorfizmi olmadığını ortaya çıkarmıştır. Bu veriler, JAK2V617F-negatif MPN'de MPL W515L'nin patojenik bir mutasyon olduğunu desteklemektedir (10).

ET'de MPL mutant alleli taşıyan hastaların %50'sinden fazlası ayrıca JAK2V617F mutasyonu taşımaktadır. ET'de W515K mutasyonunun düşük hemoglobin ve yüksek trombosit düzeyleri ile ilişkisi gösterilmiştir. Ayrıca bu mutasyonu taşıyan hastaların kemik iliği biyopsi piyeslerinde eritroid öncülleri yerine öncelikli olarak megakaryositlerin sayısında artış gösterilmiştir.

PMF'de MPL mutant alleli taşıyan hastaların %30'unda ayrıca JAK2V617F mutasyonu bulunmaktadır (12). MPL W515L, MPL W515K ve JAK2V617F mutasyon yükü PMF hastalarının klinik seyri sırasında sabit kalmaktadır. Bir fare modelinde MPL W515L mutasyonunun ileri derecede trombositoz, lökositöz, splenomegali, hepatomegali, kemik iliğinde megakaryositik hiperplazi ve kemik iliği fibrozisi ile karakterize hızlı, progresif ve letal MPN'ye neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu mutasyon eritrositoza neden olmamıştır. Bu veri, MPL mutasyonunun trombositoz gelişimine neden olurken JAK2V617F mutasyonunun eritrositoza neden olduğunu desteklemektedir. MPL W515L/K mutasyonunu taşıyan PMF hastaları, ileri yaşta, ciddi anemisi olan ve daha çok transfüzyon ihtiyacı olan hastalardır (10). PMF hastalarının yaklaşık %50'sinde klonal hematopoez olmasına rağmen JAK2 ve MPL mutasyonu yoktur. Böylelikle bu mutasyonların PMF'in tek nedeni olduğunu söylemek güçtür. PMF'de genetik temelin, birçok genetik ve muhtemelen epigenetik olayların birleşiminden kaynaklandığı söylenebilir.

LNK mutasyonu

Lenfosit-spesifik Adaptör Protein (LNK), bir JAK-STAT inhibitör adaptör proteindir. Miyeloproliferatif hastalık patogeneğinde rol oynadığına inanılmaktadır. Başlıca prolinden zengin amino bölgesi, hücre membranında yerleşimi için gerekli olan PH domaini ve MPL-JAK2'ye bağlanan SH2 domaini olmak üzere 3 ana bölümden meydana gelir. LNK, TPO ve MPL aracılı JAK2 aktivasyonu için negatif düzenleyicidir (17). LNK yetmezliği olan farelerde megakaryositlerde ve eritroid seri öncüllerinde artış yanında kendi kendine yenilenme gösteren hematopoetik kök hücre havuzu gösterilmiştir (17). Bazı çalışmalarda LNK'in in vitro olarak MPL W515L ve JAK2V617F'nin oluşturduğu sinyalleri baskıladığı gösterilmiştir (18, 19). Bir fare modelinde, LNK eksikliğinin TEL-JAK2 ve JAK2V617F tarafından indüklenen miyeloproliferatif hastalığı hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu modelde, PV/PMF ekspresyonunu baskılamak için JAK2V617F ve LNK arasında etkileşime gerek olduğu, ayrıca TEL-JAK2'nin indüklediği miyeloid ekspansiyonunu baskılamak için LNK'in SH2 domainine ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada LNK mutasyonunun kronik faz MPN'de nadir olmakla beraber blastik dönüşüm olan MPN'lerde daha sık görüldüğü (%9.8) bildirilmiştir (20). Sonuç olarak LNK, sitokin sinyalinde negatif düzenleyici rolü ile hematopoezde önemli rol oynar. Fosforilize tirozin kinazlara bağlanarak, c-KİT, JAK2 ve MPL-JAK2'yi içeren majör sitokin reseptör sinyalini inhibe eder (21).

IKZF Delesyon Mutasyonu

Ikaros Family Zinc Finger Protein (IKZF1) geni, normal hematopoezin gelişiminde fonksiyonel önemi olan Ikaros transkripsiyon faktörünü kodlayan 7p.12'de lokalize olan gendir. IKZF1 mutasyonunun etkisi fare öncül hücrelerinde çalışılmıştır. Sonuç olarak RNA aracılı IKZF1 eksikliğinin sitokin duyarlılığında ve p-STAT5 ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada IKZF1 delesyonlarının, MPN sonrası lösemi gelişen 29 olgunun 6'sında (%21)

ortaya çıktığı fakat transforme olmayan 526 MPN olgusunun hiçbirinde saptanmadığı bildirilmiştir (22). Sonuç olarak iki bağımsız kohort çalışmasında IKZF1 delesyonları ile MPN sonrası lösemi arasında güçlü bir ilişki gösterilmiştir. Bu çalışmalarda IKZF1 kaybı olan hastalarda kompleks karyotip saptanmıştır ve MPN klonunun genetik evolüsyonunda del7p geç bir sitogenetik olay olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak IKZF1 kaybının MPN hastalarının bir kısmında lösemik transformasyonda önemli rol oynadığı söylenebilir.

EZH2 Mutasyonu

Polycomb-grup (Pc-G) genleri, gelişim sırasında gen ekspresyonunu düzenleyen proteinlerdir (23). PcG proteinlerini içeren üç kompleks, Polycomb Repressive kompleks 1 (PRC1), Polycomb Repressive kompleks 2 (PRC2) ve PhoRC'dir. EZH2 proteinleri, PRC2'nin 4 bileşeninden biridir. EZH2, histon H3 üzerinde lizin 27'nin trimetilasyonundan sorumlu multiprotein enzim kompleksidir (EZH2, SUz12, EED ve YY1). Bunun yanında PRC2, diğer polycomb komplekslerini gen bölgesine çekerek kromatinin kompakt hale gelmesine neden olur (24). EZH2'nin onkojenik aktivitesi bulunmaktadır ve önceki yıllarda artmış ekspresyonunun, epitelial tümörlerdeki diferansiyasyonu önlediği gösterilmiştir (25). MPN'lerde EZH2 gen ekspresyonunun up-regülasyonu gösterilmiştir. EZH2 mutasyonları en sık PMF'de bildirilmiştir. Sonuç olarak EZH2'nin miyeloid malignitelerde tümör baskılayıcı olarak etki ettiği söylenebilir. 614 miyeloid maligniteyi içeren bir çalışmada 42 hastada toplam olarak 49 EZH2 mutasyonu bulunmuştur (24). Bu kohort çalışmasında 30 PMF olgusunun %13'ünde EZH2 mutasyonu saptanmıştır. Az sayıda PMF hastası ve kısa takip süresi nedeniyle EZH2 mutasyonunun gerçek prognostik önemini kestirmek güçtür. Ayrıca EZH2 mutasyonunun ET'de bulunmadığı ve PV hastalarının yaklaşık %3'ünde saptandığı bildirilmiştir (24).

RAS Mutasyonları

Ras proteinleri, küçük guanozin-5-trifosfat ailesine aittir (26, 27). RAS genine ait üç onkojenik mutasyon HRAS, NRAS ve KRAS mutasyonlarıdır. Myeloid hastalıklarda KRAS ve NRAS mutasyonları sık görülmekle beraber HRAS mutasyonları nadiren bulunmaktadır (28). RAS mutasyonları, G12V ve G13R gibi genellikle tek aminoasit değişimleridir. Bu mutasyon RAS'ın guanin trifosfat (GTP) aktive edici proteine hassasiyetini azaltır. Böylece RAS-GTP seviyelerinin yüksek kalmasını sağlar (26, 29). RAS ailesi mutasyonları arasında NRAS aktive edici mutasyonları, AML, MDS ve MPN'leri içeren hematopoetik malignitelerin yaklaşık %30'unda bulunmaktadır (30, 31). NRAS/KRAS mutasyonları PV'da nadir görülmekle beraber PV'dan akut lösemiye transformasyonla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (31).

Tp53 Mutasyonu

p53 mutasyonları, lenfomalar ve lösemileri içeren insan kanserlerinde en sık görülen genetik değişimlerdir (32). Mutant p53'ün artmış ekspresyonunun in vivo olarak immatür fare hematopoetik hücrelerinin transformasyonunu başlattığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda MPN ve MDS'u içeren iki tip hematopoetik hastalık indüklenmiştir (32). MPN'lerde lösemik

transformasyon için kalıtsal eğilim olduğu bilinmekle beraber transformasyona yol açan genetik mekanizmalar büyük oranda bilinmemektedir. Bir çalışmada MPN sonrasında AML gelişen 22 hastanın 6'sında (%27.3) Tp53 geninde somatik mutasyon saptanmıştır (33). Bundan dolayı Tp53 mutasyonlarının lösemik transformasyonda önemli rolü olabileceği düşünülmüştür. Tp53 mutasyonları PV'da nadir görülmekle beraber PV'dan akut lösemiye transformasyonla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (33).

TET2 Mutasyonu

Ten-Eleven Translocation (TET) gen ailesi, TET onkogen ailesi üyesi 1 (TET1), TET onkogen ailesi üyesi 2 (TET2) ve TET onkogen ailesi üyesi 3'den (TET3) oluşmaktadır (34-36). TET2 geni, kromozom 4q24'te yerleşim göstermekle beraber metilsitozine hidroksil eklenmesini sağlayan hidroksilaz enzimini kodlar (34). TET2 mutasyonları DNA metilasyonunu arttırmakla beraber hidroksimetil sitozin seviyesinde azalmaya neden olur. TET2 mutasyonları, JAK2V617F veya MPL mutasyonlarından önce veya sonra ortaya çıkabilir. TET2 mutasyonları miyeloid malignitelerde yaklaşık %15 oranında bulunmaktadır (37-41). IDH mutasyonları, fonksiyonel olarak DNA metilasyonu üzerine TET2 mutasyonu ile benzer etkiler yaratabilir. TET2 genindeki edinsel somatik mutasyonlar, DNA'da 5-metilsitozinin (5mC) 5-hidroksimetilsitozine (5hmC) oksidasyonundan sorumlu α -ketoglutarat bağımlı enzimin katalitik aktivitesini baskılar. Düşük 5hmC seviyeleri, çeşitli DNA promoter bölgelerinin CpG bölgelerinde hipermetilasyona neden olur. TET2 mRNA'sı, miyeloid öncül hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmekle beraber matür granülositlerde düşük oranda bulunur. TET2 mutasyonları TET2'de fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Sonuç olarak bu mutasyonlar DNA'da 5hmC'in birikime neden olarak DNA'da hipermetilasyonunu ortaya çıkarır (42). DNA hipermetilasyonu hücrelerin farklılaşmasını önlemektedir. İn vitro çalışmalar, TET2 eksikliğinin hematopoetik hücrelerin normal farklılaşma sürecini önlediğini göstermiştir. Transgenik hayvanlarda TET2'nin hasara uğratılması monositik dizide artışa neden olur ve bu fenotip kronik miyelomonositer lösemiye (KMML) taklit eder. TET2 mutasyonlarının ileri yaşta daha sık olduğu bildirilmiştir. MPN tanısı bulunan ailelerde TET2 mutasyonları hemen her zaman edinseldir. Bu ailelerdeki TET2 mutasyonlarının insidensi sporadik PMF ile benzerdir. MPN hastalarında yapılan klonal analiz çalışmalarında TET2 mutasyonunun edinilmesi ile JAK2 mutasyonunun edinilmesi arasında kesin kararlı bir kronolojik sıralama tespit edilememiştir. TET2 mutasyonu, MPN'nin progresyon gösterdiği geç dönemde de ortaya çıkabilir. Bu iki genetik olay birbirinden bağımsız gibi görünmektedir. Sonuç olarak TET2 mutasyonları PMF hastalarında JAK2V617F mutasyonundan bağımsız gibi görünmektedir. Bu mutasyonun tromboz oranını, lösemik transformasyonu veya tüm yaşam süresini etkilemediği bildirilmiştir. PMF hastalarında TET2 mutasyon durumunun yeni bir prognostik belirteç olmadığı düşünülmektedir. TET2 mutasyon sıklığı

PMF'de %17, ET'de %11 ve PV'da %7-16 oranında bildirilmiştir (43).

ASXL1 Mutasyonu

Additional Sex Combs-Like 1 (ASXL1) geni, kromozom 20q11.1'de yerleşmiştir. ASXL1, 'Drosophila Additional sex combs'un (Asx) insan homologudur. Asx delesyonu, Pc-G ve Trithorax grup (Tx-G) gen delesyonlarına neden olur (44). Bundan yola çıkarak Asx'un, homeotik gen ekspresyonunun baskılanması ve aktivasyonunda rolü olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak Drosophila'daki fonksiyonel çalışmalar, Asx'un Pc-G proteinleri ile benzer kromatin ilişkili proteini kodladığını göstermektedir (45). ASXL1 mutasyonlarının miyeloid transformasyonla ilişkili mekanizması net aydınlatılmış değildir. Hematopoetik olmayan hücrelerde yapılan in vitro çalışmalar, ASXL1'in retinoik asid-reseptör aktivitesini baskılamak için heterokromatin protein *1a* (HP1a) ve lizin-spesifik demetilaz 1 (LSD1) ile fiziksel etkileşimini ve lipogenezisi baskılamak için peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamma ile etkileşimini göstermektedir (Şekil 2) (46, 47).

ASXL ailesi üyesinin 3 üyesi (ASXL1, ASXL2 ve ASXL3), amino-terminal homolog bölgesi (ASXH domaini) ve C-terminal bitki homeodomaininden (PHD domaini) oluşmaktadır (Şekil 2) (46, 48). Memeli ASXL proteinlerinin korunmuş domain yapısı ile ilişkili son analizler, ASXL1'in N-terminal bölgesinin (10-100 aminoasit), HARE-HTH bölgesi (HB1, ASXL1, restriksiyon endonükleaz sarmal dönüm bölgesi) olarak adlandırılan özgün bir DNA bağlama bölgesine sahip olabileceğini göstermiştir (49). Ayrıca, PHD domainini içeren proteinlerle ilişkili analizlere dayalı olarak, ASXL proteinlerinin PHD bölgesi özgün görünmektedir. Bu bölgede histon H3'ün N-terminal ucundaki lizinlere karşı özellikle histon H3 ucunda bulunan metillenmiş lizin bölgesini tanıdığı tahmin edilmektedir. ASXL1 bölgelerinin rolünü anlamak için ileri fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır. ASXL1 mutasyonları çerçeve kayması mutasyonları şeklinde olup 12. ekzonda yer alırlar ve olgunlaşmamış proteinlerin oluşumuna neden olurlar.

Drosophila Asx, Polycomb-baskılayıcı deubiquitinaz kompleksini (PR-DUB) oluşturan 'kromatin deubiquitinaz Kalipso' ile kompleks oluşturmaktadır. PR-DUB kompleksi, lizin 119 bölgesindeki histon H2A'dan monoubiquitini uzaklaştırmaktadır (Şekil 2). Kalipso'nun memeli homologu olan BAP1, direkt olarak ASXL1 ile etkileşime girmektedir. Ayrıca memeli BAP1-ASXL1 kompleksinin in vitro deubiquitinaz aktivitesi gösterilmiştir (50).

ASXL1'in hematopoezdeki fonksiyonu net olarak aydınlatılamamıştır. ASXL1 ile ilişkili bir fare modelinde bu allelin önemli bir şekilde perinatal ölüme neden olduğu gösterilmiştir. Fisher ve arkadaşlarının modelinde PGK promoter bölgesinde neomisin eksprese eden kaset, ASXL1 ekzon 5 bölgesine konularak ASXL1 okuma bölgesini engellemiştir (bu allel Asxl1tm1BC olarak adlandırılır) (48). Bunun sonucunda PHD bölgesi yanında nüklear temas bölgesini içermeyen proteinlerin ekspresyonu gerçekleşmiştir. Ancak Asxl1tm1BC/tm1BC alleli için homozigot

farelerde yaşamın ilk bir kaç ayında aşikar hematolojik malignite gelişmemekle beraber multipotent progenitörlerin sayısında da kusur görülmemiştir. Bu çalışmadaki homozigot Asxl1tm1BC/tm1BC alleli, %75 perinatal ölüme neden olmuştur. Ayrıca fare tam bir C57BL/6J yapısına hibridize edildiğinde embriyonik letalite gözlenmiştir. ASXL1'in hematopoezdeki fonksiyonunun daha detaylı araştırılması gerekmektedir. Miyeloid kanserlerde TET2 mutasyonlarının keşfedildiği aynı yılda, diğer bir epigenetik düzenleyici bölge olan ASXL1'de mutasyonlar tanımlanmıştır. ASXL1'deki mutasyonlar, MDS'lu hasta örneklerindeki karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon (aCGH) çalışmalarına dayalı olarak tanımlanmıştır (51). Gelsi-Boyer V. ve arkadaşları, MDS'lu hastalarda ilk kez ASXL1 mutasyonunu tanımlamıştır (51-53). Bu çalışmada bir hastada 20q11'de delesyonlar tespit edilmiştir. 20q delesyonlarının ASXL1 ve DNMT3B adlı olası iki genle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Her iki gende dizileme sonucunda 35 MDS'lu hastanın 4'ünde (%11) ASXL1 mutasyonları saptanmıştır. ASXL1'in ileri sekans analizleri MPN ve diğer miyeloid hastalıklarda ASXL1 mutasyonlarının sıklığının belirlenmesini sağlamıştır. Çalışmalar ASXL1 mutasyonlarının MPN'de %10, AML'de %17 ve KMMML'de %49 oranında bulunduğunu bildirmiştir (51, 52, 54).

AML ve MDS hastalarında ASXL1 mutasyonlarının prognostik önemini araştıran detaylı klinik çalışmalarının aksine şimdiye kadar MPN'lerde bu mutasyonla ilişkili daha az sayıda ve küçük olgu serilerini içeren çalışmalar bildirilmiştir. ASXL1 mutasyonları MPN'de ileri yaşta görülmekle beraber PMF ve post-PV/ET miyelofibroza, PV veya ET ile karşılaştırıldığında daha sık görülmektedir (52, 55, 56). ASXL1 sıklığı PV'da %2-5, ET'de %5-10, PMF'de %13-26 ve post-PV/ET miyelofibroza %22-38.5 oranında bildirilmiştir. Bir çalışmada ASXL1 mutasyonu olan PMF hastalarında taşımayanlara göre tüm yaşam süresi (OS) anlamlı olarak kısa saptanmıştır. Fakat bu çalışma 9 ASXL1 mutasyonu taşıyan ve 35 taşımayan hasta grubunu içermektedir (57). PMF'de ASXL1 mutasyonunu araştıran kapsamlı çalışma Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır (58). Bu çalışmaya Mayo Kliniği'nden dahil edilen 279 PMF olgusunun 85'inde (%31) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır ve bu mutasyonun lösemi ilişkisiz sağkalım (LFS) ile ilişkisi olmadığı fakat kısa OS ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada Avrupa Kohortu'nu oluşturan 483 PMF olgusunda ASXL1 mutasyon sıklığı %21.7 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada Avrupa Kohortu'nu oluşturan PMF olgusunda ASXL1 mutasyonu varlığı, kısa OS ve lösemik transformasyonla ilişkili bulunmuştur (58). Bir çalışmada kronik faz MPN'de ASXL1 mutasyonunun lösemik transformasyon riskinde artışa neden olmadığı bildirilmiştir (55). Bu veriyeye dayanarak ASXL1 mutasyonunun MPN'lerin oluşum sürecinin başlangıcında kritik rol oynayabileceği ve MPN'lerde klonal evolüsyonun erken evresinde rol oynayabileceği düşünülebilir.

IDH1/IDH2 Mutasyonları

İki izositrat dehidrogenaz (IDH) geni olan IDH1 ve IDH2, glioma ve sekonder glioblastomalarda yüksek oranda tanımlanmış, mutasyona uğramış onkogenlerdir (59). AML'li hastalarda tüm genomu içeren sekans analizinde 188 hastanın 16'sında tekrarlayan IDH1 mutasyonu saptanmıştır (60). AML, blastik faz MPN'de ve nadiren MDS'lu hastalarda IDH mutasyonları gösterilmiştir (55, 61-64).

Memeli hücrelerinde IDH1, IDH2 ve IDH3 olmak üzere 3 ana IDH izoenzimi bulunmaktadır (65). IDH1 ve IDH2, izositratı alfa-ketoglutarata dönüştüren homodimerik, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺) bağımlı enzimlerdir (Şekil 3). IDH1 ve IDH2'de tanımlanmış mutasyonlar korunmuş kodonlarda spesifik missense (yanlış anlamlı) mutasyonlardır. Çerçeve kayması mutasyonları veya erken sonlandırma mutasyonları yoktur ve tüm mutasyonlar wild-tip allel için heterozigottur. Bundan yola çıkarak mutant proteinin wild-tip enzimi inhibe ettiği ve IDH mutasyonlarının baskın bir negatif fenotipe neden olduğu düşünülmektedir. Mutant IDH1'i eksprese eden hücrelerin yüksek seviyelerde 2-hidroksiglutarat (2-HG) içerdiği gösterilmiştir (66). Ayrıca bu anormal metabolit IDH1 veya IDH2 mutasyonunu içeren primer lösemi hücrelerinde bulunmaktadır (67). Mutant IDH enzimleri, substratın spesifitesini değiştirmektedir. Mutant IDH, izositratın α -ketoglutarata (α -KG) dönüşümünü katalizleyerek NADPH molekülünü oluşturmak yerine α -KG'ı 2-HG'a dönüştürerek NADPH'ı tüketmektedir (Şekil 3). 2-HG'ın direkt onkogenik etkisinin olup olmadığı veya NADPH ve α -KG'nin azalmasının lökomienez ile ilişkisi olup olmadığı henüz bilinmemektedir (68).

IDH1, kromozom 2q33.3'de ve IDH2, kromozom 15q26.1'de yerleşmiştir. IDH mutasyonları ekzon 4'de yer almakla beraber bir arginin kalıntısında tek aminoasit değişimini içermektedir. Bu mutasyonlar üç spesifik arginin kalıntısını etkilemektedir: R132 (IDH1), R172 (IDH2) ve R140 (IDH2) (61). Mutant IDH'ın izositrat için afinitesinin azaldığı ve α -KG'ı 2-HG'a dönüştürmek için katalitik aktivitesinin olduğu bilinmektedir (67, 69-71). Mutant IDH'ın onkogeneik özelliklerinin α -KG'nin azalması veya 2-HG'ın birikiminden kaynaklandığına inanılmaktadır (69, 72). IDH mutasyonları, düşük gradlı gliomalarda ve sekonder glioblastomalarda %70, AML'de %10-20, MDS'da %3-5, MPN'lerde %1-4, KMML'yi içeren MDS/MPN'de %9, MDS'dan AML'ye tranforme olan hastalarda %15, del(5q) ilişkili yüksek riskli MDS veya AML'de %22 ve blastik faz KML'de %4 oranında bildirilmiştir (60, 61, 63, 64, 73-78). AML'de IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının fenotipik ve prognostik etkilerini araştırarak çalışmaların çoğu, normal veya orta riskli karyotip, trizomi 8 ve NPM1 mutasyonları ile tutarlı bir ilişki göstermiştir (74, 79-82). NPM1⁺/FLT3⁺ moleküler profilini taşıyan normal sitogenetik analize sahip hastalarda mutant IDH1 kötü prognozla ilişkili bulunurken FLT3⁺ AML'de daha iyi prognozla ilişkisi gösterilmiştir (62, 75, 82, 83). Bazı çalışmalarda mutant IDH2, normal sitogenetik analize sahip AML'de kötü prognozla ilişkili saptanırken bir çalışmada mutant

R140'ın (IDH2) prognozu, mutant R172'ye (IDH2) göre daha iyi bulunmuştur (75, 84, 85). AML'li hastalardan farklı olarak MDS ve MPN'leri içeren kronik miyeloid neoplazilerde IDH mutasyonlarının prognostik önemiyle ilgili bilgi kısıtlıdır (61, 63). 1473 Ph-negatif MPN hastasını içeren bir çalışmada ET'de IDH mutasyonu %0.8, PV'da %1.9, PMF'de %4.1, post-ET/PV miyelofibroza %1, blastik faz PV'da %25 ve blastik faz PMF'de %25 oranında saptanmıştır (61). Başka bir çalışmada 301 kronik faz PMF hastasında IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının fenotipik ve prognostik etkileri araştırılmıştır (86). 12 hastada (%4) mutant IDH saptanmıştır. 7 hastada IDH2 mutasyonu (5 R140Q, 1 R140W ve 1 R172G) ve 5 hastada IDH1 mutasyonu (3 R132S ve 2 R132C) saptanmıştır. 12 mutant hastanın 6'sında (%50) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. Bu çalışma, PMF'de IDH mutasyonlarının lösemik transformasyon için bağımsız risk faktörü olduğunu ve JAK2V617F mutasyonu ile birlikte lökomojenik riski arttırdığını göstermiştir (86). Bu mutasyonun PMF'de prognozla ilişkisini araştırarak çalışmada Vannucchi AM. ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmadır (58). Bu çalışmada Mayo Kliniği'nden dahil edilen 374 PMF olgusunun 10'unda (%3) IDH1 mutasyonu ve 7'sinde (%2) IDH2 mutasyonu saptanmakla beraber IDH mutasyonları, yaşam süresinde kısalma ve lösemik transformasyonla ilişkili bulunmuştur (58). Aynı çalışmada Avrupa Kohortu'nu oluşturan 483 PMF olgusunda IDH1/IDH2 mutasyon sıklığı %2.6 olarak bildirilmiştir ve IDH1/IDH2 mutasyonlarının OS ile ilişkisi olmadığı fakat lösemik transformasyon riskini arttırdığı gösterilmiştir (58). IDH mutasyonlarının JAK2V617F, TET2 ve MPL mutasyonları ile birliktelik gösterebileceği bilinmektedir. Farklı IDH mutasyon varyantlarının PMF'de farklı biyolojik veya prognostik özellikler taşıyıp taşımadığı henüz bilinmemektedir.

CALR Mutasyonu

CALR-1 geni, insan 19.kromozomu ve maymun 8.kromozomunda yerleşmekle toplam 9 ekzon içermektedir. CALR, 3 ayrı yapısal ve fonksiyonel zincir içeren 46-kDa ağırlığında bir proteindir (87-89). CALR geninde mutasyon ilk olarak Nangalia J. ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir ve ardından Klampfl T. ve arkadaşları tarafından konfirme edilmiştir (88, 89). CALR mutasyonlarının hepsi ekzon 9'da yerleşmiştir. Olguların %80'inde en sık iki mutasyon, del52 (CALRdel52/Type I;c.1092_1143del; L367fs*46) ve ins5'dir (CALRins5/Type II;c.1154_1155insTTGTC; K385fs*47) (90). CALR mutasyonu, JAK2V617F ve MPL ekzon 10 mutasyonu olmayan ET, PMF ve ET dönüşümlü miyelofibrozisli olguların yaklaşık %15-25'inde bulunmaktadır (88, 89). Bir çalışmada CALR mutasyon sıklığı ET'de %17.7 ve PMF'de %14.8'dir (91). CALR mutasyonu PV'da bulunmamaktadır (91). Sonuç olarak CALR mutasyonu, PV'da dışlama kriteridir. CALR mutasyonu, MDS'lu hastaların %8'inde bulunmaktadır. Çalışmaların sonucunda bu mutasyonun sağlıklı bireylerde, AML, KML, lenfoproliferatif hastalıklarda ve solid tümörlerde bulunmadığı ortaya çıkmıştır. (88, 89).

ET'li hastalarda CALR mutasyonu ile yüksek trombosit sayısı ve düşük hemoglobin sayısı arasında ilişki

Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms

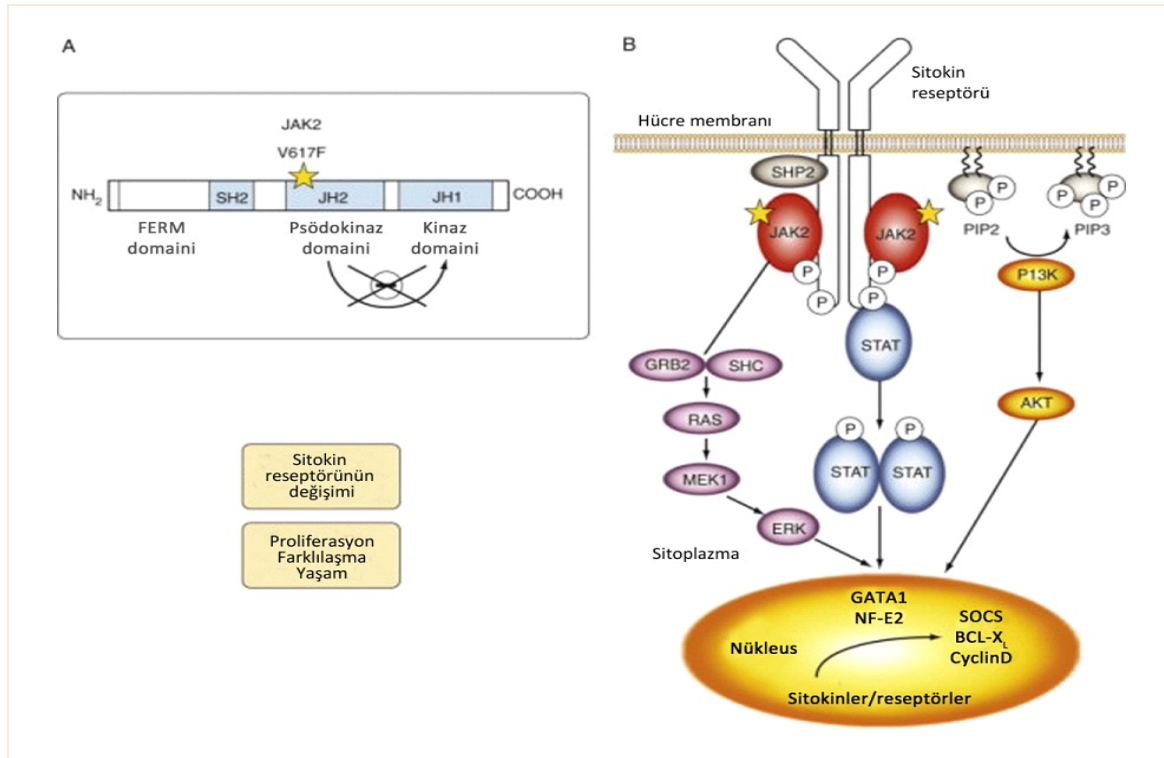
bulunmuştur. Bunun yanında CALR mutasyonu taşıyan ET'li hastalarda JAK2 mutasyonu taşıyanlara göre daha düşük lökosit sayısı bulunmaktadır (90, 92). CALR mutasyonu taşıyan ET'li hastalarda tromboz insidansı düşük olmasına rağmen ET'de farklı mutasyon grupları arasında yaşam farkı görülmemiştir (90, 92). PMF'de CALR mutasyonu varlığı, DIPSS-plus risk skorlamasından ve ASXL1 mutasyonundan bağımsız olarak yaşam üzerine olumlu etkilidir (89, 93). Sonuç olarak CALR mutasyonu, JAK2V617F ve MPL mutasyonu taşımayan ET ve PMF tanı hastaların büyük çoğunluğunda bulunmaktadır. '2014 WHO Klinik Moleküler ve Patolojik Tanı kriterlerine' göre ET ve PMF'de CALR mutasyonu yeni majör bir kriterdir (94). PMF tanı hastaların yaklaşık %85'i klonal hematopoez göstermekle beraber bir kısmı JAK2, MPL veya CALR mutasyonu taşımamaktadır. PMF patogenezi tek başına tanımlanan mutasyonlarla veya mutant allel yükü ile açıklanamaz. PMF'de genetik temelin birçok genetik ve epigenetik olayların birleşiminden kaynaklandığı düşünülebilir.

SONUÇ

MPN'lerdeki somatik lezyonlar, sitokin sinyalinin histon modifikasyonlarına kadar çeşitli hücre fonksiyonlarını etkilemektedir. Günümüzde, MPN için yüksek oranda spesifite gösteren gen mutasyonları, JAK2, MPL ve CALR mutasyonları olarak görülmekle beraber hayvanlarda miyeloproliferatif fenotipe neden oldukları gösterilmiştir. Diğer MPN ilişkili genlerin çoğunluğu başka miyeloid malignitelerde de bulunmaktadır. Bundan yola çıkarak bu genlerin MPN için spesifik olmadıkları düşünülmektedir. Bu mutasyonların birine veya mutasyon kombinasyonlarına sahip fare modellerini içeren ileri çalışmalar, bu mutasyonların hematopoetik kök hücreleri nasıl hedeflediğini ve MPN gelişimi üzerine etkilerini ortaya koyacaktır. Hastalığın klonal evölüsyonu göz önüne alındığı zaman MPN'nin genotipik ve fenotipik olarak oldukça kompleks bir yapısı olduğu açıktır. Bu kompleks hastalığı başarılı bir şekilde tedavi etmek için gelecekte geliştirilen bireysel tanı metodları ve tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Tablo 1. Polisitemia vera, esansiyel trombositemi ve primer miyelofibroziste JAK2V617F mutasyon sıklığı

	Metod	PV:mutasyon (homozigot)	ET:mutasyon (homozigot)	PMF:mutasyon (homozigot)
James ve ark.	Dizileme	89 (30)	43	43
Levine ve ark.	Dizileme	74 (25)	32 (3)	35 (9)
Kravolics ve ark.	Dizileme	65 (27)	23 (3)	57 (22)
Baxter ve ark.	Dizileme	97 (26)	57 (0)	50 (19)
Jones ve ark.	ARMS/pirosekanslama	81 (33)	41 (7)	43 (29)
Levine ve ark.	Allel spesifik/Taqman	99	72	39

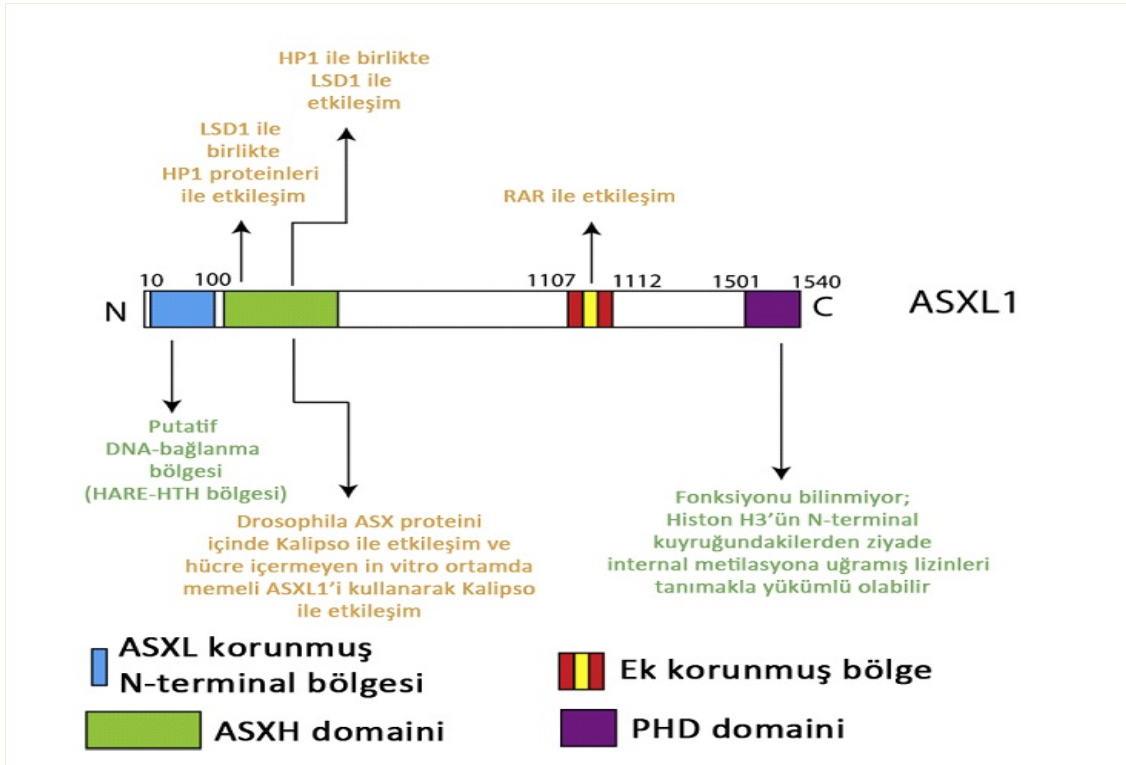


Şekil 1. Miyeloproliferatif hastalıklarda JAK2V617F sinyal mekanizması

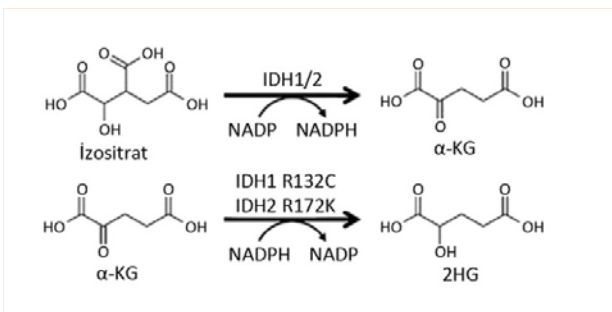
Miyeloproliferatif neoplazilerin patogenezi

A. JAK2V617F yapısı: mutasyon JH2 bölgesinde yerleşmiştir. Mutasyon, düzenleyici bölgenin otoinhibisyonunu bozarak JH1 bölgesine karşılık gelen tirozin kinazı aktifler. **B.** Homodimerik sitokin reseptörü varlığında (örn. EPOR), transfosforilat reseptörünün intrasellüler bölümüne bağlı JAK2V617F proteinleri, tirozin kalıntılarının fosforillenmesini sağlar. Takiben STAT5, fosfotidil 3-kinaz (PI3K) ve renin-angiotensin sistemi (RAS) sinyal yolları aktiflenerek hücre

döngüsü, proliferasyonu ve apoptoz ilişkili faktörlerin transkripsiyonu regüle olur. **Bcl-X_L**, Çok büyük B hücre lenfoması; **ERK**, Ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz; **GATA**, GATA-bağlayıcı faktör; **GRB**, Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein; **MEK1**, Karşılıklı hassas mitojen aktive protein kinaz 1; **NF**, Nükleer faktör; **P**, Fosfat; **PIP2**, Fosfotidil inositol bifosfat ve **PIP3**, Fosfotidil inositol trifosfat; **SH2**, Src homoloji 2; **SOCS**, Sitokin sinyal baskılayıcısı.



Şekil 2. Memelilerde ASXL proteininin korunmuş bölgeleri ve ASXL1'in olası fonksiyonları.



Şekil 3. IDH tarafından normal reaksiyonların ve mutasyon sonucunda kazanılan yeni reaksiyonların katalize edilmesi. Normal reaksiyon izositratı α -KG'a, mutasyon sonucunda oluşan reaksiyon ise α -KG'ı 2-HG'a dönüştürmektedir.

ASXL1, ASX proteinleri arasında korunmuş olan globüler yapıda bir N-terminal bölge ve fonksiyonu bilinen diğer proteinlere benzer yapıda potansiyel bir DNA-bağlama bölgesi içerir. Bu bölge, HARE-HTH bölgesi (HB1, ASXL1, restriksiyon endonükleaz sarmal dönüm bölgesi) olarak adlandırılmıştır. Bu bölgenin hemen distalindeki bölge, Kalipso'ya (BAP1'in memelideki analogu) bağlanıp histon H2A lizin 119 için deubiquitinaz aktivitesi göstermektedir. Bu aktivite in

vivo olarak Drosophila'larda ve ASXL1 pürifiye proteinini kullanan hücreden bağımsız tetkiklerde gösterilmiştir. Aynı bölgenin HP1 proteinlerine ve LSD1'e de bağlandığı düşünülmüştür (bu aktivite hematopoetik yönüyle çalışılmamıştır). Bu bölgenin distalinde retinoik asit reseptörü ile fiziksel teması olan korunmuş bir bölge bulunmaktadır (bu bölgedeki aktivite de hematopoetik hücrelerde doğrulanmamıştır). Son olarak PHD domaini, tüm ASXL proteinlerinin en uçtaki C-terminal bölgesinde bulunmaktadır. PHD bölgesinin görevi henüz bilinmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
2. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-8.

3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-90.
4. Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;233-9, 510.
5. Lambert JR, Everington T, Linch DC, Gale RE. In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: a new disease paradigm. *Blood* 2009;114(14):3018-23. doi: 10.1182/blood-2009-03-209916.
6. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, et al. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 2008;22(4):756-61. doi: 10.1038/sj.leu.2405097.
7. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356(5):459-68.
8. Pietra D, Li S, Brisci A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111(3):1686-9.
9. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* 2011;117(10):2813-6. doi: 10.1182/blood-2010-11-316810.
10. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3: e270. *PLoS Med* 2006;3(7):e270.
11. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008;112(1):141-9. doi: 10.1182/blood-2008-01-131664.
12. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108(10):3472-6.
13. Lieu CH, Shen YJ, Lai WC, Tsai WH, Hsu HC. Prevalence of MPL W515L/K mutations in Taiwanese patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *J Chin Med Assoc* 2010;73(10):530-2. doi: 10.1016/S1726-4901(10)70115-5.
14. Ruan GR, Jiang B, Li LD, et al. MPL W515L/K mutations in 343 Chinese adults with JAK2V617F mutation-negative chronic myeloproliferative disorders detected by a newly developed RQ-PCR based on TaqMan MGB probes. *Hematol Oncol* 2010;28(1):33-9. doi: 10.1002/hon.899.
15. Ma W, Zhang X, Wang X, et al. MPL mutation profile in JAK-2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. *Diagn Mol Pathol* 2011;20(1):34-9. doi: 10.1097/PDM.0b013e3181ecd261.
16. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPL W515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica* 2009;94(1):141-4. doi: 10.3324/haematol.13224.
17. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* 2005;105(12):4604-12.
18. Gery S, Cao Q, Gueller S, Xing H, Tefferi A, Koeffler HP. Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol* 2009;85(6):957-65. doi: 10.1189/jlb.0908575.
19. Gery S, Gueller S, Chumakova K, Kawamata N, Liu L, Koeffler HP. Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative disorders. *Blood* 2007;110(9):3360-4.
20. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia* 2010;24(10):1713-8. doi: 10.1038/leu.2010.163.
21. Gery S, Gueller S, Nowak V, Sohn J, Hofmann WK, Koeffler HP. Expression of the adaptor protein Lnk in leukemia cells. *Exp Hematol* 2009;37(5):585-592.e2. doi: 10.1016/j.exphem.2009.01.009.
22. Jäger R, Gisslinger H, Passamonti F, et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010;24(7):1290-8. doi: 10.1038/leu.2010.99.
23. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 2007;128(4):735-45.
24. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010;42(8):722-6. doi: 10.1038/ng.621.
25. Kleer CG. Carcinoma of the breast with medullary-like features: diagnostic challenges and relationship with BRCA1 and EZH2 functions. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(11):1822-5. doi: 10.1043/1543-2165-133.11.1822.
26. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:541-55.
27. Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS rapidly and efficiently induces CMML- and AML-like diseases in mice. *Blood* 2006;108(7):2349-57.
28. Wang J, Liu Y, Li Z, et al. Endogenous oncogenic Nras mutation promotes aberrant GM-CSF signaling in granulocytic/monocytic precursors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2010;116(26):5991-6002. doi: 10.1182/blood-2010-04-281527.
29. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007;26(22):3291-310.

30. Ayllon V, Rebollo A. Ras-induced cellular events (review). *Mol Membr Biol* 2000;17(2):65-73.
31. Scheele JS, Ripple D, Lubbert M. The role of ras and other low molecular weight guanine nucleotide (GTP)-binding proteins during hematopoietic cell differentiation. *Cell Mol Life Sci*, 2000;57(13-14):1950-63.
32. Shounan Y, MacKenzie K, Dolnikov A, Miller M, Symonds G. Myeloproliferative disease and myelodysplastic syndrome induced by transplantation of bone marrow cells expressing mutant p53. *Leukemia*, 1997;11(10):1641-9.
33. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med*, 2011;364(5):488-90 doi: 10.1056/NEJMc1012718.
34. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009 May 15;324(5929):930-5. doi: 10.1126/science.1170116.
35. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010;466(7310):1129-33. doi: 10.1038/nature09303.
36. Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 2011;473(7347):398-402. doi: 10.1038/nature10008.
37. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* 2009;23(7):1343-5. doi: 10.1038/leu.2009.59.
38. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009;41(7):838-42. doi: 10.1038/ng.391.
39. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009;113(25):6403-10. doi: 10.1182/blood-2009-02-205690.
40. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009;360(22):2289-301. doi: 10.1056/NEJMoa0810069.
41. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009;114(1):144-7. doi: 10.1182/blood-2009-03-210039.
42. Pronier E, Almire C, Mokrani H, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood* 2011;118(9):2551-5. doi: 10.1182/blood-2010-12-324707.
43. Pronier E, Delhommeau F. Role of TET2 mutations in myeloproliferative neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep* 2012;7(1):57-64 doi: 10.1007/s11899-011-0108-8.
44. Gaebler C, Stanzl-Tschegg S, Heinze G, et al. Fatigue strength of locking screws and prototypes used in small-diameter tibial nails: a biomechanical study. *J Trauma* 1999;47(2):379-84
45. Sinclair DA, Milne TA, Hodgson JW, et al. The Additional sex combs gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that binds to shared and unique Polycomb group sites on polytene chromosomes. *Development* 1998;125(7):1207-16
46. Fisher CL, Lee I, Bloyer S, et al. Additional sex combs-like 1 belongs to the enhancer of trithorax and polycomb group and genetically interacts with Cbx2 in mice. *Dev Biol* 2010;337(1):9-15 doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.004
47. Park UH, Yoon SK, Park T, Kim EJ, Um SJ. Additional sex comb-like (ASXL) proteins 1 and 2 play opposite roles in adipogenesis via reciprocal regulation of peroxisome proliferator-activated receptor {gamma}. *J Biol Chem* 2011;286(2):1354-63. doi: 10.1074/jbc.M110.177816.
48. Fisher CL, Pineault N, Brookes C, et al. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood* 2010;115(1):38-46. doi: 10.1182/blood-2009-07-230698.
49. Aravind L, Iyer LM. The HARE-HTH and associated domains: novel modules in the coordination of epigenetic DNA and protein modifications. *Cell Cycle* 2012;11(1):119-31. doi: 10.4161/cc.11.1.18475.
50. Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 2010;465(7295):243-7. doi: 10.1038/nature08966.
51. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009;145(6):788-800. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x.
52. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2009;23(11):2183-6. doi: 10.1038/leu.2009.141.
53. Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemi* 2010;24(2):469-73. doi: 10.1038/leu.2009.218.
54. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010;24(5):1062-5. doi: 10.1038/leu.2010.20.
55. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010;70(2):447-52. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3783.
56. Abdel-Wahab O, Pardani A, Patel J, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1

- mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011;25(7):1200-2. doi: 10.1038/leu.2011.58.
57. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51(8):743-55. doi: 10.1002/gcc.21960.
58. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27(9):1861-9. doi: 10.1038/leu.2013.119.
59. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360(8):765-73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710.
60. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361(11):1058-66. doi: 10.1056/NEJMoa0903840.
61. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* 2010;24(7):1302-9. doi: 10.1038/leu.2010.113.
62. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol* 2010;28(22):3636-43. doi: 10.1200/JCO.2010.28.3762.
63. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica* 2010;95(10):1668-74. doi: 10.3324/haematol.2010.025494.
64. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L, et al. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010;24(5):1094-6. doi: 10.1038/leu.2010.52.
65. Plaut GW, Cook M, Aogaichi T. The subcellular location of isozymes of NADP-isocitrate dehydrogenase in tissues from pig, ox and rat. *Biochim Biophys Acta* 1983;760(2):300-8.
66. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2010;465(7300):966. doi: 10.1038/nature09132.
67. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010;17(3):225-34. doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.020.
68. Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2011;29(5):504-15. doi: 10.1200/JCO.2010.31.1175.
69. Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science* 2009;324(5924):261-5. doi: 10.1126/science.1170944.
70. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009;462(7274):739-44. doi: 10.1038/nature08617.
71. Gross S, Cairns RA, Minden MD, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 2010;207(2):339-44. doi: 10.1084/jem.20092506.
72. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010;18(6):553-67. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015.
73. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321(5897):1807-12. doi: 10.1126/science.1164382.
74. Chou WC, Lei WC, Ko BS, et al. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011;25(2):246-53. doi: 10.1038/leu.2010.267.
75. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, et al. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 2010;28(23):3717-23. doi: 10.1200/JCO.2010.28.2285.
76. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood* 2010;116(12):2122-6. doi: 10.1182/blood-2009-11-250878.
77. Pardanani A, Patnaik MM, Lasho TL, et al. Recurrent IDH mutations in high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with isolated del(5q). *Leukemia* 2010;24(7):1370-2. doi: 10.1038/leu.2010.98.
78. Soverini S, Score J, Iacobucci I, et al. IDH2 somatic mutations in chronic myeloid leukemia patients in blast crisis. *Leukemia* 2011;25(1):178-81. doi: 10.1038/leu.2010.236.
79. Caramazza D, Lasho TL, Finke CM, et al. IDH mutations and trisomy 8 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010;24(12):2120-2. doi: 10.1038/leu.2010.213.
80. Thol F, Damm F, Wagner K, et al. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;116(4):614-6. doi: 10.1182/blood-2010-03-272146.

81. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* 2010;116(25):5486-96. doi: 10.1182/blood-2010-02-267955.
82. Green CL, Evans CM, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood* 2010;116(15):2779-82. doi: 10.1182/blood-2010-02-270926.
83. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010;28(14):2348-55. doi: 10.1200/JCO.2009.27.3730.
84. Wagner K, Damm F, Göhring G, et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol* 2010;28(14):2356-64. doi: 10.1200/JCO.2009.27.6899.
85. Green CL, Evans CM, Zhao L, et al. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood* 2011;118(2):409-12. doi: 10.1182/blood-2010-12-322479.
86. Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia* 2012;26(3):475-80. doi: 10.1038/leu.2011.253.
87. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J*. 2010;24:665-83.
88. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369:2391-2405.
89. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369:2379-90.
90. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123:1544-51.
91. Kim SY, Im K, Park SN, Kwon J, Kim JA, Lee DS. CALR, JAK2, and MPL Mutation Profiles in Patients With Four Different Subtypes of Myeloproliferative Neoplasms: Primary Myelofibrosis, Essential Thrombocythemia, Polycythemia Vera, and Myeloproliferative Neoplasm, Unclassifiable. *Am J Clin Pathol*. 2015 May;143(5):635-44.
92. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*. 2014;123(10):1552-1555.
93. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-1477.
94. Michiels JJ, Forstier K, Valster F, Potters V, Schelfout K, De Raeve H. 2014 WHO Clinical Molecular and Pathological (WHO-CMP) Diagnostic Criteria for the Classification and Staging of Five Distinct JAK2, MPL and CALR Mutated Myeloproliferative Neoplasms. *J Hematol Thromb Dis* 2:172. doi:10.4172/2329-8790.1000172