



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Ana Livun

**MEĐUDJELOVANJE GENA  
STROMALNIH STANICA  
I GENA KRVOTVORNIH MATIČNIH  
STANICA  
U PRIMARNOJ MIJELOFIBROZI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF SCIENCE  
DIVISION OF BIOLOGY

Ana Livun

**CELL-STROMA INTERACTING GENES  
IN PATIENTS WITH PRIMARY  
MYELOFIBROSIS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.

Ovaj je doktorski rad izrađen u laboratoriju Odjela za leukemiju u MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA uz pomoć Prof.dr.sc. Srđana Verstovška, dr.med. te pod vodstvom Prof.dr.sc. Rajka Kušeca, dr.med., na Odjelu molekularne dijagnostike i genetike, Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb, u sklopu

Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## Zahvale

Zahvaljujem se Taghiju Manshouriju „Everything you start, you have to finish“, Prof.dr.sc. Rajku Kušecu bez kojeg nikada ne bi upoznala ovaj dio molekularne medicine, te koji je omogućio odlazak u USA gdje su mi pokazali ono što on nije mogao,

Prof.dr.sc. Srđanu Verstovšku koji me primio u svoj lab,

Doc.dr.sc. Maruški Marušić koja zajedno s Prof.dr.sc. Rajkom Kušecom dijeli mjesto mog mentora, u pravom smislu te riječi,

Senčici, Jadranki i Ivani s kojima je tjedan ljepši te svojim roditeljima koji su bili i još uvijek jesu podrška, ali i odgojna mjera.

Ovaj rad posvećujem Marku i Jakovu, koji nije bio u planu u početku ovog rada, ali sad na kraju daje poseban smisao.

**MEĐUDJELOVANJE GENA STROMALNIH STANICA I GENA  
KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA  
U PRIMARNOJ MIJELOFIBROZI**

ANA LIVUN

Klinička bolnica Dubrava

Avenija Gojka Šuška 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Primarna mijelofibroza (PMF) je agresivna i rijetka bolest karakterizirana fibrozom koštane srži (KS), leukoeritroblastozom te hematopoezom van KS u povećanoj slezeni i jetri. U perifernoj krvi (PK) povećan je broj cirkulirajućih krvotvornih matičnih stanica CD34+. U 32 bolesnika izmjeren je izražaj *SPARC* i *CXCR4* odgovornih za komunikaciju stromalnih stanica mikrookoliša i CD34+ stanica u mononuklearima KS i PK te uspostavljenoj kulturi stromalnih i hematopoetskih stanica. Istraživanje je prošireno na gene uključene u stanični metabolizam (*COX-2*), prepisivanje (*HIF1 $\alpha$* ), diferencijaciju, prijenos signala i proliferaciju (*PAX5 C terminus*, *FOS*, *K-RAS*). Bolesnici liječeni lenalidomidom/prednizonom praćeni su kroz 2 godine. Izražaja gena pri dijagnozi PMF u odnosu na zdrave ispitanike pokazao je razliku u KS za gene *SPARC*, *K-RAS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus*, i *HIF1 $\alpha$* , te za *PAX5 C terminus* gen u PK. Promjena u izražaju ovih gena uz terapiju nije vidljiva kao niti veza s *JAK2* mutacijom. Analiza izražaja stromalnih stanica pokazuje uočljivu razliku.

**Ključne riječi: CD34+stanice/CXCR4/lenalidomid/mikrookoliš/prednizon/  
primarna mijelofibroza/SPARC**

Mentor: Prof.dr.sc. Rajko Kušec

Ocjenjivači: Doc.dr.sc. Maruška Marušić

Prof.dr.sc. Rajko Kušec

Prof.dr.sc. Nada Oršolić

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Doctoral thesis

## **CELL-STROMA INTERACTING GENES IN PATIENTS WITH PRIMARY MYELOFIBROSIS**

ANA LIVUN

Clinical hospital Dubrava

Avenija Gojka Šuška 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Primary myelofibrosis (PMF) is rare and aggressive myeloproliferative neoplasia. PMF is characterized by bone marrow (BM) fibrosis, leukoerythroblastosis, teardrop poikilocytosis, extramedullary hematopoiesis and elevated number of hematopoietic stem CD34+ cells (HSCs) in the peripheral blood (PB). To address if change in expression of HSCs-stromal interacting genes is present, expression of *SPARC* and *CXCR4* were measured in BM and PB mononuclear cells and cultured stromal cells from 32 patients. This investigation also included genes involved in metabolism (*COX-2*), transcription (*HIF1 $\alpha$* ), differentiation, signaling and proliferation (*PAX5 C terminus*, *FOS*, *K-RAS*). Patients treated with lenalidomide/prednisone were monitored during a 2 year period. Those patients haven't show any change, but changes in expression are visible for *SPARC*, *K-RAS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* and *HIF1 $\alpha$*  gene in BM and *PAX5 C terminus* in PB compared to healthy individuals. Stromal cells show a wide range of changes.

**Keywords: CD34+cells/CXCR4/lenalidomide/stroma/prednisone/primary myelofibrosis/SPARC**

Supervisor: Prof.dr.sc. Rajko Kušec

Reviewers: Doc.dr.sc. Maruška Marušić

Prof.dr.sc. Rajko Kušec

Prof.dr.sc. Nada Oršolić

## SADRŽAJ:

### **1. UVOD**

- 1.1. Obilježja kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi
- 1.2. *Janus kinaza 2 (JAK2)*
- 1.2. Ostale mutacije Philadelphia negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi
- 1.3. Liječenje PMF
- 1.4. Mikrookoliš matičnih stanica
- 1.6. *SPARC*
- 1.7. *CXCR4*
- 1.8. *PAX5 C terminus*
- 1.9. *COX-2*
- 1.10. *K-RAS*
- 1.11. *FOS*
- 1.12. *HIF1 $\alpha$*

### **2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA**

- 2.1. Hipoteza
- 2.2. Ciljevi istraživanja

### **3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE RADA**

- 3.1. Ispitanici
- 3.2. Molekularne metode
  - 3.2.1. Metoda RNA izolacije i reverzne transkripcije
  - 3.2.2. Mjerenje izražaj *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  gena
  - 3.2.3. Analiza V617F mutacije *JAK2* gena
- 3.3. Uspostavljanje kulture stromalnih stanica
- 3.4. Analiza RT-PCR podataka

### **4. REZULTATI**

- 4.1. Analiza izražaja *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  gena pri dijagnozi PMF u odnosu na zdrave ispitanike
- 4.2. Analiza izražaja *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  gena uz terapiju lenalidomid/prednisonom
- 4.3. Analiza *JAK2* mutacije i citogenetskih abnormalnosti

4.4. Analiza izražaja gena u uspostavljenoj kulturi stromalnih stanica

**5. RASPRAVA**

**6. ZAKLJUČCI**

**7. PRILOG - Popis oznaka i kratica**

**8. ŽIVOTOPIS**



## 1. UVOD

### 1.1. Obilježja kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi

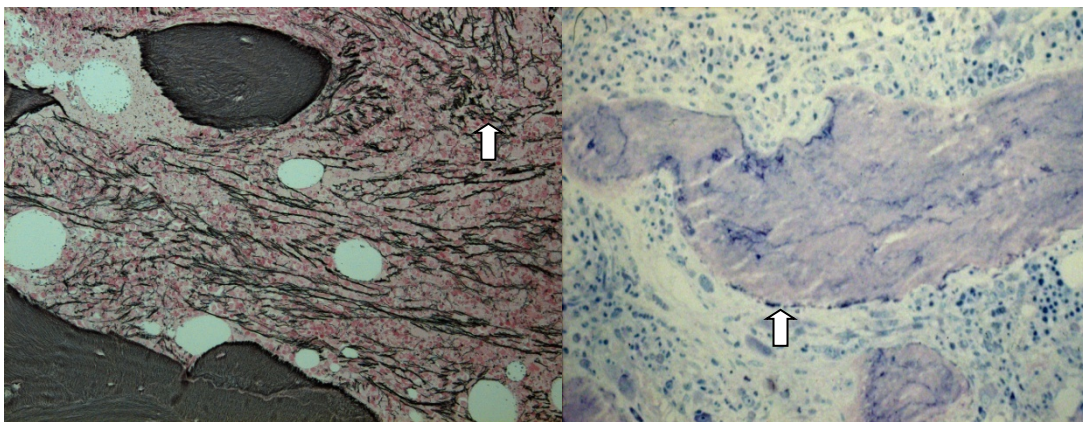
Primarna mijelofibroza (PMF) je rijetka i izuzetno agresivna hematološka bolest s prosječnim javljanjem od 0,3-1,5 slučajeva na 100000 ljudi u godinu dana i prosječnim preživljenjem od 5-7 godina<sup>1</sup>. Pripada grupi kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) klasificirala je MPN u Philadelphia pozitivne i Philadelphia negativne bolesti (Ph<sup>-</sup> MPN). Grupi Philadelphia pozitivnih bolesti pripada kronična mijeloična leukemija (KML).

Nowell i Hungerford otkrili su 1960. godine Philadelphia kromosom te je time KML postala prva leukemija s dokazanom specifičnom genskom aberacijom<sup>2</sup>. Daljnjom karakterizacijom Ph t(9;22)(q34;q11) translokacije<sup>3</sup> 1984. godine i otkrivanjem BCR-ABL fuzijskog gena započinje nova era razumijevanja biologije ove bolesti. BCR-ABL je onkogen koji nastaje kao produkt fuzije BCR gena s 22. kromosoma i gena Abelson tirozin kinaze (ABL) s 9. kromosoma<sup>4</sup>. Ovaj fuzijski protein predstavlja konstitutivno aktivnu tirozin kinazu koja potiče čitav niz citoplazmatskih signala, a time i nekontroliranu proliferaciju<sup>5</sup>. Otkrivanje BCR-ABL fuzijskog gena dovelo je do otkrića imatiniba, male molekule koja inhibira aktivnost ovog onkoproteina<sup>6</sup>.

Ph<sup>-</sup> MPN čine policitemija vera (PV), esencijalna trombocitemija (ET), PMF, kronična neutrofilna leukemija, kronična eozinofilna leukemija/hipereozinofilni sindrom, bolesti mastocita i druge neklasificirane neoplazme<sup>7,8</sup>. Prve tri navedene bolesti i KML opisao je William Damashek 1951. godine pod nazivom mijeloproliferativni poremećaji<sup>9</sup>. Danas se ove bolesti nazivaju i „BCR-ABL1 negativnim klasičnim“ mijeloproliferativnim neoplazmama<sup>7</sup>. PV, ET i PMF smatraju se bolestima monoklonalnog porijekla. Na nasljednu komponentu ukazuju Janus kinaza 2 (JAK2) i drugi faktori. Teorija pojavljivanja neovisnih abnormalnih klonova (čija je posljedica oligoklonalnost) postavljena je nedavno i još se treba dokazati<sup>11-17</sup>. U proteklih 5 godina opisane su mnoge mutacije u kroničnim ili blastnim fazama MPN: JAK2 (ekson 14<sup>18-21</sup> i ekson 12<sup>22</sup>), mijeloproliferativni leukemijski virus (MPL) (ekson 10)<sup>23,24</sup>, član 2 TET onkogene obitelji (TET2) (nekoliko eksona)<sup>25</sup>, dodatni sex combs-like 1 (ASXL1) (ekson 12)<sup>26</sup>, Casitas B-lineage lymphoma proto-onkogen (CBL) (ekson 8 i ekson 9)<sup>27</sup>

izocitrat dehidrogenaza 1 (IDH1)(ekson 4)<sup>28,29</sup>, IDH2 (ekson 4)<sup>28,30</sup> i obitelj IKARUS oblika cinkovog prsta (IKZF1) (delecija nekoliko eksona).

PMF je karakterizirana anemijom, povećanjem slezene, leukoeritroblastozom, abnormalnim putem CD34+ matičnih stanica u perifernoj krvi (PK), vanmedularnom hematopoezom osobito u jetri i slezeni te propadanjem koštane srži (KS) što je posljedica progresivne fibroze, neoangiogeneze i povećanih krvnih tvorbi<sup>31-40</sup>. To je izuzetno agresivna bolest sa životnim vijekom od <5 godina nakon postavljanja dijagnoze. Smrtnost je uzrokovana infekcijama, trombohemoragijskim događajima i leukemijskim transformacijama. U 3,9-20% bolesnika dolazi do razvoja akutne mijeloične leukemije (AML)<sup>41,42</sup>. Ph<sup>-</sup> MPN potječu iz jedne klonalne stanice s genetskim poremećajem koji utječu na fiziološki odgovor pluripotentne matične stanice na faktore rasta čime se narušava ravnoteža između proliferacije i diferencijacije ovih stanica. Glavna karakteristika PMF su cirkulirajuće krvotvorne CD34+ matične stanice (KMS). One predstavljaju važan klinički dijagnostički biljeg te služe i kao prognostički biljeg.



A.

B.

**Slika 1.** Mikrofotografije biopsija KS pacijenata s PMF u fazi osteomijelofibroze (vlasništvo autora). A. Fibroza KS (bojenje serbrom). B. Zadebljale gredice i pojačana aktivnost koštanih stanica (bojenje Giemsa).

## 1.2. Janus kinaza 2 (JAK2)

Nedavna otkrića ističu prisutnost mutacije Janus kinaze 2, JAK2 V617F, JAK2 T875N i ekson 12 mutiranog alela u Ph<sup>-</sup> MPN bolesnika. JAK2 nalazi se na kromosomu 9p24 i uključuje 25 eksona te protein od 1132 aminokiseline. Jedna je od četiri tirozin kinazne obitelji Janus nonreceptora. JAK1, JAK2 i TYK2 jednoliko su izraženi u stanicama sisavaca, dok je JAK3 izražen samo na hematopoetskim stanicama. JAK-STAT aktivacijski put bitan je za mnoge stanične procese proliferacije, preživljenja i normalne funkcije hematopoetskih, srčanih i drugih stanica<sup>43,44</sup>. Specifično vezanje citokina i faktora rasta objašnjava razlike u terapiji ovisno o tome da li lijek cilja na JAK1, JAK2, JAK3 ili više JAKova odjednom<sup>44-49</sup>. JAK2 je prvi protein koji se aktivira nakon odgovora receptora na hematopoetske faktore rasta, uključujući trombopoetin (TPO), eritropoetin (EPO), stimulirajući faktor granulocitnih kolonija i SCF (engl. Skp, Cullin and F-box complex). Onkogene mutacije JAK1, JAK2 i JAK3 otkrivene su i u limfoidnim i u mijeloidnim neoplazmama<sup>50</sup>. Janus kinaza 2 s mutacijom V617F (JAK2 V617F) otkrivena je 2004. godine<sup>18</sup> te predstavlja zamjenu valina fenilalaninom u autoinhibitornoj domeni enzima u eksonu 14, što dovodi do nemogućnosti inaktivacije ovog enzima. Nedavna istraživanja pokazala su epigenetski učinak kroz jezgenu translokaciju mutirane molekule i direktne fosforilacije histona H3<sup>51</sup> što sprečava supresiju tumora putem heterokromatina u *Drosophila*<sup>52</sup>. Kod nekih bolesnika utvrđene su višestruke JAK2 mutacije cis konformacije unutar istog eksona<sup>177</sup>. JAK2 V617F inducira PV fenotip kod transplantiranih miševa<sup>18</sup>. Inuducibilni JAK2 V617F knock-in mišji model imaju PV fenotip i u heterozigotnom i u homozigotnom obliku te kasnije pokazuju agresivan oblik mijelofibroze<sup>53</sup>. I ET i PMF slične bolesti pojavljuju se u ovih mišjih modela<sup>54,55</sup>. Udio mutantnog alela u PMF je gotovo jednak kao u PV te se njegov udio još više povećava fibroznom transformacijom što ukazuje na prisutnost dodatnog fenotipskog obilježja u post PV/ET-MF. Unatoč gore navedenim činjenicama, JAK2 V617F mutacija nije glavni uzročnik ovih bolesti, nego definira MPN klon, što se uvijek ne smatra leukemijskom transformacijom<sup>14,56,57</sup>. Blastna faza JAK2 V617F pozitivnih MPN može zahtijevati fibroznu fazu u tranziciji bolesti u odnosu na JAK2 V617F negativne MPN. S druge strane JAK2 divlji tip AML ne nastaje iz JAK2 V617F pozitivnih MPN klonova što ukazuje na višestruke mutacije.

JAK2 V617F pozitivne MPN češće su u starijih ljudi pri dijagnozi (ET i PMF), kod viših razina hemoglobina (ET i PMF), leukocitoze (ET i PMF) i sniženog broja

trombocita (ET)<sup>58</sup>. Viši udio mutacija JAK2 V617F vezan je uz pruritus (PV i PMF), viši udio hemoglobina (PV), leukocitozu (PV, ET, PMF) i povećanu slezenu (PV, ET, PMF)<sup>59-63</sup>. Prisutnost ove mutacije i njen povećani udio nemaju utjecaj na preživljenje ili leukemijsku transformaciju<sup>63,64-69</sup>. Dapače, niži udio ove mutacije vezan je s inferiornim preživljenjem u PMF bolesnika što ukazuje na klonalnu kompleksnost PMF<sup>60,64</sup>. Udio JAK2 V617F mutacije se povećava s vremenom u PV i PMF<sup>60,62,70</sup>, ali ne i kod ET<sup>63</sup>. Ovaj fenomen koincidira s nastankom post-PV mijelofibroze, povećanjem slezene i potrebom za kemoterapijom<sup>59,69,71,72</sup>. Trenutna saznanja ne objašnjavaju vezu između JAK2 V617F mutacije i tromboze<sup>62-65,72-75</sup>.

JAK2 ekson 12 mutacije specifične su za JAK2 V617F negativne PV i prvi put su opisane 2007. godine<sup>22</sup>. Dodatna istraživanja otkrila su N542-E543 deleciju kao najčešću među više od 10 JAK2 mutacija u eksonu 12<sup>22,76-78</sup>. Mutacije u eksonu 12 uključuju delecije u okviru čitanja, točkaste mutacije i duplikacije, većinom u 7 visoko konzerviranih aminokiselina (F537-E543). Kao što je slučaj i s eksonom 14, mutacija u eksonu 12 izaziva eritrocitozu u miševa<sup>22</sup>. PV bolesnici s JAK2 ekson 12 pozitivnom mutacijom često su heterozigoti za ovu mutaciju i karakterizirani su eritroidnom mijelopoezom, subnormalnom razinom EPO i mladm životnom dobi pri dijagnozi<sup>22,33,80</sup>. Klinički tijek ovih bolesnika sličan je JAK2 V617F pozitivnim PV bolesnicima<sup>76,80,81</sup>.

Kod JAK2 T875N dolazi do zamjene treonina asparaginom na mjestu 875 u JAK2 JH1 kinaznoj domeni<sup>82</sup>. I JAK2 V617F i JAK2 T875N rezultiraju trajnom signalizacijom koja djelomično objašnjava pretjeranu osjetljivost na citokine što je karakteristika hematopoetskih stanica MPN<sup>83,84</sup>. JAK2 ekson 12 mutirani alel konstitutivno aktivira JAK-STAT signalizaciju<sup>22</sup>. Kao dokaz koji potvrđuje JAK2 signalizaciju u MPN, navodi se TEL-JAK2 onkogen, pronađen ne samo kod T i B akutnih limfoblastičnih leukemija, nego i kod nekih bolesnika sa atipičnom KML<sup>86-89</sup>. TEL-JAK2 translokacija spaja oligomerizacijsku domenu Ets TEL transkripcijskog faktora s katalitičkom domenom JAK2. Ovaj fuzijski protein konstitutivno je aktivan te inducira signale koje se mogu usporediti s onim pronađenim kod BCR-ABL onkogena<sup>89</sup>. JAK2 V617F mutacija je prisutna kod 90% PV bolesnika, a kod PMF bolesnika u samo 55% slučajeva<sup>6,33-37</sup>. U ET ova mutacija prisutna je u 65% slučajeva, a može se pronaći i u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom (MDS). Rijetko se javlja u primarnim AML

kao i KML<sup>90-93</sup>. Nije pronađena u zdravih pojedinaca, reaktivnim mijeloproliferacijama ili limfoidnim neoplazmama<sup>94-97</sup>.

### 1.3. Ostale genske mutacije Philadelphia negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi

MPL gen, lociran na 1p34 kromosomu, ključan je faktor rasta i preživljenja megakariocita. MPL gen izražen je u megakariocitima, matičnim stanicama i hematopoetskim progenitorskim stanicama u ranijoj fazi hematopoeze. Međureakcija TPO, kojeg luči stroma KS, i receptora MPL na hematopoetskoj progenitorskoj stanici ukazuje i na važnu ulogu MPL gena u održavanju homeostazne niše matičnih stanica, a ne samo u razvoju trombocita. Stjecanje mutacijske funkcije *MPL* gena vezane su uz nasljednu trombocitozu (S505N) koja je vezana uz MPN fenotip te uključuje povećanje slezene, mijelofibrozu i povećani rizik od tromboze<sup>98</sup>. Mutacija MPLW515L prvi put je opisana 2006. godine u JAK2 V617F negativnih PMF bolesnika. Ova mutacija uzrokuje i PMF slične bolesti u miševa<sup>9</sup>. MPLW515K i druge mutacije na eksonu 10 poput MPLW515S i MPLS505N opisane su u ET i PMF. Sa učestalošću između 3 i 15% MPLW515L<sup>23,24,99-102</sup> najčešća je MPL mutacija vezana uz MPN dok se MPLS505N javlja u nasljednoj trombocitemiji<sup>98</sup>.

TET2 jedan je od 3 homologna ljudska proteina (TET1, TET2 i TET3) čija funkcija uključuje (na temelju saznanja o TET1<sup>103</sup>) konverziju 5-metil-citozina u 5-hidroksimetil-citozin čime se vjerojatno regulira prepisivanje na epigenetskoj razini. TET2 mutacije prvi su put opisane 2008. godine<sup>25</sup>. Uključuju pomak okvira čitanja, uvođenje stop kodona i uvođenje drugog kodona te se protežu kroz ekson 12 i pronalaze se kod JAK2 V617F pozitivnih (17%) i negativnih (7%) MPN s prosječnom učestalošću od 16% u PV, 5% u ET, 17% u PMF, 14% u post PV MF, 14% u post ET MF i 17% u blastnoj fazi MPN<sup>104</sup>. Povećana pojava TET2 mutacije primjećena je u sistemskoj mastocitozi, neklasificiranim MPN, kroničnoj mijelomonocitnoj leukemiji (KMML), MDS, MDS/MPN, AML i idičnih X (q13) pozitivnih mijeloidnih oboljenja<sup>105-112</sup>. TET2 mutacije primjećene su i uz druge mutacije uključujući receptor retinoične kiseline alfa (engl. retinoic acid receptor alpha, RARA), MPL, KIT, fms vezana tirozin kinaza (engl. fms-related tyrosine kinase 3, FLT3), RAS, MLL, CEBPA ili nukleofosmin 1 (engl. nucleophosmin 1, NPM1)<sup>105-108</sup>.

ASXL1 gen (uključuje 12 ili 13 eksona) pojačivač je trithorax gena i Polycomb genske obitelji. Ovaj gen ima dvojaku funkciju, može biti ili aktivator ili supresor prepisivanja i utječe na potiskivanje prepisivanja koje ide preko RARA<sup>113</sup>. ASXL1 je izražen u većini hematopoetskih stanica, a knock out mišji modeli pokazuju umjereno smanjenje mijelopojeze, ali ne i razvoj MDS ili nekog drugog hematološkog oboljenja<sup>114</sup>.

CBL gen od 16 eksona nalazi se na kromosomu 11q23.3 telomerično od MLL gena i kodira citosolni protein koji ima dvojaku funkciju: negativno regulira kinaznu signalizaciju preko aktivnosti E3 ubikvitina i služi kao adaptor protein s pozitivnim učinkom na signalizaciju<sup>115</sup>. Divlji tip CBL gena sudjeluje u ubikvitinaciji MPL<sup>116</sup>, KIT<sup>117</sup> i FLT3<sup>118</sup> gena, no ukoliko je prisutna mutacija CBL gena ubikvitinacija KIT i FLT3 gena nije moguća<sup>117,118</sup>. Mutirani CBL uzrokuje onkogeni fenotip u raznim staničnim linijama te potiče neovisnost o faktorima rasta<sup>119</sup>. Relativno viski udio 13-15<sup>27,119</sup> CBL mutacija javlja se u KMML bolesnika te u 8% BCR-ABL1 negativnih atipičnih KML<sup>27</sup>. KMML, mladenačka monomijelocitna leukemija i atipična KML pripadaju u podkategorije MDS/MPN<sup>120</sup>. Udio mutacija može biti veći u post-MDS/MPN AML ili u AML s 11q aberacijom<sup>121,122</sup>. Stjecanje CBL mutacije tijekom progresije bolesti iz ET u post-ET utvrđeno je u samo jednom slučaju<sup>27</sup>. Daljnja istraživanja potrebna su da bi se otkrio doprinos CBL mutacije razvoju PMF ili post ET/PV MF i transformaciju u leukemiju.

IDH1 i IDH2 gen kodiraju izocitrat dehidrogenze 1 i 2 koje su homodimerični nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP<sup>+</sup>) ovisni enzimi koji kataliziraju oksidativnu dekraboksilaciju izocitrita u  $\alpha$ -ketoglutarat generirajući reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) iz NADP<sup>+</sup>. IDH1 i IDH2 mutacije su prvi put opisane u gliomima<sup>123</sup>, a zatim i u AML<sup>124-126</sup>, a pronalazimo ih i u drugim tumorima<sup>127-130</sup>. Većinom preživljenje AML bolesnika nije u vezi s prisutnošću IDH1 mutacija<sup>124,125,131</sup>. IDH mutacije opisane su i u post-MPN AML<sup>35-37</sup>. U bolesnika s PMF s IDHR140Q, ova mutacija je pronađena i JAK2 V617F pozitivnim eritroidnim kolonijama i leukemijskom blastima. Autori nisu našli IDH mutacije niti u jednom od 180 bolesnika s PV ili ET<sup>28</sup>. U dvije stotine bolesnika s kroničnom ili blastnom fazom MPN ispitana je prisutnost IDH1 i 2 mutacija<sup>30</sup>. Ukupno je pronađeno 5 IDH1 i 4 IDH2 mutacija sa učestalošću od 21% za blastnu fazu MPN i 4% za PMF. Ove mutacije nisu pronađene kod PV i ET. IDH mutacije nađene su u 1 od 12 uzoraka koji su prešli iz kronične u blastnu fazu i mutacija je nađena u obje faze. U ovom istraživanju nađene su IDH1 mutacije R132C i R132S i IDH2 mutacije R140Q i R140W te ih pronalazimo uz

JAK2 mutaciju. Ovi rezultati ukazuju na veću učestalost mutacija u blastnoj fazi u odnosu na kroničnu fazu MPN, ali potrebno je provesti još istraživanja kako bi se utvrdilo da li je ova mutacija rani genski događaj ili je stečena tijekom leukemijske transformacije.

IKAROS obitelj cinkovog prsta 1 (IKZF1) nalazi se na kromosmu 7p12 te kodira Ikaros faktore prepisivanja koji su važan regulatorni čimbenik limfoidne diferencijacije. Prepisivanje IKZF1 gena (7 prevedenih eksona) je karakterizirano višestrukim alternativnim isjecanjem transkripata s C- (inter-Ikaros proteinska dimerizacija) i N-terminalnim vezujućim domenama deoksiribonukleinske kiseline (engl. deoxyribonucleic acid, DNA). Gubitak funkcije ovog gena u životinjskim modelima rezultira nedostacima u B, T i NK stanicama (homozigotna delecija gena) ili limfoblastičnim leukemijama (heterozigot za dominantno negativan alel)<sup>132</sup>. IKZF1 mutacije i povećan izražaj dominantno negativnih izoformi čest je u ALL, uključujući blastnu fazu CML ili BCR-ABL1 pozitivne ALL<sup>133</sup>, što ukazuje na patogeni doprinos leukemijskoj transformaciji. Nedavna istraživanja pokazala su da su IKZF1 delecije rijetke u kroničnim fazama MPN, ali su nađene u oko 19% blastnih faza MPN<sup>134</sup>. Učestalost IKZF1 mutacija u MPN je dio funkcionalne posljedice JAK-STAT aktivacijskog puta.

PMF-PV-ET prvi put su opisane 1879., 1892. i 1934. godine, a njihova međusobna veza prepoznata je 1951., a molekularno potvrđena 2005. godine<sup>135</sup>. Za razliku od KML, patogeni mehanizam u ovim BCR-ABL1 negativnim MPN puno je složeniji, nego što se prije mislilo, a njihova JAK2 i MPL obilježja nisu analogna BCR-ABL1 translokaciju u pogledu terapijske važnosti<sup>46-50,53,68,136-156,157-161</sup>. Druge mutacije poput TET2, ASXL1, CBL i IDH su u porastu, ali su zanemarive zbog toga što nisu prisutne u drugim mijelodnim oboljenjima. Pod pretpostavkom da je JAK-STAT središnji patogeni događaj kod BCR-ABL1 negativnih MPN<sup>18,22,23,76,157,101,163</sup>, brojni anti-JAK2 adenozin trifosfat (engl. adenosine triphosphate, ATP) lijekovi su razvijeni te se nalaze u kliničkim ispitivanjima<sup>47-49</sup>. Dva lijeka koja najviše obećavaju su TG101348 (JAK2 inhibitor) i INCB018424 (JAK1/2 inhibitor)<sup>46</sup>. Drugi lijekovi koji su u kliničkim ispitivanjima za PMF, PV i ET uključuju druge kinazne inhibitore (CYT387, CEP-701, AZD1480, SB1518, erlotinib), inhibitore histon deacetilaza (ITF2357, MK-0683, panobionstat) i druge anti krvožilne endotelijalne faktore rasta monoklalnog antitijela bevacizumab<sup>47,164</sup>.

#### 1.4. Liječenje PMF

Unatoč povezanosti JAK2 signalizacije s PMF mehanizam jedinstvene mutacije još uvijek ne može objasniti etiologiju PMF. PMF je posljedica višestrukih genskih promjena. Iako je PMF uglavnom nasumična, uočena je genska predispozicija za razvoj ove bolesti koja se temelji na tihim mutacijama koje idu u prilog JAK2 mutacije<sup>165-168</sup>. Razne kromosomske aberacije poput delecije 5q, 13q, 20q i trisomije 1q javljaju se pri prelasku iz PMF u leukemiju<sup>169-174</sup>, no zbog nasumičnih javljanja ovih aberacija one se ne mogu smatrati dijagnostičkim kariotipom. Dodatne genske promjene uočene u PMF karakterizirane su povećanim izražajem i/ili mutacije c-KIT gena, gena koji kodira SCF receptor nađenog u pluripotentnim hematopoetskim stanicama<sup>175-180</sup>. Kako c-KIT mutacije nisu jedinstveno vezane uz PMF, one mogu predstavljati sekundarnu promjenu u već ionako nestabilnim staničnim odjeljcima.

Sličnost među biokemijskim putevima induciranih JAK2 mutacijom i onih induciranih BCR-ABL ukazuje kako bi JAK2 inhibitori slični imatinibu mogli biti dobra terapija za bolesnike s PMF<sup>181</sup>. Trenutno je najbolje terapija alogena transplantacija KS<sup>33-39</sup>. Nažalost, samo manjini PMF bolesnika dostupna je transplantacija. Uzrok tome su starost bolesnika ili nemogućnost pronalaska odgovarajućeg donora. Kao potencijalna terapija otkrivene su male molekule, inhibitori JAK2 kinaze (npr. INCB018424, XL019 i TG101348)<sup>189</sup> i druge molekule koje vrše nespecifičnu kinaznu inhibiciju (npr. MKS-0457, CEP-701 i AT9283)<sup>189,190</sup>. Ovi inhibitori trenutno su u fazi II kliničkog ispitivanja. Većina preliminarnih rezultata pokazala je citopeniju ovisnu o količini datog inhibitora. Teškoće u pronalasku odgovarajuće terapije ukazuju na važnost razumijevanja etiologije ove bolesti.



## 1.5. Mikrookoliš krvotvornih matičnih stanica

### Hematopoetska niša krvotvornih matičnih stanica

Povezanost hematopoeze i razvoja kostiju (osteogeneze) prvi put opisana je 1970. godine kada je Schofield uveo naziv 'niša' za mikrookoliš KMS. Schofield je pretpostavio da su KMS u kontaktu s kostima i da je upravo taj kontakt odgovoran za neograničenu proliferativnu aktivnost i inhibiciju sazrijevanja KMS<sup>191</sup>. Danas je poznato da se KMS nalaze u niši u tkivima gdje prolaze kroz proces samoobnove i diferencijacije. Strukturalno, niša je izgrađena od potpornih stanica koje tvore mikrookoliš kao i od signalnih molekula koje luče potporne stanice<sup>192-194</sup>. Glavna uloga niše je regulacija ravnoteže samoobnavljanja i diferencijacije<sup>195,196</sup>. Jedan od mehanizama koji održava tu ravnotežu je kontrola asimetrično/simetričnog dijeljenja. Kada se stanice dijele simetrično nastaju dvije identične stanice kćeri koje obje ostaju u niši kao matične stanice ili kao stanice koje će diferencirati. Asimetrična podjela znači da se matična stanica podijeli u dvije stanice od kojih jedna ostaje u niši kao matična stanica, a druga napušta nišu te diferencijacijom te stanice nastaje progenitor. Simetrična i asimetrična podjela izmjenjuju se u istoj niši ovisno o fiziološkim uvjetima mikrookoliša niše<sup>192,195,196</sup>. Također postoje i dva mehanizma kojima se može postići asimetrična podjela, ovisno događa li se stanična podjela prije ili poslije tj. da li se radi o asimetriji tijekom djeljenja ili okolišnoj asimetriji<sup>197</sup>. Unutar KS, iz KMS koje se nalaze uz endotelne koštane površine nastaju progenitori koji migriraju u krvne žile u središtu KS gdje sazrijevaju i diferenciraju<sup>198-200</sup>. Tako da se mikrookoliš uglavnom dijeli na nišu stanica osteoblasta i krvožilnu nišu<sup>201</sup>. Niša stanica osteoblasta smatra se odgovornom za regulaciju i održavanje KMS, dok se u krvožilnoj niši odvija diferencijacija prekursora koji zatim odlaze u krvne žile<sup>201</sup>.

### Niša stanica osteoblasta

KMS u KS ne izražavaju stanične biljege koje pronalazimo na hematopoetskim stanicama koje pripadaju lozi (Lin), ali zato u povećanom broju izražavaju matični stanični antigen (engl. stem cell antigen 1, SCA1) i KIT te se nazivaju LSK (Lin<sup>-</sup> SCA1<sup>+</sup> KIT<sup>+</sup>) podskupina<sup>197</sup>. U ovoj podskupini samo neke KMS predstavljaju dugoročne KMS koje doprinose hematopoezi u trajanju od par mjeseci ili životnog vijeka. One su CD34<sup>-</sup> fms<sup>-</sup> FLT3<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup> (FLT3 je tirozin kinaza 3), utišane stanice

sporog staničnog ciklusa. Drugu skupinu LKS stanica predstavljaju kratkoročne KMS koje imaju ograničenu sposobnost samoumnažanja. Kratkoročne KMS i CD34<sup>+</sup>FLT3<sup>-</sup> imaju brži stanični ciklus od dugoročnih KMS<sup>211</sup>.

Istraživanja u kojima je bio povećan ili smanjen broj osteoblasta ukazala su da osteoblasti imaju značajnu ulogu u regulaciji KMS *in vivo*<sup>197</sup>. Miševi kojima nedostaje receptor za koštani morfogeni protein (BMPRI1A), koji je normalno izražen na osteoblastima, imali su povećani broj osteoblasta i repopularizirajućih KMS u stromi KS, a broj diferenciranih stanica bio je normalan. Dugoročne KMS i osteoblasti u direktnom su dodiru preko homotipnih N-kadherin međureakcija što ukazuje da su vretenoliki osteoblasti koji izražavaju N-kadherin bitna komponenta niše KMS<sup>202</sup>.

Povećani izražaj paratiroidnog hormona (PTH)/receptora za PTH protein (PPR) koji je pod kontrolom promotora tip 1 kolagena  $\alpha 1$  (Col1 $\alpha 1$ ) dovodi do povećanog broja osteoblasta s paralelnim povećanjem broja KMS u PPR transgeničnom mišjem modelu<sup>203</sup>.

Ova istraživanja pokazuju da je povećanje broja osteoblasta u direktnoj vezi s brojem funkcionalnih dugoročnih KMS što ukazuje na važnosti uloge osteoblasta u niši<sup>202,203</sup>. Sortiranje osteoblasta preko izražaja herpes virusne timidin kinaze (stanična smrt kao odgovor na ganciklovir) u razvoju osteoblasta, a koja je pod kontrolom kolagen  $\alpha 1$  promotora također potvrđuje važnost osteoblasta u niši KMS (Col2.3DTK)<sup>204</sup>. Gubitak osteoblasta u Col2.3DTK miševima obrađenih ganciklovirom dovodi do smanjenog broja limfoidnih, eritoridnih i mijeloidnih progenitora u KS, kao i osteoklastnih progenitora. U ovih miševa smanjen je i apsolutni broj KMS kao što je i reducirana staničnost KS. Do praznjenja osteoblasta došlo je odmah nakon uklanjanja ganciklovira i odgovarajuće hematopoeze u KS<sup>204</sup>. Gensko obilježavanje osteoblasta korištenjem osteokalcinskog promotora koji je aktiviran u kasnijim fazama osteoblastogeneze od Col1 $\alpha 1$  promotora ukazuje na to da nišu čine nezreli osteoblasti jer obilježavanjem ovaj promotor nije imao utjecaj na hematopoezu<sup>205</sup>. N-kadherinski osteoblasti koji izražavaju PPR<sup>+</sup>BMPRI1A<sup>+</sup> imaju izuzetno važnu ulogu u niši, ali se smatra da nišu izgrađuju još i druge stanice poput osteoklasta, stromalnih fibroblasta i endotelnih stanica. Mnoge signalne i adhezijske molekule sudjeluju u međureakciji matična stanica-niša. Potrebno je naglasiti da ova komunikacije ide u oba smjera, odnosno da KMS imaju ulogu i u diferencijaciji mezenhimalnih stanica prema osteoblastnoj lozi<sup>206</sup>.

## Krvožilna niša

Na prisutnost drugog, specijaliziranog mikrokoliša ukazuje činjenica da je veliki udio CD150<sup>+</sup>KMS vezan uz endotel sinusoida KS. Međureakcija endotelnih stanica i KMS nije za očekivati jer obje potječu iz istog embrionskog prekursora hemangioblasta<sup>207</sup>. Stanične linije primarnih endotelnih stanica dobivene iz žumanjčane vrećice ili aortno gonadne mezonefroze potiču održavanje pa čak i klonalnu ekspanziju LSK KMS *in vitro*<sup>208,209</sup>. Suprotno ovome, krvožilno endotelne stanice izolirane iz raznih ne-hematopoetskih organa u odraslih jedinki nemaju ovu mogućnost što ukazuje na činjenicu da sinusoidalne endotelne stanice KS imaju različitu funkciju i fenotip od mikrokrvožilnih endotelnih stanica drugih organa<sup>210</sup>.

Ova niša sadrži utišane KMS te služi kao spremište, ali i kao samoobnavljajuća lokacija KMS. CD150<sup>+</sup>KMS uključuje i dugoročne KMS i samoobnavljajuće KMS. U bilo kojem trenutku 3,8% ovih stanica prolazi kroz proces proliferacije te su u tom procesu u kontaktu sa sinusoidnim endotelnim stanicama<sup>211</sup>. Kontakt CD150<sup>+</sup>KMS i sinusoida omogućuje konstantno monitoriranje koncentracije faktora koji nastaju u krvi, a koji reflektiraju stanje hematopoeze. Hematološki stres bi na taj način mogao regrutirati KMS iz endotelne niše<sup>197</sup>.

Kako smanjenje broja osteoblasta potiče vanmedularnu hematopoezu<sup>204</sup>, potvrđuje se teorija kako vaskularna niša KS zasebno ne bi mogla omogućiti hematopoezu dugog vijeka. Ovo ukazuje na funkciju krvožilne niše kao sekundarnog spremišta koja sadrži dio KMS primarne endotelne niše. Zajedno, ove dvije niše jako blisko surađuju i zajedno kontroliraju utišavanje KMS te njihov samoobnavljajući proces kao i proizvodnju ranih progenitora za održavanje homeostaze ili progenitore potrebne nakon ozljede<sup>197</sup>.

Posljednjih godina istraživanja su se temeljila na genskim promjenama malignih stanica te su opisani mnogi onkogeni i tumorsupresori, no tumori su raznoliki i njihov rast uvelike ovisi o komunikaciji različitih stanica koje se nalaze u tumorskoj masi. Maligne stanice regrutiraju krvožilne i stromalne komponente preko određenih citokina i faktora rasta kako bi proizvele plodno tlo za daljnji rast i razvoj tumora. Stoga mikrokoliš ne predstavlja samo okolinu u kojoj se razvija tumor, nego stromalne stanice mikrokoliša aktivno sudjeluju u napredovanju tumora. Promjene u mikrokolišu mogu narušiti homeostazu stanica i strome te potaknuti ne samo rast, nego i metastaziranje tumora.

Ovisno o stupnju mijelofibroze razlikuje se i histologija KS. Hiperplazija hematopoetskih stanica zapažena je u ranoj fazi bolesti, dok se u kasnijim fazama povećava udio retikulinskih vlakana i debljina trabekula. Osteoskleroza se opaža na kralježnici, zdjeličnoj kosti, proksimalnim segmentima dugih kostiju i otkriva se radiološkom metodom u 30-70% bolesnika<sup>212,213</sup>. Za razliku od MDS kod kojeg ne postoji klinička manifestacija koštanog remodeliranja<sup>214</sup>, kod PMF postoji *in vivo* model s koštanim promjenama koje su vjerojatno posljedica medularne izmjene.

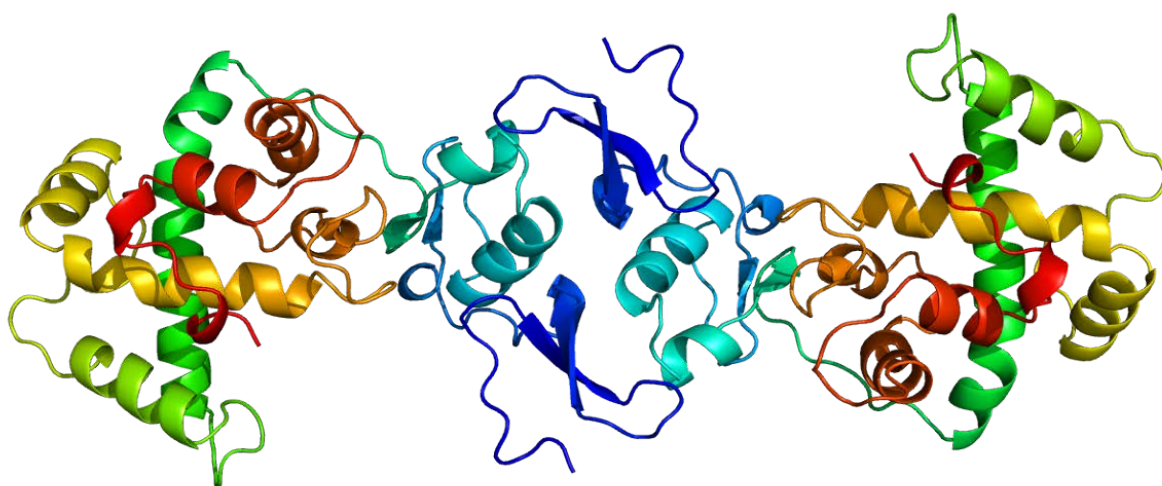
Mellibovsky i sur.<sup>215</sup> ukazali su na povezanost između histološkog bojenja i volumena kostiju što podupire hipotezu da je osteoskleroza slijedi nakon hematopoetskih promjena. Svi bolesnici pokazali su viši sadržaj minerala na vratu bedrene kosti te ukupnu gustoću bedrene kosti.

Smanjenu mineralnu apsorpciju, normalno vrijeme odlaganja, normalnu gustoću osteoida, povećanu mineralizirajuću površinu, povećanu osteoplastnu površinu, povećan broj osteoklasta i njihove površine, smanjenu dubinu erozije i normalnu debljinu stijenki pronalazimo kod ovih bolesnika. Povećani omjer volumena kostiju i ukupnog volumena u odraslih može se objasniti povećanom debljinom trabekula. Kako nema poremećaja u mineralizaciji povećana masa kostiju ukazuje na povećanu aktivaciju osteoblasta, iako se broj osteoblasta ne mijenja, ali je sinteza puno sporija. Činjenica da se kosti brže stvaraju, iako razlika nije statistički značajna, ukazuje da se opaženi porast trabekularnog volumena odvijao sporije. Povećanje broja osteoklasta i njihove površine ukazuje da je održana ravnoteža između stvaranja kostiju i resorpcije, ali smanjena dubina resorpcije ukazuje na to da bi aktivnost osteoklasta vezana uz normalnu debljinu stjenke mogla biti smanjena. Smanjena osteoplastna aktivnost dovodi do povećanja koštane mase<sup>215</sup>.

PMF pokazuje da je osteoskleroza sekundarni događaj koji ukazuje na povezanost hematopoeze i koštanih stanica tj. mikrookoliša. KMS u PMF su monoklalnog, dok su fibroblasti poliklalnog podrijetla što je potvrđeno G6PD (glukoza-6-fosfat dehidrogenaza) izoenzimskim istraživanjima. Kultivirani fibroblasti imali su normalnu kromosomsku sliku i oba tipa, B i G6PD, što ukazuje da je fibroza KS sekundarna promjena<sup>216</sup>. Reaktivnost fibroblasta potvrđena je proliferacijskom kinetikom i citogenetskim istraživanjem ovih stanica. Groopman je prvi postavio hipotezu kako proliferacija KS može biti posljedica inadekvatnog otpuštanja jednog ili više faktora rasta klonalnih megakariocita ili trombocita<sup>217</sup>.

## 1.6. SPARC

Osteonektin (engl. secreted protein acidic and rich in cystein, SPARC) se nalazi na duljem kraku ljudskog kromosma 5. Sastoji se od 286 aminokiselina, podijeljenih u 3 različite strukturne domene/modula (Slika 2)<sup>218</sup>. Prva domena sastavljena je od 52 aminokiseline s velikim brojem glutaminskih kiselinskih ostataka i može vezati do 8 kalcijevih iona s umjerenim afinitetom<sup>219</sup>. Istraživanja *in vitro* ukazala su da ova domena oponaša nekoliko funkcija (inhibicija proliferacije i kemotaksije stanica, smanjenje ekspresije fibronektina i tromospondina-1, pojačanje ekspresije inhibitora-1 plazminogenog aktivatora) cjelokupnog SPARC koje su i ovisne i neovisne o kalciju<sup>220</sup>.



**Slika 2.** Struktura SPARC proteina preuzeta s interneta [www.pdb.org](http://www.pdb.org)

Druga domena (aminokiseline (AK) 53-137) sadrži 10 cisteina, skraćenog naziva FS jer je homologna folistatinu i inhibitorima proteaza tipa Kazal<sup>221</sup>. Folistatin je inhibitor citokina aktivina i inhibina, koji su nalik transformirajućem faktoru rasta  $\beta$  (engl. transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) no za SPARC nije potvrđena ni inhibicija aktivina niti proteaza<sup>222</sup>. Pokazano je da sintetički peptidi koji odgovaraju ovoj domeni imaju mnoštvo bioloških učinaka na stanice tkivnih kultura, kao što su inhibicija proliferacije stanica i prekid žarišnih adhezija<sup>223</sup>. Nasuprot tome, ova domena sadrži dva vezna mjesta za bakar<sup>224</sup>, a jedno od njih - slijed KGHK (AK 119-122) stimulira proliferaciju stanica i angiogenezu<sup>225,226</sup>. Glikozilacija SPARC na asparaginu, koji je 99 AK u FS domeni je primjer posttranslacijske modifikacije koja mijenja funkciju

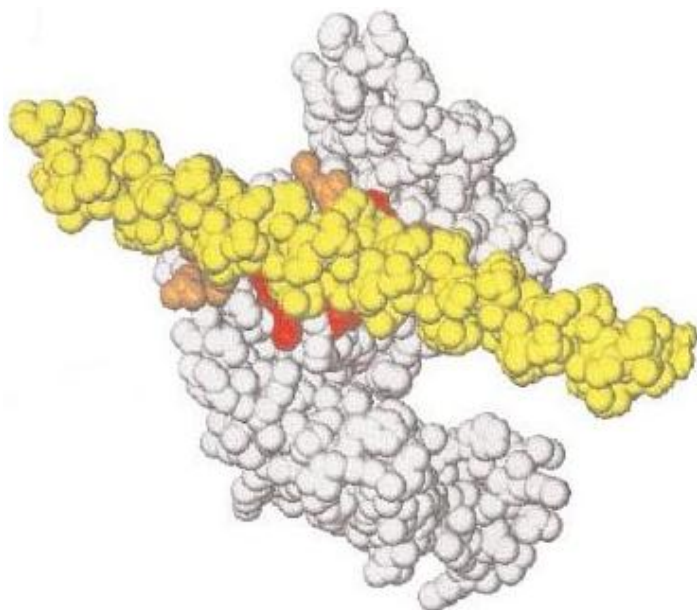
proteina<sup>218</sup>. Uzrok strukturne razlike između SPARC porijeklom iz kosti i trombocita je u glikozilaciji<sup>227</sup>. Koštani SPARC veže se na kolagen tipa I jačim afinitetom, nego SPARC porijeklom iz trombocita<sup>228</sup>. Različiti afinitet SPARC za kolagen i vjerojatno druge komponente izvanstaničnog matriksa mogao bi dijelom biti uvjetovan varijacijama u N-glikozilaciji među različitim tkivima<sup>219</sup>.

Treća domena (AK 138-286), skraćenog naziva EC (engl. extracellular calcium binding domain) ima sekundarnu strukturu  $\alpha$ -heliksa koja sadrži 2 regije snažnog afiniteta za kalcij<sup>229</sup>, koja do analize ove molekule nije bila poznata<sup>230</sup>. Okruženje tkivnih tekućina i vezivnog tkiva koje je bogato kalcijem, moglo bi zasititi SPARC što bi dovelo do strukturnih promjena potrebnih za funkcionalnost (kao što se događa i pri vezanju kalcija za unutarstanične proteine)<sup>219</sup>. Ova domena također ima epitop umjerenog afiniteta za vezanje kolagena tipa I ili IV<sup>231</sup>.

Vjerojatna uloga SPARC je regulacija međureakcije stanice s izvanstaničnim okruženjem za vrijeme razvoja i odgovora na oštećenje, a s obzirom na sposobnost SPARC da se veže na proteine izvanstaničnog matriksa, da mijenja učinak faktora rasta, da utječe na izražaj metaloproteinaza izvanstaničnog matriksa te da oblikuje stanice moglo bi mu udijeliti ulogu protuadhezivnog faktora<sup>232</sup>.

SPARC vezuje jakim afinitetom ione kalcija, koji mu moduliraju strukturu uzrokujući promjenu konformacije<sup>233</sup>, a koja smanjuje osjetljivost EC domene na proteinaze i mijenja afinitet za kolagen<sup>234</sup>. Također vezuje i ione bakra i željeza<sup>224</sup>. Snažan afinitet prema kalciju izražen je u području aminokiselina 113-130 i slijeda KGHK (AK 119-122)<sup>236</sup>. Pokazano je da peptidi koji sadrže ovaj slijed aminokiselina (dobiven proteolizom SPARC) mogu utjecati na angiogenezu *in vitro*<sup>236</sup> i *in vivo*<sup>237</sup>.

SPARC se veže na kolagen tipa I<sup>238</sup>, tipa II i III<sup>239</sup>; tipa IV<sup>240</sup>, tipa V, i tipa VIII<sup>239</sup>, regulira stvaranje kolagena tipa I, a njihova međusobna reakcija može utjecati na adheziju stanica<sup>238</sup>. Kako se SPARC veže na kolagen tipa IV (koji je dominantna komponenta bazalne membrane), abnormalnosti SPARC mogu dovesti do promjena bazalne membrane. Pokazano je da se SPARC preko treće domene veže uz vitronektin<sup>241</sup>, glikoprotein koji se nalazi u različitim područjima izvanstaničnog matriksa, posebno u stijenkama žila, koži, a vezan je uz različite karcinome<sup>242</sup>.



**Slika 3.** Kristalna struktura vezanog SPARC i kolgena (žut) preuzeto i modificirano iz Sasaki i suradnici<sup>231</sup>

Faktori rasta porijeklom iz trombocita (engl. platelet derived growth factor, PDGF) izlučuju krvožilne endotelne stanice i fibroblasti. Do sada je opisano 5 različitih dimeričnih isoformi: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD. PDGF- i reguliraju biološke funkcije stanica vezanjem za receptore  $\alpha$  i  $\beta$  (PDGF-R-  $\alpha$ , PDGF-R-  $\beta$ ) na površini stanice, a koji su tirozinske kinaze<sup>243</sup>. Svi tipovi PDGF i njihovih receptora sudjeluju u migraciji različitih tipova stanica. Usmjerenja migracija stanica u središtu je nekoliko fizioloških i patoloških procesa, kao što su rast i razvoj, cijeljenje rana, ateroskleroza, imunološki odgovor, angiogeneza i metastaziranje. Proces migracije uključuje reorganizaciju aktinskog citoskeleta, polarizaciju i adheziju stanica<sup>244</sup>. PDGF su ključni faktori opstanka (engl. survival) stanica zahvaljujući inhibiciji apoptoze i poticanju proliferacije s obzirom da su mehanizmi proliferacije i transformacije stanica usko povezani s apoptozom: sudbina proliferirajuće stanice je apoptoza ukoliko nisu primljeni specifični signali opstanka<sup>245</sup>. SPARC se vezuje isključivo na B-lanac (te stoga na dimere AB i BB, dok ne AA) faktora rasta porijeklom iz trombocita što sprječava vezanje PDGF za receptore na fibroblastima<sup>246</sup> i time utječe na biološku aktivnost PDGF.

Obitelj faktora rasta krvožilnog endotela (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF) glikolizirani su proteini u formi homodimera s disulfidnom vezom, koji su mitogeni endotelnih stanica. Imaju različite učinke: posreduju u povećanju propusnosti krvnih žila, induciraju angiogenezu i vaskulogenezu te rast endotelnih stanica podržavajući migraciju stanica i inhibirajući apoptozu<sup>247</sup>. SPARC se veže za VEGF ometajući njegovo vezivanje za endotelne stanice i na taj način inhibira proliferaciju endotela<sup>248</sup>.

Do danas je otkriveno 23 faktora rasta fibroblasta (engl. fibroblast growth factors, FGFs). Nazivi im se razlikuju samo po broju. Faktori rasta fibroblasta sudjeluju u različitim staničnim procesima uključujući apoptozu, opstanak stanica, kemotaksiju, adheziju, migraciju, angiogenezu, diferencijaciju i proliferaciju stanica<sup>249</sup>. Značajne fiziološke funkcije FGF-2 su poticanje angiogeneze (faktor je rasta za fibroblaste i endotelne stanice, potiče migraciju endotelnih stanica regulacijom adhezijskih molekula na površini stanice), pupanje i razvoj udova embrija. Kod maligne bolesti dolazi do pojačanog izražaja FGF-2 (do sad nisu zabilježene mutacije FGF koje bi ih aktivirale). Također, konstitucijski aktiviran receptor FGF-2 pronađen je kod osteosarkoma, dok FGF-2 pojačava izražaj bcl-2 (antiapoptotičkog proteina) kod limfoproliferativnih tumora i glioma<sup>250</sup>. SPARC utječe i na biološku aktivnost osnovnog faktora rasta fibroblasta (engl. basic fibroblast growth factor, bFGF) inhibirajući njegov receptor (engl. fibroblast growth factor receptor, FGFR-1), čime dovodi do inhibicije proliferacije endotelnih stanica i diferencijacije skeletnih mioblasta<sup>251</sup>. Međureakcijom ova 2 faktora SPARC utječe na angiogenezu.

TGF- $\beta$  je faktor rasta kojeg stvaraju gotovo sve stanice tijela, uključujući epitelne, endotelne, hematopoetske stanice, neurone i stanice vezivnog tkiva; a također posjeduju i njegove receptore. TGF- $\beta$  potiče rast tkiva i morfogenezu tokom embrionalnog razvoja, dok aktivira procese stanične smrti i na taj način održava homeostazu u zrelim tkivima. Maligne stanice nadilaze ove učinke akumulirajući mutacije koje utišavaju ili isključuju učinke TGF- $\beta$ <sup>252</sup>. TGF- $\beta$  ključni je regulator cijeljenja rana i fibroziranja inducirajući sintezu proteina izvanstaničnog matriksa uključujući kolagen i fibronektin<sup>253</sup>, a inducira i izražaj SPARC<sup>254</sup>. TGF- $\beta$  povišuje razinu glasničke RNA (engl. messenger RNA, mRNA) SPARC pomoću posttranskripcijskog mehanizma u jezgri ljudskih fibroblasta<sup>255</sup>. Vrijedi i obrnuto, SPARC može pojačati izražaj TGF- $\beta$  (mRNA i proteina) u mezangijskim stanicama miševa<sup>256</sup>. Nadalje, SPARC pojačava



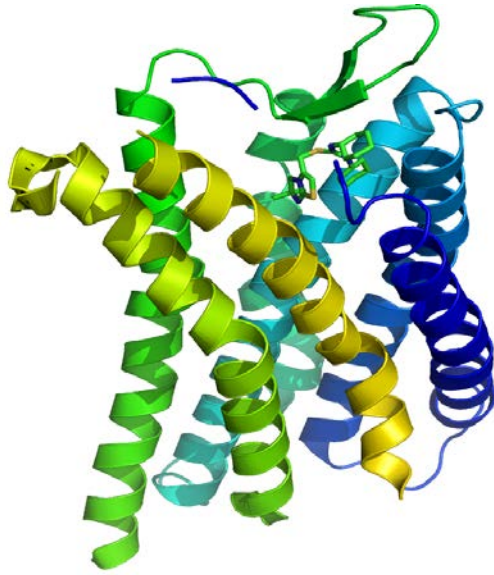
stimulatorni učinak TGF- $\beta$  na mezangijske stanice<sup>257</sup> kao što pojačava i inhibitorne funkcije TGF- $\beta$  na epitelne stanice<sup>258</sup>. Stoga se može reći da između SPARC i TGF- $\beta$  postoji uzajamna recipročna regulatorna povratna sprega.

Istraživanja *in vitro* pokazala su da SPARC slabi prijanjanje stanica za izvanstanični matriks u ovisnosti o koncentraciji<sup>259</sup>. Restrukturirajući žarišne adhezije SPARC dovodi do slabljenja stanja adhezije, dovodeći i do promjene oblika stanice. Produljeno izlaganje SPARC dovodi preko indukcije intermedijarnog stanja adhezije do stanja u kojem je stanica zaobljenog oblika. Dva niza AK SPARC proteina smještenih u različitim domenama mogu stimulirati reorganizaciju žarišnih adhezija i to neovisno jedna o drugoj<sup>260</sup>. Slabljenje ili prekid međureakcija s izvanstaničnim matriksom postiže se kontroliranom proteolizom koju obavljaju metaloproteinaze izvanstaničnog matriksa (engl. matrix metalloproteinases, MMPs). Obitelji metaloproteinaza izvanstaničnog matriksa čine intersticijske kolagenaze (MMP-1, 8, 13), gelatinaza A (MMP-2), gelatinaza B (MMP-9), stromelizini (MMP-3, 10, 11), matrilizin (MMP-7), metaloelastaza (MMP-12) te skupina metaloproteinaza matriksa nazvanih tipom membrana. Intersticijske kolagenaze cijepaju sve ostale komponente izvanstaničnog matriksa. Pokazano je da SPARC stimulira stvaranje metaloproteinaza matriksa u stanicama monocita<sup>261</sup>. Čini se da je ova uloga SPARC dvojaka ovisno o tome da li je došlo do njegove razgradnje – što čine mnoge proteaze u *in vitro* uvjetima: katepsini, stromelizini, neutralne metaloproteinaze, elastaze i serinske proteaze tripsin i plazmin<sup>185</sup>. Enzimatska razgradnja SPARC oslobađa peptide koji sadrže GHK slijed te podupiru angiogenezu *in vivo*, što je dodatno potvrđeno kasnijim istraživanjima koja su pokazala da razgradnja SPARC metaloproteinazom matriksa-3 također oslobađa peptide koji sadrže GHK slijed te podupiru angiogenezu<sup>262</sup>.

O biološkoj ulozi SPARC u neoplazmama krvotvornog tkiva malo se zna. Praćen je u multiplom mijelomu, AML, ali ne i u PMF.

## 1.7. CXCR4

Stromalni faktor 1/CXC kemokinski ligand 12 (engl. stromal derived factor 1, SDF-1/CXCL12) odgovoran je za privlačenje KMS i progenitorskih stanica. Proizvode ga endotelne stanice, nezreli osteoblasti i stromalne stanice unutar KS kao i CD34+ stanice<sup>263</sup>. Receptor SDF-1 je kemokinski receptor 4 (engl. C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4). CXCR4 pripada obitelji od sedam trans membranskih domena udruženih s heterotrimernim G1 proteinima. Istraživanja su pokazala da embrionalni nedostatak SDF-1 ili CXCR4 dovodi do smrti karakterizirane greškama u razvoju srčanog, gastrointestinalnog sustava kao i krvnih žila, središnjeg živčanog sustava (SŽS) te nedovoljne proizvodnje KMS i zrelih stanica mijeloidne ili limfoidne loze<sup>264-267</sup>. Također sudjeluju u širenju metastaza<sup>268-271</sup>. Lokalno proizveden SDF-1<sup>272</sup> odgovoran je za čvrsto vezanje KMS uz endotel KS u mišjem modelu, dok je dodatni SDF-1 uzrokovao odlazak KMS i zrelih leukocita u krvotok i jetru<sup>273</sup> stoga je zaključeno da je pozitivan gradijent SDF-1 mehanizam normalnog zadržavanja KMS u KS. Mobilizacija KMS koja je posljedica primjene granulocitno stimulatornog faktora (engl. granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) ili kemoterapeutika<sup>274,275</sup> povezana je s otpuštanjem proteolitskih enzima poput katpsina G, neutrofilne elasataze, i MMP-9 koje uzrokuju razgradnju SDF-1 i cijepanje N terminalnog kraja CXCR4<sup>274</sup>. Negativna korelacija pronađena je između mobiliziranih KMS u PK i genskog izražaja CXCR4 u bolesnika koji su primali kemoterapiju sa G-CSF<sup>276</sup> ili sami G-CSF<sup>277</sup>. CD34+ stanice u KS bolesnika obrađenih G-CSF pokazuju nižu membransku gustoću CXCR4. Mobilizacija CD34+ stanica ovisna je o gustoći CXCR4 na staničnoj membrani<sup>278</sup>. Mehanizam kojim G-CSF utječe na izražaj CXCR4 nije do kraja razjašnjen, ali je djelomično ovisan o proteolitičkim modifikacijama s funkcionalnim inaktivacijama receptora<sup>275</sup>. Pokazano je naime da G-CSF snižava razinu CXCR4 u mijeloidnim stanicama<sup>279</sup> preko transkripcijskog represora neovisnog faktora rasta 1<sup>280</sup>. Vezanje SDF-1 brzom fosforilacijom i internalizacijom regulira razinu CXCR4 na migrirajućim stanicama te je moguće da je kretanje KMS posljedica promjena u izražaju SDF-1 i/ili CXCR4<sup>281</sup>.



**Slika 4.** Struktura CXCR4 proteina preuzeta s interneta [www.sbk.org](http://www.sbk.org)

S obzirom da je jedna od glavnih karakteristika PMF konstitutivna mobilizacija CD34+ stanica u PK, 300 puta je veći broj CD34+ stanica u PK nego u zdravih jedinki, a 20-30 puta veći nego kod bolesnika s PV i ET<sup>282</sup>. Mobilizacija stanica u PMF nije samo ograničena na KMS, nego i na CD133+ stanice i stanice s endotelnim receptorom krvožilnog faktora rasta fenotipa 2+ u ranijim fazama bolesti<sup>283</sup>. Iako ove stanice ne sudjeluju kao prave endotelne progenitorske stanice i njihova uloga u stvaranju krvnih žila i/ili homeostazi nije još razjašnjena mogle bi biti podložne istom mehanizmu kojim KMS napuštaju KS<sup>284</sup>. Taj mehanizam vjerojatno stvara proteolitički okolinu za SDF-1 unutar KS<sup>285,286</sup>. Sniženi izražaj CXCR4 u CD34+ stanicama PMF također ima ulogu u ovom mehanizmu<sup>287,288</sup>. Stoga je istraživanje izražaja CXCR4 uključeno u ovaj rad kako bi se rasvijetlila konstitutivna migracija CD34+ stanica u krvotok.

### **1.8. PAX5 C terminus**

PMF je karakterizirana i prisutnošću klonalnih B-limfocita<sup>289</sup>. Gen odgovoran za proliferaciju B limfocita je iz obitelji PAX transkripcijskih faktora čije je obilježje visoko prezerviran DNA vezujući motiv poznat pod nazivom paired box. PAX proteini su važni regulatori ranog razvoja te se njihove alteracije smatraju odgovornim za

neoplastične transformacije<sup>290</sup>. *PAX5 C terminus* izražen je u ranoj fazi diferencijacije B limfocita. Njegov izražaj otkriven je u razvoju SŽS i testisa te njegov protein može imati ulogu u neuralnom razvoju i spermatogenezi<sup>291</sup>. Lociran je na 9. kromosomu koji je podložan translokacijama u limfomima. Ovim translokacijama IgH pojačivač dolazi u blizinu PAX5 promotora.

## 1.9. COX-2

Angiogeneza je važan događaj u embriogenezi, upalnim procesima te širenju metastaza<sup>292</sup>. Kronična upala je čimbenik uzroka raka<sup>293</sup>, ali je još uvijek nedovoljno istražena. Na mjestu upale prisutan je enzim ciklooksigenaza-2 (COX-2) koji sudjeluje u sintezi pro-upalnih i angiogenih prostaglandina (PG) poput PEG2 koji uključuju MMP i VEGF<sup>294,295</sup>. Mnogi lijekovi baziraju mehanizam svog djelovanja na inhibiciji COX-2<sup>296</sup>. Kod mnogih malignih oboljenja poput raka debelog crijeva i dojke razina COX-2 je povišena. Povišen COX-2 potiče sintezu PG<sup>297</sup>, VEGF i TGF- $\beta$  čime se potiče angiogeneza. Razina COX-2 povišena je u raku debelog crijeva<sup>296</sup>, raku pluća, ali ne i u epitelnom tkivu koje okružuje tumore<sup>298</sup>. Povišena razina COX-2 znači lošiju prognozu kod bolesnica s rakom cerviksa<sup>299</sup>, kao i širenje bolesti kod bolesnika s rakom debelog crijeva<sup>300</sup>. Povišenu razinu COX-2 pronalazimo i kod raka prostate<sup>301</sup>, melanoma<sup>302</sup> i retinoblastoma<sup>303</sup>. Razina COX-2 u PMF još nije istražena, no s obzirom na agresivnost ove bolesti za očekivati je povišeni izražaj.

## 1.10. K-RAS

Onkogen obitelj Ras intenzivno se istražuje već godinama, no s obzirom na njen udio u patološkim promjenama raka kao i u kontroli stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja, taj interes na jenjava<sup>304,305</sup>. H-ras, N-ras i K-ras prvi su opisani onkogeni. Oni zajedno s ostalih 150ak članova pripadaju Ras GTPaznoj obitelji. Uključeni su u kontrolu staničnog ciklusa, rast, migraciju, promjene citoskeleta i apoptozu. Mutacije ras gene uočene su u mnogim malignim oboljenjima<sup>306,307</sup>. Prisutne su u hematološkim oboljenjima sa učestalošću od 5% u KML te 27% u KMML<sup>308</sup>. Mutacije K-ras i N-ras pronađene su u multiplom mijelomu<sup>309</sup>. Postoje mnoga oprečna istraživanja vezana uz

AML. Određeni literaturni navodi tvrde da je mutacija N-ras vezana uz lošiju prognozu<sup>310</sup> dok druga istraživanja tvrde da ne utječe na ishod bolesti<sup>311,312</sup>. U PMF mutacije Ras obitelji još nisu istražene.

### 1.11. *FOS*

Genska obitelj FOS sastoji se od četiri člana: *FOS*, *FOSB*, *FOSL1* i *FOSL2*. Ovi geni kodiraju leucin zipper proteine koji dimeriziraju s JUN proteinima tvoreći pritom transkripcijski faktor AP-1. Sudjeluju u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji i transformaciji te je negdje uočena i njihova uloga u apoptozi<sup>313</sup>. FOS je jezgri fosfoprotein koji tvori čvrsti, ali ne i kovalentno vezani kompleks s JUN/AP1 transkripcijskim faktorom koji regulira TGF- $\beta$  signalizaciju. Kako još nije istražen u MPN, a dio je mnogih signalnih puteva, uvršten je u ovo istraživanje.

### 1.12. *HIF1 $\alpha$*

Promjene u koncentraciji kisika česte su u normalnim tkivima, ali su posebno snižene u tumorima<sup>314</sup>. Glavni mehanizam odgovora na smanjenje koncentracije tkiva je hipoksija inducibilni transkripcijski faktor (engl. hypoxia inducible factor 1, HIF1) koji se sastoji od dvije podjedinice ( $\alpha$ ,  $\beta$ ). HIF1 $\beta$  je konstitutivno aktivna jedinica dok je HIF1 $\alpha$  podjedinica ovisna o promjeni kisika<sup>315</sup>. Raščlanjivanje uloge HIF1 $\alpha$  faktora u PMF moglo bi doprinijeti razumijevanju biologije ove teške zloćudne bolesti jer ove podjedinice imaju glavnu ulogu u prilagodbi stanica na sniženu razinu kisika kao i na upalni stres, a koji su obilježja PMF.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

### 2.1. Hipoteza

Uloga SPARC, CXCR4, PAX5 C terminus, COX-2, K-RAS, FOS i HIF1 $\alpha$  molekula je u komunikaciji između stromalnih stanica i KMS te staničnom metabolizmu i proliferaciji, a dosadašnja istraživanja ne daju dostatne informacije o etiologiji bolesti.

Dokazat ćemo da je u PMF poremećena regulacija izražaja ovih gena, molekula adhezije, metaboličkih molekula i onkogeni što predstavlja ključni patogenetski mehanizam koji omogućuje patološkom klonu prevagu čija je jedna od posljedica i izrazito povišen odlazak nezrelih KMS u PK. Ovo zbivanje je i jedna od osnovnih patofizioloških i bioloških značajki ove bolesti.

### 2.2. Ciljevi istraživanja

U morfološki i klinički definiranim bolesnicima s PMF :

1. Odrediti izražaje gena *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  pri dijagnozi PMF u odnosu na zdrave ispitanike
2. Odrediti postoji li promjena u izražaju gena *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  uz terapiju lenalidomid/prednizonom
3. Odrediti postoji li veza između JAK2 mutacije i/ili citogenetskih abnormalnosti i izražaja *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  gena
4. Odrediti postoji li promjena u izražaju *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  gena u uspostavljenoj kulturi stromalnim stanicama mikrookoliša u odnosu na zdrave ispitanike

### **3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE RADA**

#### **3.1. Ispitanici**

U ovo istraživanje uključeno je 32 bolesnika s dijagnozom PMF od 2005. do 2008. godine te 6 zdravih donora. Kriterij za odabir bolesnika bila je dijagnoza PMF postavljena po kriterijima SZO iz 2008. godine koji uključuju u uvodnom dijelu opisane kliničke, morfološke i molekularne parametre prema prijedlogu A. Tefferi i suradnika<sup>7</sup>. Svi bolesnici prikupljeni su i liječeni u MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA. Ovi bolesnici liječeni su drugom generacijom imunomodulatornog inhibitora lenalidomida uz prednizon. Terapijski protokol bio je 10 mg lenalidomida dnevno 21 dan uzastopno u ciklusu od 28 dana u kombinaciji sa 30 mg dnevno prednizona svaki drugi dan u drugom ciklusu te 15 mg dnevno svaki drugi dan u trećem ciklusu. Terapija lenalidomidom provedena je neograničeno u bolesnika s vidljivim kliničkim napretkom.

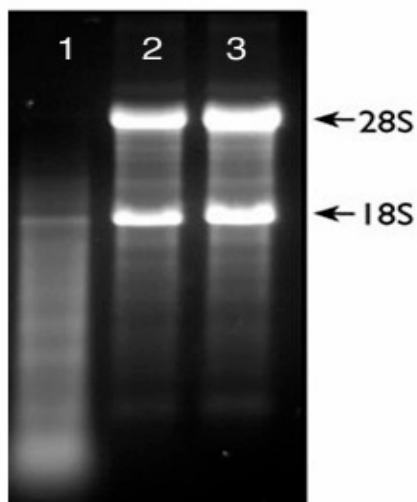
Od svakog ispitanika dobiven je pismeni pristanak za pretrage te korištenje dijagnostičkih uzoraka za istraživanje, a istraživanje je odobrilo etičko povjerenstvo MD Anderson Cancer Center-a. Ono je također regulirano ugovorom izvođenja znanstvenoistraživačkog projekta „Genetika i funkcija hematopoeze i mikrookoliša Ph-mijeloproliferativnih bolesti“ Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske.

#### **3.2. Molekularne metode**

Molekularne analize učinjene su pomoću lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR) na uzorcima aspirata stanica KS ili PK rutinski uzetih bolesnicima prilikom postavljanja dijagnoze te svaka 3 mjeseca uz terapiju lenalidomid/prednizonom.

### 3.2.1. Metoda RNA izolacije i reverzne transkripcije

Ukupnu staničnu ribonukleinsku kiselinu (engl. ribonucleic acid, RNA) izolirali smo iz mononukleara uz pomoć Trizola te smo koncentraciju i čistoću RNA odredili spektrofotometrijskom metodom<sup>316</sup>. Kvaliteta RNA određena je elektroforezom u trajanju od 1 sat uz 70 V na 1% agaroznom gelu u Tris/Borat/EDTA puferu (TBE).



**Slika 5.** Određivanje kvalitete RNA na 1% agaroznom gelu (reprezentativna elektroforeza). 1 – RNA neodgovarajuće kvalitete. 2, 3 – RNA odgovarajuće kvalitete jer prikazuju podjedinice ribosomske RNA (28S i 18S).

Bit ove izolacijske metode je liza stanica reagensima koji istovremeno inhibiraju RNA-ze (enzimi koji cijepaju RNA). RNA se od DNA i proteina odjeljuje taloženjem i ekstrakcijom s fenolom i kloroformom. Prijepis RNA u komplementarnu DNA (engl. complementary DNA, cDNA) napravljen je prema uputi proizvođača za Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) i to za 2  $\mu\text{g}$  RNA po uzorku. Prepisivanje (reverzna transkripcija) uključuje zagrijavanje smjese 2  $\mu\text{L}$  heksamera (50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  10mM deoksiribonukleotid trifosfata (engl. deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP) te 2  $\mu\text{g}$  RNA kroz 7 minuta na 65°C, zatim hlađenje od 2 minute na ledu. Potom se dodaje 9  $\mu\text{L}$  smjese koja sadrži 2  $\mu\text{L}$  x 10 RT pufera (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 4  $\mu\text{L}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{L}$  DTT (0.1 M) te 1  $\mu\text{L}$  inhibitora RNA-za (40 U/ $\mu\text{L}$ ) te se sve stavi na 25°C 2 minute. Slijedeći korak je dodavanje enzima SuperScript II RT (50 U/ $\mu\text{L}$ ) te se cjelokupna smjesa stavi na 25°C 10 minuta, potom na 42°C 60 minuta te 70°C 15 minuta nakon čega se stavlja na led te dodaje 1  $\mu\text{L}$



enzima *E. Coli* RNase H (2 U/ $\mu$ L) te inkubira na 37°C 20 minuta. Dobivena cDNA razrjeđuje se u omjeru 15  $\mu$ L cDNA+15  $\mu$ L destilirane H<sub>2</sub>O.

### 3.2.2. Mjerenje izražaj *Sparc*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$* gena

Za umnažanje cDNA pomoću lančane reakcije polimeraze s fluorescentno obilježenim oligonukleotidnim probama korišten je 7000 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Kvantifikacija u odnosu na uzorak kalibrator, omogućena je mjerenjem fluorescencije (koja je proporcionalna količini nastalog produkta) u svakom ciklusu reakcije.

Kao kontrolni gen koristili smo  $\beta$ -aktin: korištene su početnice slijeda 5'-GATGGCCACGGCTGCTT-3, 5'-ACCGCTCATTGCCAATGG-3' te fluorescentno obilježena proba , 6FAM5'-ACCACCACGGCCGAGCGGCAMGMNFQ.

Za PCR reakciju korišten je volumen od 25  $\mu$ L smjese koja se sastoji od 5  $\mu$ L razrijeđene cDNA i 20  $\mu$ L smjese za PCR.

Smjesa za PCR za  $\beta$ -aktin, *COX-2*, *SPARC*, *HIF1 $\alpha$* , *FOS* i *K-RAS* gen

Početnica	0,5 $\mu$ L
Početnica	0,5 $\mu$ L
Proba	0,5 $\mu$ L
Taqman Universal PCR Master Mix	12,5 $\mu$ L
Dest. H <sub>2</sub> O	6 $\mu$ L
<b>UKUPNO</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>

**Tablica 1.** Početnice i fluorescentno obilježene probe za umnožavanje ciljnih gena

početnica	nukleotidni slijed početnice/probe
uzvodna početnica COX-2	5'-CCTTCCTCCTGTGCCTGA TG-3'
nizvodna početnica COX-2	5'-ACAATCTCATTGAATCAGGAAGC T-3'
fluorescentno obilježena proba COX-2	6FAM5'-TGCCCGACTCCCTTGGGTGTCAMGBNFQ
uzvodna početnica SPARC	5'-TCTTCCCTGTACACTGGCAGTTC-3'
nizvodna početnica SPARC	5'-AGCTCGGTGTGGGAGAGGTA-3'
fluorescentno obilježena proba SPARC	6FAM5'- CAGCTGGACCAGCACCCATTGACAMGBNFQ
uzvodna početnica HIF1 $\alpha$	5'-CTCATCCAAGAAGCCCTAACGTGT T-3'
nizvodna početnica HIF1 $\alpha$	5'-GCTTTCTCTGAGCATTCTGCAAAG C-3'
fluorescentno obilježena proba HIF1 $\alpha$	6FAM5'- CCTCAGGAACTGTAGTTCTTTGACTCAAAGCGAC AMGBNFQ
uzvodna početnica FOS	5'-CGAGCCCTTTGTATGACTTCCT-3'
nizvodna početnica FOS	5'-GTCCATGTCTGGCACGGAG-3'
fluorescentno obilježena proba FOS	6FAM5'- CCCAGCATCATCCAGGCCAGTCAMGBNFQ
uzvodna početnica K-RAS	5'-TTCCTACAGGAAGCAAGTAG-3'
nizvodna početnica K-RAS	5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCA-3'
fluorescentno obilježena proba K-RAS	6FAM5'- TTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGCAGMBNFQ

Za gene *CXCR4* i *PAX5 C terminus* korištene su patentirane smjese početnica i proba tvrtke Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA po rednim šiframa **CXCR4:** Hs00607978\_s1 i **PAX5 C terminus:** Hs00277134\_m1.

Smjesa za PCR za *CXCR4* gen

Hs00607978_s1	1,5 µL
Taqman Universal PCR Master Mix	12,5 µL
Dest. H <sub>2</sub> O	6 µL
<b>UKUPNO</b>	<b>20 µL</b>

Smjesa za PCR za *PAX5 terminus* gen

Hs00277134_m1	1,5 µL
Taqman Universal PCR Master Mix	12,5 µL
Dest. H <sub>2</sub> O	6 µL
<b>UKUPNO</b>	<b>20 µL</b>

Uzorke smo nanijeli na sterilnu pločicu, za kontrolni  $\beta$ -*aktin* gen u duplikatu, a za ciljani gen u triplikatu. Program umnažanja sastojao se od 2 minute na 50°C (aktivacija), 10 minuta na 95°C (aktivacija AmpliTaq Gold DNA polimeraze), i 50 PCR ciklusa (15 sekundi na 95°C-taljenje i 1 minuta na 60°C-ekstenzija).

### 3.2.3. Analiza V617F mutacije *JAK2* gena

Mutacijski status *JAK2* V617F odredili smo alel-specifičnom PCR reakcijom prema Baxter i sur.<sup>21</sup> koristeći zajedničku obrnutu početnicu slijeda GTAATACTAATGCCAGGATCACTAAGTTT, usmjerenu početnicu specifičnu za mutaciju AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTAGGTT i kontrolnu usmjerenu početnicu GAAGATTTGATATTTAATGAAAGCCTTG.

Smjesa za PCR sastoji se od:

2,5  $\mu\text{L}$  10 x PCR pufera

1,5  $\mu\text{L}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$

1,0  $\mu\text{L}$  zajedničke usmjerene početnice (10  $\mu\text{M}$ )

0,5  $\mu\text{L}$  usmjerene početnice specifične za mutaciju (10  $\mu\text{M}$ )

0,5  $\mu\text{L}$  kontrolne usmjerene početnice (10  $\mu\text{M}$ )

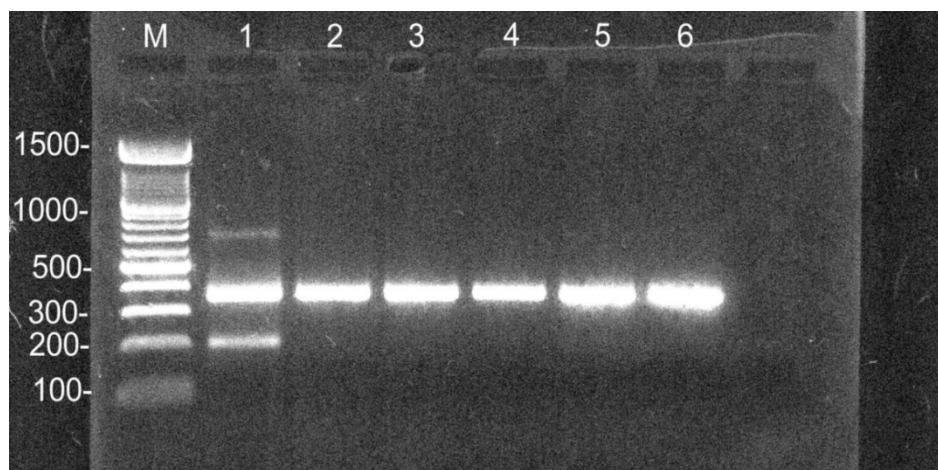
0,5  $\mu\text{L}$  dNTPs (2.5 mM)

18,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

0,25  $\mu\text{L}$  AMPLI TAQ gold DNA polimeraze

1,0  $\mu\text{L}$  cDNA

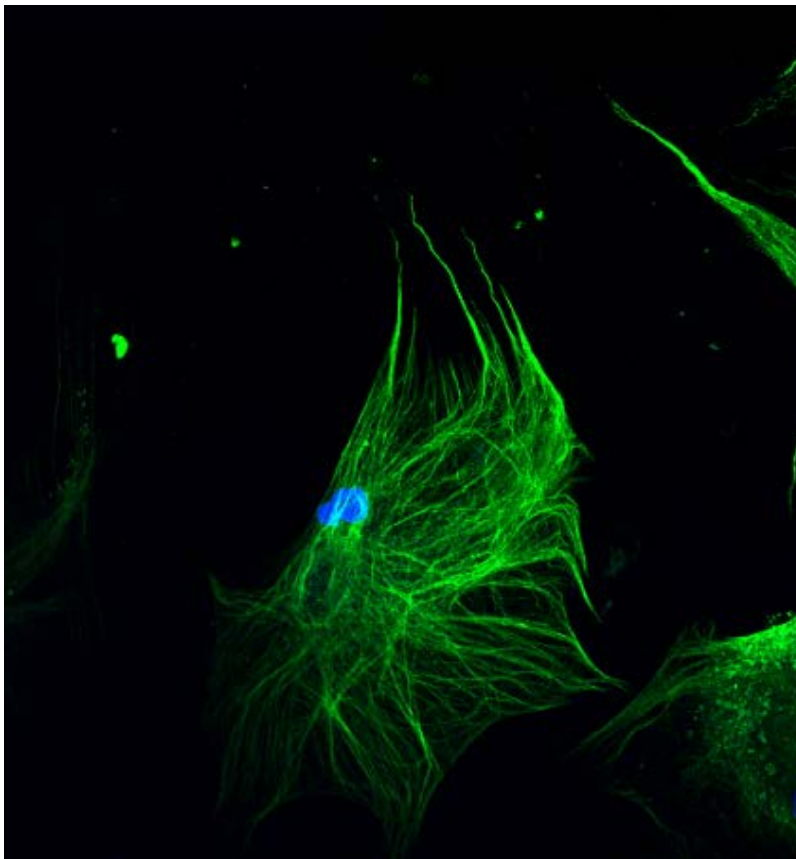
Program umnažanja sastojao se od 11 minuta na 94°C (aktivacija AmpliTaq Gold DNA polimeraze), 39 PCR ciklusa (30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 56°C, 30 sekundi na 72°C), 7 minuta na 72°C (elongacija) te pohrane na 4°C. Umnožene ulomke razdvojili smo elektroforezom (30 minuta na 120 V u 1 x TBE puferu) na 2%-tnom agaroznom gelu uz upotrebu etidij bromida kako bi se razdvojeni uzorci vidjeli pod ultraljubičastim svjetlom. Mutirani uzorak ima 2 vrpce (od 230 parova baza (pb) i 364 pb), a nemutirani samo kontrolnu vrpce (364 pb), Slika 6.



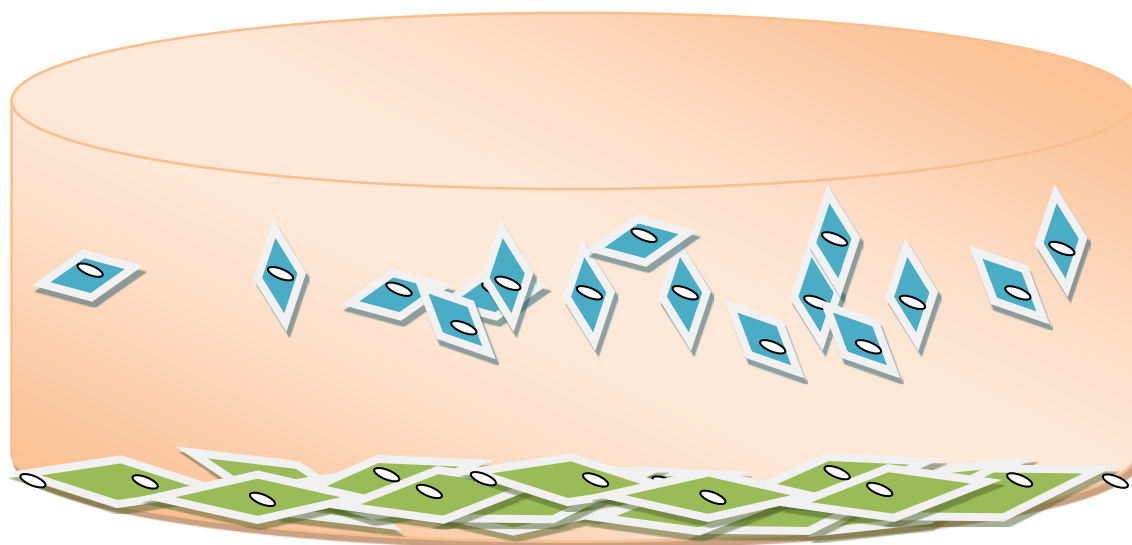
**Slika 6.** Primjer PCR analize JAK2 V617F mutacije (reprezentativna elektroforeza na agaroznom gelu). M-biljeg za određivanje veličine fragmenata- DNA biljeg molekularne težine XIV (ljestvica po 100 parova baza), stupac 1-uzorak s prisutnom mutacijom JAK2 V617F, stupci 2,3,4,5,6- uzorci s nemutiranom JAK2

### 3.3. Uspostavljanje kulture stromalnih stanica

Dvadeset milijuna nesortiranih mononukleara iz aspirata KS 20 bolesnika pri dijagnozi i 6 zdravih komercijalnih aspirata postavljeno je u eksperimentalne posude od 100 cm<sup>3</sup> sa  $\alpha$ MEM medijem i 20%-tnim goveđim fetalnim serumom te inkubirano na temperaturi od 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. Pola medija je tjedno uklanjano i zamijenjeno sa  $\alpha$ MEM medijem koji sadrži 10% goveđeg fetalnog seruma kako bi se uspostavila kultura stromalnih stanica. Nakon nekoliko tjedana skupljen je medij koji sadrži nepriljepljene stanice. Priljepljene stanice obrađene su tripsinom te također skupljene. Sve skupljene stanice sortirane su prema CD34 biljegu uz pomoć CD34 MACS Microbead kita (Milteny Biotec, Auburn CA, USA). Iz sortiranih stanica izolirana je RNA prema već gore navedenoj metodi te je izmjeren izražaj gena.



**Slika 7.** Mezenhimalna stromalna stanica obilježena SPARC protutijelom te snimljena pod invertnim mikroskopom.

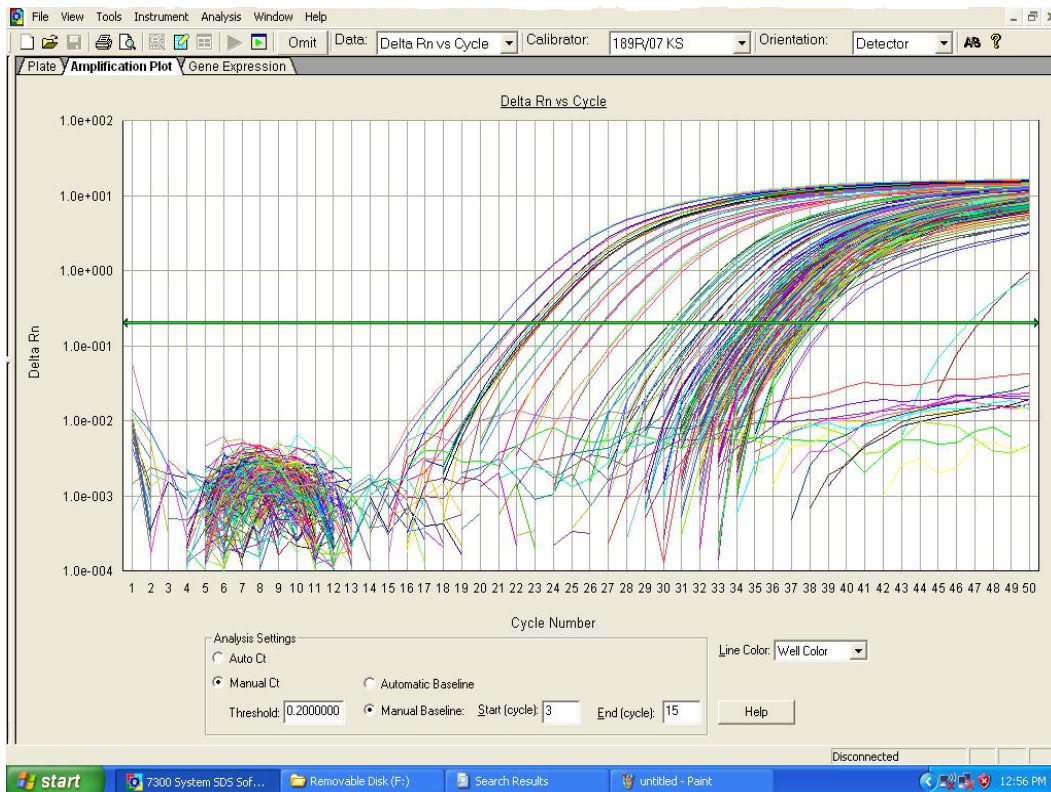


**Slika 8.** Shematski prikaz stanične kulture stromalnih stanica. Plava boja predstavlja nepriljepljene stromalne stanice koje se nalaze u mediju (KMS), a zelena priljepljene stromalne stanice uz dno ekperimentalne posude (stromalne). I plave i zelene stanice međusobno se razlikuju prema CD34 biljegu.

### 3.4. Analiza RT-PCR podataka

Za analizu rezultata korišten je GraphPad Prism5 program. Izražaj gena standardiziran je u odnosu na unutarnju kontrolu  $\beta$ -aktin za svaki uzorak te su rezultati prikazani Whiskers Min - Max grafom. Mann-Whitneyev test korišten je kako bi usporedili vrijednosti zdravih kontrola i bolesnika, Friedmanov za usporedbu izražaja gena uz terapiju, a Kurskal-Wallisov test za usporedbu stromalnih skupina stanica iz uspostavljene kulture. Srednja vrijednost više mjerenja kontrolnih KS i PK korištena je prilikom statističke obrade.

Rezultati analize prikazani su kao  $2^{\Delta Ct}$  vrijednosti ili kao omjer srednje vrijednosti ciljanog gena i srednje vrijednosti  $\beta$ -aktina. Ct je broj ciklusa potrebnih da se količina umnoženog PCR produkta podigne iznad granične vrijednosti (treshold value). Stoga je  $\Delta Ct$  obrnuto proporcionalna količini mRNA. Viša  $2^{\Delta Ct}$  vrijednost predstavlja jači izražaj, a omjer srednjih vrijednosti je obrnuto proporcionalan izražaju.



**Slika 9.** Prikaz rezultata umnažanja fragmenata cDNA gena iz programa podrške 7000 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza izražaja *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$* gena pri dijagnozi PMF u odnosu na zdrave ispitanike

**Tablica 2.** Izražaj ispitivanih gena bolesnika u odnosu na zdrave kontrole. Sr.vr.-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

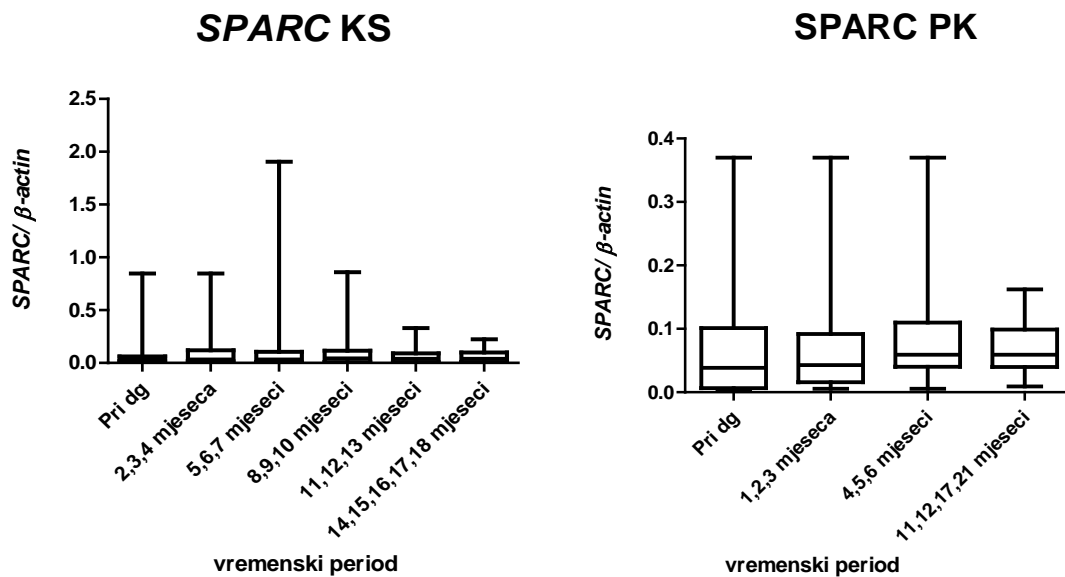
Gen	KS			PK		
	Pri dg (sr.vr.±SD)	kontrola (sr.vr.±SD)	P vrijednost	Pri dg (sr.vr.±SD)	kontrola (sr.vr.±SD)	P vrijednost
<i>SPARC</i>	0,102 ± 0,208	0,014 ± 0,005	0,045	0,0715 ± 0,099	0,0296 ± 0,014	0,966
<i>COX-2</i>	0,009 ± 0,012	0,002 ± 0,001	0,136	0,007 ± 0,009	0,001 ± 0,0002	0,119
<i>K-RAS</i>	0,006 ± 0,011	0,081 ± 0,054	<0.0001	0,029 ± 0,083	0,005 ± 0,001	0,1
<i>FOS</i>	0,413 ± 0,646	0,184 ± 0,135	0,745	0,178 ± 0,291	0,042 ± 0,015	0,21
<i>CXCR4</i>	0,111 ± 0,287	0,175 ± 0,049	0,003	0,122 ± 0,220	0,034 ± 0,024	0,247
<i>Pax5 C terminus</i>	0,002 ± 0,002	0,013 ± 0,008	0,005	0,002 ± 0,002	0,006 ± 0,002	0,019
<i>HIF1<math>\alpha</math></i>	0,012 ± 0,014	0,028 ± 0,015	0,02	0,019 ± 0,014	0,012 ± 0,001	0,615

Izražaja gena pri dijagnozi PMF u odnosu na zdrave ispitanike pokazao je statistički značajnu razliku Mann-Whitneyevog testa u KS za gene *SPARC*, *K-RAS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus*, i *HIF1 $\alpha$* , dok je u PK značajna razlika vidljiva jedino u izražaju *PAX5 C terminus* gena.

### 4.2. Analiza izražaja *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$* gena uz terapiju lenalidomid/prednisonom

Promjena u izražaju ovih gena uz terapiju lenalidomid/prednisonom u periodu kroz 24 mjeseca nije vidljiva niti u mononuklearima PK, niti u KS.





**Slika 10.** Kretanje vrijednosti izraženosti *SPARC* gena pri dijagnozi te tijekom liječenja lenalidomid/prednizonom. Statistički nema značajne razlike.

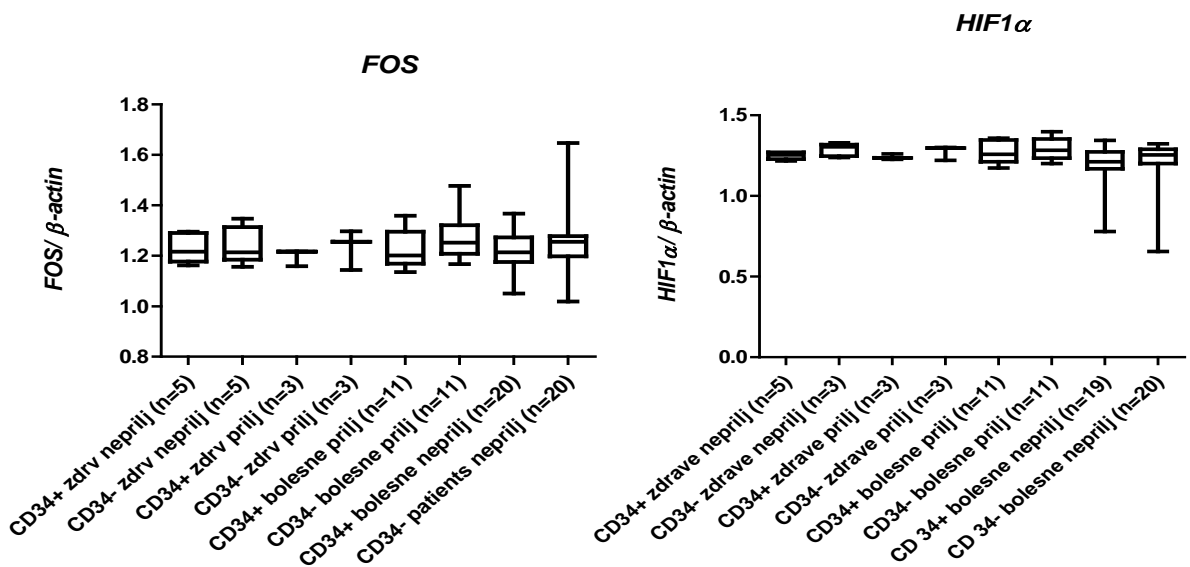
#### 4.3. Analiza JAK2 mutacije i citogenetskih abnormalnosti

Nije pronađena veza između JAK2 mutacije i/ili citogenetskih abnormalnosti te genskog izražaja *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1α*.

#### 4.4. Analiza izražaja gena u uspostavljenoj kulturi stromalnih stanica

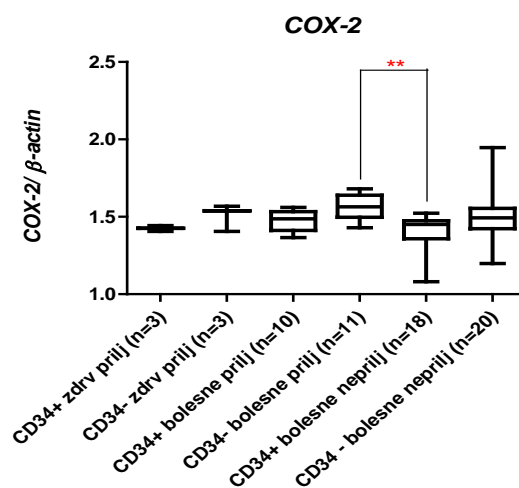
Kultura stromalnih stanica uspješno je uspostavljena prema gore navedenim uvjetima te su stanice uspješno sortirane iz stanične kulture kulture prema CD34 biljegu.

*FOS* i *HIF1α* geni ne pokazuju razliku u izražaju među stromalnim stanicama koje se nalaze u mediju te onih koje su priljepljene uz eksperimentalnu posudu bez obzira potječu li iz zdravih ili bolesnih ispitanika.



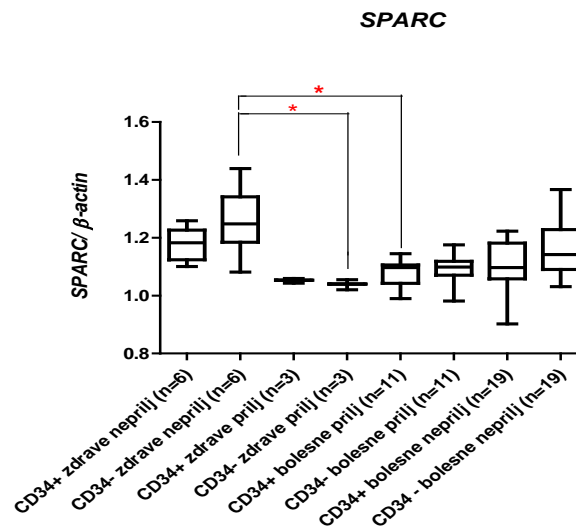
**Slika 11.** Izražaj *FOS*, i *HIF1α* gena u uspostavljenoj kulturi stromalnih stanica. Brojevi u zagradama predstavljaju broj uzoraka. Više vrijednosti predstavljaju niži izražaj. Prilij - stanice priljepljene uz podlogu, neprilij – stanice koje se nalaze u mediju.

Razlika u izražaju *COX-2* gena vidljiva je između CD34- bolesnih priljepljenih i CD34+ bolesnih nepriljepljenih stromalnih stanica, naime CD34+ bolesne nepriljepljene stanice imaju viši izražaj ovog gena u odnosu na CD34- bolesne priljepljene stromalne stanice uz dno eksperimentalne posude. Između CD34- priljepljenih stanica bolesnika i zdravih ispitanika ta razlika nije vidljiva.



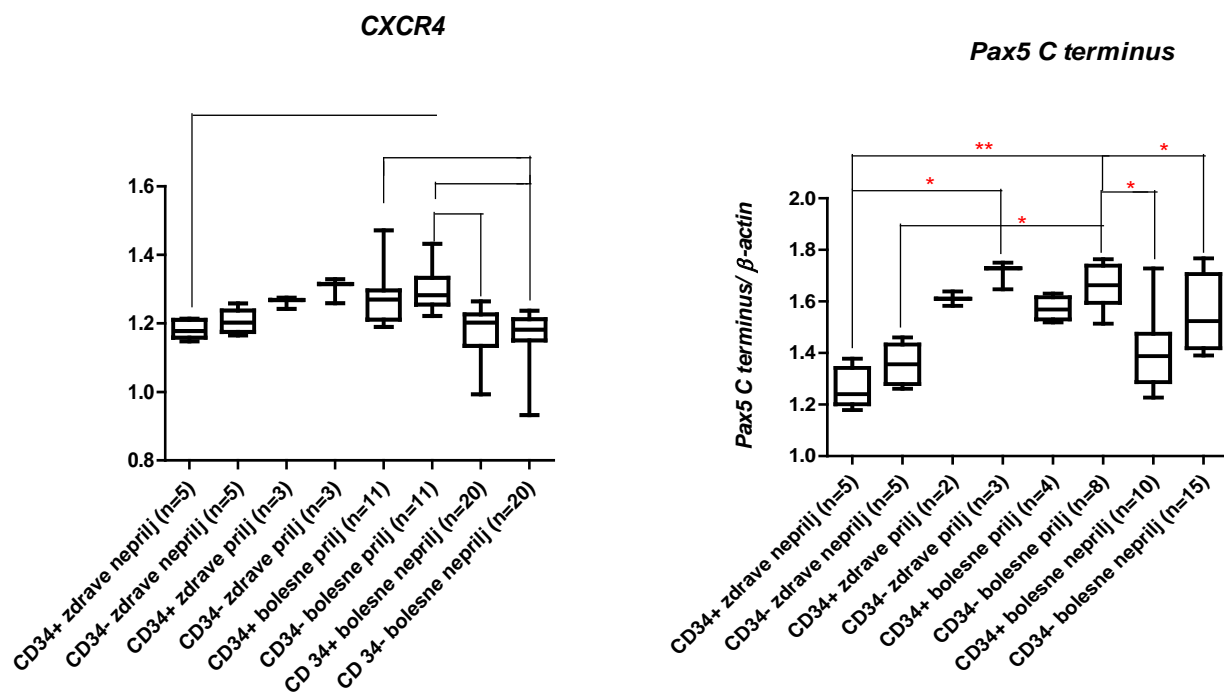
**Slika 12.** Razlika u izražaju *COX-2* gena u uspostavljenoj kulturi stromalnih stanica. Statistički značajnu razliku Kruskal-Wallisovog testa predstavlja oznaka \*. Brojevi u zagradama predstavljaju broj uzoraka. Više vrijednosti predstavljaju niži izražaj.

Najviši izražaj *SPARC* gena imaju CD34- zdrave stromalne stanice uz eksperimentalnu posudu te se taj izražaj statistički značajno razlikuje od CD34- zdravih stromalnih stanica koje se nalaze u mediju. Druga značajna razlika izražaja *SPARC* gena odnosi se na CD34- zdrave, priljepljene stanice prema priljepljenim CD34+ stanicama bolesnika koje imaju niži izražaj gena.



**Slika 13.** Razlika u izražaju *SPARC* gena u uspostavljenoj kulturi stromalnih stanica. Brojevi u zagradama predstavljaju broj uzoraka. Statistički značajnu razliku Kruskal-Wallisovog testa predstavlja oznaka \*. Brojevi u zagradama predstavljaju broj uzoraka. Više vrijednosti predstavljaju niži izražaj.

Ukoliko se usporede izražaji gena *CXCR4* i *PAX5 C terminus*, vidi se najveća promjena u izražaju među stromalnim stanicama u kulturi. CD34+ zdrave stanice u mediju imaju najviši izražaj *CXCR4* gena te se značajno razlikuju od bolesnikovih CD34-priljepljenih stanica uz dno posude. Te bolesnikove CD34-stanice s izrazito niskim izražajem ovog gena također pokazuju značajnu razliku u odnosu na druge skupine stromalnih stanica koje potječu iz bolesnih ispitanika. *PAX5 C terminus* zdrave stromalne stanice u mediju bez obzira na CD34 biljeg pokazuju statistički značajan, povišeni izražaj u odnosu na stromalne stanice bolesnika. S obzirom na izrazite razlike među stromalnim stanicama, detaljniji prikaz je na niže prikazanim grafovima.



**Slika 14.** Razlika u izražaju *CXCR4* i *PAX5 C terminus* gena u uspostavljenoj kulturi stromalnih stanica. Statistički značajnu razliku Kruskal-Wallisovog testa predstavlja oznaka\*. Brojevi u zagradama predstavljaju broj uzoraka. Više vrijednosti predstavljaju niži izražaj.

## 5. RASPRAVA

PMF je kompleksna bolest u kojoj patofiziološki mehanizam uključuje velik broj matičnih stanica, od kojih su neke klonalne. KMS potječu iz patološkog klona na što ukazuju i remisije u mlađih bolesnika koji su prošli transplantaciju hematopoetskih stanica<sup>162</sup>. Ove stanice vjerojatno nose genetičku promjenu što svrstava PMF u grupu bolesti KMS<sup>15</sup>. Svakim danom sve je više dokaza da stanice mikrookoliša imaju udio u regulaciji KMS bez obzira da li one nose genetičko obilježje bolesti ili ne, ali njihova uloga u specifičnim međusobnim interakcijama je neosporiva.

Iz gore navedenih razloga temeljili smo ovo istraživanje na *SPARC* genu te smo ga kasnije proširili i na ostale gene. *SPARC* ima vrlo važnu ulogu u interakciji stanica – mikrookoliš te je stoga vrlo zanimljivo pogledati njegov izražaj u PMF kojoj je glavno obilježje fibroza KS jer je *SPARC* kao stromalni faktor uključen u odgovor KS na mijeloproliferaciju<sup>184</sup>. Naši bolesnici u KS pokazuju povećani izražaj *SPARC* gena u odnosu na zdrave kontrole. Nedavna i dosad jedina studija *SPARC* u MF<sup>184</sup> pokazala je da je u tipičnoj PMF povećani izražaj *SPARC* gena u stromalnim stanicama povezan sa stupnjem stromalnih promjena, s lošijom prognozom te s oslabljenom hematopoezom, koji ukazuju na ulogu stromalnog *SPARC* u razvoju fibroze KS te njenog napredovanja. Ovi zaključci dobiveni su uporabom modela *Sparc*<sup>-/-</sup> miševa na kojima je dokazano da *SPARC* ima vrlo važnu ulogu u nastanku fibroze KS i mijeloproliferativnih uvjeta<sup>184</sup>, a to također potvrđuju i rezultati našeg rada.

Naša istraživanja temelje se na proučavanju izražaja *SPARC* u *in vitro* modelu kulture stanica te analizi CD34<sup>-</sup> (stromalne) i CD34<sup>+</sup> (krvotvorne, primarne hematopoetske) stanica u stanju adhezije (priljepljenosti za podlogu) te slobodnih u mediju. Pri tome smo uspoređivali stanje zdravih i bolesnih (PMF) stanica.

Za *SPARC* gen razina izražaja bila je nedvojbeno viša u PMF u odnosu na zdrave stanice, a vidljivo je da stromalne i hematopoetske stanice zdravih ispitanika slabije izražavaju *SPARC* od istovrsnih, ali priljepljenih stanica. Ovo nije slučaj u PMF, gdje slobodne stanice tek neznatno slabije izražavaju *SPARC*, ali jače no u zdravim uvjetima. Statistički je značajna razlika iskazana za priljepljene stromalne zdrave i hematopoetske bolesne u odnosu na zdrave stromalne slobodne stanice. Ovi rezultati bi prema

funkcionalnom gledištu mogli značiti da povišeni izražaj *SPARC* (kao protuadhezivne molekule) u slobodnim stromalnim i hematopoetskim stanicama PMF doprinosi njihovoj lakšoj pokretljivosti i odvajanju od vanstanične potke strome te pojačanom izlasku u perifernu cirkulaciju.

S obzirom na vezanje *SPARC* i kolagena<sup>238-240</sup>, izražaj *SPARC* je istražen u plućnoj<sup>187</sup>, jetrenoj<sup>188</sup>, bubrežnoj<sup>190</sup> te u srčanoj fibrozi<sup>183</sup>. U ovim fibrozama uzrokovanim upalom, *SPARC* izražavaju stromalne stanice, ali i hematopoetske stanice imunološkog sustava, a funkcija *SPARC* ovisna je o vrsti stanica koje ga izražavaju. Stromalne i upalne stanice potiču taloženje kolagena<sup>219</sup>, kao i smirivanje upale. U PMF bi to značilo da povišeni izražaj *SPARC* gena potiče fibrozu što dovodi do smanjenja hematopoetske rezerve organa KS.

Održavanje jednake razine *SPARC* proteina od esencijalne je važnosti i u kontroli angiogeneze te razvoja krvožilja u razvoju odraslog tkiva<sup>318</sup>. *SPARC* može imati ulogu čimbenika angiogeneze te njegova povišena razina može rezultirati u povišenoj proliferaciji endotelnih stanica i krvožilnih struktura preko vezanja na receptore VEGF, PDGF i bFGF<sup>248,246,251</sup>. U PMF je izražena neoangiogeneza i to preko VEGF i njegovog receptora. Prisutnost *SPARC*, kao što je to pokazano kod karcinoma mokraćnog mjehura<sup>139</sup>, glioblastoma<sup>140</sup>, invazivnog duktalnog raka dojke<sup>141</sup>, hepatocelularnog karcinoma<sup>142</sup>, nemikrocelularnog karcinoma pluća<sup>145</sup>, karcinoma jajnika<sup>146</sup>, adenokarcinoma gušterače<sup>147</sup>, karcinoma prostate<sup>148</sup> te melanoma<sup>157</sup>, može utjecati na povećanje razine VEGF, VEGFR2, MMP-2 i MMP-9 i samim time promovirati angiogenezu<sup>261</sup>. Stoga možemo zaključiti da se ovaj proces odvija i u PMF. Ponovno, povišen izražaj *SPARC* potvrđuje naše sumnje o njegovoj ulozi u ovoj bolesti.

*SPARC* izražavaju KMS, megakariociti, osteoblasti, adipociti i endotelne stanice. Ima ulogu onkogeni, ali i tumor supresora u određenim bolestima te je opisano povećanje njegovog izražaja u CD34+ mijeloidnim stanicama u 5q- MDS bolesnika uz terapiju lenalidomidom<sup>73</sup>. U vremenskom periodu od 24 mjeseca uz terapiju lenalidomid/prednisonom u naših bolesnika *SPARC* ne mijenja svoj izražaj. Taj povećani izražaj u MDS bolesnika unatoč očekivanjima nije opisan u humanoj mijeloblastičnoj MDS-L staničnoj liniji s translokacijom koja uključuje deleciju 5q kritične regije<sup>186</sup>. Nedavno je opisano da *SPARC* vjerojatno nije odgovoran za

hematopoezu kod miševa tijekom stresa uzrokovanog akutnom hemolizom ili transplantacijom KS, što ukazuje na to da *SPARC* ne utječe direktno na hematopoetski potencijal KS ili na doprinos 5q- fenotipu<sup>317</sup>. Vrlo vjerojatno 5q- fenotip utječe na izražaj drugih gena što svrstava MDS i PMF u dvije različite skupine bolesti.

Na homeostazu KS svojim povišenim ili sniženim izražajem utječu i drugi proteini poput tromospodina-1 i osteopontina, čija je uloga u patogenezi neoplazmi s mijelofibrozmom neosporiva.<sup>79,85,32,10</sup> Možemo s toga zaključiti da je uloga *SPARC* gena u patogenezi PMF značajna.

CXCR4 je jedini funkcionalni kemokinski receptor na KMS čija je uloga nepobitna u udomljavanju i zadržavanju KMS unutar niše KS<sup>320</sup>. Mobilizacija KMS G-CSF vezana je uz snižavanje razine CXCL12 proteina u KS i sniženi izražaj *CXCR4* gena na KMS<sup>321</sup>. Sniženi izražaj *CXCR4* gena kojeg slijedi G-CSF uzrokovana mobilizacija KMS objašnjen je nakupljanjem aktivnih neutrofilnih proteaza koje mogu cijepati GHS epitop i prvu transmembransku domenu CXCR4, rez koji inaktivira kemotaktična svojstva CXCR4<sup>285</sup>. Smanjenje CXCL12 proteina u KS posljedica je nakupljanja raznih proteaza koje direktno cijepaju i tako inaktiviraju CXCL12 i suprimiraju proizvodnju CXCL12 od strane osteoblasta u KS<sup>321,322</sup>.

Naša studija u modelu zdravih stromalnih i hematopoetskih stanica *in vitro*, pokazala je da priljepljene stanice iskazuju malo niže razine *CXCR4* gena u odnosu na slobodne frakcije u mediju u zdravih pojedinaca. Ova je situacija drugačija u PMF gdje slobodne stromalne i CD34+ stanice znatno jače izražavaju gen *CXCR4*, potvrđeno na razini statističke značajnosti. Dosadašnja malobrojna istraživanja odnosa CXCL12 i njegovog receptora CXCR4 u povećanom prometu CD34+ stanica između KS i PK bolesnika s PMF pokazala su u *in vivo* situaciji snižene razine izražaja *CXCR4* vjerojatno epigenetičkim mehanizmom<sup>323</sup>. Nađene su također snižene koncentracije intaktnog CXCL12, ali i značajne količine skraćenih oblika. Ove molekule nastale su povišenom katalitičkom aktivnošću serin proteaza kao što su dipetidil peptidaza V, neutrofilna elastaza, MMP-9. Cijepani oblici CXCL12 ne mogu ostvariti u potpunosti adhezijsku funkciju i biti molekula koja privlači CD34+ stanice, a možda i djeluju suprotno aktivnosti CXCL12. Stoga autori pružaju mogućnost da je proteolitička razgradnja CXCL12 karakteristika mijeloproliferacija, osobito u PMF odgovorna za povišenu cirkulaciju i mobilizaciju krvotvornih stanica u ovoj bolesti<sup>323</sup>. Naši rezultati *in vitro* ne

potvrđuju sniženu regulaciju *CXCR4* mjerenjem genskog izražaja, no valja uzeti u obzir da se ovdje radi o samo dijelu biološkom modelu za bolest PMF.

U svjetlu gornje rasprave skloni smo razmišljati da moguće upravo deregulacija izraženosti *SPARC* gena, a posljedično i njegovog proteina, svojom povišenom aktivnošću i protuadhezijskom funkcijom može doprinijeti karakterističnoj promjeni cirkulacije KMS između prostora KS i njihovog mikrookoliša i prostora PK u PMF.

Prisutnost klonalnih B-limfocita u PMF opisana je u samo jednom istraživanju do sad<sup>289</sup>. S obzirom da su PAX proteini važni regulatori ranog razvoja te se njihove alteracije smatraju odgovornim za neoplastične transformacije<sup>290</sup> bilo je zanimljivo pogledati njegov izražaj u KS i PK bolesnika s PMF kao i u uspostavljenoj kulturi stromalnih stanica nebi li došli do uvida u klonalnost B-limfocita, no naša saznanja o sniženom izražaju *PAX5 C terminus* gena u KS i PK ne mogu sa sigurnošću objasniti proliferaciju B-limfocita u PMF.

*COX-2* gen nije pokazao nikakvu promjenu u izražaju gena u PMF pri dijagnozi, niti kroz period od 24 mjeseca uz gore opisanu terapiju, iako je to možda bilo za očekivati s obzirom na njegovu važnu ulogu u angiogenezi jer sudjeluje u sintezi angiogenetskih prostaglandina koji induciraju VEGF u *in vivo* modelu<sup>297</sup>. Jedina vidljiva razlika u izražaju je između CD34+ i CD34- stanica u bolesnika. Naime CD34+ bolesne nepriljepljene stanice imaju viši izražaj ovog gena u odnosu na CD34- bolesne priljepljene stromalne stanice uz dno eksperimentalne posude. S obzirom da ta razlika nije vidljiva između CD34- priljepljenih stanica bolesnika i zdravih ispitanika razlika u izražaju mogla bi se objasniti kao zbir individualnih upalnih procesa.

Osvrnemo li se na izražaj *HIF1α* gena mjeren u mononukleara naših bolesnika, vidjet ćemo da on u KS pokazuje višu razinu u odnosu na zdrave kontrole kako je bilo i za očekivati na temelju saznanja grupe iz Bordeauxa<sup>235</sup>. Snižene koncentracije O<sub>2</sub> potiču prepisivanje *HIF1α* transkripcijskog faktora<sup>315</sup>, dok je *HIF1β* konstitutivno aktivna



jedinica te nije bilo potrebe za promatranjem izražaja *HIF1 $\beta$*  podjedinice. Iako su koncentracije O<sub>2</sub> snižene *in vivo* ponekad su za održavanje homeostaze potrebni uvjeti u kojima O<sub>2</sub> uopće nije prisutan<sup>235</sup>. Promjene u koncentraciji kisika česte su u normalnim tkivima, ali su posebno izražene u mnogo nižim vrijednostima što ukazuje na hipoksične uvjete mononukleara bolesnika s PMF<sup>319</sup>. *HIF1 $\alpha$*  gen nije pokazao nikakvu promjenu u modelu kulture stromalnih stanica, što je vjerojatno posljedica uspostavljanja kulture stromalnih stanica pri atmosferskoj koncentraciji O<sub>2</sub>. Kako bi dobili točnija saznanja o promjenama koncentracija O<sub>2</sub> u PMF potrebno bi bilo uspostaviti stromalnu kulturu stanica u posebnim komorama koje bi regulirale koncentraciju O<sub>2</sub>. S obzirom na najnoviji rad<sup>319</sup> koji ukazuje na složenost i ulogu redoks procesa u niši KMS, a koji se tek počinju istraživati bilo bi vrlo zanimljivo nastaviti istraživanje u ovom smjeru. Složenost niše KS, difuzibilna priroda mnogih spojeva poput H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i poteškoće u praćenju oksidativnih reakcija u KS, izazov su u razlučivanju dinamske regulacije niše KS osobito u patofiziološkim uvjetima KS kakvu pronalazimo u bolesnika s PMF, a naše istraživanje je tek početak rasvjetljavanja tog procesa.

*K-RAS* gen pokazuje izrazito sniženu razinu izražaja prije terapijskih intervencija u bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike. S obzirom da su geni ras obitelji uključeni u kontrolu staničnog ciklusa, rast, migraciju, promjene citoskeleta i apoptozu<sup>304,305</sup> promjena u izražaju ovog gena možda predstavlja dio nedovoljno istražene etiologije ove bolesti. S obzirom da su ras prvi opisani onkogeni i da su istraživanja ove genske obitelji i dalje intenzivna, a da su ras geni ključni u mnogim procesima mogli bismo zaključiti da imaju ulogu antiapoptotičkog faktora u ovoj rijetkoj i agresivnoj bolesti. Ovo je prvo takvo istraživanje u PMF, iako je ras gen vezan uz mnoga istraživanja u AML uz oprečne rezultate o njegovoj ulozi<sup>310-312</sup>.

Posljednji gen ovom našem istraživanju bio je *FOS* gen koji sudjeluje u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, transformaciji te ponegdje i u apoptozu<sup>213</sup>, no u našem istraživanju on ne pokazuje promjene u izražaju što vjerojatno ukazuje na to da nije dio patološkog procesa nastanka PMF bolesti.

Temeljem dobivenih rezultata istraživanja vezanih za izražaj gena *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$* , možemo zaključiti da *SPARC* ima značajnu ulogu u patološkim promjenama PMF; deregulacija *SPARC* izražaja narušava ravnotežu u okolišu KMS te kao vjerojatno jedan od uočljivih mehanizama olakšava mobilizaciju KMS i njihovo napuštanje KS.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. U bolesnika s PMF povišen je izražaj *SPARC* gena u KS, dok je izražaj *K-RAS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  snižen.

2. U PK bolesnika snižen je izražaj *PAX5 C terminus* gena.
3. Liječenje lenalidomidom/prednizonom ne utječe na izražaj ovih gena.
4. Prisutnost JAK2 V617F mutacije i/ili citogenetskih abnormalnosti ne pokazuje vezu s genskim izražajem *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$* .
5. Uspostavljena kultura stromalnih stanica pokazuje razliku u genskom izražaju *SPARC*, *COX-2*, *CXCR4* i *PAX5 C terminus*.
6. Zaključno, istraživanje izražaja *SPARC*, *COX-2*, *K-RAS*, *FOS*, *CXCR4*, *PAX5 C terminus* i *HIF1 $\alpha$*  gena ukazuje da su ovi geni, a osobito *SPARC* uključeni u patološki mehanizam PMF tako što deregulacija njihovog izražaja narušava ravnoteža u okolišu KMS te one napuštaju KS.

## **7. PRILOG – Popis oznaka i kratica**

- ABL - abelson kinaza  
AML - akutna mijeloična leukemija

ASXL1	- engl. additional sex combs-like 1
ATP	- adenzin trifosfat, engl. adenosine triphosphate
bFGF	- osnovni faktor rasta fibroblasta, engl. basic fibroblast growth factor
BMPR1A	- receptor za koštani morfogeni protein, engl. bone marrow morphogenetic protein receptor, type 1A
CBL	- Casitas B-lineage lymphoma proto-onkogen, engl. Casitas B-lineage lymphoma
cDNA	- komplementarna DNA, engl. complementary DNA
Coll1 $\alpha$ 1	- promotor tip 1 kolagena $\alpha$ 1
COX-2	- ciklooksigenaza-2
CXCR4	- kemokinski receptor 4, engl. chemokine receptor 4
DNA	- deoksiribonukleinska kiselina, engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	- deoksiribonukleotid trifosfati, engl. deoxyribonucleotide triphosphate
EPO	- eritropoetin
ET	- esencijalna trombocitemija
FGF	- faktor rasta fibroblasta, engl. fibroblast growth factor
FGFR-1	- receptor faktora rasta fibroblasta-1, engl. fibroblast growth factor receptor-1
FLT3	- engl. fms-related tyrosine kinase 3
G6PD	- glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza, engl. glucose-6-phosphate-dehydrogenase
G-CSF	- granulocitno stimulirajući faktor, engl. granulocyte colony-stimulating factor
HIF1	- hipoksija inducibilni faktor 1, engl. hypoxia inducible factor 1
IDH	- izocitrat dehidrogenaza, engl. isocitrate dehydrogenase
IKZF1	- IKAROS obitelj cinkovog prsta 1, engl. IKAROS zinc finger 1
JAK2 V617F	- Janus kinaza 2 s mutacijom V617F
JAK2	- Janus kinaza 2
KML	- kronična mijeloična leukemija
KMML	- kronična mijelomonocitna leukemija
KMS	- krvotvorne matične stanice
KS	- koštana srž
LSK	- Lin <sup>-</sup> SCA1 <sup>+</sup> KIT <sup>+</sup>
MDS	- mijelodisplastični sindrom

MMP	- metaloproteinaze izvanstaničnog matriksa, engl. matrix metalloproteinases
MPN	- mijeloproliferativna neoplazma
MPL	- mijeloproliferativni leukemijski virus
mRNA	- glasnička ribonukleinska kiselina, engl. messenger ribonucleic acid
NADP	- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	- reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NPM	- nukleofosmin, engl. nucleophosmin
pb	- parovi baza
PDGF	- faktor rasta trombocita, engl. platelet derived growth factor
PG	- prostaglandini
Ph-neg	- Philadelphia (kromosom) negativna
PK	- periferna krv
PMF	- primarna mijelofibroza
PPR	- receptor za paratiroidni hormon
PTH	- paratiroidni hormon
PV	- policitemija vera
RARA	- receptor retinoične kiseline alfa, engl. Retinoic Acid Receptor Alpha
RNA	- ribonukleinska kiselina, engl. ribonucleic acid
RNA-ze	- enzimi koji cijepaju RNA
SCA	- matični stanični antigen, engl. stem cell antigen
SCF	- engl. Skp, Cullin and F-box complex
SDF1/CXCL12	- stromalni faktor 1/CXC kemokinski ligand 12, engl. Stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12
SPARC	- engl. secreted protein acidic and rich in cystein
SZO	- svjetska zdravstvena organizacija
SŽS	- središnji živčani sustav
TBE	- Tris/Borat/EDTA
TGF-β1	- transformirajući čimbenik rasta beta1, engl. transforming growth factor beta 1
PCR	- lančana reakcija polimeraze, engl. polymerase chain reaction
TET2	- član 2 TET onkogene obitelji
TGF-β	- transformirajući čimbenik rasta β, engl. transforming growth factor β
TPO	- trombopoetin

VEGF - krvožilni endotelni čimbenik rasta , engl. vascular endothelial growth  
factor

## 8. ŽIVOTOPIS

Ana Livun rođena je u Zagrebu 1982. godine gdje je završila osnovnu školu i matematičku gimnaziju. Godine 2000. upisala je Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularna biologija gdje je 2005. godine i diplomirala s prosječnom ocjena 4,6. Poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu upisala je 2006. godine, te je u razdoblju od 2006.-2013. godine zaposlena u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i genetiku, Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničke bolnice Dubrava kao znanstveni novak na projektu „Genetika i funkcija hematopoeze i mikrookoliša Ph- mijeloproliferativnih bolesti“. U sklopu poslijediplomskog studija odlazi 2008. godine u Sjedinjene američke države u MD Anderson Cancer center gdje izrađuje doktorski rad u laboratoriju Prof.dr.sc. Srđana Verstovšeka.

Aktivno je sudjelovala na znanstvenim i stručnim skupovima u zemlji i inozemstvu, te je autor i koautor više znanstvenih i stručnih radova.

#### POPIS LITERATURE:

1. Ahmed A, Chang CC (2006) Chronic idiopathic myelofibrosis: clinicopathologic features, pathogenesis, and prognosis. *Arch Pathol Lab Med* 130(8): 1133-1143.
2. Nowell PC, Hungerford DA (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25: 85-109.
3. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36(1): 93-99.
4. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E (1985) Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315(6020): 550-554.
5. Hallek M, Danhauser-Riedl S, Herbst R, Warmuth M, Winkler A, Kolb HJ, Druker B, Griffin JD, Emmerich B, Ullrich A (1996) Interaction of the receptor tyrosine kinase p145c-kit with the p210bcr/abl kinase in myeloid cells. *Br J Haematol* 94(1): 5-16.
6. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr—Abl positive cells. *Nat Med* 2(5): 561-566
7. Tefferi A, Vardiman JW (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22(1): 14–22.
8. Orazi A, Germing U (2008) The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* 22(7): 1308–1319.
9. Dameshek W (1951) Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6(4): 372–375.
10. Liersch R, Gerss J, Schliemann C, Bayer M, Schwoppe C, Biermann C, Appelmann I, Kessler T, Lowenberg B, Buchner T, Hiddemann W, Muller-Tidow C, Berdel WE, Mesters R (2012) Osteopontin is a prognostic factor for survival of acute myeloid leukemia patients. *Blood* 119(22): 5215-5220.
11. Lambert JR, Everington T, Linch DC, Gale RE (2009) In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: a new disease paradigm. *Blood* 114: 3018–3023.
12. Schaub FX, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Lehmann T, Tichelli A, Skoda RC (2010) Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can



- be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 115: 2003-2007.
13. Schaub FX, Jager R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F, Ticheli A, Gisslinger H, Kralovics R, Skoda RC (2009) Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the predisposing mutations for JAK2-V617F. *Blood* 113: 2022–2027.
  14. Beer PA, Delhommeau F, Lecouedic JP, Bareford D, Kusec R, McMullin MF, Harrison C, Vannucchi A, Vainchenker W, Green AR (2009) Two routes to leukemic transformation following a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Hematologica* 94(s2): 421.
  15. James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, Lippert E, Mahon FX, Pasquet JM, Etienne G, Delhommeau F, Giraudier S, Vainchenker W, de Verneuil H(2008) The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood* 112: 2429–2438.
  16. Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, Skoda RC (2006) Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 108: 1377–1380.
  17. Beer PA, Jones AV, Bench AJ, Goday-Fernandez A, Boyd EM, Vaghela KJ (2009) Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *Br J Haematol* 144: 904–908.
  18. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Beger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constanitnescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144–1148.
  19. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779–1790.
  20. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly PJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D’Andrea D, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub

- TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387–397.
21. 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 (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054–1061.
22. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 356: 459–468.
23. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Werning G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL (2006) MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 3(7): e270.
24. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliot MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A (2006) MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108: 3472–3476.
25. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, L elcluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, RomanaSP, Dessen P, Soulier J, Vigi e F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360: 2289–2301.
26. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adelaide J, Rey J, Vainchenker W, Bernard OA, Chaffanet M, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci MJ (2009) Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 23: 2183–2186.
27. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, Kreil S, Jones A, Score J, Metzgerot G, Oscier D, Hall A, Brandts C, Serve H, Reiter A, Chase AJ, Cross NCP (2009) Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 113: 6182–6192.

28. Green A, Beer P (2010) Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 362: 369–370.
29. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, Heguy A, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Levine RS, Verstovsek S (2010) Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 70: 447–452.
30. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Mai M, McClure R, Tefferi A (2010) IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic and blast phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 24(6): 1146-1151.
31. Ahmed A, Chang CC (2006) Chronic idiopathic myelofibrosis: clinicopathologic features, pathogenesis, and prognosis. *Arch Pathol Lab Med* 130(8): 1133–1143.
32. Tefferi A (2005) Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 23(33): 8520-8530.
33. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW (2007) Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an *ad hoc* international expert panel. *Blood* 110(4): 1092–1097.
34. Abdel-Wahab OI, Levine RL (2008) Primary myelofibrosis: update on definition, pathogenesis, and treatment. *Annu Rev Med* 60: 233-245.
35. Barosi G, Hoffman R (2005) Idiopathic myelofibrosis. *Semin Hematol* 42(4): 248–258.
36. Reilly JT (2006) Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis to treatment. *Hematol Oncol* 24(2): 56–63.
37. Thiele J, Kvasnicka HM (2006) Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders — dynamics and clinical impact. *Histol Histopathol* 21(12): 1367–1378.
38. Cervantes F (2007) Myelofibrosis: biology and treatment options. *Eur J Haematol Suppl* 68: 13–17.
39. Tefferi A (2008) Primary myelofibrosis. *Cancer Treat Res* 142: 29–49.

40. Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P, Rogers R, Folkman J, Plamblad J (2000) Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol* 157(1): 15-19.
41. Visani G, Finelli C, Castelli U, Petti MC, Ricci N, Vianelli N, Gianni L, Zuffa E, Aloe Spiriti MA, Latagliata R, Pileri S, Magrini U, Gugliota L, Mona E, Bernasconi C, Mandelli F, Tura S (1990) Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol* 75(1): 4–9.
42. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A (1999) Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976–1995. *Am J Hematol* 61(1): 10-15.
43. Kurdi M, Booz GW (2009) JAK redux: a second look at the regulation and role of JAKs in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1545-H1556.
44. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ (2009) Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev* 228: 273–287.
45. Murray PJ (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178: 2623–2629.
46. Pardanani A (2008) JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia* 22: 23–30.
47. Pardanani A, Lasho T, Smith G, Burns CJ, Fantino E, Tefferi A (2009) CYT387, a selective JAK1/JAK2 inhibitor: *in vitro* assessment of kinase selectivity and preclinical studies using cell lines and primary cells from polycythemia vera patients. *Leukemia* 23: 1441–1445.
48. Pardanani A, Hood J, Lasho T, Levine RL, Martin MB, Noronha G, Finke C, Mak CC, Mesa R, Zhu H, Soll R, Gilliland DG, Tefferi A (2007) TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia* 21: 1658–1668.
49. Lasho TL, Tefferi A, Hood JD, Verstovsek S, Gilliland DG, Pardanani A (2008) TG101348, a JAK2-selective antagonist, inhibits primary hematopoietic cells derived from myeloproliferative disorder patients with

- JAK2V617F, MPLW515K or JAK2 exon 12 mutations as well as mutation negative patients. *Leukemia* 22: 1790–1792.
50. Tefferi A (2009) Molecular drug targets in myeloproliferative neoplasms: mutant ABL1, JAK2, MPL, KIT, PDGFRA, PDGFRB and FGFR1. *J Cell Mol Med* 13: 215–237.
  51. Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, Kouzarides T (2009) JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 461: 819–822.
  52. Li WX (2008) Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends Cell Biol* 18: 545–55.
  53. Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG (2010) Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* 115(17): 3589–3597.
  54. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC (2008) Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111: 3931–3940.
  55. Shide K, Shimoda HK, Kumano T, Karube K, Kameda T, Takenaka K, Oku S, Abe H, Katayose KS, Kubuki Y, Kusumoto K, Hasuike S, Tahara Y, Nagata K, Matsuda T, Ohshima K, Harada M, Shimoda K (2008) Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. *Leukemia* 22: 87–95.
  56. Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, Talmant P, Tichelli A, Hermouet S, Skoda RC (2007) Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 110: 375–379.
  57. Jamal R, Belisle C, Lessard MC, Hebert J, Roy DC, Levine R, Busque L (2008) Evidence suggesting the presence of a stem cell clone anteceding the acquisition of the JAK2-V617F mutation. *Leukemia* 22: 1472–1474.
  58. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A (2008) Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 22: 1299–1307.
  59. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferrini PR, Rambaldi A, Guerini V, Bosi A, Barbui T (2007)

- Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* 21: 1952–1959.
60. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Masa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Spechia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T (2007) JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 110: 4030–4036.
  61. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Wadleigh M, Gilliland GD (2005) The JAK2 tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol* 131: 320–328.
  62. Tefferi A, Strand JJ, Lasho TL, Knudson RA, Finke CM, Gangat N, Pardanani A, Hanson CA, Ketterling RP (2007) Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera. *Leukemia* 21: 2074–2075.
  63. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, Li CJ, Wu W, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A (2007) Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* 109: 2279–2284.
  64. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR (2005) Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 366: 1945–1953.
  65. Palandri F, Ottaviani E, Salmi F, Catani L, Polverelli N, Fiacchini M, Giovanni Martinelli G, Baccarani M, Vianelli N (2009) JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia: correlation with clinical characteristics, response to therapy and long-term outcome in a cohort of 275 patients. *Leuk Lymphoma* 50: 247–253.
  66. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, Vannucchi AM, Mesa RA, Demory JL, Barosi G, Rumi E, Tefferi A (2009) New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 113: 2895–2901.

67. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, Rambaldi A, Lo Coco F, Antonioli E, Pieri L, Pancrazzi A, Ponziani V, Delaini F, Longo G, Ammatuna E, Liso V, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM (2009) Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* 114: 1477–1483.
68. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, Wu W, Hanson CA, Pardanani A (2008) 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* 22: 756–761.
69. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, Roncoroni E, Astori C, Merli M, Boggi S, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M (2009) Relationship between granulocyte JAK2 (V617F) mutant allele burden and risk of progression to myelofibrosis in polycythemia vera: a prospective study of 338 patients. *ASH Annual Meeting Abstracts* 114: 751.
70. Tefferi A, Lasho TL, Gilliland G (2005) JAK2 mutations in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 353: 1416–1417.
71. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, Li CY, Wadleigh M, Lee SM, Gilliland DG (2006) The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 106: 631–635.
72. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, Marfisi MR, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Randi ML, De Stefano V, Caberlon S, Tafuri A, Ruggeri M, Specchia G, Liso V, Rossi E, Pogliani E, Gugliotta L, Bosi A, Barbui T (2007) Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 110: 840–846.
73. Pellagatti A, Jadersten M, Forsblom AM, Cattani H, Christensson B, Emanuelsson EK, Merup M, Nilsson L, Samuelsson J, Sander B, Wainscoat JS, Boultonwood J, Hellstrom-Lindberg E (2007) Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(27): 578-589.
74. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Alvarez-Larran A, Rambaldi A, Finazzi G, Barosi G (2010) Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood* 115: 778–782.

75. Politou M, Zoi C, Dahabreh IJ, Rallidis L, Gialeraki A, Loukopoulos D, Zoi K (2009) No evidence of frequent association of the JAK2 V617F mutation with acute myocardial infarction in young patients. *Leukemia* 23: 1008–1009.
76. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A (2007) Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* 21: 1960–1963.
77. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferarri M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda RC, Cazzola M (2008) Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2(V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 111: 1686-1689.
78. Butcher CM, Hahn U, To LB, Gecz J, Wilkins EJ, Scott HS, Bardy PG, D'Andrea RJ (2008) Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia* 22: 870–873.
79. Kopp HG, Hooper AT, Broekman MJ, Avecilla ST, Petit I, Luo M, Milde T, Ramos CA, Zhang F, Kopp T, Bornstein P, Jin DK, Marcus AJ, Rafii S (2006) Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization. *J Clin Invest* 116(12): 3277-3291.
80. Passamonti F, Schnittger S, Girodon F, Kiladjian J-J, McMullin MF, Ruggeri M, Besses C, Vannucchi AM, Lippert E, Gisslinger H, Rumi E, Lehmann T, Ortman CA, Pietra D, Pascutto C, Haferlach T, Cazzola M (2009) Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations: a European Multicenter Study. *ASH Annual Meeting Abstracts* 114: 3904.
81. Martinez-Aviles L, Besses C, Alvarez-Larran A, Cervantes F, Hernandez-Boluda JC, Bellosillo B (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 92: 1717–1718.
82. Mercher T, Wernig G, Moore SA, Ross LL, Gu TL, Frohling S, Cullen D, Polakiewicz RD, Boggon TJ, Lee BH, Gilliland DG (2006) JAK2T875N is a novel activating mutation that results in myeloproliferative disease with features of megakaryoblastic leukemia in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 108(8): 2770–2779.
83. Tefferi A, Gilliland DG (2005) JAK2 in myeloproliferative disorders is not just another kinase. *Cell Cycle* 4(8): 1053–1056.



84. Zhao ZJ, Vainchenker W, Krantz SB, Casadevall N, Constantinescu SN (2005) Role of tyrosine kinases and phosphatases in polycythemia vera. *Semin Hematol* 42(4): 221–229.
85. Evrard S, Bluteau O, Tulliez M, Rameau P, Gonin P, Zetterberg E, Palmblad J, Bonnefoy A, Villeval JC, Vainchenker W, Giraudier S, Wagner-Ballon O (2011) Thrombospondin-1 is not the major activator of TGF- $\beta$ 1 in thrompoietin-induced myelofibrosis. *Blood* 117(1): 246-249.
86. Cramer K, Nieborowska-Skorska M, Koptyra M, Slupianek A, Penserga ETP, Eaves CJ, Aulitzky W, Skorski T (2008) BCR/ABL and other kinases from chronic myeloproliferative disorders stimulate single-strand annealing, an unfaithful DNA double-strand break repair. *Cancer Res* 68(17): 6884–6888.
87. Tomasson MH, Williams IR, Li S, Kutok J, Cain D, Gillissen S, Dranoff G, Van Etten RA, Gilliland DG (2001) Induction of myeloproliferative disease in mice by tyrosine kinase fusion oncogenes does not require granulocyte—macrophage colony-stimulating factor or interleukin-3. *Blood* 97(5): 1435–1441.
88. Schwaller J, Frantsve J, Aster J, Williams IR, Tomasson MH, Ross TS, Peeters P, Van Rompaey L, Van Etten RA, Ilaria Jr R, Marynen P, Gilliland DG (1998) Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced *TEL/JAK2* fusion genes. *EMBO J* 17(18): 5321–5333.
89. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffé M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA (1997) A *TEL—JAK2* fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278(5341): 1309–1312.
90. Steensma DP, McClure RF, Karp JE, Tefferi A, Lasho TL, Powell HL, De Wald W, Kaufman SH (2006) *JAK2 V617F* is a rare finding in *de novo* acute myeloid leukemia, but *STAT3* activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 20: 971–978.
91. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A (2005) The *JAK2 V617F* activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both 'atypical' myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 106: 1207–1209.
92. Inami M, Yamaguchi H, Hasegawa S, Mitamura Y, Kosaka F, Kobayashi A, Kimura S, Dan K, Inokuchi K (2008) Analysis of the exon 12 and 14

- mutations of the JAK2 gene in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia* 22: 216.
93. Hussein K, Bock O, Theophile K, Seegers A, Arps H, Basten O, Grips KH, Franz-Werner J, Busche G, Kreipe H (2008) Chronic myeloproliferative diseases with concurrent BCR-ABL junction and JAK2V617F mutation. *Leukemia* 22: 1059–1062.
94. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, Wolanskyj AP, Steensma DP, Mesa R, Gilliland DG (2005) Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol* 131: 166–171.
95. Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Moller P (2006) Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 20: 157–158.
96. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Lazzarino M, Cazzola M (2007) JAK2 (V617F) mutation in healthy individuals. *Br J Haematol* 136: 678–679.
97. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B, Deininger MWN (2005) The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106: 3377–3379.
98. Teofili L, Giona F, Torti L, Cenci T, Ricerca BM, Rumi C, Nunes V, Foà R, Leone G, Martini M, Larocca LM (2010) Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis. *Haematologica* 95: 65–70.
99. Schnittger S, Haferlach C, Beelen DW, Bojko P, Dengler R, Diestelrath A (2007) Detection of three different MPLW515 mutations in 10.1% of all JAK2 V617 unmutated ET and 9.3% of all JAK2 V617F unmutated OMF: a study of 387 patients. *ASH Annual Meeting Abstracts* 110: 2546.
100. Vannucchi AM, Antonioli E, Pancrazzi A, Guglielmelli P, Di Lollo S, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T (2007) The clinical phenotype of patients with essential thrombocythemia

- harboring MPL 515W>L/K mutation. ASH Annual Meeting Abstracts 110: 678.
101. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioli E, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM (2007) Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol* 137: 244–247.
  102. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR (2008) MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 112: 141–149.
  103. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324: 930–935.
  104. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Gangat N, Finke CM, Schwager S, Mullally A, Li CY, Hanson CA, Mesa R, Bernard O, Delhommeau F, Vainchenker W, Gilliland DG, Levine RL (2009) TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 23: 905–911.
  105. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Finke CM, Mullally A, Li CY, Pardanani A, Gilliland DG (2009) Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR $\alpha$  correlates. *Leukemia* 23: 900–904.
  106. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Patnaik MM, Hanson CA, Pardanani A, Gilliland DG, Levine RL (2009) Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* 23: 1343–1345.
  107. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AD, Raymakers RAP, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH (2009) Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 41: 838–842.
  108. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau MM, Beran M, Tallman MS, Ebert BL,

- Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL (2009) Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 114: 144–147.
109. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, Vigui   F, Quesnel B, Beyne-Rauzy O, Solary E, Vey N, Hunault-Berger M, Fenaux P, Mansat-De Mas V, Delabesse E, Guardiola P, Lacombe C, Vainchenker W, Preudhomme C, Dreyfus F, Bernard OA, Birnbaum D, Fontenay M (2009) TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* 114: 3285–3291.
110. Mohamedali AM, Smith AE, Gaken J, Lea NC, Mian SA, Westwood NB, Strupp C, Gattermann N, Germing U, Mufti GJ (2009) Novel TET2 mutations associated with UPD4q24 in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 27: 4002–4006.
111. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afable M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, Maciejewski JP (2009) Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 113: 6403–6410.
112. Paulsson K, Haferlach C, Fonatsch C, Hagemeijer A, Andersen MK, Slovak ML, Johansson B (2010) The idic(X)(q13) in myeloid malignancies: breakpoint clustering in segmental duplications and association with TET2 mutations. *Hum Mol Genet* 19: 1507–1514.
113. Lee SW, Cho YS, Na JM, Park UH, Kang M, Kim EJ, Um SJ (2010) ASXL1 represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LSD1. *J Biol Chem* 285: 18–29.
114. Fisher CL, Pineault N, Brookes C, Helgason CD, Ohta H, Bodner C, Hess JL, Humphries RK, Brock HW (2010) Loss-of-function additional sex combs-like1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood* 115: 38–46.
115. Swaminathan G, Tsygankov AY (2006) The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* 209: 21–43.
116. Saur SJ, Sangkhae V, Geddis AE, Kaushansky K, Hitchcock IS (2010) Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* 115: 1254–1263.

117. Bandi SR, Brandts C, Rensinghoff M, Grundler R, Tickenbrock L, Kohler G, Duyster J, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H, Sargin B (2009) E3 ligase-defective Cbl mutants lead to a generalized mastocytosis and myeloproliferative disease. *Blood* 114: 4197–4208.
118. Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, Schmidt MH, Grundler R, Rensinghoff M, Thiessen C, Tickenbrock L, Schwäble J, Brandts C, August B, Koschmieder S, Bandi SR, Duyster J, Berdel WE, Müller-Tidow C, Dikic I, Serve H (2007) Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood* 110: 1004–1012.
119. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koefler HP, Ogawa S (2009) Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 460: 904–908.
120. Tefferi A, Vardiman JW (2009) Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 361: 1872–1885.
121. Abbas S, Rotmans G, Lowenberg B, Valk PJ (2008) Exon 8 splice site mutations in the gene encoding the E3-ligase CBL are associated with core binding factor acute myeloid leukemias. *Haematologica* 93: 1595–1597.
122. Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, Greif PA, Benthaus T, Argiropoulos B, Mellert G, Vempati S, Duyster J, Buske C, Bohlander SK, Humphries KR, Hiddemann W, Spiekermann K (2009) CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 15: 2238–2247.
123. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz Jr LA, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807–1812.

124. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy YV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ (2009) Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361: 1058–1066.
125. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, Thompson CB (2010) The common feature of leukemia-associated *idh1* and *idh2* mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17: 225–234.
126. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, Sasaki M, Jin S, Schenkein DP, Su SM, Dang L, Fantin VR, Mak TW (2010) Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 207: 339–344.
127. Gaal J, Burnichon N, Korpershoek E, Roncelin I, Bertherat J, Plouin PF, de Krijger RR, Gimenez-Roqueplo AP, Dinjens WN (2010) Isocitrate dehydrogenase mutations are rare in pheochromocytomas and paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1274–1278.
128. Park SW, Chung NG, Han JY, Eom HS, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2009) Absence of IDH2 codon 172 mutation in common human cancers. *Int J Cancer* 125: 2485–2486.
129. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SI, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2009) Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer* 125: 353–355.
130. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni

- L, Buttitta F, Malatesta S, Marchetti A, Bardelli A (2009) IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat* 30: 7–11.
131. Chou WC, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Ko BS, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Huang YN, Chang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF (2010) Distinct clinical and biological characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation. *Blood* 116: 4086-4094.
132. Mullighan C, Downing J (2008) Ikaros and acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 49: 847-849.
133. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA, Downing JR (2008) BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453: 110-114.
134. Jager R, Gisslinger H, Berg T, Passamonti F, Cazzola M, Rumi E, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Harutyunyan A, Klampfl T, Olcaydu D, Cazzola M, Kralovics R (2009) Deletions of the Transcription Factor Ikaros in Myeloproliferative Neoplasms at Transformation to Acute Myeloid Leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts* 114: 435.
135. Tefferi A (2008) The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 22: 3–13.
136. Renneville A, Quesnel B, Charpentier A, Terriou L, Crinquette A, Lai JL, Cossement C, Lionne-Huyghe P, Rose C, Bauters F, Preudhomme C (2006) High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia* 20: 2067–2070.
137. Schmitt-Graeff AH, Teo SS, Olschewski M, Schaub F, Haxelmans S, Kirn A, Reinecke P, Germing U, Skoda RC (2008) JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 93: 34-40.
138. Atallah E, Nussenzveig R, Yin CC, Bueso-Ramos C, Tam C, Manshour T, Pierce S, Kantarjian H, Verstovsek S (2008) Prognostic interaction between thrombocytosis and JAK2 V617F mutation in the WHO subcategories of myelodysplastic/myeloproliferative disease-unclassifiable and refractory

- anemia with ringed sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia* 22: 1295–1298.
139. Nimphius W, Moll R, Olbert P, Ramaswamy A, Barth PJ (2007) CD34+ fibrocytes in chronic cystitis and noninvasive and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Virchows Arch* 450: 179-185.
140. Bornstein P (2002) Cell-matrix interactions: The view from the outside. *Methods in Cell Biology* 69: 7-11.
141. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R (2008) Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 214: 357-367.
142. Lau CP, Poon RT, Cheung ST, Yu WC, Fan ST (2006) SPARC and Hevin expression correlate with tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 210: 459-468.
143. Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, Westwood NB, Milojkovic D, Thanigaikumar M, Yallop D, Arya R, Pagliuca A, Gäken J, Wendon J, Heaton ND, Mufti GJ (2006) Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 130: 2031–2038.
144. Bellanne-Chantelot C, Jegou P, Lionne-Huyghe P, Tulliez M, Najman A (2008) The JAK2(V617F) mutation may be present several years before the occurrence of overt myeloproliferative disorders. *Leukemia* 22: 450–451.
145. Amatschek S, Koenig U, Auer H, Steinlein P, Pacher M, Gruenfelder A (2004) Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 64: 844-856.
146. Paley PJ, Goff BA, Gow AM, Greer BE, Sage EH (2000) Alternations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 78: 336-341.
147. Mantoni TS, Schendel RR, Rodle F, Niedobitek G, Al-Assar O, Masamune A (2008) Stromal SPARC expression and patient survival after chemoradiation for non-resectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 7: 1806-1818.
148. Thomas R, True LD, Bassuk JA, Lange PH, Vessela RL (2000) Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 6: 1140-1145.



149. Kilpivaara O, Levine RL (2008) JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia* 22: 1813–1817.
150. Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H (2005) Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18962–18967.
151. Funakoshi-Tago M, Tago K, Abe M, Sonoda Y, Kasahara T (2010) STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. *J Biol Chem* 285: 5296–5307.
152. Chlenski A, Guerrero LJ, Pedintti R, Spitz JA, Leonhardt PT, Yang Q, Tian Y, Salwen HR, Cohn SL (2010) Anti-angiogenic SPARC peptides inhibit progression of neuroblastoma tumors. *Molecular Cancer* 9: 138.
153. Kota J, Caceres N, Constantinescu SN (2008) Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 22: 1828–1840.
154. Turk N, Kusec R, Jaksic B, Turk Z (2005) Humoral SPARC/osteonectin protein in plasma cell dyscrasias. *Ann Hematol* 84(5): 304-310.
155. Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F, Boissinot M, Ponge T, Harousseau JL, Issa JP, Hermouet S (2010) JAK2 mutation and disease phenotype: a double L611V/V617F in cis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. *Leukemia* 24: 1069-1073.
156. Wang YL, Vandris K, Jones A, Cross NC, Christos P, Adriano F, Silver RT (2008) JAK2 mutations are present in all cases of polycythemia vera. *Leukemia* 22: 1289.
157. Ikuta Y, Nakasutra T, kageshita T, Fukushima S, Ito S, Wakamatsu K (2005) Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cysteine and glypican-3 levels. *Clin Cancer Res* 11: 8079-8088.
158. Patnaik MM, Tefferi A (2009) The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. *Leukemia* 23: 834–844.
159. da Costa Reis Monte-Mor B, Plo I, da Cunha AF, Costa GG, de Albuquerque DM, Jedidi A, Villeval JL, Badaoui S, Lorand-Metze I, Pagnano KB, Saad ST, Vainchenker W, Costa FF (2009) Constitutive JunB expression, associated

- with the JAK2 V617F mutation, stimulates proliferation of the erythroid lineage. *Leukemia* 23: 144–152.
160. Plo I, Nakatake M, Malivert L, de Villartay JP, Giraudier S, Villeval JL, Wiesmuller L, Vainchenker W (2008) JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 112: 1402–1412.
161. Kralovics R (2008) Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 22: 1841–1848.
162. Kerbaux DM, Gooley TA, Sale GE, Flowers ME, Doney KC, Georges GE, Greene JE, Linenberger M, Petersdorf E, Sandmaier BM, Scott BL, Sorrow M, Stirewalt DL, Stewart FM, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR, Deeg HJ (2007) Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 355–365.
163. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T (2008) Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 112: 844–847.
164. Guerini V, Barbui V, Spinelli O, Salvi A, Dellacasa C, Carobbio A, Intronà M, Barbui T, Golay J, Rambaldi A (2008) The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2(V617F). *Leukemia* 22: 740–747.
165. Rumi E (2008) Familial chronic myeloproliferative disorders: the state of the art. *Hematol Oncol* 26(3): 131–138.
166. Rossbach HC (2006) Familial infantile myelofibrosis as an autosomal recessive disorder: preponderance among children from Saudi Arabia. *Pediatr Hematol Oncol* 23(5): 453–454.
167. Sheikha A (2004) Fatal familial infantile myelofibrosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 26(3): 164–168.
168. Bonduel M, Sciuccati G, Torres AF, Pierini A, Gallo G (1998) Familial idiopathic myelofibrosis and multiple hemangiomas. *Am J Hematol* 59(2): 175–177.

169. Pastore C, Nomdedeu J, Volpe G, Guerrasio A, Cambrin GR, Parvis G, Pautasso M, Daglio C, Mazza U, Saglio G (1995) Genetic analysis of chromosome 13 deletions in BCR/ABL negative chronic myeloproliferative disorders. *Genes Chromosomes Cancer* 14(2): 106–111.
170. Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, Fitzgerald PM, Jones N, Watmore A, Potter A (1997) Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol* 98(1): 96–102.
171. Juneau AL, Kaehler M, Christensen ER, Schad CR, Zinsmeister AR, Lust J, Hanson C, Dewald GW (1998) Detection of RB1 deletions by fluorescence *in situ* hybridization in malignant hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 103(2): 117–123.
172. Wurster-Hill DH, Cornwell GG, 3rd, McIntyre OR (1974) Chromosomal aberrations and neoplasm — a family study. *Cancer* 33(1): 72–81.
173. Ohyashiki K, Kodama A, Ohyashiki JH (2008) Recurrent der(9;18) in essential thrombocythemia with JAK2 V617F is highly linked to myelofibrosis development. *Cancer Genet Cytogenet* 186(1): 6–11.
174. Santana-Davila R, Tefferi A, Holtan SG, Ketterling RP, Dewald GW, Knudson RA, Steensma DP, Chen D, Hoyer JD, Hanson CA (2008) Primary myelofibrosis is the most frequent myeloproliferative neoplasm associated with del(5q): clinicopathologic comparison of del(5q)-positive and -negative cases. *Leuk Res* 32(12): 1927–1930.
175. Nakata Y, Kimura A, Katoh O, Kawaishi K, Hyodo H (1995) c-kit point mutation of extracellular domain in patients with myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 91(3): 661–663.
176. Kimura A, Nakata Y, Katoh O, Hyodo H (1997) c-kit Point mutation in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 25(3–4): 281–287.
177. Longley BJ, Jr., Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ, Heitjan D, Ma Y (1999) Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(4): 1609–1614.
178. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, Duffy T, Jacobs P, Tang LH, Modlin I (1996) Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet* 12(3): 312–314.

179. Munugalavadla V, Sims EC, Chan RJ, Lenz SD, Kapur R (2008) Requirement for p85 $\alpha$  regulatory subunit of class IA PI3K in myeloproliferative disease driven by an activation loop mutant of KIT. *Exp Hematol* 36(3): 301–308.
180. Vidovic A, Jankovic G, Colovic M, Tomin D, Perunicic M, Bila J, Markovic O, Boskovic D (2008) The proto-oncogene expression varies over the course of chronic myeloid leukemia. *Hematology* 13(1): 34–40.
181. Kaushansky K (2005) On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005*: 533–537.
182. Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S (2010) Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer and metastasis. *Cancer Metastasis* 29(2): 295-307.
183. Schellings MW, Vanhoutte D, Swinnen M, Cleutjens JP, Debets J, van Leeuwen RE, d'Hooge J, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM, Sage EH, Heymans S (2009) Absence of SPARC results unincreased cardiac rupture and dysfunction after myocardial infraction. *J Exp Med* 206(1): 113-123.
184. Tripodo C, Sangaletti S, Guarnotta C, Piccaluga PP, Cacciatore M, Giuliano M, Franco G, Chiodoni C, Sciandra M, Miotti S, Calvaruso G, Carè A, Florena AM, Scotlandi K, Orazi A, Pileri SA, Colombo MP (2012) Stromal SPARC contributes to the detrimental fibrotic changes associated with myeloproliferation while its deficiency favors myeloid cell expansion. *Blood* 120(17): 3541-3554.
185. Motamed K (1999) SPARC (osteonectin/BM40). *Int J Biochem Cell Biol* 3: 1363-1366.
186. Matsuoka A, Tochigi A, Kishimoto M, Nakahara T, Kondo T, Tsujioka T, Tasaka T, Tohyama Y, Tohyama K (2010) Lenalidomide induces cell death in an MDS-derived cell line with deletion of 5q by inhibition of cytokinesis. *Leukemia* 24: 748-755.
187. Kuhn C, Mason RJ (1995) Immunolocalization of SPARC, tenascin, and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 147(6): 1759–1769.
188. Blazejewski S, Le Bail B, Boussarie L, Blanc JF, Malaval L, Okubo K, Saric J, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J (1997) Osteonectin (SPARC) expression in human liver and in cultured human liver myofibroblasts. *Am J Pathol* 151(3): 651–657.
189. Geron I, Abrahamsson AE, Barroga CF, Kavalierchik E, Gotlib J, Hood JD, Durocher J, Mak CC, Noronha G, Soll RM, Tefferi A, Kaushansky K, Jamieson

- CH (2008) Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors. *Cancer Cell* 13(4): 321–330.
190. Alpers CE, Hudkins KL, Segerer S, Sage EH, Pichler R, Couser WG, Johnson RJ, Bassuk JA (2002) Localization of SPARC in developing, mature, and chronically injured human allograft kidneys. *Kidney Int* 62(6): 2073–2086.
191. Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4: 7-25.
192. Li L, Xie T (2005) Stem cell niche: Structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 605-631.
193. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414: 98-104.
194. Lin H (2002) The stem-cell niche theory: Lessons from flies. *Nat Rev Genet* 3: 931-940.
195. Watt FM, Hogan BL (2000) Out of eden: Stem cells and their niche. *Science* 287: 1427-1430.
196. Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004) Socializing with the neighbours: Stem cells and their niche. *Cell* 116: 769-778.
197. Wilson A, Trumpp A (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell-niches. *Nat Rev Immunol* 6: 93-106.
198. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA (2001) Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: Inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 97: 2293-2299.
199. Gong JK (1978) Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science* 199: 1443-1445.
200. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated. *Cell* 109(5): 625-637.
201. Yin T, Li L (2006) The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116: 1195-1201.
202. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003) Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche. *Nature* 425: 836-841.

203. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003) Osteoblastic cells regulate the haemopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-846.
204. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL (2004) Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103: 3258-3264.
205. Corral DA, Amling M, Priemel M, Loyer E, Fuchs S, Ducy P, Baron R, Karsenty G (1998) Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc Natl Acad. Sci USA* 95: 13835-13840.
206. Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, Havens A, Schneider A, Ge C, Franceschi RT (2008) Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells* 26: 2042-2051.
207. Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G (2004) Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432: 625-630.
208. Ohneda O, Fennie C, Zheng Z, Donahue C, La H, Villacorta R, Cairns B, Lasky LA (1998) Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad- mesonephros region-derived endothelium. *Blood* 92: 908-919.
209. Li W, Johnson SA, Shelley WC, Ferkowicz M, Morrison P, Li Y, Yoder MC (2003) Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood* 102: 4345-4353.
210. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S (2005) The bone marrow vascular niche: Home of the HSC differentiation and mobilization. *Physiology* 20: 349-356.
211. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches from stem cells. *Cell* 121: 1109-1121.
212. Ward HP, Block MH (1971) The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of its relationship with the myeloproliferative syndrome. *Medicine* 50: 357-420.

213. Sciascia R, Albisinni U, Tondi L (1988) Idiopathic myelofibrosis. Radiological appearance of bone changes. *Radiol Med* 75: 281-286.
214. Mellibovsky L, Diez A, Serrano S, Aubia J, Pérez-Vila E, Mariñoso ML, Nogués X, Recker RR (1996) Bone remodeling alternations in myelodysplastic syndrome. *Bone* 19: 401-405.
215. Mellibovsky L, Mariñoso ML, Cervantes F, Besses C, Nacher M, Nogués X, Florensa L, Munné A, Diez-Perez A, Serrano S (2004) Relationship among densitometry, bone histomorphometry, and histologic state in idiopathic myelofibrosis. *Bone* 34: 330-335.
216. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ (1978) Angiogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 5: 189-194.
217. Groopman JE (1980) The pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Ann Int Med* 92: 857-858.
218. Yan Q, Sage EH (1999) SPARC, a Matricellular Glycoprotein with Important Biological Functions. *J Histochem Cytochem* 47: 1495-1505.
219. Martinek N, Shahab J, Sodek J, Ringuette M (2007) Is SPARC an Evolutionarily Conserved Collagen Chaperone? *J Dent Res* 86(4): 296-305.
220. Lane TF, Iruela-Arispe ML, Sage EH (1992) Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator-1. *J Biol Chem* 267: 16736-16745.
221. Patthy L (1991) Modular exchange principals in proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1: 1351-1361.
222. Maurer P, Mayer U, Bruch M, Jenö P, Mann K, Landwehr R, Engel J, Timpl R (1992) High affinity and low affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin). *Eur J Biochem* 205: 233-240.
223. Brekken RA, Sage EH (2001) SPARC, a matricellular at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 19: 816-827.
224. Vernon R, Sage EH (1989) The calcium-binding protein SPARC is secreted by Leydig and Sertoli cells of the adult mouse testis. *Biol Reprod* 40: 1329-1340.
225. Funk SE, Sage EH (1993) Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 154: 53-63.

226. Lane TF, Iruela-Arsipe ML, Johnson RS, Sage EH (1994) SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol* 4: 929-943
227. Kelm RJ Jr, Mann KG (1991) The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation. *J Biol Chem* 266: 9623-9639.
228. Kaufmann B, Muller S, Hanisch FG, Hartmann U, Paulsson M, Maurer P (2004) Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity. *Glycobiology* 14: 609-619.
229. Hohenester E, Maurer P, Timpl R (1997) Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J* 16: 3778-3786.
230. Hohenester E, Maurer P, Hohenadl C, Timpl R, Jansonius JN, Engel J (1996) Structure of a novel extracellular calcium-binding molecule in BM-40. *Nature Struct Biol* 3: 67-73.
231. Sasaki T, Hohenester E, Gohring W, Timpl R (1998) Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagenbinding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J* 17: 1625-1643.
232. Brekken RA, Sage EH (2000) SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 19: 569-580.
233. Engel J, Taylor W, Paulsson M, Sage EH, Hogan B (1987) Calcium binding domains and calcium induced conformational transition of SPARC/BM-40/osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and nonmineralized tissues. *Biochemistry* 26: 6958-6956.
234. Pottgiesser J, Maurer P, Mayer U, Nischt R, Timpl R, Krieg T, Engel J (1994) Changes in calcium binding and collagen IV binding caused by mutations in the EF hand and other domains of extracellular matrix protein BM-40 (SPARC, osteonectin). *J Mol Biol* 238: 563-574.
235. Ivanovic Z (2009) Hypoxia or in situ normoxia. The stem cell paradigm. *J Cell Physiol* 219: 271-277.
236. Lane TF, Sage EH (1994) The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 8: 163-173.
237. Iruela-Arispe ML, Lane TF, Redmond D, Reilly D, Bolender RP, Kavanagh TJ, Sage EH (1995) Expression of SPARC during development of the chicken



- chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis in vivo. *Mol Biol Cell* 6: 327-343
238. Iruela-Arispe ML, Vernon RB, Wu H, Jaenisch R, Sage EH (1996) Type I collagen-deficient mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: implications for fibroblast function. *Dev Dyn* 207:171-183.
239. Sage EH, Vernon R, Funk S, Everitt E, Angello J (1989) SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits calcium-dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol* 109: 341-356.
240. Maurer P, Hohenadl C, Hohenester E, Gohring W, Timpl R, Engle J (1995) The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds calcium and collagen IV. *J Mol Biol* 253: 347-357.
241. Rosenblatt S, Bassuk JA, Alpers CE, Sage EH, Timpl R, Preissner KT (1997) Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins: characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC). *Biochem J* 324: 311-319.
242. Bornstein P, Sage EH (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14: 608-616.
243. Fredriksson L, Li H, Eriksson U (2004) The PDGF family: four gene products from five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(4): 197-204.
244. Jimenez C, Portela RA, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, Martinez-A C, Avila J, Carrera AC (2000) Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol* 151(2): 249-262.
245. Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* 401(6748): 86-90.
246. Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, Sage EH (1992) The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1281-1285.
247. Zachary I, Glikli G (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 49(3): 568-581.

248. Kupprion C, Motamed K, Sage EH (1999) SPARC inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 29635-29640.
249. Bottcher RT, Niehrs C (2005) Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* 26(1): 63-77.
250. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer* 7: 165-197.
251. Motamed K, Angello J, Hauschka S, Sage EH (1999) Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and promotion of skeletalmyoblast differentiation by SPARC. *FASEB J* 13: A704.
252. Massague J, Gomis RR (2006) The logic of TGF $\beta$  signaling. *FEBS* 580: 2811-2820.
253. Verrechia F, Mauviel A (2007) Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 13: 3056-3062.
254. Reed MJ, Vernon RB, Abrass IB, Sage EH (1994) TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young aged donors. *J Cell Physiol* 158: 169-179.
255. Wrana JL, Overall CM, Sodek J (1991) Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cystein (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. *Eur J Biochem* 197: 519-528.
256. Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH (1999) SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 274: 32145-32152.
257. Francki A, McClure TD, Brekken RA, Motamed K, Mirri C, Wand T (2004) SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* 91: 915-925.
258. Schiemann BJ, Neil JR, Schiemann WP (2003) SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. *Mol Biol Cell* 14: 3977-398.
259. Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.

260. Bornstein P (2000) Matricellular proteins: an overview. *Matrix Biology* 19: 555-556.
261. Shankavaram UT, DeWitt DL, Funk SE, Sage EH, Wahl LM (1997) Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* 173: 327-334.
262. Termine JD, Kleinman HK, Whiston SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981) Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26: 99-105.
263. Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Hérodin F, Dupuy C, Jasmin C, Le Bousse-Kerdilès MC (2002) Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: Evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 99: 1117–1129.
264. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595–599.
265. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393: 591–594.
266. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382: 635–638.
267. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T (1999) Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283: 845–848.
268. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50–56.

269. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS (2003) Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 89: 462–473.
270. Voermans C, van Heese WP, de Jong I, Gerritsen WR, van Der Schoot CE (1992) Migratory behavior of leukemic cells from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 16: 650–657.
271. Tavor S, Petit I, Porozov S, Avigdor A, Dar A, Leider-Trejo L, Shemtov N, Deutsch V, Naparstek E, Nagler A, Lapidot T (2004) CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res* 64: 2817–2824.
272. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T (2000) The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: Role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95: 3289–3296.
273. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitariano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA (2001) Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 97: 3354–3360.
274. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T (2002) G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology* 3: 687–694.
275. Lévesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ (2003) Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 111: 187–196.
276. Voermans C, Kooi ML, Rodenhuis S, van der Lelie H, van der Schoot CE, Gerritsen WR (2001) In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood* 97: 799–804.
277. Dlubek D, Drabczak-Skrzypek D, Lange A (2006) Low CXCR4 membrane expression on CD34(+) cells characterizes cells mobilized to blood. *Bone Marrow Transplant* 37: 19–23.

278. Shen H, Cheng T, Olszak I, Garcia-Zepeda E, Lu Z, Herrmann S, Fallon R, Luster AD, Scadden DT (2001) CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 166: 5027–5033.
279. Kim HK, De La Luz Sierra M, Williams CK, Gulino AV, Tosato G (2006) G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* 18: 812–820.
280. De La Luz Sierra M, Gasperini P, McCormick PJ, Zhu J, Tosato G (2007) Transcription factor Gfi-1 induced by G-CSF is a negative regulator of CXCR4 in myeloid cells. *Blood* 110: 2276–2285.
281. Busillo JM, Benovic JL (2007) Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768: 952–963.
282. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frassoni F (2001) Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 98: 3249–3255.
283. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, Meli V, Marchetti M, Hoffman R, Barosi G (2005) Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 23: 5688–5695.
284. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA (2007) Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109: 1801–1809.
285. Xu M, Bruno E, Chao J, Ni H, Lindgren V, Nunez R, Mahmud N, Finazzi G, Fruchtman SM, Popat U, Liu E, Prchal JT, Rondelli D, Barosi G, Hoffman R (2005) Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood* 105: 4508–4515.
286. Xu M, Bruno E, Chao J, Ni H, Lindgren V, Nunez R, Mahmud N, Finazzi G, Fruchtman SM, Popat U, Liu E, Prchal JT, Rondelli D, Barosi G, Hoffman R (2005) The constitutive mobilization of bone marrow-repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 105: 1699–1705.
287. Rosti V, Massa M, Vannucchi AM, Bergamaschi G, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, Meli V, Marchetti M, Guglielmelli P, Bruno E, Xu M, Hoffman R, Barosi G (2007) The expression of CXCR4 is down-regulated on the CD34+

- cells of patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood Cells Mol Dis* 38: 280–286.
288. Guglielmelli P, Zini R, Bogani C, Salati S, Pancrazzi A, Bianchi E, Mannelli F, Ferrari S, Le Bousse-Kerdilès MC, Bosi A, Barosi G, Migliaccio AR, Manfredini R, Vannucchi AM (2007) Molecular profiling of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis identifies a set of disease-associated genes and reveals the clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1). *Stem Cells* 25: 165–173.
289. Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, Tefferi A (2003) Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 101(5): 1981-1983.
290. Cozma D, Yu D, Hodawadekar S, Azvolinsky A, Grande S, Tobias JW, Metzgar MH, Paterson J, Erikson J, Marafioti T, Monroe JG, Atchison ML, Tikhonenko AT (2007) B cell activator PAX5 promotes lymphomagenesis through stimulation of B cell receptor signaling. *J Clin Invest* 117(9): 2602-2610.
291. Adams B, Dörfler P, Aguzzi A, Kozmik Z, Urbánek P, Maurer-Fogy I, Busslinger M (1992) Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes & Dev* 6: 1589-1607.
292. Suh DY (2000) Understanding angiogenesis and its clinical applications. *Ann Clin Lab Sci* 30: 227-238.
293. Eschwege P, de Ledinghen V, Camilli T, Kulkarni S, Dalbagni G, Droupy S, Jardin A, Benoit G, Weksler BB (2001) Arachidonic acid and prostaglandins, inflammation and oncology. *Presse* 30: 508-510.
294. Cheng T, Cao W, Wen R, Steinberg RH, LaVail MM (1998) Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 581-591.
295. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 372: 83-87.
296. Fosslien E (2000) Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37: 431-502.

297. Fosslien E (2000) Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30: 3-21.
298. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT (2000) COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 89: 2637-2645.
299. Gaffney DK, Holden J, Davis M, Zemmpolich K, Murphy KJ, Dodson M (2001) Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49: 1213-1217.
300. Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H (2000) Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 83: 324-328.
301. Madaan S, Abel PD, Chaudhary KS, Hewitt R, Stott MA, Stamp GW, Lalani EN (2000) Cytoplasmic induction and over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. *BJU Int* 86: 736-741.
302. Denkert C, Kobel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U, Hauptmann S (2001) Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 61: 303-308.
303. Karim MM, Hayashi Y, Inoue M, Imai Y, Ito H, Yamamoto M (2000) Cox-2 expression in retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 129: 398-401.
304. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S (2007) Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1177-1195.
305. Stites EC, Ravichandran KS (2009) A systems perspective of ras signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 15(5): 1510-3.
306. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR, Futreal PA (2011) COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 39: D945-950.
307. Shimizu N, Ohtsubo M, Minoshima S (2007) MutationView/KMccancerDB: a database for cancer gene mutations. *Cancer Sci* 98(3):259-267.

308. Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L (2000) Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 96(5):1655-1669.
309. Steinbrunn T, Stuhmer T, Gattenlohner S, Rosenwald A, Mottok A, Unzicker C, Einsele H, Chatterjee M, Bargou RC (2011) Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival. *Blood* 117(6): 1998-2004.
310. De Melo MB, Lorand-Metze I, Lima CS, Saad ST, Costa FF (1997) N-ras gene point mutations in Brazilian acute myelogenous leukemia patients correlate with a poor prognosis. *Leuk Lymphoma* 24(3-4): 309-17.
311. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R (1999) Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 93(9): 3074-80.
312. Shih LY, Huang CF, Wang PN, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Kuo MC (2004) Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 18(3): 466-75.
313. Stein B, Baldwin AS, Jr, Ballard DW, Greene WC, Angel P, and Herrlich P (1993) Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 12(10): 3879–3891.
314. Harris AL (2002) Hypoxia-a key regulatory factor in tumor growth. *Nat Rev Cancer* 2: 38-47.
315. Semenza GL (2010) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29: 625-634.
316. Chomczynski P, Mackey K (1995) Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *BioTechniques* 19(6): 942-945.
317. Siva K, Jaako P, Miharda K, Rorby E, Ehinger M, Karlsson G, Karlsson S (2012) SPARC is dispensable for murine haematopoiesis, despite its suspected pathophysiological role in 5q- myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 26: 2416-2419.
318. Rivera LB, Bradshaw AD, Brekken RA (2011) The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cell Mol Life Sci* 68(19): 3165-3173.



319. Urao N, Ushio-Fukai M (2013) Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic Biol Med* 54: 26-39.
320. Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, Wilson D, Xu Q, Raz E (2008) Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132: 463–473.
321. Papayannopoulou T, Scadden DT (2008) Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood* 111: 3923–3930.
322. Sweeney EA, Papayannopoulou T (2001) Increase in circulating SDF-1 after treatment with sulfated glycans. The role of SDF-1 in mobilization. *Ann N Y Acad Sci* 938: 48–52.
323. Cho SY, Xu M, Roboz J, Lu M, Mascarenhas J, Hoffman R (2010) The effect of CXCL12 processing on CD34+ cell migration in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Res* 70(8): 3402-3410.