

1.1. Patogeneza nowotworów układu krwiotwórczego

Emilia Białopiotrowicz

1.1.1. Wprowadzenie

Nowotwory układu krwiotwórczego to klonalne choroby krwiotwórczych komórek macierzystych lub komórek progenitorowych linii mieloidalnej. Do tej grupy nowotworów zalicza się choroby mieloproliferacyjne (MPN, *myeloproliferative neoplasms*), zespoły mielodysplastyczne (MDS, *myelodysplastic syndromes*) oraz ostrą białaczkę szpikową (AML, *acute myeloid leukemia*). Nowotwory układu krwiotwórczego są powodowane zaburzeniami genetycznymi oraz epigenetycznymi, które współwystępują ze sobą w różnych konfiguracjach, nadając heterogenny charakter tym chorobom. Konsekwencjami tych zaburzeń są nadmierna zdolność macierzystych/progenitorowych komórek krwiotwórczych do samoodnowy i upośledzona zdolność do różnicowania.

1.1.2. Hematopoeza

Hematopoeza to wieloetapowy i hierarchiczny proces powstawania elementów morfotycznych krwi w wyniku proliferacji oraz różnicowania krwiotwórczych komórek macierzystych (HSC, *hematopoietic stem cells*). W wyniku asymetrycznego podziału HSC powstają nowa komórka macierzysta zapewniająca ciągłość populacji HSC oraz wielopotencjalna komórka progenitorowa (MPP, *multipotent progenitor*), która może dać początek komórce progenitorowej linii mieloidalnej (CMP, *common myeloid progenitor*) lub limfoidalnej (CLP, *common lymphoid progenitor*). Komórka CMP może ulec różnicowaniu do komórki progenitorowej granulocytów i monocytów (GMP, *granulocyte-macrophage*

progenitor) lub komórki progenitorowej dającej początek megakariocytom oraz erytrocytom (MEP, *megakaryocyte-erythroid progenitor*) (ryc. 1.1.1). Wybór drogi różnicowania zależy od skoordynowanego działania licznych czynników, w tym cytokin hematopoetycznych oraz czynników transkrypcyjnych [1]. Cytokiny hematopoetyczne wpływają na różnicowanie komórek przez wiązanie się do specyficznych względem nich receptorów błonowych i w konsekwencji na aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych zależnych od danego receptora. Receptory odznaczają się bardzo dużą czułością — już stężenie cytokiny rzędu 10^{-12} mola wywiera efekt w komórkach docelowych. Do receptorów kluczowych dla wczesnych etapów hematopoezy zalicza się receptory kinaz tyrozynowych FLT3 (*fms like tyrosine kinase 3*) oraz KIT. Receptor FLT3 indukuje ekspansję wczesnych komórek progenitorowych, podczas gdy KIT jest niezbędny do podtrzymywania populacji HSC, CMP, GMP i MEP.

Aktywacja szlaku sygnałowego po przyłączeniu cytokiny do receptora prowadzi do ekspresji określonego wzorca genów, co kontrolują czynniki transkrypcyjne. Przez wiązanie się z DNA w ściśle określonych regionach (promotor, sekwencja wzmacniająca) czynniki transkrypcyjne regulują proces syntezy RNA na matrycy DNA (transkrypcji) dla wybranych genów. Dlatego czynniki transkrypcyjne determinują funkcjonalne konsekwencje aktywacji szlaków sygnałowych wywołanych przyłączeniem cytokiny do receptora. Ekspresja większości czynników transkrypcyjnych jest ograniczona jedynie do komórek znajdujących się w określonych stadiach rozwojowych, co wskazuje na konieczność ich precyzyjnej regulacji w celu zachowania prawidłowej hematopoezy. Wybrane czynniki transkrypcyjne i wzrostowe (cytokiny) kontrolujące proces hematopoezy przedstawiono na rycinie 1.1.1.

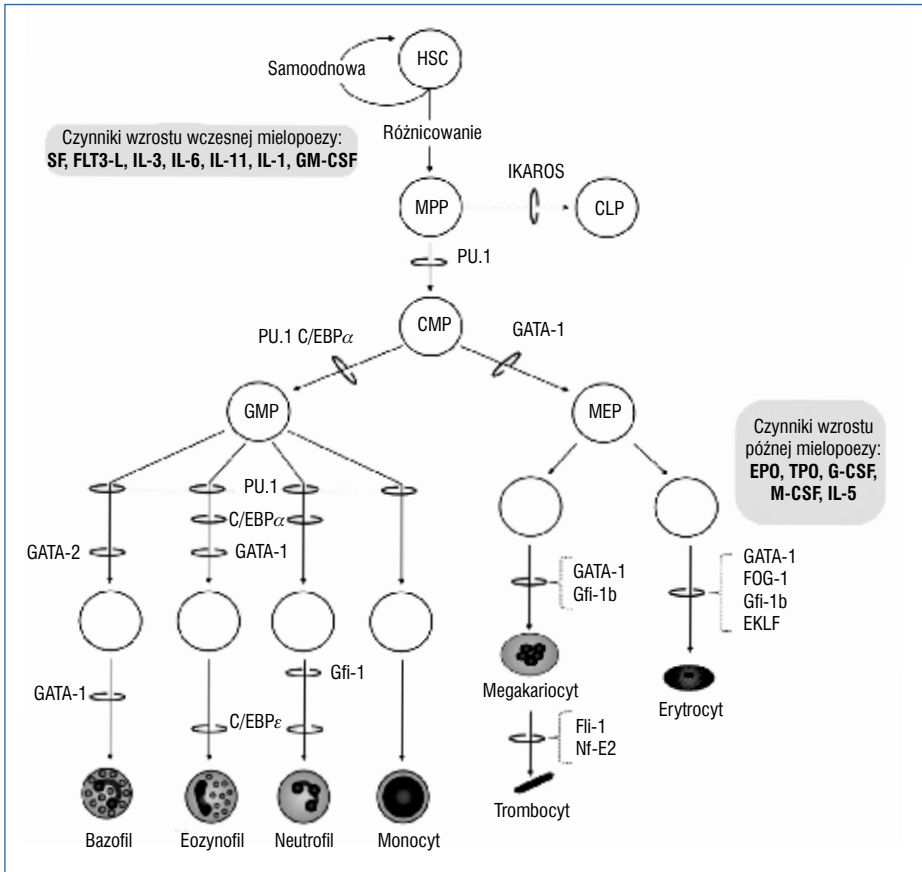
Zaburzenia ekspresji cytokin, aktywności receptorów, transdukcji sygnału lub czynników transkrypcyjnych mogą wynikać z zaburzeń genetycznych (aberracje chromosomowe i mutacje genowe) lub pozagenetycznych (tzw. epigenetycznych) i prowadzić do zaburzeń hematopoezy skutkujących rozwojem nowotworów układu krwiotwórczego.

1.1.3. Zaburzenia genetyczne w nowotworach układu krwiotwórczego

1.1.3.1. Aberracje chromosomowe

Aberracje chromosomowe (cytogenetyczne) mogą dotyczyć zarówno zmiany struktury, jak i liczby chromosomów. Przykładem anomalii chromosomowych występujących w nowotworach układu krwiotwórczego są translokacje, aneuploidie i delecje. Wybrane aberracje chromosomowe przedstawiono w tabeli 1.1.1.

Translokacje powstają w wyniku przemieszczenia się fragmentu chromosomu w inne miejsce tego samego lub innego chromosomu i często prowadzą do powstania genów fuzyjnych [2]. Przykładem są translokacje obejmujące geny czynników transkrypcyjnych (CBF, *core binding factor*) kontrolujących hematopoezę. Czynniki transkrypcyjne CBF funkcjonują jako heterodimery składające się z podjednostki regulatorowej kodowanej przez gen *CBFB* (*CBF beta*) oraz podjednostki wiążącej DNA należącej do rodziny genów *RUNX* (*runt-related transcription factor*). Translokacja t(8;21) występuje u około 12% chorych z AML i prowadzi do fuzji genu *RUNX1* z genem *ETO* (*eight twenty-one*). Chimeryczne



Rycina 1.1.1. Przebieg różnicowania komórek linii mieloidalnej. Na schemacie uwzględniono czynniki transkrypcyjne oraz czynniki wzrostu kontrolujące różnicowanie; HSC (*hematopoietic stem cells*) — krwiotwórcze komórki macierzyste; SCF (*stem cell factor*) — czynnik wzrostu komórek macierzystych; FLT3-L (*fms like tyrosine kinase 3 ligand*) — ligand dla fms podobnej kinazy 3; IL — interleukina; GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) — czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) — czynnik stymulujący tworzenie granulocytów; GATA-1 — *GATA-binding factor 1*; C/EBP α — *CCAAT/enhancer-binding protein alfa*; EPO — erytropoetyna; TPO (*thrombopoietin*) — trombopoetyna; CLP (*common lymphoid progenitor*) — komórka progenitorowa linii limfoidalnej; CMP (*common myeloid progenitor*) — komórka progenitorowa linii mieloidalnej; GMP (*granulocyte-macrophage progenitor*) — komórka progenitorowa granulocytów i monocytów; MEP (*megakaryocyte-erythroid progenitor*) — komórka progenitorowa megakariocytów i eryocytów; MPP (*multipotent progenitor*) — wielopotencjalna komórka progenitorowa

Tabela 1.1.1. Najczęstsze aberracje chromosomowe w nowotworach układu krwiotwórczego

Zaburzenie chromosomowe	Konsekwencje biologiczne	Choroba i częstość (%)	Rokowanie/ uwagi
Translokacje			
t(8;21)	Białko fuzyjne RUNX1-ETO działa antagonistycznie w stosunku do RUNX1, hamując hematopoezę	8% AML, częściej u dzieci niż dorosłych	Korzystne
t(16;16)(p13.1;q22)	Białko fuzyjne CBFβ-SMMHC, konsekwencje jak powyżej	9% AML	Korzystne
t(15;17)(q22;q12)	Białko fuzyjne PML-RAR α niewrażliwe na działanie kwasu retinowego, zahamowanie różnicowania	95% APL	Korzystne, terapia ATRA i ATO
t(5;12)(q33;p13)	Białko fuzyjne ETV6-PDGFRB o konstytutywnej aktywności kinazy tyrozynowej	1–2% CMML	Dobra odpowiedź na imatynib
t(11q23;...)	Obejmują gen metylotransferazy histonowej MLL, białka fuzyjne z MLL aktywują program transkrypcyjny charakterystyczny dla HSC	12% AML	Niekorzystne
t(9;22)(q34;q11.2)	Białko fuzyjne BCR-ABL1 o konstytutywnej aktywności kinazy tyrozynowej	> 95% CML	Dobra odpowiedź na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych
t(6;9)(p23;q34)	Białko fuzyjne DEK-NUP214 powodujące zaburzenia regulacji transkrypcji	< 2% AML	Niekorzystne
t(1;22)(p13;q13)	Białko fuzyjne RBM15-MKL1, niewłaściwa organizacja chromatyny i zaburzenia szlaków sygnałowych związanych z różnicowaniem	< 2% AML	Niekorzystne
Delecje			
del(5q)	Najczęściej prowadzi do utraty kilku genów kodujących białka rybosomalne	15% MDS	Korzystne, z wyjątkiem przypadków, gdy obejmuje geny <i>MAML1</i> i <i>NPM1</i>
del(7q)	Utrata genu supresora nowotworów <i>CUX1</i> , może obejmować geny <i>EZH2</i> i <i>MLL5</i> związane z regulacją epigenetyczną	10% <i>de novo</i> MDS, 50% z zależnym od terapii MDS lub AML	Niekorzystne



Tabela 1.1.1 cd. Najczęstsze aberracje chromosomowe w nowotworach układu krwiotwórczego

Zaburzenie chromosomowe	Konsekwencje biologiczne	Choroba i częstość (%)	Rokowanie/ uwagi
Trisomie			
+ chromosom 8.	Wysokie stężenie białek antyapoptotycznych (np. surwiwiny), zaburzenia autoimmunologiczne	40% CML (faza blastyczna)	Niekorzystne
		5% MDS	Pośrednie
+ chromosom 21. (zespół Downa)	Słabo poznane	3% AML	Pośrednie lub korzystne
Pozostałe			
Kariotyp złożony	≥ 3 aberracje chromosomowe, utrata wielu genów, różne konsekwencje	12% AML	Niekorzystne

ATO (*arsenic trioxide*) — trójtlenek arsenu; ATRA (*all-trans retinoic acid*) — kwas całkowicie trans-retinowy; AML (*acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa; APL (*acute promyelocytic leukemia*) — ostra białaczka promielocytowa; CML (*chronic myeloid leukemia*) — przewlekła białaczka szpikowa; CMML (*chronic myelomonocytic leukemia*) — przewlekła białaczka mielomonocytowa; MDS (*myelodysplastic syndromes*) — zespoły mielodysplastyczne

białko RUNX1-ETO działa antagonistycznie w stosunku do prawidłowego białka RUNX1, prowadząc do zatrzymania ekspresji genów hematopoetycznych kontrolowanych przez CBF. Podobny efekt wywołują translokacja 16;16(p13.1;q22) oraz inwersja chromosomu 16(p13.1;q22), które prowadzą do powstania fuzyjnego genu *CBFB-SMMHC*.

W 95% przypadków ostrej białaczki promielocytowej (APL, *acute promyelocytic leukemia*) stwierdza się obecność translokacji 15;17(q22;q12), w wyniku której dochodzi do połączenia genu *PML* (*promyelocytic leukemia protein*) z genem *RARA* (*retinoic acid receptor alpha*), kodującym receptor α kwasu retinowego ($RAR\alpha$, *retinoic acid receptor alpha*), zlokalizowanym w jądrze komórkowym. W obecności kwasu retinowego $RAR\alpha$ wiąże się do DNA, uruchamiając ekspresję genów związanych z różnicowaniem. Fuzyjne białko *PML-RAR α* upośledza funkcje *PML* i zaburza budowę $RAR\alpha$, co czyni ten receptor niewrażliwym na fizjologiczne stężenia kwasu retinowego, to z kolei prowadzi do zahamowania hematopoezy. W terapii APL stosowane są kwas trans-retinowy (ATRA, *all-trans retinoic acid*) oraz trójtlenek arsenu (ATO, *arsenic trioxide*), które niwelują onkogenny wpływ *PML-RAR α* i indukują różnicowanie.

Translokacje chromosomowe mogą obejmować geny kinaz tyrozynowych, których produkty białkowe fosforylują reszty tyrozynowe białek, wpływając na ich aktywność i w konsekwencji — na przekazanie sygnałowe w komórce. Do rodziny kinaz tyrozynowych należą zarówno receptory czynników wzrostu, takie jak receptory płytkopochodnego czynnika wzrostu ($PDGFR\alpha$ / $PDGFR\beta$, *platelet-derived growth factor receptor alpha/beta*), jak również białka cytoplazmatyczne, na przykład kinaza *ABL1* (*Abelson tyrosine-protein kinase 1*). Konsekwencją translokacji z udziałem genów kinaz tyrozynowych jest powstanie fuzyjnego białka o konstytutywnej aktywności kinazy tyrozynowej, które silnie promuje

proliferację (tab. 1.1.1). U ponad 95% chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (CML, *chronic myeloid leukemia*) stwierdza się obecność translokacji 9;22(q34;q11.2): *BCR-ABL1* (tzw. chromosom Filadelfia [Ph, *Philadelphia*]). Z kolei translokacja 5;12(q33;p13): *ETV6-PDGFRB* występuje u 1–2% chorych z przewlekłą białaczką mielomonocytową (CMML, *chronic myelomonocytic leukemia*). Racjonalną strategią terapeutyczną w translokacjach prowadzących do nadaktywności kinaz tyrozynowych jest zastosowanie inhibitorów tych białek.

Poza translokacjami u ponad 50% chorych z MDS, AML i CML występują aneuploidie i delecje (tab. 1.1.1). Delecja długiego ramienia chromosomu 5. (5q) występuje u 15% nowo zdiagnozowanych chorych z MDS i jeśli jest ona jedynym zaburzeniem, to wiąże się z dobrym rokowaniem choroby. Wyjątkiem są przypadki, gdy delecja ta obejmuje również geny *MAML1* (*mastermind-like protein 1*) i *NPM1* (*nucleolar phosphoprotein B23*), których utrata zwiększa prawdopodobieństwo nabycia dodatkowych aberracji chromosomowych i stąd wiąże się z agresywnym przebiegiem choroby. Del(5q) najczęściej prowadzi do utraty funkcji genu *RPS14* (*40S ribosomal protein S14*) oraz kilku innych genów kodujących białka rybosomowe i odpowiada za ciężką niedokrwistość.

Aberracje chromosomu 7. (monosomia i delecje 7q) obserwuje się u około 10% nowo zdiagnozowanych przypadków MDS i znacznie częściej (do 50%) u chorych z wtórnym MDS lub AML po terapii środkami alkilującymi [3]. Zaburzenia chromosomu 7. wiążą się z niekorzystnym rokowaniem (nadmierna proliferacja i progresja do AML). Utracony region obejmuje gen *CUX1* (*cut-like homeobox 1*) będący regulatorem różnicowania. Wskutek delecji 7q inaktywacji mogą ulec również epigenetyczne regulatory procesu różnicowania, *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*) i *MLL5/KMT2E* (*lysine methyltransferase 2E*).

Czasami obserwuje się obecność kilku niepowiązanych zaburzeń cytogenetycznych w tym samym klonie komórkowym, na przykład współwystępowanie zaburzeń chromosomów 5. i 7. w MDS i AML. Obecność co najmniej 3 nieprawidłowości chromosomowych w tym samym klonie komórkowym określa się jako kariotypy złożone (CK, *complex karyotype*). Kariotypy złożone mają zwykle niekorzystne znaczenie rokownicze.

1.1.3.2. Architektura mutacji somatycznych w nowotworach układu krwiotwórczego

W nowotworach układu krwiotwórczego mutacje somatyczne genów mogą towarzyszyć zmianom cytogenetycznym lub występować jako jedyne zaburzenia genetyczne u osób z prawidłowym kariotypem. Rozwój techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS, *next-generation sequencing*) pozwolił na lepsze poznanie architektury mutacji somatycznych występujących w nowotworach układu krwiotwórczego. Mutacje te najczęściej dotyczą genów związanych z przekaźnictwem/transdukcją sygnału, supresorów nowotworowych, regulatorów epigenetycznych, czynników transkrypcyjnych oraz genów związanych z edycją (splicingiem) matrycowego RNA [4]. Najczęściej występujące mutacje somatyczne przedstawiono w tabeli 1.1.2.

Tabela 1.1.2. Najczęstsze mutacje somatyczne w nowotworach układu krwiotwórczego

Gen	Konsekwencje biologiczne	Choroba i częstość (%)	Rokowanie
Transdukcja sygnału			
<i>FLT3</i>	Konstytutywna aktywacja FLT3	30% AML, 5% MDS	Niekorzystne
<i>KIT</i>	Konstytutywna aktywacja KIT prowadząca do aktywacji szlaku RAS/PI3K-AKT	20% CBF-AML	Niekorzystne
<i>MPL</i>	Konstytutywna aktywacja MPL, aktywacja JAK/STAT, proliferacja megakariocytów	5–9% MPN	Pośrednie
<i>CALR</i>	Nadmierna aktywacja MPL i JAK/STAT	30% MPN bez mutacji <i>JAK2</i> i <i>MPL</i>	Pośrednie
<i>JAK2 V617F</i>	Konstytutywna aktywność JAK2	60% MPN	Pośrednie
<i>RAS</i>	Nadmierna aktywacja RAS i szlaku MAPK	5–11% AML	Niekorzystne
Supresory nowotworów			
<i>TP53</i>	Utrata funkcji supresorowych	10% <i>de novo</i> AML, 30% wtórna AML	Niekorzystne
<i>WT1</i>		6–15% <i>de novo</i> AML	Niekorzystne
Regulatory epigenetyczne			
<i>DNMT3A</i>	Utrata zdolności metylacji DNA	15–25% AML, 8% MDS, 7–15% MPN	Niekorzystne
<i>TET2</i>	Nadmierna metylacja DNA, zmiana profilu ekspresji genów	7–23% AML, 20–25% MDS, 4–13% MPN	Niekorzystne
<i>EZH2</i>	Zaburzona metylacja histonów, zmiana profilu ekspresji genów	6% MDS, 3–13% MPN, 2% AML	Niekorzystne
<i>ASXL1</i>	Zaburzenia profilu ekspresji genów	45% CMML, 35% PMF, 11% AML, 16% MDS, 2–23% MPN	Niekorzystne
<i>MLL/KMT2A</i>	Mutacje o charakterze częściowych tandemowych duplikacji, zaburzona metylacja histonów, zmiana profilu ekspresji genów	6–8% <i>de novo</i> AML	Niekorzystne
<i>IDH1</i>	Produkcja 2-hydroksyglutaranu (2HG) hamującego aktywność demetylaz DNA i histonów, zaburzenia ekspresji genów	20% AML, 3,5% MDS, 2,5–5% MPN	Korzystne dla IDH2 R140Q
<i>IDH2</i>			



Tabela 1.1.2 cd. Najczęstsze mutacje somatyczne w nowotworach układu krwiotwórczego

Gen	Konsekwencje biologiczne	Choroba i częstość (%)	Rokowanie
Edycja i składanie/splicing mRNA			
<i>SETBP1</i>	Zaburzenia splicingu	25% aCML, 4% CMML	Niekorzystne
<i>SF3B1</i>		7% MDS, 4,5% CMML, 5% AML/ /MDS	Korzystne
Pozostałe			
<i>NPM1</i>	Zaburzenia biogenezy rybosomów, naprawy DNA i odpowiedzi na stres, unikatowy profil ekspresji genów (nadekspresja genów <i>HOX</i>)	50% NK-AML	Korzystne
<i>CEBPA</i>	Utrata zdolności wiązania DNA i indukcji ekspresji regulatorów różnicowania	5–15% AML	Korzystne

aCML (*atypical chronic myeloid leukemia*) — atypowa przewlekła białaczka szpikowa; FLT3 (*fms like tyrosine kinase 3*) — fms podobna kinaza tyrozynowa 3; CBF-AML (*core binding factor acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa z zaburzeniami czynników transkrypcyjnych CBF; CMML (*chronic myelomonocytic leukemia*) — przewlekła białaczka mielomonocytoza; MDS (*myelodysplastic syndromes*) — zespoły mielodysplastyczne; MPN (*myeloproliferative neoplasms*) — nowotwory mieloproliferacyjne; MPL (*myeloproliferative leukemia protein*) — receptor trombopoetyny; NK-AML (*normal karyotype AML*) — ostra białaczka szpikowa z prawidłowym kariotypem; PMF (*primary myelofibrosis*) — pierwotna mielofibroza

1.1.3.3. Mutacje genów odpowiedzialnych za transdukcję sygnału

Do zaburzeń w komórkowym przekaźnictwie sygnałowym prowadzą mutacje w genach kodujących receptory kinaz tyrozynowych FLT3 i KIT. Mutacje w genie *FLT3* występują u około 30% pacjentów chorych AML i 5% chorych na MDS. Receptor FLT3 po połączeniu z ligandem reguluje procesy proliferacji i różnicowania komórki. Mutacje w *FLT3* mogą mieć charakter wewnątrzrandemowej duplikacji (*FLT3-ITD*, *FLT3 internal tandem duplication*), która polega na podwojeniu 3–400 par zasad nukleotydowych w okołobłonowej domenie receptora, lub dotyczyć domeny kinazowej (*FLT3-TKD*, *FLT3 tyrosine kinase domain*). Konsekwencją obu typów mutacji jest konstytutywna i niezależna od ligandu aktywacja receptora FLT3, co prowadzi do zahamowania apoptozy i stymulacji podziałów komórkowych. W terapii przypadków pozytywnych pod względem mutacji FLT3 stosuje się inhibitory tej kinazy (midostauryna, gilteritynib w badaniach klinicznych).

U około 2% chorych z AML stwierdza się obecność mutacji w genie receptora KIT. Mutacje te występują w obrębie domeny pozakomórkowej, która odpowiada za dimeryzację receptora, co prowadzi do wzrostu jego aktywności i uruchomienia szlaków sygnałowych RAS i PI3K-AKT promujących proliferację. Konstytutywna aktywność KIT może również wynikać z nadekspresji ligandu dla tego receptora, czynnika wzrostu komórek macierzystych (*SCF*, *stem cell factor*).

Receptory regulujące hematopoezę: erytropoetyny (*EPO-R*, *erythropoietin receptor*), trombopoetyny (*MPL*, *myeloproliferative leukemia protein*) i czynnika wzrostu kolonii granulocytów (*G-CSFR*, *granulocyte colony-stimulating factor receptor*) nie mają wewnętrznej

domeny katalitycznej, a jej funkcję pełni kinaza JAK2 (*Janus kinase 2*), która przekazuje sygnał od receptora do wnętrza komórki i w efekcie prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT (*signal transducer and activation of transcription*). Mutacje JAK2 są częstą przyczyną MPN i prowadzą do konstytutywnej aktywacji osi sygnałowej JAK/STAT [5]. U 5–9% chorych na MPN niezależna od ligandów aktywacja JAK2 jest powodowana mutacjami w MPL. Z kolei u 30% chorych negatywnych pod względem mutacji JAK2 i MPL choroby mieloproliferacyjne powodowane są mutacjami w genie *CALR* kodującym kalretikulinę. Białko to jest regulatorem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz ma zdolność do rozpoznawania nieprawidłowo sfałdowanych glikoprotein. W MPN mutacje *CALR* dotyczą domeny C-końcowej białka i prowadzą do jego wiązania się do MPL, co skutkuje nadmierną aktywacją tego receptora i w konsekwencji — szlaku sygnałowego JAK/STAT.

Istotną funkcję w transdukcji sygnału od receptorów błonowych pełnią białka RAS, które mają zdolność wiązania guanozyno-5'-trójfosforanu (GTP, *guanosine-5'-triphosphate*) i jego przekształcania do guanozyno-5'-dwufosforanu (GDP, *guanosine-5'-diphosphate*). Białka RAS ze związanym GTP są aktywne, z przyłączonym GDP zaś — nieaktywne. Liczba aktywnych białek RAS jest związana z liczbą receptorów powierzchniowych, a przekazywany przez te białka sygnał podlega autoregulacji. U 5–11% chorych z AML spotyka się mutacje genów *N-RAS* i *K-RAS*, które prowadzą do utraty zdolności przekształcania GTP do GDP, w wyniku czego dochodzi do konstytutywnej aktywacji RAS oraz białek przez nie regulowanych, na przykład kinazy PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*).

1.1.3.4. Mutacje w genach supresorów nowotworowych

Geny supresorów nowotworowych kodują negatywne regulatory cyklu komórkowego. Mutacje prowadzące do utraty funkcji przez te geny prowadzą do niekontrolowanej proliferacji, co promuje nowotworzenie [6]. Przykładem supresora nowotworów jest gen *TP53*. Produkt tego genu, białko p53, jest zaangażowane w liczne procesy komórkowe, zwłaszcza aktywację mechanizmów naprawy DNA lub indukcję apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Mutacje *TP53* występują u 10% nowo zdiagnozowanych chorych z AML i aż u 30% u chorych z wtórną AML. Inaktywacja *TP53* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym skracaającym czas całkowitego przeżycia chorego.

Gen *WT1* (*Wilms tumor protein*) koduje czynnik transkrypcyjny niezbędny do prawidłowej hematopoezy. Choć jego szczegółowa rola w komórce nie została wyjaśniona, przypuszcza się, że białko WT1 może pełnić funkcję zarówno supresorową, jak i proto-onkogeną w zależności od stadium rozwoju komórki. Ostatnie badania dowodzą, że WT1 może pełnić funkcje regulatora epigenetycznego przez bezpośrednie oddziaływanie z demetylaza DNA. Mutacje w *WT1* prowadzące do inaktywacji jego białkowego produktu występują u 6–15% przypadków *de novo* AML i wiążą się z krótszym całkowitym przeżyciem oraz opornością na leczenie indukcyjne.

1.1.3.5. Mutacje genów odpowiedzialnych za regulację epigenetyczną

Regulacja epigenetyczna polega na kontrolowaniu ekspresji genów przez zmianę stopnia kondensacji chromatyny, a tym samym jej stopnia dostępności dla aparatu transkrypcyjnego bez ingerencji w sekwencję nukleotydową. Zmiany epigenetyczne mają charakter odwracalny i mogą być dziedziczone przez komórki potomne. Do modyfikacji epigenetycznych zalicza się metylację DNA, modyfikacje kowalencyjne (np. metylacja, acetylacja) białek histonowych stanowiących rusztowanie dla DNA oraz regulację ekspresji genów za pomocą tzw. mikroRNA (miRNA). Zmiany epigenetyczne dotyczące metylacji DNA i modyfikacji histonów są kontrolowane przez enzymy, których mutacje prowadzą do zaburzeń kondensacji chromatyny, a tym samym profilu ekspresji genów, co sprzyja rozwojowi białaczek [7].

Metylacja DNA polega na przyłączeniu reszty metylowej najczęściej do nukleotydu cytozynowego, co czyni taki fragment chromatyny nieaktywnym transkrypcyjnie. Metylacja DNA przeprowadzana jest przez metylazy DNMT (*DNA methyltransferase*), zaś za odłączenie grupy metylowej odpowiadają między innymi demetylasy TET (*ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*). Zaburzenia metylacji DNA są powszechnym zjawiskiem w MDS oraz AML i pojawiają one się na wczesnych etapach tych chorób (tab. 1.1.2). Mutacje w genie *DNMT3A* obserwuje się u 15–25% chorych na AML i 8% chorych na MDS. Z podobną częstością występują mutacje w genie *TET2*. Zarówno mutacje w *DNMT3A*, jak i *TET2* są niekorzystnym czynnikiem rokowniczym.

Metylacja histonów może prowadzić do aktywacji lub zahamowania ekspresji genów w zależności od tego, która lizyna w łańcuchu peptydowym histonu ulegnie metylacji. Proces metylacji histonów jest przeprowadzany przez metylotransferazy lizynowe (KMTs, *lysine methyltransferases*). W nowotworach układu krwiotwórczego spotyka się mutacje genów metylotransferaz histonowych EZH2 (*enhancer of zeste polycomb repressive complex 2 subunit*) i ASXL1 (*additional sex combs like transcriptional regulator 1*). EZH2 jest częścią kompleksu białkowego PRC2 (*polycomb repressor complex 2*) i powoduje metylację lizyny 27 histonu H3 (H3K27), co prowadzi do represji transkrypcji. Mutacje EZH2 mają charakter utraty funkcji. W skład PRC2 wchodzi również białko ASXL1, które odpowiada za rekrutację kompleksu do określonych regionów DNA i ich transkrypcję. Mutacje *ASXL1* są spotykane u chorych z pierwotną mielofibrozą (35%), przewlekłą białcząką mielomonocytową (45%), MDS (16%) i AML (10,8%), mają charakter utraty funkcji i uważa się je za czynnik złego rokowania.

Zaburzenia metylacji DNA i histonów powodują również mutacje w genach kodujących dehydrogenazy izocytrynianowe 1 i 2 (*IDH1/2, isocitrate dehydrogenase 1/2*). Enzymy te katalizują reakcję przekształcenia izocytrynianu do α -ketoglutaranu, będącą jednym z etapów utleniania glukozy. Mutacje *IDH1/2* prowadzą do produkcji 2-hydroksyglutaranu (2HG, *2-hydroxyglutarate*), który hamuje aktywność demetylaz DNA i histonów, co powoduje zaburzenia epigenetyczne i w efekcie zmianę profilu ekspresji genów. Mutacje *IDH1/2* występują u około 20% pacjentów z AML i pojawiają się na wczesnym etapie nowotworzenia. Mutacje *IDH1* dotyczą zazwyczaj argininy w pozycji 132 (R132), mutacje *IDH2* zaś obejmują najczęściej argininę 140 (R140) i 172 (R172). Inhibitor zmutowanego białka *IDH2*, enasidenib, został zatwierdzony w 2017 roku przez amerykańską

Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) do leczenia chorych na AML z mutacjami w *IDH2*.

Niektóre mutacje mają tendencję do współwystępowania ze sobą lub z pewnymi aberracjami chromosomowymi, co ma znaczenie rokownicze. Mutacje *NPM1*, *DNMT3A* i *FLT3-ITD* współwystępują u 6% chorych z AML, co wiąże się ze znacząco gorszym rokowaniem w stosunku do chorych pozytywnych jedynie pod względem mutacji *FLT3-ITD*. Podobnie wpływ na rokowanie chorych AML z mutacjami *TP53* ma dodatkowa obecność mutacji lub jej brak w genach *ASXL1* i *SRSF2*. Z kolei mutacje *IDH2 R172* nie współwystępują z mutacjami w *NPM1*, zaś mutacje *TET2* wykluczają obecność mutacji *IDH1/IDH2*. Lepsze poznanie architektury mutacji somatycznych nowotworów układu krwiotwórczego ma istotne implikacje diagnostyczne i kliniczne. Zintegrowana analiza mutacji somatycznych oraz aberracji chromosomowych przeprowadzona z udziałem 1540 chorych z AML pozwoliła na wyodrębnienie 11 molekularnych podgrup tego nowotworu [8]. Klasyfikacja ta lepiej odzwierciedla mechanizmy patogenezы występujące w AML i ma większą wartość rokowniczą w stosunku do klasyfikacji bazującej głównie na obrazie cytogenetycznym.

1.1.3.6. Zaburzenia ekspresji mikroRNA

MikroRNA (miRNA) to krótkie (19–24 par zasad) niekodujące cząsteczki RNA, które wiążą się do matrycowego RNA (mRNA), blokując syntezę białka lub powodując degradację mRNA. Zaburzenia ekspresji miRNA wynikają z anomalii genetycznych lub epigenetycznych [9]. MikroRNA mogą pełnić funkcję protoonkogenów lub supresorów nowotworowych. Protoonkogenne cząsteczki miR-155 hamują ekspresję białek SHIP1 (*SH-2 containing inositol 5'-polyphosphatase 1*) i CEBPB (*CCAAT/enhancer-binding protein beta*) istotnych w różnicowaniu granulocytów, co promuje samoodnowę komórek hematopoetycznych. Nadekspresja miR-155 u chorych z AML jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Z kolei miR-29b aktywuje ekspresję p53, a hamuje ekspresję metylaz DNA oraz anty-apoptotycznego białka MCL1 (*myeloid cell leukemia 1*), stąd pełni rolę supresora nowotworowego. Obniżona ekspresja miR-29b u chorych z AML wiąże się z krótszym całkowitym przeżyciem chorych.

1.1.3.7. Ewolucja klonalna

Większość nowotworów układu krwiotwórczego ma charakter heterogenny, co oznacza, że w populacji komórek nowotworowych stwierdza się współwystępowanie kilku klonów odmiennych genetycznie i/lub epigenetycznie. Klony komórek nowotworowych podlegają nieustannej ewolucji podczas rozwoju choroby. Skutkiem ewolucji klonalnej są selekcja i ekspansja subpopulacji komórek najlepiej dostosowanych do warunków środowiskowych [10]. Czynnikiem przyspieszającym ewolucję klonalną jest chemioterapia, która przez wprowadzenie silnej presji selekcyjnej pozwala na ekspansję tylko tych komórek, które rozwinęły chemiooporność. Subklonalny charakter zaburzeń może uniemożliwić wykrycie niekorzystnych mutacji w nielicznych klonach komórek nowotworowych. Mutacje w genie *TP53* stwierdzane są u 8% chorych z *de novo* AML i aż u 30% chorych z wtórną postacią tej choroby. Do niedawna uważano, że wzrost częstości mutacji *TP53* u chorych z wtórną AML jest wynikiem uszkodzeń DNA nabytych podczas

chemioterapii. Wykorzystując techniki NGS wykazano, że zwiększona częstość mutacji *TP53* we wtórnej AML wynika z selekcji i ekspansji rzadkich (0,003–0,7% populacji komórek białaczkowych) chemoopornych klonów komórek progenitorowych pozytywnych pod względem mutacji *TP53*, które nie zostały wykryte podczas diagnozy choroby [11]. Standardowa technika sekwencjonowania Sangera wykorzystywana w diagnostyce ma zbyt niską czułość, by wykryć mutacje w nielicznych klonach. Dlatego też technika NGS jest coraz częściej stosowana jako narzędzie diagnostyczne. Ponadto analiza genomów i eksonów pojedynczych komórek (*single cell sequencing*) umożliwia odtworzenie kolejności nabywania poszczególnych mutacji wraz z rozwojem choroby. Badania te pozwoliły ustalić, że mutacje w genach regulatorów epigenetycznych związanych z metylacją DNA i modyfikacją histonów (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*) pojawiają się na długo przed wystąpieniem pierwszych klinicznych objawów AML, są często obecne w dominującym klonie komórek nowotworowych i utrzymują się po chemioterapii [12]. Z kolei mutacje w genach związanych z przekazywaniem sygnałowym i proliferacją (np. *FLT3*, *KRAS*) pojawiają się na późniejszych etapach i odpowiadają za pełny rozwój choroby. Występowanie mutacji w genach regulatorów epigenetycznych u osób zdrowych nie musi się jednak wiązać z późniejszym rozwojem nowotworu. Częstość mutacji *TET2* i *DNMT3A* zwiększa się wraz z wiekiem u osób zdrowych, zwłaszcza po 60. roku życia, a ich nabycie jest prawdopodobnie wynikiem prób uzyskania przez komórki układu krwiotwórczego większej plastyczności w sytuacji starzenia się organizmu. Obecność klonów komórek progenitorowych z mutacjami somatycznymi, którym nie towarzyszą inne objawy hematologiczne wskazujące na rozwój nowotworu, określa się mianem klonalnej hematopoezy o nieokreślonym potencjale (CHIP, *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*). Jeśli jednak skutek nabycia dodatkowych aberracji genetycznych dojdzie do rozwoju nowotworu, mutacje regulatorów epigenetycznych są zwykle niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, ponieważ oferują komórce nowotworowej większą plastyczność wobec presji środowiska. Mutacje, które są wykrywane u osób zdrowych i predysponują do rozwoju AML w ciągu 10 kolejnych lat, obejmują geny *TP53*, *RUNX1* oraz geny zaangażowane w obróbkę (*splicing*) matrycowego RNA.

1.1.4. Predyspozycje genetyczne do rozwoju nowotworów układu krwiotwórczego

Niektóre zaburzenia wrodzone wywołane mutacjami dziedzicznymi/germinalnymi predysponują do rozwoju nowotworów układu krwiotwórczego [13]. Zwykle mutacje te dotyczą genów związanych z naprawą i integralnością DNA, różnicowaniem, supresorów nowotworowych oraz negatywnych regulatorów cyklu komórkowego (tab. 1.1.3).

Mutacje genów *FANC* (*Fanconi anaemia complementation group*) kodujących białka zaangażowane w naprawę DNA wywołują niedokrwistość Fanconiego, która jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. U 50% osób z tą chorobą w wieku około 40 lat dochodzi do rozwoju białaczek, głównie AML. Szczególnie predysponujący charakter mają bialleliczne mutacje w genie *FANCD1/BRCA2*, które u 80% pacjentów prowadzą do rozwoju AML przed 10. rokiem życia. Dzieci z trisomią chromosomu 21. (T21, zespół Downa) cechuje 150-krotnie wyższe ryzyko rozwoju AML (zwłaszcza o fenotypie

Tabela 1.1.3. Mutacje germinalne predysponujące do nowotworów układu krwiotwórczego

Predyspozycja genetyczna	Sposób dziedziczenia	Geny	Zaburzony szlak/funkcja	Choroba
Anemia Fanconiego	AR, XLR	<i>FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1</i> , inne	Naprawa DNA	MDS, AML
<i>Dyskeratosis congenita</i>	AD, AR, XLR	<i>DKC1, TERC, TINF2, TERT</i> , inne	Stabilność telomerów	MDS, AML
Zespół Downa	Sporadyczny	Nieznane	Wiele zaburzeń	AMKL
RASopatie	AD	<i>K-RAS, N-RAS, NF1, SOS1, PTPN11</i> , inne	Szlak RAS, wiele zaburzeń	NS-MPD, JMML
Niedobór <i>GATA2</i>	AD	<i>GATA2</i>	Czynnik transkrypcyjny	MDS, AML, CMML
Trombocytopenia 2	AD	<i>ANKRD26</i>	Szlak MAPK	MDS, AML, CML
Trombocytopenia 5	AD	<i>ETV6</i>	Czynnik transkrypcyjny	MDS
Zespół Li-Fraumeni	AD	<i>TP53</i>	Naprawa DNA	AML, sAML
Zespół Turcota	AR	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>	Naprawa DNA	MDS, AML
Mutacje <i>CEBPA</i>	AD	<i>CEBPA</i>	Czynnik transkrypcyjny	AML
Mutacje <i>DDX41</i>	AD	<i>DDX41</i>	Splicing RNA i/lub stabilność telomerów?	MDS, AML, CML
Duplikacje <i>ATG2B/ /GSKIP</i>	AD	<i>ATG2B/GSKIP</i>	Nieznane	MPN, AML
Mutacje <i>ACD</i>	AD	<i>ACD</i>	Stabilność telomerów?	Zwłóknienie szpiku
Mutacje <i>SRP72</i>	AD	<i>SRP72</i>	Nieznane	MDS
Mutacje <i>RBBP6</i>	AD	<i>RBBP6</i>	Naprawa DNA?	MPN

AD — autosomalny dominujący; AML (*acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa; AMKL (*acute megakaryoblastic leukemia*) — ostra białaczka megakarioblastyczna; AR — autosomalny recesywny; CMML (*chronic myelomonocytic leukemia*) — przewlekła białaczka mielomonocytowa; CML (*chronic myelogenous leukemia*) — przewlekła białaczka szpikowa; JMML (*juvenile myelomonocytic leukemia*) — postać młodzieńcza białaczki mielomonocytowej; MDS (*myelodysplastic syndromes*) — zespoły mielodysplastyczne; MPN (*myeloproliferative neoplasms*) — nowotwory mieloproliferacyjne; NS-MPD (*Noonan syndrome/myeloproliferative disease*) — choroba mieloproliferacyjna związana z zespołem Noonan; sAML (*secondary AML*) — wtórna AML; XLR — recesywny sprzężony z chromosomem X

megakarioblastycznym) w porównaniu z ich zdrowymi rówieśnikami. Do rozwoju białaczek predysponują również choroby wrodzone związane z mutacjami w genach *RAS*, tak zwane RASopatie. Przykładem jest zespół Noonan, który u 10% chorych predysponuje do rozwoju chorób mieloproliferacyjnych w wieku dziecięcym, które zwykle mają charakter przejściowy, jednak czasami mogą ulec progresji do młodzieńczej postaci białaczki mielomonocytovej. W ostatnich latach wykryto nowe mutacje germinalne predysponujące do rozwoju białaczek [14]. Dotyczą one genów *ANKRD26* (*ankyrin repeat domain-containing protein 26*), *GATA2* (*GATA-binding factor 2*), *ETV6* (*ETS translocation variant 6*) i *DDX41* (*DEAD-box helicase 41*). Wykrycie mutacji germinalnych predysponujących do nowotworzenia jest utrudnione w przypadku braku wyraźnych objawów klinicznych. Tymczasem około 1% zdrowej populacji jest nosicielami takich mutacji. Najczęstsze mutacje germinalne predysponujące do rozwoju nowotworów układu krwiotwórczego przedstawiono w tabeli 1.1.3.

1.1.5. Rola mikrośrodowiska

Istnieje sieć interakcji między komórkami krwiotwórczymi a otaczającym je mikrośrodowiskiem szpiku kostnego. Elementy niszy szpiku regulują samoodnowę, proliferację i różnicowanie HSC, dlatego odgrywają istotną rolę w nowotworzeniu i decydują o skuteczności leczenia [15]. U chorych z AML po allogenicznej transplantacji mikrośrodowisko może przekształcać prawidłowe HSC od dawcy w komórki nowotworowe, powodując nawrót choroby. Również komórki białaczkowe mogą przekształcać otaczające mikrośrodowisko tak, aby faworyzowało ekspansję subpopulacji nowotworowej oraz chroniło ją przed chemioterapeutykami, na przykład przez wydzielanie czynników proangiogennych oraz cytokin prozapalnych (czynnik martwicy nowotworu alfa [*TNF α* , *tumor necrosis factor alpha*], interleukiny: IL-6, IL-1 β) stymulujących proliferację komórek endotelialnych. W zamian komórki endotelialne produkują czynnik stymulujący tworzenie granulocytów (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*), który promuje ekspansję komórek białaczkowych. U 30–70% przypadków chorych na MDS i AML w komórkach mezenchymalnych zrębu szpiku stwierdza się anomalie chromosomowe, co jest czynnikiem złego rokowania i świadczy o dynamicznym udziale mikrośrodowiska w przebiegu choroby. Mikrośrodowisko wspomaga komórki białaczkowe w nabywaniu chemiooporności. Komórki białaczkowe ekspozowane na działanie cytarabiny (chemioterapeutyk uszkodzający mitochondria) mają zdolność do pobierania funkcjonalnych mitochondriów od komórek podścieliska szpiku, tworząc z nimi bezpośrednie połączenia międzykomórkowe. Związki blokujące interakcje komórek białaczkowych z mikrośrodowiskiem są intensywnie testowane w badaniach przedklinicznych i klinicznych (np. inhibitory receptora CXCR4 i cząsteczek adhezyjnych VLA-4 i E-selektyny).

1.1.6. Białaczkowe komórki macierzyste

Nowotwory układu krwiotwórczego charakteryzuje hierarchia komórkowa, w której źródłem populacji ze zmianami nowotworowymi jest niewielka frakcja komórek mających zdolność do samoodnowy i określanych jako białaczkowe komórki macierzyste (LSC, *leu-*

kemic stem cells). Białaczkowe komórki macierzyste są zdolne do wywołania białaczki po seryjnych przeszczepach u immunoniekompetyentnych myszy oraz do częściowego różnicowania do blastów, które fenotypowo i morfologicznie odpowiadają blastom dawcy LSC. W celu uzyskania długotrwałej remisji stosowane terapie powinny doprowadzić do całkowitej eliminacji LSC, jest to jednak problematyczne, ponieważ komórki te łatwo wchodzi w stan uśpiania, w którym są mniej wrażliwe na chemioterapeutyki. Białaczkowe komórki macierzyste stanowią poważne ograniczenia w skuteczności leczenia klasycznych przypadków CML wywołanych translokacją *BCR-ABL1*, która prowadzi do konstytutywnej aktywności kinazy tyrozynowej ABL1 [16]. Zastosowanie inhibitorów kinaz tyrozynowych (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*), takich jak imatynib, znacznie poprawiło rokowania chorych, jednak tylko u 10% pacjentów w fazie chronicznej remisja utrzymuje się po odstawieniu TKI. Za częste nawroty choroby odpowiadają LSC, które mimo obecności translokacji *BCR-ABL1* są odporne na długotrwałe działanie TKI. Badania nad skutecznymi strategiami terapeutycznymi anty-LSC opierają się na analizach porównawczych LSC z prawidłowymi HSC. Na przykład białaczkowe komórki macierzyste w MDS cechuje nadekspresja białka IL1RAP (*interleukin-1 receptor accessory protein*) oraz markerów powierzchniowych CD99 i CD123. Związki celujące w wymienione cząsteczki są testowane w badaniach przedklinicznych i klinicznych [17].

1.1.7. Wnioski

Nowoczesne narzędzia biologii molekularnej pozwalają na odtworzenie kolejności nabywania zaburzeń oraz umożliwiają czulszą detekcję mutacji w nielicznych klonach białaczkowych. Postęp ten umożliwia rozwój medycyny spersonalizowanej, która będzie dostosowana do molekularnego obrazu choroby poszczególnych pacjentów. Analizy NGS znacząco wpłynęły również na rozwój terapii celowanych, które w przeciwieństwie do chemioterapeutyków wykazują o wiele silniejszą specyficzność względem komórek z konkretną mutacją i są mniej toksyczne dla komórek prawidłowych. W 2017 roku FDA zatwierdziła pierwsze leki celowane w leczeniu AML: midostaurynę (inhibitor FLT3) i enasidenib (inhibitor zmutowanej formy IDH2).

Piśmiennictwo

1. Nakajima H. Role of transcription factors in differentiation and reprogramming of hematopoietic cells. *Keio J. Med.* 2011; 60: 47–55.
2. Yang J.J., Park T.S., Wan T.S. Recurrent cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1541: 223–245.
3. Zahid M.F., Malik U.A., Sohail M. i wsp. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes: an overview. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* 2017; 11: 231–239.
4. Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J. Clin. Oncol.* 2017; 35: 934–946.
5. Vainchenker W., Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017; 129: 667–679.
6. Kavianpour M., Ahmadzadeh A., Shahrazi S., Saki N. Significance of oncogenes and tumor suppressor genes in AML prognosis. *Tumour Biol.* 2016; 37: 10041–10052.
7. Wouters B.J., Delwel R. Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* 2016; 127: 42–52.

8. Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L. i wsp. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374: 2209–2221.
9. Ciccone M., Calin G.A. MicroRNAs in myeloid hematological malignancies. *Curr. Genomics* 2015; 16: 336–348.
10. Sykes S.M., Kokkaliaris K.D., Milsom M.D., Levine R.L., Majeti R. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells in acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* 2015; 43: 989–992.
11. Prokocimer M., Molchadsky A., Rotter V. Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy. *Blood* 2017; 130: 699–712.
12. Shallis R.M., Ahmad R., Zeidan A.M. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur. J. Haematol.* 2018; 101: 260–271.
13. McGee R.B., Nichols K.E. Introduction to cancer genetic susceptibility syndromes. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2016; 2016: 293–301.
14. Porter C.C. Germ line mutations associated with leukemias. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2016; 2016: 302–308.
15. Korn C., Méndez-Ferrer S. Myeloid malignancies and the microenvironment. *Blood* 2017; 129: 811–822.
16. Holvoake T.L., Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood* 2017; 129: 1595–1606.
17. Shastri A., Will B., Steidl U., Verna A. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2017; 129: 1586–1594.