

МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

MYELOID TUMORS

Модели миелофиброза (обзор литературы и собственные данные)

*А.А. Силютин, И.И. Гин, Н.М. Матюхина,
Е.Н. Балаян, П.А. Бутылин*

ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

Myelofibrosis Models: Literature Review and Own Data

*AA Silyutina, II Gin, NM Matyukhina,
EN Balayan, PA Butylin*

VA Almazov Federal North-West Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

РЕФЕРАТ

Актуальность и цели. Развитие хронических миелопролиферативных заболеваний проходит длительный латентный период, затрудняя исследования механизмов патогенеза. Наблюдения, отмеченные в клинической практике, зачастую требуют экспериментальной проверки. Механизмы онкологической трансформации, связанные с возникновением мутаций, встречающихся при хронических миелопролиферативных заболеваниях, были подтверждены на моделях трансгенных животных. Биологические модели позволили выявить комплексную природу развития миелофиброза. Однако изучение отдельных клеточных механизмов требует создания новых моделей. В работе представлен как обзор опубликованных моделей развития миелопролиферативных заболеваний, в основном первичного миелофиброза, так и результаты исследования разработанной клеточной линии с экспрессией JAK2 V617F. Цель настоящей работы — создание клеточной линии с экспрессией трансформирующей мутации JAK2 V617F в клетках острого моноцитарного лейкоза THP-1.

Методы. Основой для создания трансгенной клеточной линии послужила линия клеток моноцитарного лейкоза THP-1, способная дифференцироваться в макрофаги. Мутация V617F была получена методом направленного мутагенеза. Было создано две трансгенные линии: одна с экспрессией гена JAK2 с мутацией V617F, другая — JAK2 дикого типа.

Результаты. Обе трансгенные линии характеризовались повышенной экспрессией JAK2 по сравнению с немодифицированными клетками. При рутинном культивировании трансгенные THP-1 сохраняли морфологию моноцитов. После обработки флороболовым эфиром THP-1 дифференцировались в макрофаги и прикреплялись к культуральному пластику. Адгезировавшие клетки принимали различную форму: часть отличалась сферической формой, у других отмечены псевдоподии. Значимых различий по доле жизнеспособных клеток не наблюдалось. Однако макрофаги с экспрессией мутантного гена JAK2 и JAK2 дикого типа имели тенденцию к уменьшению количества нежизнеспособных клеток при культивировании.

Заключение. Полученная клеточная модель может служить объектом для оценки влияния мутации JAK2 V617F на про- и антифибротический потенциал макрофагов, что может пролить свет на патогенетическую роль макрофагов в развитии миелофиброза. Кроме того, с помощью данной модели можно исследовать новые методы терапии и диагностики как первичного, так и вторичного миелофиброза.

ABSTRACT

Background & Aims. Chronic myeloproliferative disorders typically develop during a long latent period, and it complicates the study of the mechanism of its pathogenesis. Observations from the clinical practice should be confirmed by experiments. The mechanisms of oncological transformation related to mutations associated with chronic myeloproliferative diseases were confirmed in transgene animal models. Biological models permitted to determine a complex nature of myelofibrosis. However, studies of the cellular mechanisms of myelofibrosis require new models. This paper presents a review of published models of myeloproliferative disorders, mainly, primary myelofibrosis, and results of studies of a new cell line with expression of JAK2 V617F. The aim of this study is to create a new cell line with expression of transforming JAK2 V617F mutation in acute monocytic leukemia THP-1 cells.

Methods. Transgenic cell lines were created on the basis of monocytic leukemia THP-1 cell line that can differentiate into macrophages. Direct mutagenesis was used to cause V617F mutation. Two cell lines were created: one with JAK2 expression with V617F mutation, the other with wild type JAK2.

Results. Both transgenic lines were characterized by increased JAK2 expression as compared to non-modified cells. In routine cultivation, transgenic THP-1 cells retained the morphology of monocytes. After treatment with phorbol ester, THP-1 differentiated into macrophages and become adherent to culture plastic. Adherent cells demonstrated the variety of shapes: some of them were spherical, the other ones had pseudopodia. No significant differences in viability of cells were observed. However, macrophages expressing mutant JAK2 and overexpressing the wild type JAK2 demonstrated a tendency to decreased amount unlivable cells during cultivation.

Conclusion. The obtained cell model can be used for estimating the influence of JAK2 V617F mutation on pro- and antifibrotic potential of macrophages that can help to investigate the pathogenetic role of macrophages in myelofibrosis development. In addition, this model can help to develop novel methods of therapy and diagnostics of primary and secondary myelofibrosis.

Ключевые слова: Ph-негативные хронические миелопролиферативные заболевания, первичный миелофиброз, JAK2 V617F, трансгенные животные.

Keywords: Ph-negative chronic myeloproliferative disorders, primary myelofibrosis, JAK2 V617F, transgenic animals.

Получено: 15 сентября 2016 г.

Принято в печать: 13 декабря 2016 г.

Received: September 15, 2016

Accepted: December 13, 2016

Для переписки: Павел Андреевич Бутылин, канд. биол. наук, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; e-mail: butylinp@gmail.com

For correspondence: Pavel Andreevich Butylin, PhD, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; e-mail: butylinp@gmail.com

Для цитирования: Силютина А.А., Гин И.И., Матюхина Н.М. и др. Модели миелофиброза (обзор литературы и собственные данные). Клиническая онкогематология. 2017;10(1):75–84.

For citation: Silyutina AA, Gin II, Matyukhina NM, et al. Myelofibrosis Models: Literature Review and Own Data. Clinical oncohematology. 2017;10(1):75–84 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-1-75-84

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-1-75-84

ВВЕДЕНИЕ

Первичный миелофиброз (ПМФ), или миелофиброз с миелоидной метаплазией, — злокачественная гематологическая опухоль, которая относится к Ph-негативным хроническим миелопролиферативным заболеваниям (ХМПЗ) [1]. Заболевание характеризуется дисфункцией миелоидного ростка гемопоэза с развитием цитопении и возникновением экстрамедуллярных очагов кроветворения, в первую очередь в селезенке [2, 3]. Основные симптомы: утомляемость, ночные поты, боль в костях, повышение температуры тела, потеря массы тела и боль в области селезенки [3]. К осложнениям ПМФ относят кровотечения, портальную гипертензию, снижение иммунитета с подверженностью инфекциям и трансформацию в острый лейкоз [4, 5]. Пациенты с ПМФ имеют самый низкий уровень качества жизни и наиболее высокую смертность среди больных с Ph-негативными ХМПЗ. Средняя продолжительность жизни этих больных составляет 5–7 лет [2, 4, 6].

При развитии ПМФ фиброз костного мозга нарастает постепенно. Это сопровождается угнетением нормального кроветворения в костном мозге и нарастанием доли экстрамедуллярного кроветворения, в первую очередь, в селезенке, а также в печени, костях черепа и позвоночнике. В гемопоэтических тканях человека фиброз встречается не так часто и обычно связан с патологическими изменениями миелоидного ростка кроветворения [7]. Изменения в костном мозге при ПМФ имеют цитокин-опосредованный характер. Они возникают в результате клонального (злокачественного) перерождения мультипотентной гемопоэтической стволовой клетки [8, 9], что сопровождается усилением продукции белков внеклеточного матрикса [10]. Исследования *in vitro* и *in vivo* указывают на вовлечение в эти процессы целого ряда цитокинов. Особый акцент делается на роль плейотропного цитокина TGF- β 1 (трансформирующего фактора роста). Данный фактор способен активировать фибробласты, что в итоге приводит к продукции белков межклеточного матрикса, увеличению экспрессии протеаз и ингибированию продукции белков, участвующих в реорганизации межклеточного матрикса. TGF- β секретируется большим количеством различных

типов клеток, причем наиболее активно моноцитами/макрофагами и мегакариоцитами/тромбоцитами.

Частота ПМФ составляет 3,6–5,7 случая на 100 000 населения [11]. Развитие заболевания может продолжаться годами, а диагностика этой опухоли на ранних стадиях клинически затруднена. В силу указанных обстоятельств изучение патогенетических факторов ПМФ с использованием клинического материала становится малоэффективным. Наибольший вклад в понимание биологии ПМФ вносят модели, на которых можно изучать механизмы становления и развития заболевания, а также тестировать новые препараты. В настоящем обзоре нами представлены основные существующие модели ПМФ, при которых объектом исследования были модельные животные или клеточные культуры.

МОДЕЛИ TPO^{high}

Тромбопоэтин (TPO), также известный как MPL-лиганд или фактор роста и развития мегакариоцитов (MGDF), — это главный физиологический гуморальный регулятор мегакариопоэза и продукции тромбоцитов [12, 13]. Модели TPO^{high} были открыты в результате изучения побочных эффектов длительного применения TPO как препарата, повышающего уровень тромбоцитов в крови [14]. Описаны модели, созданные как путем повторного введения пегилированного TPO [15], так и с использованием ретро- [16, 17] и аденовирусных [18–21] векторов либо путем трансгенеза [22, 23].

Введение пегилированного TPO

Наиболее просто реализуемая модель TPO^{high} образуется при введении экспериментальным животным экзогенного TPO. Иммунокомпетентным BALB/с мышам в течение 14 дней вводился в возрастающих дозах (от 10 до 500 мкг/кг) пегилированный TPO [15]. У всех животных развились дозозависимые тромбоцитоз, лейкоцитоз, анемия, спленомегалия; кроме того, возникали очаги экстрамедуллярного кроветворения в селезенке и других органах. Фиброз костного мозга развивался при введении максимальных доз TPO. Подобный эффект при введении данного препарата наблюдался и у крыс [24].

Использование аденовирусной доставки

Еще одним подходом к созданию модели ПМФ у мышей послужило использование аденовирусных векторов для экспрессии кДНК ТРО человека. При этом использовался промотор цитомегаловируса (CMV) или вируса саркомы Рауса (RSV). Кроме того, применялись различные методы введения: подкожный [17], интратрахеальный [19], интраперитонеальный [21] или внутривенный [20]. При проведении экспериментов на иммунокомпетентных мышах линии BALB/c развитие ПМФ не наблюдалось, что было связано с выработкой антител против ТРО человека [25]. В случае использования иммунодефицитных по Т- и В-клеточному звену мышей NOD/SCID наблюдали лейко- и тромбоцитоз, а также выраженную мегакариоцитарную гиперплазию в селезенке и костном мозге. При этом фибротических изменений у мышей линии NOD/SCID не возникало [25]. У мышей SCID развивался прогрессирующий ПМФ не позднее 6 нед. после введения вируса. В связи с тем, что мыши NOD/SCID отличаются от мышей SCID нарушением фагоцитарной функции мононуклеаров [26, 27], авторы утверждают, что моноциты/макрофаги являются обязательным звеном в развитии ПМФ у мышей с гиперэкспрессией ТРО. Следует отметить, что в исследованиях O. Wagner-Ballon и соавт. это наблюдение не подтверждено [28].

Использование ретровирусной доставки

При использовании данного подхода кДНК ТРО человека встраивается в вектор, входящий в состав ретровируса, в результате заражения которым происходит встраивание последовательности вируса в геном клетки. Вирусные частицы использовались для инфицирования гемопоэтических стволовых клеток, которые трансплантировали летально облученным мышам [16, 17]. В результате были получены животные с состоянием, сходным по течению с ПМФ, и 100%-й смертностью через 10 мес. после трансплантации костного мозга (ТКМ) [16]. Заболевание протекало в две стадии. На первой стадии, в течение 2 мес. после ТКМ, наблюдали 4-кратное повышение числа тромбоцитов и присутствие гигантских тромбоцитов в крови, 10-кратное повышение числа лейкоцитов и увеличение гематокрита. В костном мозге и селезенке отмечалась мегакариоцитарная и гранулоцитарная гиперплазия в сочетании с эритробластической гипоплазией в костном мозге. На второй стадии, через 3 мес. после ТКМ, число клеток-предшественниц снизилось в костном мозге и селезенке, но увеличилось в периферической крови и перитонеальной жидкости, а впоследствии привело к развитию панцитопении. Экстрамедуллярные очаги кроветворения наблюдали в печени, почках, лимфатических узлах и легких. У нескольких мышей имела место бластная трансформация. Гистологическое исследование позволило выявить признаки фиброза в костном мозге и селезенке, а также признаки остеосклероза в костном мозге.

В другой работе при применении аналогичного подхода наблюдали симптомы меньшей интенсивности [17]. Число тромбоцитов повысилось в 5 раз и сохранялось на таком уровне 73 нед. Отмечались анемия средней степени тяжести и небольшое увели-

чение количества лейкоцитов и предшественников миелоидного ряда в крови. У мышей наблюдали образование экстрамедуллярных очагов кроветворения, спленомегалию и гиперплазию мегакариоцитарного и гранулоцитарного ростков. В костном мозге выявлены плотная сеть ретикулиновых волокон и образование новых костных трабекул. Вторая стадия, как в описанном предыдущем исследовании, не развивалась. Мыши оставались живыми и активными в течение года. Исход в острый лейкоз не наблюдался. Эти фенотипические отличия могут объясняться различным уровнем ТРО в плазме: 1000 нг/мл в первом исследовании [16] и 30 нг/мл — во втором [17].

МОДЕЛИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ТРАНСГЕННЫМ ПУТЕМ

Существует две трансгенных модели мышей ТРО^{high} с разным фенотипом. В одной из них [22] гиперэкспрессия человеческого ТРО осуществляется энхансером/промотором специфичного печеночного апо-липпротеина Е. В этой модели не отмечено признаков ПМФ, несмотря на повышенный уровень ТРО в плазме (3 нг/мл), 4-кратное повышение числа тромбоцитов и тканевых мегакариоцитов в течение 16 мес. Во второй модели [23], в которой полноценный мышинный ТРО был экспрессирован под контролем энхансера/промотора N-цепей мыши, выявлены 2-кратный лейкоцитоз, анемия со снижением гематокрита на 10 %, 3-кратный тромбоцитоз и повышение уровня ТРО в плазме до 3 нг/мл. Фиброз костного мозга развивался на 9-м месяце и прогрессировал до 12 мес. жизни мышей. Эта модель отличается от первой локальной продукцией ТРО в костном мозге, вероятнее всего послужившей причиной развития ПМФ [23].

Все эти модели показывают, что гиперэкспрессия ТРО у мышей вызывает миелопролиферативное заболевание, имеющее сходные с ПМФ признаки: лейкоцитоз, анемию, тромбоцитоз, в некоторых случаях — панцитопению, спленомегалию, экстрамедуллярный гемопоэз, миелофиброз и остеосклероз. Возникновение и степень проявления этих симптомов могут быть связаны с уровнем ТРО в плазме, продолжительностью его повышения и локальным уровнем в аспирате костного мозга [29]. Создание данных моделей позволило доказать центральную роль ТРО в развитии симптомов Ph-негативного ХМПЗ.

МОДЕЛЬ GATA-1LOW

GATA-1 — это транскрипционный фактор, кодирующийся геном в X-хромосоме и играющий жизненно важную роль в регуляции экспрессии генов, которые участвуют в дифференцировке и развитии эритроидных [30], мегакариоцитарных [31], эозинофильных [32] и тучных [33] клеток. Это было выяснено с помощью мышей с экспериментально индуцированными нарушениями экспрессии данного фактора. M.A. McDevitt и соавт. создали линию мышей с делецией участка длиной 8 kb в гене GATA-1 [34]. Эмбриональные стволовые клетки с данной

делецией вводили в бластоцисты мышей линии C57BL/6 [35]. У этих мышей наблюдали анемию и нарушения созревания клеток эритроидного ряда, связанные с повышением интенсивности апоптоза в 4–5 раз. Кроме того, отмечалась тромбоцитопения, т. к. при практически полной блокаде экспрессии GATA-1 происходило нарушение созревания мегакариоцитов и образование небольшого количества аномальных крупных тромбоцитов [35, 36]. Созревание мегакариоцитов блокировалось между I и II стадией, что приводило к нарушению организации α -гранул в результате снижения экспрессии некоторых специфических белков. Это фактор Виллебранда и атипичная локализация белков, например Р-селектина, который, несмотря на нормальный уровень экспрессии, обнаруживался на границах мембранных систем, а не в α -гранулах [37].

Смертность у мышей данной линии достигала более 90 % сразу после рождения. Однако после возвратного скрещивания с мышами C57BL/6 с образованием гетерозиготы подавляющее большинство мышей достигало взрослого возраста. У мышей развивалась анемия на 1-м месяце жизни, которая переставала определяться в более старшем возрасте. Тромбоцитопения, при которой количество тромбоцитов составляло менее 10 % нормы, наблюдалась у этих животных в течение всей жизни. Снижение числа тромбоцитов было вызвано дисфункцией их образования, тогда как число мегакариоцитов в костном мозге и селезенке было значительно повышено. Размеры клеток при этом варьировали: наряду с большими практически зрелыми мегакариоцитами встречались малые формы, образующие скопления, особенно в селезенке [38].

В течение 1-го года жизни у мышей развивалась тромбоцитопения и происходило увеличение селезенки в связи с экспансией клеток мегакариоцитарного ряда, отмечалась анемия в течение 1-го месяца жизни, которая в более старшем возрасте не наблюдалась. При этом увеличение интенсивности апоптоза эритроидных предшественников продолжалось и далее. В течение этого времени проявлялись первые признаки ПМФ с миелоидной метаплазией: снижение числа ядерных клеток (до $1/5$ от нормального числа) в костном мозге, появление ретикулинового фиброза с коллагеновыми волокнами и остеосклерозом. Селезенка увеличивалась в размере в 5–10 раз по сравнению с мышами дикого типа, очаги экстрамедуллярного гемопоэза определялись в печени и, реже, в других органах. В крови наблюдали лейкоцитоз средней степени с некоторым количеством незрелых клеток, но без бластных элементов, дакриоциты и эритробласты. В возрасте 15–18 мес. полностью обозначался фенотип ПМФ. Бластная трансформация, т. е. исход в острый лейкоз, у таких мышей не наблюдалась, показатели выживаемости были удовлетворительными. Продолжительность жизни животных составляла 20–24 мес. [38, 39].

Эти данные свидетельствуют о патогенетической роли мегакариоцитарной дисплазии в развитии признаков миелоидной дисфункции. Однако при этом невозможно сделать вывод о непосредственном влиянии мегакариоцитоза на развитие ПМФ.

МОДЕЛИ С МУТАЦИЕЙ JAK2 V617F

Общей в патогенезе всех ХМПЗ является активация тирозинкиназ [40]. Первой открытой мутацией для ХМПЗ была транслокация $t(9;22)(q34;q11)$ с образованием слитного гена BCR-ABL, которая приводит к активации пролиферации, ингибирует апоптоз и способствует увеличению уровня клональной эволюции, что может закончиться бластной трансформацией [40]. Генетические изменения, характерные для истинной полицитемии (ИП), эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) и ПМФ, оставались неизвестными до 2005 г., когда были опубликованы данные о точечной мутации в гене Янус-киназы (JAK2), вызывающей замену валина на фенилаланин в положении 617 полипептидной цепи [41–43]. Мутация была найдена в половине случаев заболеваний ЭТ и ПМФ и практически во всех случаях ИП [44]. JAK2 V617F является соматической мутацией, характерной исключительно для гемопоэтической ткани [45].

Валин в положении 617 находится в псевдокаталитическом домене, который имеет структуру, гомологичную каталитическому, но не обладает при этом киназной активностью [46]. Это делает механизм активации JAK2 в результате мутации V617F не совсем ясным. Однако существуют данные об активации JAK2 в результате делеции в псевдокаталитическом домене [47]. Основываясь на подобных наблюдениях, можно предположить, что этот домен осуществляет отрицательную регуляцию киназной активности каталитического домена подобно аутоингибирующему действию юкстамембранного домена в тирозинкиназных рецепторах, например FLT3 [48]. Расчетная модель структуры рецептора JAK2 показала, что валин 617 тесно связан с активационной «шпилькой» (участок РНК, формирующий ее вторичную структуру, напоминающую шпильку) в каталитическом домене [49].

Янус-киназы, связанные с цитокиновыми рецепторами и рецепторами тирозинкиназ, играют ведущую роль в восприятии и передаче сигнала от цитокинов в клетках млекопитающих. Существуют данные, что на клетки-предшественницы миелоидного ряда, дефицитные по JAK2, не действуют эритропоэтин, тромбопоэтин и гранулоцитарно-макрофагальные колониестимулирующие факторы, что в результате приводит к нарушению эритропоэза [50]. Эти наблюдения указывают на то, что JAK2 служит ключевым ферментом регуляции развития и дифференцировки клеток миелоидного ряда. Это подтверждается и тем, что мутации JAK2 обнаруживают при целом ряде миелопролиферативных заболеваний [51–53], а клетки, положительные по JAK2 V617F, проявляют гиперчувствительность к цитокиновой стимуляции [43, 54].

Результаты генетического анализа указывают на то, что мутация JAK2 V617F имеет дозозависимое влияние на фенотип ХМПЗ [41–43, 54]. Так, у ряда пациентов с ИП, даже с низкой аллельной нагрузкой, существует эритроидный клон, гомозиготный по JAK2 V617F. Однако подобная картина крайне редко наблюдается у пациентов с ЭТ [55]. Эти данные подтверждаются и на мышинных моделях. Первые исследования *in vivo* показали, что гиперэкспрессия JAK2 V617F в

гемопоэтическом компартменте вызывает полностью пенетрантный фенотип (признак, в формировании которого участвовало несколько генов) ХМПЗ с полицитемией и лейкоцитозом без сопутствующего тромбоцитоза [56, 57]. В данных работах была описана прямая зависимость между аллельной нагрузкой JAK2 V617F и степенью лейкоцитоза и миелофиброза. Позднее две группы исследователей создали трансгенные модели для изучения JAK2 V617F-позитивных ХМПЗ [58, 59]. Более низкий уровень экспрессии в этих моделях был связан с ЭТ-подобным фенотипом, но не с ИП. При высокой аллельной нагрузке наблюдался фенотип ИП, впоследствии переходящий в ПМФ [57, 58]. Исследования на моделях «knock-in» (определенный ген не удаляется из организма, а заменяется другим) показывают, что у мышей с конститутивной активацией JAK2 V617F в гемопоэтических предшественниках развивается фенотип, сходный с ЭТ [60]. При этом при индукции экспрессии JAK2 V617F более сильным промотором развивались симптомы, характерные для ИП [60].

Впервые модель JAK2 V617F была создана при попытке оценить вклад данной мутации в патогенез ХМПЗ вскоре после ее открытия [41–43, 54]. Для анализа влияния мутации на регуляцию гемопоза *in vivo* была создана модель путем трансплантации мышам-реципиентам костномозговых клеток, трансдуцированных ретровирусом, несущим мутацию JAK2 V617F [56, 57]. У этих мышей проявлялись симптомы заболевания, похожие на ИП. В дальнейшем у животных развивался вторичный миелофиброз. Развитие симптомов происходило в несколько стадий.

Через 2–4 мес. после трансплантации у мышей развивался лейкоцитоз с редко встречающимися незрелыми формами и гиперсегментацией, отмечались увеличение гематокрита (60–90 %), ретикулоцитоз, снижение уровня эритропоэтина [56]. Размеры тромбоцитов увеличивались. При этом число их могло варьировать от нормальных значений до повышенных. В костном мозге наблюдались признаки миелоидной гиперплазии со скоплениями мегакариоцитов. Отмечалось 2–3-кратное увеличение селезенки за счет гиперплазии красной пульпы и эритроидного/миелоидного ростков, скопления дисплазированных и подверженных апоптозу мегакариоцитов с явлением нейтрофильного эмпериполеза. Кроме того, описывается повышение плоидности мегакариоцитов, наличие очагов экстрамедуллярного гемопоза в печени с эритроидными, миелоидными и мегакариоцитарными клетками [56]. Эритроидные клетки-предшественницы имели костномозговое и селезеночное происхождение, а также конститутивную активацию эффекторов JAK2 (STAT5, ERK1/2). На этой стадии фиброз еще не наблюдался.

Через 4 мес. после трансплантации мыши разделились на группы в зависимости от проявления признаков заболевания [57]. У одних наблюдались аномальные эритроциты, гигантские тромбоциты, полицитемия с признаками фиброза в селезенке и костном мозге. У других мышей, напротив, развитие фиброза с коллагеновыми и ретикулиновыми волокнами в костном мозге и селезенке сочеталось с анемией, тромбоцитопенией и гранулоцитозом,

гиперклеточностью костного мозга и значительной спленомегалией. В бедренных костях наблюдался остеосклероз. Продолжительность жизни мышей превышала 6 мес.

В дальнейшем полученные экспериментальные данные позволили создать целый ряд моделей трансгенных мышей «knock-in», в т. ч. с индуцируемой тканеспецифической экспрессией мутантной формы JAK2 V617F. Детальный анализ моделей описан в обзоре J. Li и соавт. [61]. Любопытно, что лишь в моделях, в которых экспрессировался ген JAK2 человека с мутацией, были отмечены симптомы, характерные для развития ПМФ: спленомегалия, фиброз костного мозга. Однако эти симптомы не развивались при введении гена JAK2 V617F мыши, хотя и приводили к миелоидной метаплазии.

Экспериментальные модели позволили доказать трансформирующую природу мутации JAK2 V617F.

МОДЕЛЬ С МУТАЦИЕЙ MPLW515L

Поиск механизмов, ответственных за нарушение сигнального пути JAK-STAT при JAK-негативных ХМПЗ, привел к обнаружению мутации в гене TPO-рецептора MPL W515L [61]. В европейской и североамериканской популяции эта мутация встречается приблизительно у 5–10 % пациентов с JAK-негативным ПМФ [61, 62] и приводит к конститутивной активации JAK2. Гемопоэтические стволовые клетки, экспрессирующие мутантный MPL, имеют большую пролиферативную активность и цитокин-независимый рост по сравнению с клетками дикого типа [61]. Для того чтобы оценить вклад этой мутации в патогенез ПМФ, была создана модель трансплантации летально облученным мышам линии BALB/c костномозговых клеток с экспрессией MPL W515L или MPL дикого типа под промотором гена вируса стволовых клеток мышей (MSCV). Последний активен в гемопоэтических и эмбриональных стволовых клетках. Только мыши с мутацией развили полностью пенетрантное летальное миелолипролиферативное заболевание с гепато- и спленомегалией, лейкоцитозом, значительным тромбоцитозом, очагами экстрамедуллярного кроветворения и миелофиброзом [61]. По сравнению с MPL дикого типа костный мозг мутантных мышей содержал большее количество зрелых миелоидных клеток, атипичных мегакариоцитов с признаками дисплазии, а также можно было наблюдать явление эмпериполеза. Аналогичная картина наблюдалась в селезенке и печени.

Эта модель демонстрирует альтернативные пути активации JAK/STAT-сигнального пути у JAK2-негативных пациентов. При этом очевидна схожесть с моделями с мутацией JAK2 V617F.

МОДЕЛИ С МУТАЦИЕЙ В ЭКЗОНЕ 9 ГЕНА CALR

В 2013 г. две группы исследователей методом полногеномного секвенирования обнаружили, что около 30 % JAK2- и MPL-негативных пациентов с ЭТ и ПМФ

несут соматические мутации в гене, кодирующем кальретикулин (CALR) [63–65]. Кальретикулин является белком эндоплазматического ретикула, где он участвует в поддержании гомеостаза ионов кальция в клетке и в фолдинге белков (процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру), выполняя функции шаперона (класс белков, главная функция которых состоит в восстановлении правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также в образовании и диссоциации белковых комплексов) [66, 67]. Кроме того, CALR участвует в передаче клеточных сигналов, регуляции экспрессии генов, клеточной адгезии, индуцирует макрофагальный фагоцитоз [68, 69]. В настоящее время описано более 40 мутаций, расположенных в экзоне 9 гена CALR, все они являются инсерциями и/или делециями и приводят к сдвигу рамки считывания, образованию новой С-концевой последовательности белка и потере сигнальной последовательности KDEL [64, 65, 70]. Наиболее часто встречающиеся мутации — делеция 52 п.о. (тип I) и инсерция 5 п.о. (тип II), причем мутации I типа чаще наблюдаются при ПМФ [71].

Для создания модели ПМФ с мутантным CALR летально облученным мышам трансплантировали клетки костного мозга, трансдуцированные ретровирусным вектором, несущим мутацию CALR I или II типа [72]. В отличие от дикого типа CALR CALR del52 и, в меньшей степени, CALR ins5 индуцировали тромбоцитоз, вызванный мегакариоцитарной гиперплазией. Костный мозг, полученный от первичных реципиентов, затем трансплантировали вторичным реципиентам. Через 6 мес. у мышей с мутацией CALR I типа развивался ПМФ, связанный со спленомегалией и выраженным остеосклерозом. Мониторинг популяции клеток, трансдуцированных ретровирусом, выявил, что мутация I типа ведет к экспансии клеток на более ранних стадиях гемопоэза, чем мутация II типа, хотя в обоих вариантах мутаций увеличивалось количество мегакариоцитов и отмечался тромбоцитоз. Кроме того, было показано, что предшественники мегакариоцитов в случае экспрессии CALR были гиперчувствительными к действию TPO, что, возможно, также способствует пролиферации мегакариоцитарного ростка.

Модель на основе клеточной линии Ba/F3, экспрессирующей CALR и MPL, показала, что мутантные формы CALR в отличие от CALR с делецией экзона 9 могут специфически активировать MPL [69, 71]. Было продемонстрировано, что мутантный CALR индуцирует конститутивную лиганд-независимую активацию сигнальных путей JAK2/STAT/PI3-K и MAPK через MPL и ведет к пролиферации и автономному росту клеток Ba/F3 [70]. Следует отметить, что мутантный CALR способен также активировать STAT5 через рецептор гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора, но только MPL может поддерживать длительный цитокин-независимый рост клеток в присутствии обоих типов мутантного CALR. Кроме того, было показано, что активация MPL основана на связывании мутантного CALR с его внеклеточным доменом, причем для активации MPL

необходимы гликансвязывающий сайт CALR и сайты N-гликозилирования MPL.

Таким образом, мутации в гене CALR представляют собой перспективные диагностические маркеры Ph-негативных ХМПЗ. Данные об индукции мутантным CALR конститутивной активации MPL и JAK/STAT-пути подтверждают единство патогенеза Ph-негативных ХМПЗ даже при разных трансформирующих мутациях.

Использование моделей позволяет уточнять молекулярные аспекты патогенетических факторов, лежащих в основе ПМФ. Так, трансформирующая активность мутаций JAK2 V617F и MPL W515L при их экспрессии в гемопоэтических стволовых клетках доказывает определяющее значение этих мутаций для развития ПМФ. Недавняя публикация данных о MPL-зависимой активации при наличии мутаций в гене CALR объединяет различные пути активации ХМПЗ в одну систему, в которой ключевым эффектором является JAK/STAT-путь передачи сигнала. При этом вовлечение одного и того же эффектора вызывает различные по клиническим проявлениям заболевания. Нередко происходит прогрессия ЭТ и ИП во вторичный миелофиброз. Однако эта трансформация имеет место далеко не всегда, а если и происходит, то с различной интенсивностью. К тому же зачастую ПМФ развивается без предшествующих других ХМПЗ.

Экспрессия трансформирующих мутаций приводит к пролиферации клеток миелоидного ростка, при этом наиболее явные изменения наблюдаются в мегакариоцитах и тромбоцитах. При этом во время развития фиброза наблюдается обеднение костного мозга гемопоэтическими клетками, в т. ч. и мегакариоцитами, но фибротические изменения продолжают развиваться. Это наводит на мысль о существовании еще одного клеточного эффектора, который и реализует развитие фиброза в костном мозге. Отсутствие фиброза у мышей с макрофагальной дисфункцией после введения TPO [24] свидетельствует о том, что этим эффектором, по всей видимости, служат макрофаги. Однако есть исследования, в которых опровергается необходимость макрофагов для развития ПМФ [27]. Существуют работы, показывающие как повышение числа зрелых CD68+ резидентных (тканевых) макрофагов в костном мозге у пациентов с ПМФ [73], так и увеличение их активности, которое выражается в повышении продукции TGF- β , интерлейкина-1 и вещества P [74]. Эти данные дают возможность предположить, что именно повреждение или неповреждение моноцитарно-макрофагального звена гемопоэза определяет фенотип Ph-негативного ХМПЗ. Таким образом, детальное исследование патологических процессов невозможно без оценки вклада клеток моноцитарно-макрофагального ряда в развитие ПМФ. Поскольку макрофаги имеют миелоидное происхождение, они также способны нести в себе мутации, что увеличивает их потенциальную роль в патогенезе ПМФ.

Целью настоящей работы было создать клеточную линию с экспрессией трансформирующей мутации JAK2 V617F в клетках острого моноцитарного лейкоза THP-1.

МЕТОДЫ

Создание трансгенной линии макрофагов с гиперэкспрессией JAK2 и мутацией V617F

Основой для создания трансгенной клеточной линии послужила линия клеток моноцитарного ряда THP-1, способная дифференцироваться в макрофаги. Модификация осуществлялась с использованием лентивирусного вектора LeGO-iG2, содержащего зеленый флуоресцентный белок (GFP). Для клонирования в вектор использовалась человеческая кДНК гена JAK2. Мутация V617F была получена методом направленного мутагенеза. Кроме того, в вектор был клонирован ген устойчивости к антибиотику бластицидину.

Оценка трансдукции проводилась по флуоресцентному свечению GFP. Затем трансдуцированные клетки были подвергнуты батч-селекции: проводили культивирование на 24-луночных планшетах в среде RPMI-1640 с содержанием 10 мкг/мл бластицидина. Выжившие клетки подвергались клональной экспансии. Клетки рассаживались методом последовательных разведений до 1 клетки на 96-луночные планшеты и культивировались в присутствии бластицидина в концентрации 10 мкг/мл, чтобы получить потомство 1 клетки.

Экспрессия мутантного аллеля гена JAK2 оценивалась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и секвенирования по Сэнгеру.

В результате было создано две трансгенные линии: одна содержала вектор с экспрессией гена JAK2 с мутацией V617F, другая — JAK2 дикого типа.

Культивирование клеток

Клеточные линии были дифференцированы до макрофагов с помощью форболового эфира (PMA) в концентрации 50 нг/мл по стандартным протоколам [75]. В качестве контроля для трансгенных клеток использовалась немодифицированная линия THP-1. Клетки культивировались в среде RPMI-1640 с добавлением 50 мкг/мл гентамицина и 2 ммоль/л глутамина и 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °C.

Секвенирование транскрипта JAK2

Последовательность транскрипта JAK2 определяли с помощью секвенатора ABI 3130 (Life Technologies, США) с использованием набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, США). РНК выделяли из суспензии клеток с использованием набора ExtractRNA («Евроген», Россия), затем проводили ОТ-ПЦР с помощью набора реагентов MMLV RT kit («Евроген», Россия). Сиквенсная реакция осуществлялась реагентами компании «Евроген» на амплификаторе Dyad (Bio-Rad, США).

Определение уровня экспрессии JAK2

Аmplификация была проведена на приборе Applied Biosystems 7500 (Life Technologies, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green («Евроген», Россия). Уровень экспрессии JAK2 рассчитывался относительно образца немодифицированных

клеток, инкубированных в среде в присутствии сыворотки. Уровень экспрессии этого образца был принят за единицу. Расчет проводился с использованием нормализующего фактора для каждого образца, который основывался на значении уровня экспрессии контрольного гена — гена «домашнего хозяйства», в качестве которого использовался ген гипоксантингуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT).

Окрашивание актиновых микрофиламентов

Клетки культивировали в течение 5 дней, затем их фиксировали 4% параформальдегидом, пермеабилizировали 0,1% тритоном X-100 и окрашивали флуоресцентно меченным фаллоидином (Sigma-Aldrich, США) и DAPI (Sigma-Aldrich, США). Окрашивание визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

Проточная цитофлуориметрия

Для оценки количества живых клеток в каждой лунке мы использовали проточный цитометр Guava EasyCyte и реагент Guava ViaCount Reagent (Merck Millipore, Германия). Макрофаги снимали с пластика с помощью 5 ммоль/л ЭДТА с 4 мг/мл лидокаина (инкубация при температуре 4 °C в течение 20–30 мин).

Затем открепившиеся клетки смешивали с Guava ViaCount Reagent согласно инструкции к реагенту. Подсчет клеток проводился на цитометре Guava EasyCyte.

Статистический анализ

Различия между группами были оценены с помощью непараметрического критерия Краскала—Уоллиса с использованием пакета программ GraphPad Prism, версия 6 (GraphPad Software, США). Для значимых различий принималось значение $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы с 25-м и 75-м квартилями.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика модифицированных клеток

Секвенирование по Сэнгеру показало, что клетки, трансдуцированные с помощью вектора с мутацией JAK2 V617F, имеют необходимую замену G→T (рис. 1, А). Обе трансгенные линии имели повышенную экспрессию JAK2 по сравнению с немодифицированной (рис. 1, Б).

При рутинном культивировании трансгенные THP-1 имели морфологию моноцитов — суспензионные клетки сферической формы. После обработки форболовым эфиром THP-1 дифференцировались в макрофаги и прикреплялись к культуральному пластику. Клетки имели различную форму: одни были сферической формы, другие имели псевдоподии в разном количестве (рис. 2).

Оценка количества живых клеток

Значимых различий по доле жизнеспособных клеток не наблюдалось. Однако макрофаги с экспрессией мутантного гена JAK2 и JAK2 дикого типа имели тенденцию к большему числу живых клеток (рис. 3).

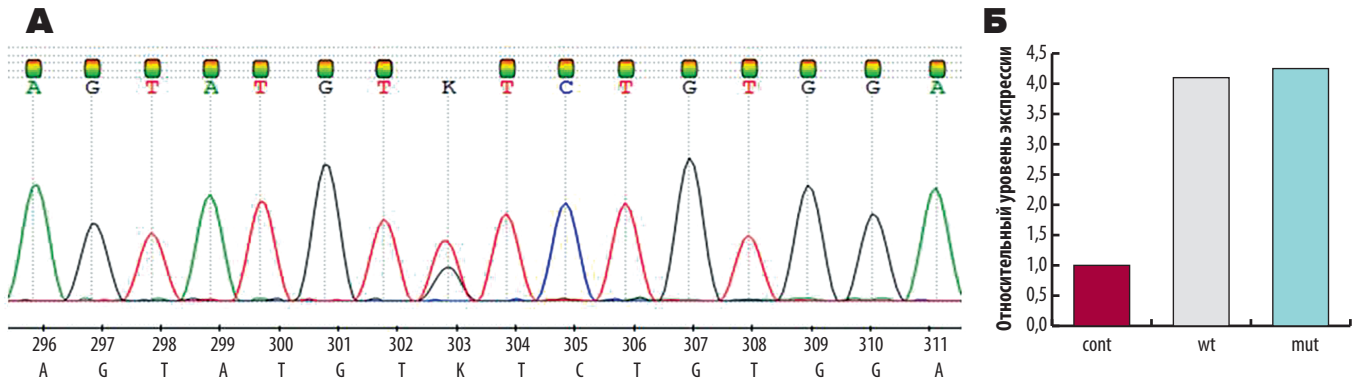


Рис. 1. Характеристика трансгенных клеток:

А — последовательность гена JAK2 в JAK2 V617F-экспрессирующей модифицированной клеточной линии, замена G→T; Б — повышенный уровень экспрессии JAK2 в обеих модифицированных линиях

Cont — немодифицированные клетки; mut — клетки, модифицированные с использованием вектора, несущего в себе ген JAK2 с мутацией V617F; wt — клетки, модифицированные с использованием вектора, несущего в себе ген JAK2 дикого типа.

Fig. 1. Characteristics of transgenic cells:

A—sequence of JAK2 gene in JAK2 V617F-expressing modified cell line, G→T replacement; Б—increased JAK2 expression level in both modified lines

Cont — unmodified cells; mut — cells modified using a vector carrying the type JAK2 gene with V617F mutation; wt — cells modified using a vector carrying the wild type JAK2 gene.

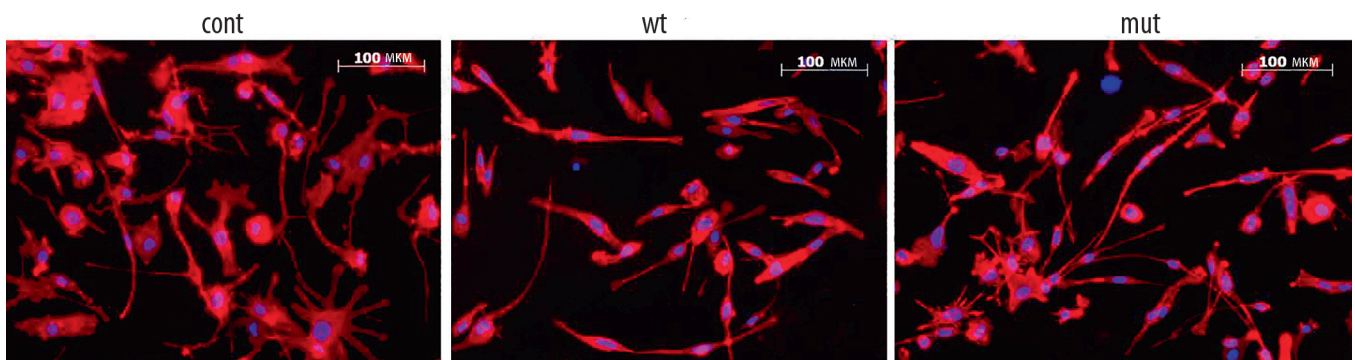


Рис. 2. Анализ морфологии активированных моноцитов линии THP-1. Окрашивание актиновых микрофиламентов флуоресцентно меченным фаллоидином (зеленый) и ДНК флуоресцентным красителем DAPI (голубой)

Cont — немодифицированные клетки; mut — клетки, модифицированные с использованием вектора, несущего в себе ген JAK2 с мутацией V617F; wt — клетки, модифицированные с использованием вектора, несущего в себе ген JAK2 дикого типа.

Fig. 2. The analysis of the morphology of activated THP-1 monocytes. Staining of actin microfilament with fluorescent phalloidin (green) and DNA with DAPI fluorescent stain (blue)

Cont — unmodified cells; mut — cells modified using a vector carrying the type JAK2 gene with V617F mutation; wt — cells modified using a vector carrying the wild type JAK2 gene.

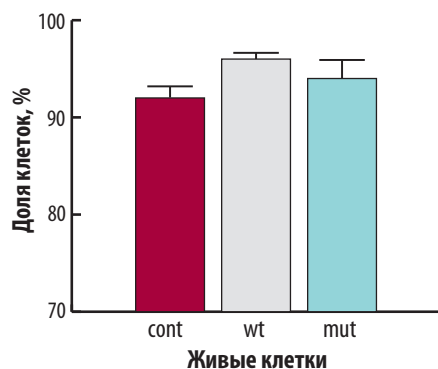


Рис. 3. Доля живых клеток (%) при различных условиях культивирования

Cont — немодифицированные клетки; mut — клетки, модифицированные с использованием вектора, несущего в себе ген JAK2 с мутацией V617F; wt — клетки, модифицированные с использованием вектора, несущего в себе ген JAK2 дикого типа.

Fig. 3. The percentage (%) of live cells under different cultivation conditions

Cont — unmodified cells; mut — cells modified using a vector carrying the type JAK2 gene with V617F mutation; wt — cells modified using a vector carrying the wild type JAK2 gene.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимость более детального исследования патогенетической роли макрофагов в развитии миелофиброза способствовала созданию клеточной модели макрофагов с экспрессией JAK2 V617F и с гиперэкспрессией JAK2 дикого типа.

В разработанной нами модели макрофагов с экспрессией JAK2 V617F мы наблюдали изменения фенотипа в зависимости от условий культивирования, а также тенденцию к увеличению выживаемости клеток, модифицированных с использованием вектора, несущего в себе ген JAK2 дикого типа, в условиях стандартного культивирования. Полученная клеточная модель может служить объектом для оценки отличий про- и антифибротического потенциала макрофагов, несущих мутацию, от клеток дикого типа. Молекулярно-биологические характеристики JAK2 V617F-позитивных макрофагов помогут найти ответ на вопрос, есть ли различия между активацией Янус-киназы вследствие мутации в псевдокиназном домене и опосредованной активацией в результате

мутаций в других генах. Кроме того, с помощью данной модели можно исследовать новые методы терапии и диагностики как первичного, так и вторичного миелофиброза.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было выполнено в рамках государственного задания «Расшифровка механизмов развития фиброза костного мозга и подходов к его реверсии».

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.А. Силютин, П.А. Бутылин.

Сбор и обработка данных: А.А. Силютин, И.И. Гин.

Предоставление материалов исследования: А.А. Силютин, И.И. Гин.

Анализ и интерпретация данных: А.А. Силютин, П.А. Бутылин.

Обзор литературных данных: А.А. Силютин, Н.М. Матюхина, Е.Н. Балаян.

Подготовка рукописи: А.А. Силютин, П.А. Бутылин.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в оформлении экспериментальных данных сотруднику НИЛ онкогематологии Института гематологии лаборанту-исследователю Станиславе Сергеевне Приходько, сотруднику Института молекулярной биотехнологии (ИМВА, Вена, Австрия) Сергею Владимировичу Жуку за помощь в создании клеточной линии.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100(7):2292–302. doi: 10.1182/blood-2002-04-1199.
- Hoffman R, Rondelli D. Biology and treatment of primary myelofibrosis. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;1:346–54. doi: 10.1182/asheducation-2007.1.346.
- Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M, et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international internet-based survey of 1179 MPD patients. *Cancer*. 2007;109(1):68–76. doi: 10.1002/cncr.22365.
- Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113(13):2895–901. doi: 10.1182/blood-2008-07-170449.
- Scherber R, Dueck AC, Johansson P, et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood*. 2011;118(2):401–8. doi: 10.1182/blood-2011-01-328955.
- Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*. 2008;22(2):437–8. doi: 10.1038/sj.leu.2404914.

- Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med*. 2000;342(17):1255–65. doi: 10.1056/nejm200004273421706.
- Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978;51:189–94.
- Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, Tefferi A. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2003;101(5):1981–3. doi: 10.1182/blood-2002-07-2341.
- Reilly JT. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis, natural history and management. *Blood Rev*. 1997;11(4):233–42. doi: 10.1016/s0268-960x(97)90022-9.
- Mehta J, Wang H, Iqbal SU, Mesa R. Epidemiology of myeloproliferative neoplasms (MPN) in the United States. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(3):595–600. doi: 10.3109/10428194.2013.813500.
- Kaushansky K. Thrombopoietin: The primary regulator of platelet production. *Blood*. 1995;86(2):419–31.
- de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med*. 1996;183(2):651–6.
- Vannucchi AM, Villeval J-L, Wagner-Ballon O, et al. Animal Models of Myelofibrosis. In: Conn PM, ed. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa: Humana Press Inc.; 2008. pp. 713–23. doi: 10.1007/s12223-008-0071-5.
- Ulich TR, del Castillo J, Senaldi G, et al. Systemic hematologic effects of PEG-rHuMGDF-induced megakaryocyte hyperplasia in mice. *Blood*. 1996;87(12):5006–15.
- Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood*. 1997;90(11):4369–83.
- Yan XQ, Lacey D, Fletcher F, et al. Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (MPL-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. *Blood*. 1995;86(11):4025–33.
- Ohwada A, Rafii S, Moore MA, Crystal RG. In vivo adenovirus vector-mediated transfer of the human thrombopoietin cDNA maintains platelet levels during radiation- and chemotherapy-induced bone marrow suppression. *Blood*. 1996;88(3):778–84.
- Cannizzo SJ, Frey BM, Raffi S, et al. Augmentation of blood platelet levels by intratracheal administration of an adenovirus vector encoding human thrombopoietin cDNA. *Nat Biotechnol*. 1997;15(6):570–3. doi: 10.1038/nbt0697-570.
- Abina MA, Tulliez M, Duffour MT, et al. Thrombopoietin (TPO) knockout phenotype induced by cross-reactive antibodies against TPO following injection of mice with recombinant adenovirus encoding human TPO. *J Immunol*. 1998;160(9):4481–9.
- Frey BM, Raffi S, Teterson M, et al. Adenovector-mediated expression of human thrombopoietin cDNA in immune-compromised mice: Insights into the pathophysiology of osteomyelofibrosis. *J Immunol*. 1998;160(2):691–9.
- Zhou W, Toombs CF, Zou T, et al. Transgenic mice overexpressing human c-MPL ligand exhibit chronic thrombocytosis and display enhanced recovery from 5-fluorouracil or antiplatelet serum treatment. *Blood*. 1997;89(5):1551–9.
- Kakumitsu H, Kamezaki K, Shimoda K, et al. Transgenic mice overexpressing murine thrombopoietin develop myelofibrosis and osteosclerosis. *Leuk Res*. 2005;29(7):761–9. doi: 10.1016/j.leukres.2004.12.009.
- Yanagida M, Ide Y, Imai A, et al. The role of transforming growth factor-beta in PEG-rHuMGDF-induced reversible myelofibrosis in rats. *Br J Haematol*. 1997;99(4):739–45.
- Abina MA, Tulliez M, Lacout C, et al. Major effects of TPO delivered by a single injection of a recombinant adenovirus on prevention of septicemia and anemia associated with myelosuppression in mice: Risk of sustained expression inducing myelofibrosis due to immunosuppression. *Gene Ther*. 1998;5(4):497–506. doi: 10.1038/sj.gt.3300638.
- Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-SCID mice. *J Immunol*. 1995;154:180–91.
- Serreze DV, Gaedeke JW, Leiter EH. Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(20):9625–9. doi: 10.1073/pnas.90.20.9625.
- Wagner-Ballon O, Hedia Chagraoui H, Eric Prina E, et al. Monocyte/Macrophage Dysfunctions Do Not Impair the Promotion of Myelofibrosis by High Levels of Thrombopoietin. *J Immunol*. 2006;176(11):6425–33. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6425.
- Tefferi A. Experimental myelofibrosis in mice and the implications to human disease. *Leuk Res*. 2005;29(7):723–6. doi: 10.1016/j.leukres.2004.12.006.
- Tsai SF, Martin DL, Zon LI, et al. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*. 1989;339(6224):446–51. doi: 10.1038/339446a0.
- Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, et al. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature*. 1990;344(6265):447–9. doi: 10.1038/344447a0.
- Yu C, Cantor AB, Yang H, et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med*. 2002;195(11):1387–95. doi: 10.1084/jem.20020656.
- Migliaccio AR, Rana RA, Sanchez M, et al. GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the GATA-1^{low} mouse mutant. *J Exp Med*. 2003;197(3):281–96. doi: 10.1084/jem.20021149.

34. McDevitt MA, Shivdasani RA, Fujiwara Y, et al. A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(13):6781–5. doi: 10.1073/pnas.94.13.6781.
35. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, et al. A line-age-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*. 1997;16(13):3965–73. doi: 10.1093/emboj/16.13.3965.
36. Vyas P, Ault K, Jackson CW, et al. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*. 1999;93(9):2867–75.
37. Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, et al. Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1(low) mice. *Blood*. 2004;104(12):3573–80. doi: 10.1182/blood-2004-01-0193.
38. Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, et al. Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood*. 2002;100(4):1123–32. doi: 10.1182/blood-2002-06-1913.
39. Vannucchi AM, Migliaccio AR, Paoletti F, et al. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia: Lessons from mouse models of the disease. *Semin Oncol*. 2005;32(4):365–72. doi: 10.1053/j.seminoncol.2005.04.008.
40. Radich J. The Molecular Biology of Myeloproliferative Disorders. *Cancer Cell*. 2010;18(1):7–8. doi: 10.1016/j.ccr.2010.06.006.
41. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054–61. doi: 10.1016/s0140-6736(05)74230-6.
42. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779–90. doi: 10.1056/nejmoa051113.
43. Levine RL, Wadleigh M, Coombs J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387–97. doi: 10.1016/j.ccr.2005.03.023.
44. Kiladjian JJ. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:561–6. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.561.
45. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;112(6):2190–8. doi: 10.1182/blood-2008-03-077966.
46. Chen M, Cheng A, Chen YQ, et al. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(13):6910–5. doi: 10.1073/pnas.94.13.6910.
47. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem*. 2002;277(49):47954–63. doi: 10.1074/jbc.m205156200.
48. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*. 2004;13(2):169–78. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00505-7.
49. Lindauer K, Loerting T, Liedl KR, et al. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Engin. Design Select*. 2001;14(1):27–37. doi: 10.1093/protein/14.1.27.
50. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93(3):385–95. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81167-8.
51. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(10):3377–9. doi: 10.1182/blood-2005-05-1898.
52. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia-chromosome negative CML and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(10):3370–3. doi: 10.1182/blood-2005-05-1800.
53. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005;106(4):1207–9. doi: 10.1182/blood-2005-03-1183.
54. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144–8. doi: 10.1038/nature03546.
55. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006;108(7):2435–7. doi: 10.1182/blood-2006-04-018259.
56. Wernig G, Mercher T, Okabe R, et al. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2006;107(11):4274–81. doi: 10.1182/blood-2005-12-4824.
57. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, et al. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108(5):1652–60. doi: 10.1182/blood-2006-02-002030.
58. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild type JAK2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2007;111(8):3931–40. doi: 10.1182/blood-2007-08-107748.
59. Xing S, Ho WT, Zhao W, et al. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. *Blood*. 2008;111(10):5109–17. doi: 10.1182/blood-2007-05-091579.
60. Marty C, Lacout C, Martin A, et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood*. 2010;116(5):783–7. doi: 10.1182/blood-2009-12-257063.
61. Li J, Kent DG, Chen E, Green AR. Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Dis Model Mech*. 2011;4(3):311–7. doi: 10.1242/dmm.006817.
62. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270. doi: 10.1371/journal.pmed.0030270.
63. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPLW515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472–6. doi: 10.1182/blood-2006-04-018879.
64. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391–405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542.
65. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379–90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347.
66. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(6):842–6. doi: 10.1016/j.biocel.2012.02.009.
67. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. 2009;417(3):651–66. doi: 10.1042/BJ20081847.
68. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J*. 2010;24(3):665–83. doi: 10.1096/fj.09-145482.
69. Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*. 2012;32(7):805–18. doi: 10.1038/onc.2012.130.
70. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123(10):1544–51. doi: 10.1182/blood-2013-11-539098.
71. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2014;29(1):249–52. doi: 10.1038/leu.2014.270.
72. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*. 2016;127(10):1317–24. doi: 10.1182/blood-2015-11-679571.
73. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325–35. doi: 10.1182/blood-2015-11-681932.
74. Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B. Resident bone marrow macrophages in idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF): a histochemical and morphometric study on sequential trephine biopsies. *Leuk Res*. 1999;23(11):983–5. doi: 10.1016/s0145-2126(99)00120-4.
75. Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*. 1982;42(4):1530–6.