

MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LA TRANSFORMACIÓN EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

J. LEÓN¹, M. ALBAJAR²

¹ Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina. Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBBTEC). Universidad de Cantabria-CSIC. Santander.

² Servicio de Hematología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. IFIMAV. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina. Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBBTEC). Santander

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un hemopatía maligna clasificada dentro del grupo de los síndromes mieloproliferativos. La LMC supone el ~20% de las leucemias de adultos. Típicamente la LMC se desarrolla en tres fases. Suele diagnosticarse en una fase crónica (FC) caracterizada por la expansión de granulocitos. A pesar de su nombre, la LMC no tratada es en realidad una enfermedad poco “crónica”, pues la FC sólo dura unos pocos años (mediana ~ 4 años) para llegar a una fase acelerada y finalmente a una crisis blástica (CB). Esta fase es terminal, con una supervivencia media de unos 9 meses¹⁻³. En la mitad de los casos, aproximadamente, no hay fase acelerada distinguible clínicamente sino que se pasa de la FC a la CB directamente. Desde el punto de vista molecular, no hay diferencia significativa con la CB⁴, y en esta revisión sólo nos referiremos a FC y CB.

Se han identificado unos 400 “genes del cáncer” según el último censo (Cancer Genome Project, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP), incluyendo oncogenes y genes oncosupresores, pero muy pocos de ellos aparecen activados en prácticamente todos los casos de una determinado tumor. La LMC es una de las cuatro neoplasias hematológicas caracterizadas por una anomalía molecular presente en > 95% de los casos: la proteína tirosina quinasa BCR-ABL (las otras tres neoplasias y genes serían el linfoma de Burkitt por MYC, la leucemia promielocítica por PML-RAR α y la policitemia vera por JAK2). En las LMC, la evidencia epidemiológica en humanos junto con los modelos de ratones transgénicos demuestran sin lugar a dudas que es la actividad quinasa de BCR-ABL la responsable de la leucemia. Por esta razón se ha acumulado mucha información sobre la biología molecular de la LMC y el BCR-ABL. A pesar de ello, la biología de la LMC presenta varios aspectos oscuros que hacen de la LMC un reto, no sólo desde el punto de vista clínico, sino también para la biología celular y molecular. Los interrogantes importantes pendientes son:

1) ¿Cuáles son los sustratos de BCR-ABL clave para el origen y desarrollo de leucemia?

2) ¿Cuáles son las células en las que se origina la LMC?

3) ¿Por qué ocurre la transformación de FC a CB? Es decir, ¿qué otras alteraciones genéticas son responsables de la transformación blástica?

La presente ponencia revisará principalmente esta última cuestión. La introducción del imatinib y más recientemente de otros dos inhibidores de BCR-ABL (nilotinib y dasatinib) ha “cronificado” de hecho la LMC, de modo que consiguen evitar la aparición de la CB durante al menos 8 años. Por tanto, el imatinib ha paliado en gran medida el problema clínico de la LMC, aunque sigue habiendo un porcentaje significativo de casos refractarios primarios y de BCR-ABL mutantes resistentes a los inhibidores (10-20% de las LMCs en distintas series publicadas). Sin embargo, la transformación desde una situación donde las células están diferenciadas a otra blástica en la que se acumulan formas inmaduras hace de la LMC un modelo *in vivo* del mayor interés científico.

¿Qué es el BCR-ABL?

Las proteínas quiméricas BCR-ABL se originan por la traslocación t(9;22) (q34;q11), descubierta hace casi 40 años. Se genera así el cromosoma derivado 22q- o Philadelphia (Ph). Al ser una traslocación recíproca, se genera también un gen ABL-BCR en el cromosoma 9 derivado (9-der).

La proteína de fusión BCR-ABL contiene la mayor parte de la quinasa ABL (a excepción de su extremo N-terminal) y buena parte de la proteína BCR. El resultado es una enzima con una actividad tirosina quinasa constitutivamente activada. Se han descrito tres puntos de ruptura que generan tres proteínas BCR-ABL con fragmentos progresivamente mayores de BCR, aunque conservando la parte ABL: p190, p210 y p230. En la LMC las rupturas clásicas son las b2a2 y b3a2, que fusionan el exón 13 (b2) o el 14 (b3) de BCR con el exón 2 (a2) de ABL1, fusión que da lugar a la proteína p210. La p210 es la expresada en la inmensa mayoría de las LMC, aunque ocasionalmente se detectan también la p190 y la p230. Un porcentaje menor (~25% en adultos, mucho menor en niños) de leucemias linfoblásticas agudas (LLA) también presentan el cromosoma Ph, y la mayoría de estas LLA (60%) expresan la forma p190, mientras que el resto expresan la p210. Se desconoce el mecanismo molecular responsable de la especificidad de las formas p210 y p190 por LMC y por leucemia linfoblástica, respectivamente y en esta revisión nos referiremos exclusivamente a la p210^{1,2}.

La diferencia fundamental entre p210 BCR-ABL1 (que a partir de aquí llamaremos BCR-ABL) y ABL1 está en un pequeño dominio N-terminal que le sirve

para anclarse a membranas por un resto miristoílo, característica que, por tanto, está ausente en BCR-ABL. El anclaje a la membrana (típico también de otras tirosina quinasa citoplásmicas, como SRC, FYN, etc.) permite un plegamiento de ABL1 que está ausente en BCR-ABL. Esto y otras razones estructurales hacen que BCR-ABL sea una quinasa constitutivamente activa¹. También aparece una Tyr fosforilada en posición 177. La proteína BCR-ABL tiene otros dominios, entre los que destacan los SH2 y SH3, además del dominio quinasa, que sirven para interactuar con sustratos y otras proteínas efectoras que revisaremos posteriormente^{2,3} (Figura 1).

¿Cómo provoca BCR-ABL la LMC?

Varios modelos murinos, bien transgénicos que expresan BCR-ABL en células de médula ósea o bien con transducción retroviral de BCR-ABL en progenitores hematopoyéticos seguida de trasplante, han demostrado que la expresión de BCR-ABL es suficien-

te para transformar células hematopoyéticas e inducir un síndrome semejante a la LMC. Además, la enfermedad remite con el tratamiento de inhibidores de BCR-ABL como imatinib. Por tanto, no hay duda de que BCR-ABL causa la enfermedad, pero para contestar la pregunta del epígrafe debemos preguntarnos primero ¿cuáles son los sustratos y los interactores de BCR-ABL?, puesto que son estas interacciones las que determinan finalmente la actividad de BCR-ABL y por tanto la leucemia que genera. Veinte años de investigación han generado una lista de sustratos de BCR-ABL, los más importantes de los cuales se esquematizan en la Figura 1.

Algunos de los sustratos más estables de BCR-ABL hasta ahora identificados son GRB2, SHC, HCK y CRKL. La fosforilación de CRKL es el estándar usado hasta ahora para medir la actividad quinasa de BCR-ABL, tanto *in vitro* como en células de pacientes. Sin embargo, son bastantes más las proteínas fosforiladas que aparecen en la célula debido a la actividad de BCR-ABL, aunque en algunos casos la unión de sustrato a la quinasa sea inestable o su fosforilación sea indirecta, a través de otras quinasa.

Gracias a estas interacciones BCR-ABL activa numerosas rutas de transducción de señales intracelulares⁶, que a su vez acaban activando factores de transcripción que promueven la expresión de otros genes de proliferación, supervivencia, etc. Las rutas bioquímicas de señalización más importantes que parten de BCR-ABL serían (revisado en^{1,3}):

1) Activación de la ruta BCR-ABL→RAS. La oncoproteína RAS se activa según la ruta BCR-ABL→GRB2→SOS→RAS. La Tyr-177 fosforilada (que pertenece a la parte BCR de la BCR-ABL) conforma un sitio de unión para GRB2, lo que es necesario para la activación de esta ruta. RAS, a su vez, activaría una cascada de quinasa que culmina en la activación de la quinasa ERK.

2) Activación de la ruta BCR-ABL→PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa)→AKT. Esta quinasa induce supervivencia de las células y es uno de los efectores más importantes de BCR-ABL.

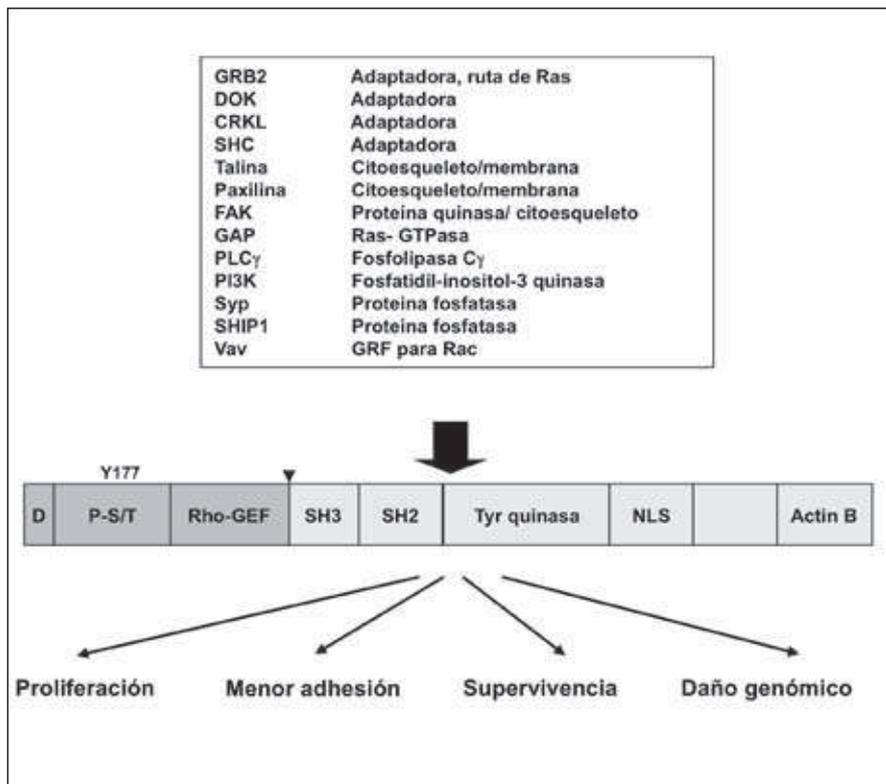


Figura 1. Esquema de la proteína BCR-ABL p210. Se representa en la parte superior una lista de proteínas interactores-sustratos. En la parte inferior se indican los principales efectos biológicos de BCR-ABL en células. El triángulo indica el punto de fusión entre las secuencias de BCR y de ABL. Se indican los distintos dominios de la proteína: D: dominio de dimerización; P-S/T: dominio con Ser y Thr fosforiladas; SH3 y SH2: dominios "Src homology" de interacción con otras proteínas señalizadoras; NLS: región de localización nuclear; actin B: región de unión a actina.

AKT inhibe la actividad de p27/KIP1 (inhibidor del ciclo celular) y de BAD (proteína proapoptótica), además de estimular la síntesis de proteínas.

3) Activación de la ruta BCR-ABL→JAK2→STAT5. STAT5 induce la expresión de MYC y del gen anti-apoptótico BCL-X (BCL2L1) y otros genes pro-proliferativos.

4) Activación de la ruta BCR-ABL→RAC1→JUNK, p38. La importancia de la activación de RAC y de las quinasas finales de su ruta (JUNK y p38) se ha demostrado en modelos animales de LMC⁷.

5) Activación de β-catenina. La actividad de β-catenina a través de factores Wnt es esencial para la renovación de células madre hematopoyéticas (CMH) por estabilización de β-catenina, tanto directamente como indirectamente al bloquear la inhibición de β-catenina por BCR⁸. La activación de la ruta de la β-catenina en CMH de LMC se ha confirmado por estudios de perfil transcripcional⁴.

Estas activaciones se han reproducido en células primarias de LMC, y el uso de silenciamiento específico con siRNAs y de inhibidores químicos demuestra que todas estas rutas son importantes para los efectos transformantes de BCR-ABL en células en cultivo. Son estas interacciones las responsables en último término de los efectos biológicos de BCR-ABL. La larga lista de posibles sustratos sugiere una multiplicidad de funciones *in vivo* de BCR-ABL, y que en conjunto dan cuenta de la actividad leucemogénica.

Actividades oncogénicas de BCR-ABL

En numerosos estudios con modelos celulares se ha demostrado que BCR-ABL es capaz de:

1) Inducir la proliferación celular. BCR-ABL estimula la proliferación y es capaz de transformar líneas de fibroblastos murinos en cooperación con otros oncogenes, así como líneas murinas hematopoyéticas y células primarias de médula ósea⁹. Asimismo, la expresión de BCR-ABL en CD34+ humanas induce proliferación en respuesta a factores crecimiento. Las células progenitoras (CD34+ CD38-) de LMC muestran mayor supervivencia y proliferación en cultivo que las de médula sana, y también se ha demostrado la represión o retención en el citoplasma del inhibidor de ciclo p27/KIP1 en células con expresión de BCR-ABL², lo que favorece la proliferación.

2) Disminuir la adhesión al estroma y promover alteraciones del citoesqueleto, actividades que resultan en pérdida de adherencia en el nicho de la médula de las células del LMC. Las células madre hematopoyéticas de LMC tienen regulados negativamente genes de adhesión y motilidad, y ensayos *in vitro* confirman la pérdida de ambas funciones por parte de las células con expresión de BCR-ABL¹⁰.

3) Proteger de apoptosis frente a diversos agentes. La sobreexpresión de BCR-ABL en líneas celulares hematopoyéticas confiere un elevado grado de resistencia a fármacos y otros agentes proapoptóticos. Esto puede explicarse por la activación de AKT y la inducción de BCL2L1 (BCL-X) mencionadas arriba. Sin embargo, líneas celulares y células primarias de LMC en cultivo se muestran dependientes de BCR-ABL para su supervivencia (un ejemplo del fenómeno conocido como “adicción a oncogenes”).

4) Inducir daño genómico. Se ha demostrado que células con expresión alta de BCR-ABL acumulan anomalías genéticas. Esto puede ser debido en primer lugar a una mayor producción de radicales libres de oxígeno (ROS)¹¹. Por otra parte, BCR-ABL es capaz de inhibir la actividad reparadora de DNA. En la literatura se pueden encontrar datos demostrando un efecto inhibidor de BCR-ABL sobre los mecanismos más importantes de reparación de DNA: reparación de nucleótidos mal apareados (MMR), reparación por excisión de nucleótidos (NER), por unión de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HRR)¹². También se ha descrito en células de LMC la represión de la actividad de quinasas importantes para la identificación de DNA dañado como ATR y DNA-PK^{3,12}.

Las actividades anteriores de BCR-ABL justifican su actividad leucemogénica. Además, para todas ellas, BCR-ABL es dependiente de la actividad Tyr-quinasa de BCR-ABL, lo que está en concordancia con el control de la enfermedad que ejerce el imatinib y otros inhibidores de esta actividad. Sin embargo, BCR-ABL ya se expresa en una población de células madres de la LMC, como se discute más adelante, y las actividades biológicas de BCR-ABL en esa población, que es la que mantiene la LMC, son más difíciles de estudiar y están sometidas a controversia.

¿Por qué la LMC se transforma a una fase blástica?

A pesar de la abundante información sobre las actividades leucemogénicas de BCR-ABL descritas en el punto anterior, BCR-ABL ya se expresa en FC. Por tanto, la actividad de la proteína BCR-ABL no explicaría por sí sola el dramático cambio que tiene lugar en la LMC desde la FC a la CB, cambio que además es relativamente rápido en comparación con la larga duración de la FC (unos 5 años de mediana en LMC no tratada). La misma relevancia de BCR-ABL en la progresión de la enfermedad no está clara, pero parece que es necesaria para la misma, ya que la expresión de BCR-ABL se mantiene y normalmente aumenta a nivel de mRNA y proteína en la CB, aunque se hayan descrito algunas CB en las que se llega a perder la expresión de BCR-ABL^{3,5}. Sin embargo,

algo ocurre al cabo del tiempo que hace que la LMC evolucione a una fase avanzada aguda, la crisis blástica (CB), en la que se acumulan células indiferenciadas de la estirpe mielóide (aproximadamente el 75% de las CB) o linfoide (el 25%)⁵.

La célula diana de la transformación

La identidad de las células madre de esta leucemia es aún motivo de controversia y no es el tema central de esta revisión. Sin embargo, se suele asumir que los cambios genéticos responsables de la transformación blástica tienen lugar en la misma célula Ph-positiva pluripotente que da lugar a la FC (Figura 2). La LMC es una neoplasia clonal originada en células madre hematopoyéticas (CMH). El hecho de que un ~25% de las CB sean de tipo linfoide ya sugiere que la CB se ha de originar en una célula pluripotente diferente de la célula leucémica acumulada en la FC, que es siempre de tipo granulocito. Por tanto, la LMC se mantiene gracias a una pequeña población (<1% de las células CD34+) de CMH Ph-positivas que expresan BCR-ABL y que son básicamente quiescentes. Sin embargo, también se ha demostrado que el número de progenitores granulocito-macrófago (PGM) (CFU-GM en ensayos de colonias) es mucho mayor en la médula ósea de CB respecto a la de FC, sugiriendo que la CB también se mantiene con una población de células madre tipo PGM ya comprometidas a linaje mielóide¹³, lo que ha llevado a postular que hay dos poblaciones de células madre con capacidad de autorrenovación: las células madre de la LMC y los progenitores granulocito-macrófagos de la CB^{14,15}. Recientemente, se ha demostrado que el perfil transcripcional de las CMH de LMC es semejante al de las CMH sanas, aunque con menor expresión de genes de moléculas de adhesión y motilidad celular, de autorrenovación de célula madre, de diferenciación y de inhibidores de proliferación¹⁰. Esto sugiere que se

trataría de una célula semejante al progenitor mielóide común (PMC) que no ha perdido marcadores inmunofenotípicos de la CMH (CD34+, CD38-).

Desgraciadamente, sea cual sea la identidad de las células madre de la LMC, estas células no son eliminadas por los inhibidores de BCR-ABL, lo que explica que, aunque la LMC haya respondido inicialmente al inhibidor, recidiva si se suspende el tratamiento¹⁵. De acuerdo con este hecho, se ha demostrado que en pacientes en respuesta molecular al imatinib, aún se puede detectar mRNA de BCR-ABL en el compartimento de CMHs pero no en otras poblaciones de la médula ósea. Esta resistencia al imatinib puede deberse a que la actividad quinasa de BCR-ABL no sea necesaria para la supervivencia o autorrenovación de las células madre de la LMC, que su expresión de BCR-ABL sea más alta que las de los granulocitos leucémicos, o bien que posean eficientes sistemas de bombeo del fármaco⁹.

Modelos matemáticos basados en datos epidemiológicos postulan que se requieren 4-5 mutaciones para que se desarrolle una LMC hasta CB⁹. La identidad de los cambios subsiguientes a la translocación que genera el gen BCR-ABL, esta sujeta a investigación. Pero puesto que la expresión de BCR-ABL se mantiene o au-

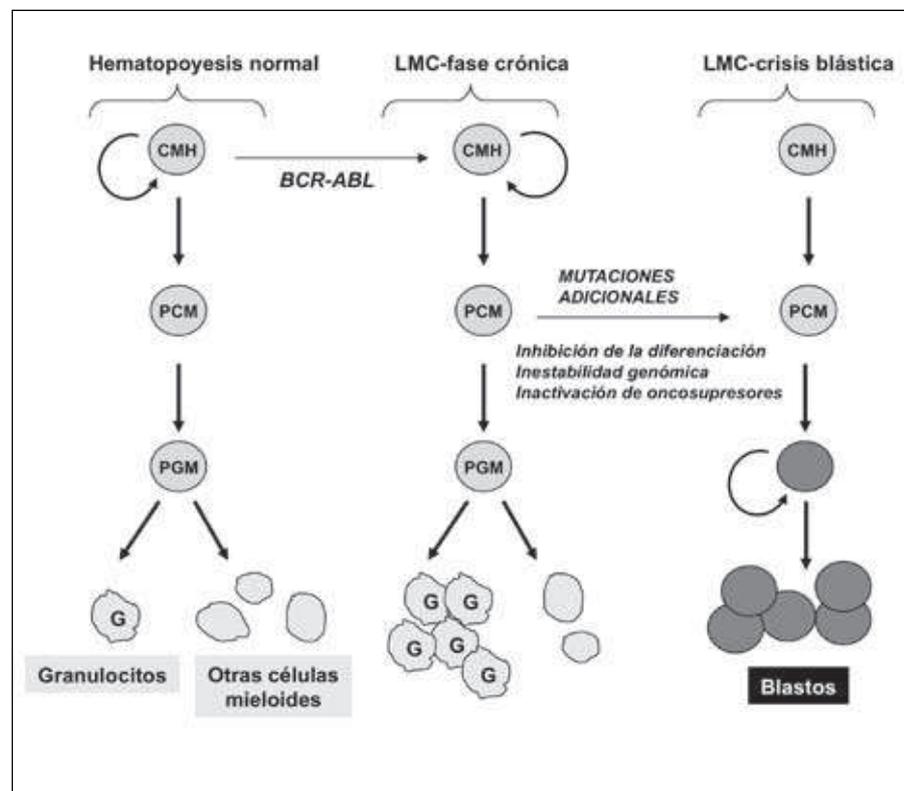


Figura 2. Esquema de la transformación de LMC, basado en Stuart *et al.*¹⁵. CMH: célula madre hematopoyética; PCM: progenitor común mielóide; PGM: progenitor de granulocitos-macrófagos; G: granulocitos. Se indican los principales cambios biológicos observados en la transformación blástica, producto de mutaciones y cambios genéticos adicionales.

Tabla 1. Aberraciones cromosómicas frecuentes en la crisis blástica de la LMC. Se indica el porcentaje aproximado de casos en cada aberración. Se indica también el gen producto de las translocaciones

Anomalía	Frecuencia
Trisomía 8	40%
Cromosoma Ph adicional	30%
Isocromosoma 17	20%
Trisomía 19	10%
Trisomía 21	7%
Monosomía 7	5%
Deleciones en el crom. 9-der	15%
t(3;21) → RUNX1-EVI1	<5%
t(7;11) → NUP98-HOXA9	<5%
Disomías uniparentales	50%

menta en la CB, los efectos demostrados de BCR-ABL en células en cultivo (estimulación de la proliferación, protección de la apoptosis, daño genómico) se mantendrían *in vivo*. La historia natural de la LMC sugiere que en la FC existe un “umbral anaplásico” que marca la transformación a la CB¹⁴. Comparando la biología de la FC y la CB, en la progresión de la LMC a CB se pueden distinguir tres cambios biológicos importantes que caracterizan esta transformación (resumidos en la Figura 2), que describiremos a continuación:

Bloqueo de la diferenciación celular

El tránsito de FC a CB en la transformación de la LMC es quizá el mejor ejemplo en biología del cáncer de cómo la transformación se asocia a un bloqueo en la diferenciación. Mientras que en la FC hay una acumulación de granulocitos maduros, en la CB se acumulan formas blásticas, normalmente de línea mielóide pero también linfoblastos en un 25% de los casos³. En la transformación de LMC se observan cambios genéticos como la sobreexpresión de MYC y mutaciones activadoras de GATA2 que bloquean diferenciación mielóide, así como represión de genes que median diferenciación mielóide como CEBPA (CEBP α), y SPI1 (PU.1), comentados más abajo. En algunas CB, aparecen traslocaciones que generan el gen RUNX1-EVI1 (Tabla 1), que inhibe diferenciación mielóide.

Inestabilidad genómica

Ésta se manifiesta por aberraciones cromosómicas y genómicas adicionales y defectuosa reparación del DNA genómico¹². Es frecuente que la CB se acompa-

ñe de aberraciones cromosómicas recurrentes, listadas en la Tabla 1. Entre ellas destaca la trisomía del cromosoma 8, un cromosoma Ph adicional o el isocromosoma¹⁷ [i(17q)]^{5,12}. Hay otras trisomías y translocaciones con frecuencias menores. También se han detectado recientemente disomías uniparentales, otro indicador de inestabilidad genómica, que es frecuente en FC (~50%)¹⁶ y deleciones en el 9der¹⁷. En la CB linfóide también se detectan deleciones del gen Ikaros (IKZF1) y de los genes de la cadena pesada de IgG y de receptor de células T. Otro marcador de la inestabilidad genómica es el progresivo acortamiento de telómeros desde la FC a la CB¹⁸. En concordancia con esto, la expresión de telomerasa (hTERT) en células CD34+ de LMC es menor que en las CD34+ normales y la actividad BCR-ABL reprime la expresión de dicha telomerasa¹⁹. Todas estas alteraciones se han usado de marcadores de la progresión, pero no tienen por qué desempeñar un papel causal de la transformación. Dado el efecto inhibitorio de BCR-ABL en la reparación de DNA, es posible que BCR-ABL contribuya directamente a la inestabilidad genómica observada en la transformación blástica.

Inactivación de supresores tumorales

Se ha descrito la inactivación de una serie de oncosupresores en la evolución a CB³. El gen oncosupresor p53 (TP53) está mutado en un 25% de las CB pero en ninguna FC^{20,21}. Además, el isocromosoma i(17q), frecuente en las CB, implica la pérdida de una copia de TP53. El gen del inhibidor del ciclo p16 (CDKN2A) aparece mutado 50% de CB linfóide y ~25% de CB mielóide²², y el RB (retinoblastoma) en el ~20% de las CB, y en mayor frecuencia si son megacarioblásticas²⁰. Uno de los oncosupresores que más atención ha recibido en LMC es la proteína fosfatasa PP2A. Esta fosfatasa es inactivada con la progresión a CB; debido a la regulación positiva de SET, un inhibidor fisiológico de PP2A²³.

¿Qué genes son los responsables de la progresión de la LMC de FC a CB?

La hipótesis más en boga es que durante la progresión de FC, el BCR-ABL promueve una serie de cambios moleculares secundarios. Estos implican la desregulación o la mutación de varios genes clave que son los responsables de la transformación a CB. Por tanto, ha habido una investigación muy intensa en los últimos años para identificar genes cuyo cambio de expresión entre FC y CB pueda: a) explicar la transformación blástica, b) servir de marcadores tempranos de la misma y c) suministrar nuevas dianas para fármacos

que se puedan usar junto con inhibidores de BCR-ABL para controlar la LMC.

Genes regulados en la transformación blástica identificados en estudios individuales

En la Tabla 2, aunque seguramente no están todos, se presenta una lista de genes para los que se ha descrito expresión diferencial entre FC y CB, así como genes que se sobreexpresan en la LMC respecto a la células de médula ósea sana. También se ha demostrado la regulación de otros genes mediada por BCR-ABL en sistemas en cultivo pero en esta tabla sólo se recogen aquellos regulados en células primarias de LMC. Sus funciones, también recogidas en la Tabla 2, son coherentes con su regulación en la transformación blástica. De hecho, la mayoría han sido estudiados en LMC por sus conocidos efectos oncogénicos en otros tumores o modelos. Algunos de los más relevantes serían:

- **CEBP α** : es un factor de transcripción que representa un papel importante en la diferenciación mieloide. Los niveles de proteína CEBP α están bajos en la FC de LMC. Esto se debe a que BCR-ABL aumenta la expresión de una ribonucleoproteína (hnRNPE2) que bloquea la traducción del mRNA de CEBP α ²⁴.

- **SPI1** (también llamado PU.1): es un factor de transcripción de la familia ETS y es también necesario para la diferenciación de varios linajes mieloides²⁵. Nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión es reprimida en LMC y que en pacientes que responden al imatinib se restauran los niveles de PU.1 a los niveles altos encontrados en médula ósea sana²⁶. Por tanto, la represión de CEBP α y de PU.1 registrados en la progresión de LMC contribuiría al bloqueo de la diferenciación que caracteriza esta transformación.

- **MYC**: es un gen con actividad antidiferenciadora en múltiples modelos²⁷. Además, MYC contribuye a la inestabilidad genómica²⁸. La actividad transformante de BCR-ABL en células de médula ósea murina requiere MYC²⁹ y la actividad quinasa de BCR-ABL mantiene altos niveles de expresión de MYC en líneas derivadas de LMC humana³⁰. Nuestro laboratorio ha demostrado un aumento de MYC en LMC y que la expresión alta de MYC al diagnóstico implica una menor probabilidad de respuesta al imatinib (M. Albajar *et al.*, manuscrito enviado). El gen MYC mapea en 8q24, lo que implica que estas LMC tienen una dosis génica mayor de este oncogén, aunque no está claro que esto se traduzca en mayor expresión de MYC. Por tanto, un aumento de MYC contribuiría al bloqueo de la diferenciación y al aumento de la inestabilidad genómica.

- **JUNB**: es un factor de transcripción de la familia JUN/FOS cuya expresión es menor en la FC respecto a controles sanos y aún menor en la CB. JUNB es un gen que determina diferenciación mieloeritroide e in-

teresantemente, ratones deficientes en JunB desarrollan un síndrome semejante a la LMC, incluyendo la progresión a CB³¹.

- **LYN** es una quinasa citoplásmica de la familia de SRC, al igual que ABL. Se encuentra sobreexpresada y activada (fosforilada) en fases avanzadas de FC y CB, incluso en presencia de tratamiento con imatinib. Sin embargo, el imatinib inactiva LYN en FC. Esto ilustra el cambio genético que ocurre en la transformación blástica. El silenciamiento de LYN provoca la apoptosis de células de CB, lo que indica que los efectos de BCR-ABL son en parte debidos LYN³².

Genes identificados comparando perfiles transcripcionales de FC y CB

La implantación de la tecnología de hibridación de microrarrays y, más recientemente, el de secuenciación masiva paralela de mRNA permite estudiar la expresión de todo del genoma completo de una muestra. La LMC es especialmente adecuada para determinar el “perfil de expresión genética” por sus fases bien definidas. Recientemente, se han publicado estudios comparativos de los perfiles de expresión entre células de LMC y de médula ósea sana, entre FC y CB, o entre FC de pacientes que responden y que no responden a imatinib. En la Tabla 3 se presenta un resumen describiendo estos estudios, así como los genes que cambian más significativamente en cada uno de ellos. Algunas conclusiones de estos estudios transcripcionales a gran escala son:

- 1) El perfil de expresión de la fase acelerada es muy similar al de la CB4.

- 2) El perfil de expresión de las células de CB de médula ósea es diferente del de CB de sangre periférica³³.

- 3) No aparecen como regulados entre FC y CB la mayoría de los genes validados a nivel individual (Tabla 2), aunque sí algunos (FYN, PRAME, SOCS2). Sin embargo, estos estudios han sacado a la luz nuevos candidatos para su estudio individual en cohortes de muestras mayores.

- 4) Los genes regulados en CB no tienen que ver con la actividad de BCR-ABL, aunque se identifica un grupo significativo de genes relacionados con la ruta de activación de β -catenina⁴.

- 5) La mayoría de los genes identificados como relevantes en estos cribados no aparecen implicados en otros tumores y leucemias.

- 6) En conjunto, el perfil de expresión de los pacientes que no responden al imatinib se asemeja al de fases avanzadas (FC avanzada o CB) de la enfermedad.

- 7) Hay muy poca coincidencia de genes entre los distintos estudios (Tabla 3), e incluso para algún gen, se han descrito resultados opuestos. Sin embargo, sí se detectan algunas coincidencias. Por ejemplo, cinco genes (CSTA, RNASE3, PRTN3, PLAUR y MPO) están regula-

Tabla 2. Genes regulados en LMC versus controles sanos y en FC versus CB. La lista no pretende ser completa. Los genes se han listado por orden alfabético y aparecen según la nomenclatura HUGO. Salvo que se indique otra cosa, los cambios se refieren al nivel de mRNA

<i>Gen</i>	<i>Regulación</i>	<i>Proteína/RNA</i>	<i>Función</i>
AICDA	Aumento en CB (linfoide)	Citidina-deaminasa	Hipermutación de linfocitos
BCL6	Aumento en CB	Factor de transcripción oncogénico	Maduración de linfocitos
BCLX	Aumento en CML vs sanos	Proteína mitocondrial	Inhibición de apoptosis
BMI1	Aumento en CB	Proteína tipo polycomb	Regulación de la expresión y estado de la cromatina
BRCA1	Descenso en CB	Proteína de reparación de DNA	Oncosupresión
CEBPA	Descenso en CB (proteína)	Factor de transcripción (C/EBP α)	Diferenciación mieloide
FYN	Aumento en CB	Proteína-tirosina quinasa de la familia ABL/SRC	Oncoproteína. Promueve proliferación
FZD2	Aumento en CB	Receptor de factores Wnt	Activación de β -catenina
GATA2	Aumento en CB	Factor de transcripción	Diferenciación mieloide
GFI1	Aumento en CML vs. sanos	Factor de transcripción	Hematopoyesis
HCK	Aumenta en CB	Proteína-tirosina quinasa de la familia ABL/SRC	Hematopoyesis. Activado por BCR-ABL
HES1	Aumento en CB	Factor de transcripción	Autorrenovación de células madre. Gen diana de Notch
hnRNPE2	Aumento en CB	Ribonucleoproteína nuclear	Regulación de la traducción de mRNA
HOXA10	Aumento en CB	Factor de transcripción tipo homeodominio	Desarrollo y hematopoyesis
HOXB4	Descensos en CB	Factor de transcripción tipo homeodominio	Desarrollo y hematopoyesis
IKZF1	Descenso/delección en CB linfoide	Factor de transcripción	Diferenciación linfoide
JUNB	Descenso en CML vs. sanos Descenso en CB	Factor de transcripción tipo cremallera de leucinas	Proliferación y diferenciación mieloide
LYN	Aumento en CB	Proteína-tirosina quinasa de la familia ABL/SRC	Proteína-tirosina quinasa de la familia ABL/SRC
miR-328	Descenso en CB	Micro-RNA	Represión génica. Provoca apoptosis de blastos
miR-150	Descenso en CB	Micro-RNA	Represión génica. Reprime Myb y aumenta diferenciación eritroide
MSI2	Aumento en CB	Proteína de unión a RNA	Oncoproteína. Reprime Numb
MYC	Aumento en CML vs. MO sana	Factor de transcripción	Oncoproteína. Promueve proliferación y bloquea diferenciación
NUMB	Descenso en CB	Proteína citoplásmica	Reprime señalización por Notch
PTCH1	Aumento en CB	Receptor de los factores Shh	Desarrollo temprano y mantenimiento de células madre
PP2A	Descenso en CB (actividad)	Proteína fosfatasa	Activación del oncosupresor RB. Inactivación de JAK2 y STAT5
PRAME	Aumento en CB	Proteína nuclear	Represión de RAR α . Elevado en leucemia mieloide e inducido por BCR-ABL
PRDM2	Descenso en CB	Factor de transcripción de tipo dedos de Zn	Regulación transcripcional. Silenciado en tumores
SET	Aumento en CB	Chaperona	Inhibición de PP2A
SOCS2	Aumento en CB	Proteína citoplásmica supresora de señalización por citoquinas	Inhibición de la activación de JAK y STAT
SPI1/PU.1	Descenso en LMC vs. sanos	Factor de transcripción de la familia ETS	Diferenciación mieloide. Oncoproteína en eritroleucemia
SUZ12	Aumento en CB	Proteína tipo polycomb	Regulación de la expresión y estado de la cromatina

Tabla 3. Cambios de expresión entre FC y CB detectado por cribados en gran escala basados en microarrays. La respuesta (meses para alcanzar la respuesta citogenética mayor) es la definida en cada publicación. Se recogen los genes que muestran en cada estudio un mayor cambio entre las cohortes de LMC indicadas en cada caso

Estudio	Comparación	Genes	Cambio	Muestras y plataforma
Ohmine <i>et al.</i> , 2001	FC vs. CB	PIASy, DPAK3	Descenso en CB	Células CD34+ de 7 FC, 2 FA y 4 CB Mi-O (Mergen)
		DDB1, NDUFB8	Aumento en CB	
Nowicki <i>et al.</i> , 2003	FC vs. CB	AML1, AF1Q, ETS2, LYL1, GBDR1, NME1, GRO2, CA4, SNC73 MSF	Aumento	Células de MO de 5 FC y 5 CB. Células de SP de 5 CB mieloides Mi-O (Affymetrix)
McLean <i>et al.</i> , 2004	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	RAD9, SMC1L1, RAB2, VRK1, FVT1, GIT2, JKA1, H9G3, MYLK, PKIG, REL, SFRS3	Aumento en no-respondedores	SP de 66 LMC antes y después del tratamiento con imatinib Mi-O (Affymetrix)
		AS3, ADD2, CXCR3, PPP2R2A, SNTB2, CRHR2, PAK1, PI3KR1, PIK3R3, TRAF5, AQP4, CREB1, TRIP6	Descenso en no-respondedores	
Crossman <i>et al.</i> , 2005	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	AES, OPTN, CLU	Aumento en no-respondedores (no significativo)	Células de MO y SP de 16 respondedores y 13 no-respondedores Mi-O (Affymetrix)
		UGCG, LMNB1, LMAP2, BAX, MTHFS	Descenso en no-respondedores (no significativo)	
Janssen <i>et al.</i> , 2005	FC vs. CB	MMRN, NACSIN, LARS	Aumento en CB	Células de SP de 1 LMC en al diagnóstico, 2 años de FC y CB) Hibridación sustractiva
		IL8, FPR1, LYZ, MEN	Descenso en CB	
Radich <i>et al.</i> , 2006	FC vs. CB	GLI2, PRAME, SOCS2, WT1, GAS2, MDF1, RRAS2, ITPR1	Aumento en CB	Células de MO de 42 FC, 17 FA y 28 CB Mi-O (Affymetrix)
	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	CTRL, MAP21K14, CLK3, MKNK2, FYN, ABCC3	Aumento en la recaída postimatinib	Células de MO de 15 LMC resistentes a imatinib. Mi-O (Affymetrix)
Yong <i>et al.</i> , 2006	LMC indolente vs. LMC agresiva	CD7, SMAA4, CEBPA	Aumento en LMC agresiva	Células CD34+ de 10 casos de LMC indolente (FC larga) y 9 de LMC agresiva (FC de rápida progresión a CB). Validado len 68 LMCs. Mi-O (Affymetix)
		PR3, ELA2, DF, MBP, STARD1	Descenso en LMC agresiva	
Pizzatti <i>et al.</i> , 2006	Controles vs. FC	MYCBP, 53BP1, MDM4, OSBP-RP3, Mortalin	Aumento (proteína)	Células de MO de 13 donantes sanos y 17 FC. Estudio proteómico
Villuendas <i>et al.</i> , 2006	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	DSG1, BCL2L2, PTPN22 SRR, FZD5, PTGS1 BIRC4, SOCS2, DEDD FZD7, HD CYP2B6, PPARA	Aumenta en los no-respondedores	Células de MO 32 LMC y 3 controles. Mi-C (Oncochip)
		PRDX2 SLC2A1 TNC	Disminuye en los no-respondedores	
Oehler <i>et al.</i> , 2009	FC vs. CB	NOB1, DDX47, , SCARB1, SLC25A3	Aumento en CB	Células de MO de 42 FC y 51 de FA+CB Mi-O (Rosetta)
		LTB4R, IGSF2	Descenso en CB	
Bruns <i>et al.</i> , 2009	Controles vs. LMC (células madre hematopoyéticas)	CDH2, CXCR4 PDE4B TLE4, NR4A3, MZF1, FOS, FLT3. PROM.MS4A3, RASA3, GTSE1	Descenso No se describen aumentos	Diferentes subpoblaciones de CD34+ de 6 LMC al diagnóstico y 5 controles sanos. Mi-O (Affymetrix)
De Lavallade <i>et al.</i> , 2010	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	KIF23, DDX11, CENPP, SLFN13, RAD51L1, BUB1, ORC6L, SMC4, EZH2, NUP85, AURKB, GUSBP1, FANCA, POLQ, PDE4D, DERA	Aumento en los no-respondedores	Células de SP de 8 respondedores y 7 no-respondedores Mi-O (Affymetrix)
McWeeney <i>et al.</i> , 2010	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	VWF, ANGPT1, EGFL6, MUC4 MMRN1, ITGA2, ITGB8, EVA1, ZNF44, MEIS1, NFIB ZNF140, ZNF253	Aumento en no-respondedores	Células CD34+ de 23 respondedores y 12 no-respondedores a imatinib Mi-O (Affymetrix)
		CEBPB, MAFB, CSTA, RNASE3, PRTN3, PLAUR, MPO	Descenso en no-respondedores	

FA: fase acelerada; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

Las plataformas de análisis del perfil transcripcional son: Mi-O: microarrays de oligonucleótidos; Mi-C: microarrays de cDNA.

dos negativamente en tres estudios que comparan perfiles de expresión en las LMC de progresión rápida *versus* lenta (FC largas)³⁴ en las CB *versus* FC³⁵ y en no-respondedores *versus* respondedores³⁴. Sin embargo, en un estudio similar a este último no se han encontrado genes coincidentes con los anteriores³⁶. En algún estudio no se llegan a encontrar diferencias estadísticamente significativas entre respondedores y no-respondedores³⁶.

El último punto de arriba llama la atención. En principio, parece sorprendente la poca concordancia entre los genes identificados en los distintos estudios de expresión a larga escala realizados hasta ahora. ¿Por qué no aparecen los mismos genes en los distintos estudios de perfil genético? Se pueden proponer varias explicaciones a este hecho:

1) La LMC es una enfermedad más heterogénea de lo que parece. A pesar de la casi universal presencia del cromosoma Ph y de la expresión de BCR-ABL, la larga evolución en FC hace que cada paciente sea diagnosticado en un estadio diferente en cuanto a cambios genéticos.

2) El origen de las células utilizadas para la preparación de mRNA difiere de un estudio a otro: mononucleares de médula ósea, CD34+ de médula ósea, mononucleares de sangre periférica.

3) Pequeños cambios en los niveles de mRNA (dos veces o menos) pueden ser relevantes según el gen de que se trate, pero son filtrados por las herramientas de análisis estadístico de los datos de microarrays. Por ejemplo, cambios de expresión de sólo dos veces de MYC tiene efectos drásticos en su capacidad transformante²⁷.

4) Los “genes positivos” que resultan de cada experimento de microarray pueden variar mucho según el método estadístico de análisis. Sirva como ejemplo que sólo 11 de 150 genes identificados en muestras de LLC son coincidentes al analizar los mismos datos crudos con tres métodos estadísticos diferentes³⁷.

Por último, es muy importante tener en cuenta que los cambios a nivel de mRNA pueden no correlacionarse con la proteína: la estabilización de ciertas oncoproteínas puede aumentar drásticamente sus niveles y ser determinantes en la progresión de la LMC y, sin embargo, sus genes no van a ser detectados como regulados con análisis de microarrays ni RT-PCR.

Conclusiones

Gracias al imatinib y otros inhibidores de la actividad quinasa de la BCR-ABL se ha conseguido retrasar significativamente la progresión de fase crónica a crisis blástica de la LMC. A pesar de ello, persiste el reto científico de conocer por qué aparece la CB. Dado que la aparición de la CB implica un pronóstico fatal en casi todos los casos, este conocimiento tiene una gran relevancia clínica. La progresión se asocia a un bloqueo de la diferenciación

mieloide, un aumento de la inestabilidad genómica y la inactivación de una serie de genes oncosupresores.

Además de la persistente expresión de BCR-ABL, y posiblemente debida a ella, se acumulan una serie de cambios genéticos adicionales que dan cuenta de la transformación. Se han identificado al menos unos 20 genes que se regulan en dicha transformación y las funciones de muchos de ellos son consistentes con el fenotipo de la crisis blástica. También se han hecho recientemente una docena de estudios transcripcionales a gran escala que confirman que el perfil genético de las células de CB difiere bastante del de FC. Estos estudios han sacado a la luz numerosos genes con expresión diferencial entre ambas fases de la leucemia, así como entre muestras de LMC y de médula ósea sana. Aunque hay poca coincidencia en los estudios publicados, la expectativa es que en los próximos años se aporte información de muchos otros estudios de perfil de expresión en las que los cohortes de muestras sean cada vez mayores y mejor seleccionadas. Esto permitirá ir conformando una “firma genética” capaz de predecir el pronóstico de la LMC, explicar mejor las bases moleculares de la transformación blástica y alumbrar nuevas dianas para fármacos que se puedan usar junto con inhibidores de BCR-ABL para controlar la LMC.

Agradecimientos

El grupo de investigación está financiado por proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF08-01581) y del Instituto Carlos III (RD06/0020/017 de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer).

Bibliografía

1. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113: 1619-30.
2. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood* 2004; 103: 4010-22.
3. Melo JV, Bames DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 441-53.
4. Radich JP, Dai H, Mao M, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2794-9.
5. Wong S, Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 247-306.
6. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003; 349: 1451-64.
7. Thomas EK, Cancelas JA, Chae HD, et al. Rac guanosine triphosphatases represent integrating molecular therapeutic targets for BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Cancer Cell* 2007; 12: 467-78.
8. Coluccia AM, Vacca A, Dunach M, et al. Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *Embo J* 2007; 26: 1456-66.
9. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 172-183.

10. Bruns I, Czibere A, Fischer JC, et al. The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia* 2009; 23: 892-9.
11. Skorski T. Genomic instability: The cause and effect of BCR/ABL tyrosine kinase. *Curr Hematol Malig Rep* 2007; 2: 69-74.
12. Burke BA, Carroll M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2010.
13. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351: 657-67.
14. Savona M, Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 341-50.
15. Stuart SA, Minami Y, Wang JY. The CML stem cell: evolution of the progenitor. *Cell Cycle* 2009; 8: 1338-43.
16. Boulwood J, Perry J, Zaman R, et al. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. *Leukemia* 2010.
17. Fourouclas N, Campbell PJ, Bench AJ, et al. Size matters: the prognostic implications of large and small deletions of the derivative 9 chromosome in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 952-5.
18. Keller G, Brassat U, Braig M, Heim D, Wege H, Brummendorf TH. Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. *Hematol Oncol* 2009; 27: 123-9.
19. Drummond M, Lennard A, Brummendorf T, Holyoake T. Telomere shortening correlates with prognostic score at diagnosis and proceeds rapidly during progression of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1775-81.
20. Beck Z, Kiss A, Toth FD, et al. Alterations of P53 and RB genes and the evolution of the accelerated phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000; 38: 587-97.
21. Feinstein E, Cimino G, Gale RP, et al. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 6293-7.
22. Sill H, Goldman JM, Cross NC. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 85: 2013-6.
23. Neviani P, Santhanam R, Trotta R, et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* 2005; 8: 355-68.
24. Perrotti D, Cesi V, Trotta R, et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 2002; 30: 48-58.
25. Koschmieder S, Rosenbauer F, Steidl U, Owens BM, Tenen DG. Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia. *Int J Hematol* 2005; 81: 368-77.
26. Albajar M, Gutiérrez P, Richard C, et al. PU.1 expression is restored upon treatment of chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Lett* 2008; 270: 328-36.
27. Leon J, Ferrandiz N, Acosta JC, Delgado MD. Inhibition of cell differentiation: a critical mechanism for MYC-mediated carcinogenesis? *Cell Cycle* 2009; 8: 1148-57.
28. Prochowik EV. c-Myc: linking transformation and genomic instability. *Curr Mol Med* 2008; 8: 446-58.
29. Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 1992; 70: 901-10.
30. Gómez-Casares MT, Vaque JP, Lemes A, Molero T, Delgado MD, Leon J. C-myc expression in cell lines derived from chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2004; 89: 241-3.
31. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* 2004; 119: 431-43.
32. Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, Emerson SG, Gewirtz AM. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med* 2004; 10: 1187-9.
33. Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, Hess G, Pawlowski T, Skorski T. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene* 2003; 22: 3952-63.
34. McWeeney SK, Pemberton LC, Loriaux MM, et al. A gene expression signature of CD34+ cells to predict major cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Blood* 2010; 115: 315-25.
35. Zheng C, Li L, Haak M, et al. Gene expression profiling of CD34+ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia* 2006; 20: 1028-34.
36. Crossman LC, Mori M, Hsieh YC, et al. In chronic myeloid leukemia white cells from cytogenetic responders and non-responders to imatinib have very similar gene expression signatures. *Haematologica* 2005; 90: 459-64.
37. Abruzzo LV, Wang J, Kapoor M, et al. Biological validation of differentially expressed genes in chronic lymphocytic leukemia identified by applying multiple statistical methods to oligonucleotide microarrays. *J Mol Diagn* 2005; 7: 337-45.

ATYPICAL MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS: NEW INSIGHTS INTO PATHOGENESIS

F. GRAND¹, N.P. CROSS²

¹ Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury (UK)

² Human Genetics Division, University of Southampton, Southampton (UK)

Introduction

William Dameshek first described the spectrum of MPN in 1951. 'Atypical myeloproliferative disorders' is a general term for a group of myeloproliferative disorders that cannot be categorised as one of the four 'classic' MPNs: chronic myeloid leukaemia (CML), essential thrombocythaemia (ET), polycythaemia vera (PV) or primary myelofibrosis (PMF). Atypical MPNs are highly heterogeneous and span the current WHO subgroups of chronic MPNs and myelodysplastic/myeloproliferative disorders (MDS/MPN).¹ Specific WHO-defined entities within the umbrella term of atypical MPNs include atypical CML (aCML), chronic neutrophilic leukaemia (CNL), chronic eosinophilic leukaemia (CEL), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML), CMPN-unclassified and MDS/MPN-unclassified. Many people would also include systemic mastocytosis (SM) under the same category.

Chromosomes and fusion genes

The vast majority of patients with atypical MPNs present with a normal or aneuploid karyotype, i.e. gains or