

# Nye sygdomsmarkører ved de kroniske myeloproliferative neoplasier

Morten Orebo Holmström<sup>1</sup>, Lukas Frans Ocias<sup>2</sup>, Klaus Kallenbach<sup>3</sup>, Lasse Kjær<sup>1</sup>, Thomas Kielsgaard Kristensen<sup>4</sup>, Niels Pallisgaard<sup>5</sup>, Bodil Laub Petersen<sup>3</sup>, Vibe Skov<sup>1</sup>, Karin de Stricker<sup>4</sup>, Thomas Stauffer Larsen<sup>2</sup> & Hans Carl Hasselbalch<sup>1</sup>

## STATUSARTIKEL

- 1) Hæmatologisk Afdeling, Roskilde Sygehus
- 2) Hæmatologisk Afdeling, Odense Universitetshospital
- 3) Patologiafdelingen, Roskilde Sygehus
- 4) Afdeling for Klinisk Patologi, Odense Universitetshospital
- 5) Klinisk Biokemisk Afdeling, Vejle Sygehus

Ugeskr Læger  
2015;177:V12140653

Essentiel trombocytose (ET) (**Figur 1**), polycytaemia vera (PV) og primær myelofibrose (PMF) (**Figur 2**) repræsenterer de klassiske myeloproliferative neoplasier (MPN). Det er hæmatologiske kræftsygdomme, som udgår fra knoglemarvens stamceller. Kendetegnet ved sygdommene er en autonomt hyperprolifererende knoglemarv, som resulterer i overproduktion af en eller flere af blodets modne celler. Klinisk ses en øget risiko for tromboemboli og/eller blødninger, samt varierende symptomer fra mikrocirkulationen, hypermetabole symptomer og hudkløe. PV og ET kan progredierte til post-PV- eller post-ET-myelofibrose, og alle tre typer MPN kan progredierte til akut myeloid leukæmi (AML) [1]. Allerede i 1951 introducerede *Dameshek* konceptet om et nært slægtskab mellem de tre sygdomme [2], hvilket molekylærbiologisk blev bekræftet i 2005 ved identifikationen af V617F-mutationen i *JAK2* hos 98% af patienterne med PV og ca. 50% af patienterne med ET og PMF [3]. Mutationen medfører en ændring af valin til fenylalanin i kodon 617, hvorfor mutationen benævnes *JAK2*-V617F.

*JAK2* koder for Januskinase (*JAK*) 2, en proteinkinase, som aktiveres af bl.a. erythropoietinreceptoren og trombopoietinreceptoren (*TPOR*). *JAK2*-mutationen resulterer i en liganduafhængig aktivering af *JAK2*, der aktiverer nedstrømscellulære signalveje, bl.a. *signal transducer and activator of transcription* (*STAT*), der inducerer celleproliferation [1, 4]. Fundet af *JAK2*-mutationen har bidraget med ny viden om patofysiologien og patogenesen bag MPN samt forenklet diagnostikken, som tidligere beskrevet i *Ugeskrift for Læger* [5]. Diagnosticering af *JAK2*-negativ ET og PMF har pga. fraværet af klonale markører været en udfordring. Formålet med denne artikel er at beskrive de senere års nye molekylærbiologiske landvindinger inden for sygdomsgruppen, herunder bl.a. *MPL*-mutationen og det seneste molekylærbiologiske gennembrud – identifikationen af mutationer i *calretikulin-genet* (*CALR*).

## MPL-MUTATION VED MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASIER

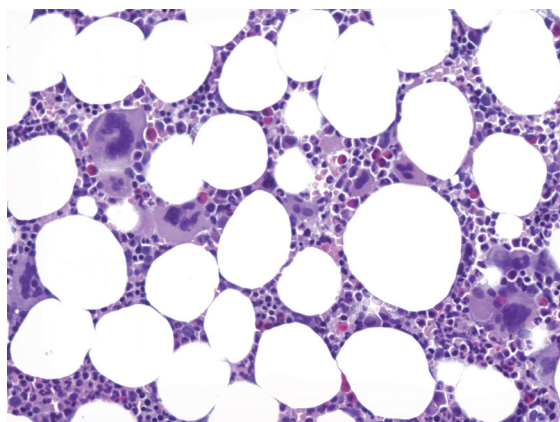
Allerede i 2006 identificeredes ved PMF en mutation i kodon 515 i *MPL*, der koder for *TPOR*. Mutationen indebærer en ændring af tryptofan til leucin og medfører en cytokinuafhængig vækst samt konstitutiv aktivering af *JAK2* og de intracellulære proteiner *STAT3* og *STAT5* [6]. Mutationen er senere påvist hos patienter med ET, således at ca. 5% af alle *JAK2*-negative ET- og PMF-patienter har mutation i *MPL* [7, 8]. Mutationen påvirker *TPOR*'s juxtamembranøse cytoplasmatiske del, som forhindrer spontan aktivering af receptoren, hvilket stimulerer til celleproliferation. Siden er der beskrevet flere varianter af *MPL*-mutationen, og der er identificeret patienter med samtidig *MPL*- og *JAK2*-mutation [7].

## CALRETIKULINS BIOLOGI

På trods af fundet af *MPL*-mutationen manglede der indtil for nylig en markør for størstedelen af de *JAK2*-negative patienter med PMF eller ET. Gennembruddet kom i december 2013, da to uafhængige forskergrupper publicerede resultater, der påviste flere mutationstyper i *CALR*, som koder for proteinet *calretikulin* (*CALR*).

**FIGUR 1**

Mikroskopibillede af hæmatoxylin-eosin-farvet knoglemarvsbiopsi fra en 45-årig patient med essentiel trombocytose. Marven er normocellulær, og der ses et øget antal megakaryocytter, som er lejret både diffust og i klynger. Størstedelen af megakaryocytterne er store med hyperlobulerede kerner (staghornceller).



CALR er et protein på 46 kilodalton og er højt konserveret mellem arterne. CALR er 3,6 kilobasepar stort, sidder på kromosom 19 og består af 9 exoner og 8 introner [9]. Proteinet er opdelt i tre domæner: N-, P- og C-domænet, hvor N-domænet interagerer med chaperoner (proteiner, der faciliterer korrekt foldning af proteiner ved deres syntese), og P- samt C-domænet, der binder calcium. C-domænet er surt pga. mange negativt ladede aminosyrer og indeholder et retentionssignal, som varetager tilbageføring af CALR fra golgiapparatet til det endoplasmatiske retikulum (ER) [10].

Proteinet er lokaliseret til ER-lumen, cytosolen samt plasmamembranen, hvori øgede mængder udtrykkes ved brystcancer, hepatocellulært karcinom og prostatacancer [9, 11]. Proteinet er centralt for reguleringen af den intracellulære calciumkoncentration og indgår som chaperone i foldningen af *major histocompatibility complex I*-molekylet. CALR er desuden påvist at modulere aktiviteten i STAT3-systemet gennem chaperonen ERp57.

#### Strukturelle og funktionelle konsekvenser af CALR-mutation

CALR-mutationerne ved MPN er alle somatiske mutationer, som er lokaliseret til exon 9 (Figur 3), der koder for den sure C-terminal. Mutationerne introducerer et skift i proteinets læseramme, hvilket medfører tab af ER-retentionssignalet og en ændring af C-terminalens surhedsgrad, så denne bliver mere basisk [11]. Indtil videre er der beskrevet 41 forskellige mutationer – de fleste insertioner eller deletioner og enkelte komplekse rearrangementer [12]. Størstedelen af mutationerne – 50-80% – udgøres af en 52-bp-deletion (type 1) eller en 5-bp-insertion (type 2). Type 1 medfører tab af alle negativt ladede aminosyrer i C-terminalen, og type 2 medfører tab af halvdelen [11].

Funktionelt har type 1-mutationen vist sig at inducere cytokinuafhængig vækst og øge sensitiviteten for interleukin 3 samt øge mængden af aktiveret STAT. Den cytokinuafhængige celleproliferation hæmmes af JAK-inhibitor, hvilket kan tolkes som, at celleproliferationen ved CALR-mutation er afhængig af JAK-STAT-systemet [13]. Dette fund understøttes af, at man vha. computerprogrammer har regnet sig frem til, at netop mutationer til første læseramme danner fosforyleringssites på CALR, som dermed kan aktivere nedstrømscellulære signalveje.

Mængden af CALR, der udtrykkes på plasmamembranens overflade, ændres ikke med mutation [14], og i longitudinelle retrospektive studier er det påvist, at CALR-mutationerne modsat JAK2-mutationen opstår tidligt i udviklingen af MPN [14].

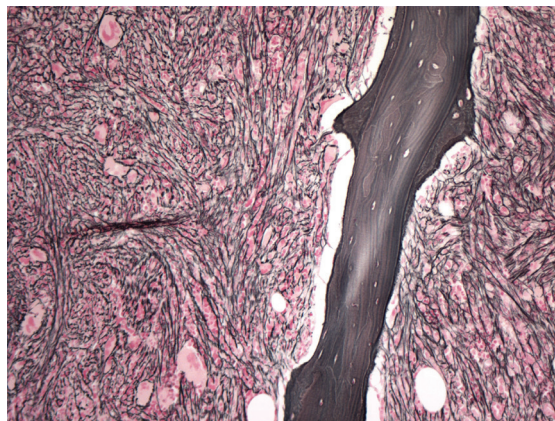
CALR-mutationer forekommer i familier med op-

#### ! FORKORTELSER

AML = akut myeloid leukæmi  
 CALR = calretikulin  
 ER = endoplasmatisk retikulum  
 ET = essentiel trombocytose  
 JAK = Januskinase  
 MPN = kronisk myeloproliferativ neoplas  
 PMF = primær myelofibrose  
 PV = polycythaemia vera  
 STAT = *signal transducer and activator of transcription*  
 TPOR = trombopoietinreceptor

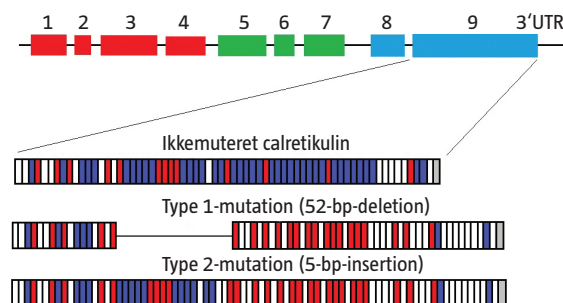
#### FIGUR 2

Mikroskopibillede af en retikulinfarvet knoglemarvsbiopsi med grad 3-retikulinfibrose fra en 63-årig patient med myelofibrose. De tætte, sorte streger udgøres af retikulinfibre.



#### FIGUR 3

Skematisk tegning af CALR og dets ni exoner. Nedenfor ses en skematisk angivelse af aminosyresekvensen i exon 9 for hhv. vildtype-calretikulin samt for de to hyppigste mutationstyper ved kronisk myeloproliferativ neoplas. Hver enkelt vertikalbarre repræsenterer en aminosyre, hvor hvid angiver neutral ladning, blå en negativ ladning, rød en positiv ladning og grå et stopkodon. Frit efter [13].





## FAKTABOKS

De kroniske Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasier (MPN) omfatter essentiel trombocytose (ET), polycythaemia vera (PV) og primær myelofibrose (PMF).

Mutation i *MPL*, der koder for trombopoietinreceptoren, ses hos ca. 5% af patienterne med *JAK2*-muteret PMF og ET.

*CALR* koder for calretikulín – et protein, der bl.a. fungerer som chaperone og calciumlager.

Mutation i *CALR* er en nyopdaget mutation, der findes hos 16-28% af alle med ET og 25-35% af patienterne med PMF samt nogle få procent med myelodysplastisk syndrom.

*CALR*-muteret ET er ift. *JAK2*-muteret ET associeret med lavere alder, lavere leukocytaltal, lavere hæmoglobiniveau, højere trombocytaltal og lavere risiko for tromboemboliske episoder.

*CALR*-muteret PMF er ift. *JAK2*-muteret PMF associeret med lavere alder, lavere leukocytaltal, højere trombocytaltal, lavere risikoscore og bedre overlevelse.

*CALR*-mutation danner et muteret protein, der har potentiale som mål for immunterapi.

hobning af MPN og er alle somatiske, hvilket tyder på en ukendt arvelig genetisk læsion eller konstellation, der øger risikoen for udvikling af såvel *JAK2*-muteret som *CALR*-muteret MPN [12, 15].

Ved hjælp af immunhistokemisk undersøgelse med monoklonale antistoffer rettet mod muteret *CALR* er det klarlagt, at *CALR* – både muteret og vildtype – udtrykkes mest i megakaryocytter samt deres forstadier og i mindre grad i erytroide og granulocytære forstadier [16].

*CALR*-mutationerne er undersøgt ved såvel myeloide som lymfoide neoplasier samt ved solide tumorer og forekommer kun i førstnævnte [13]. *CALR*-mutation er påvist hos enkelte patienter med myelodysplastisk syndrom, atypisk kronisk myeloid leukæmi og kronisk myelomonocytær leukæmi [13]. Initialt blev *CALR*-mutation opfattet som en mutation, der aldrig forekom sammen med *JAK2*-mutation, men efterfølgende er der beskrevet enkelte patienter med samtidig *CALR*- og *JAK2*-mutationer [12]. Derudover foreligger der en enkelt kasuistik om to patienter med *CALR*-muteret og *JAK2*-umuteret PV.

#### CALR-mutationer ved MPN

*CALR*-mutationer ses hos 16-28% af alle ET-patienter og hos 49-70% af de *JAK2*- og *MPL*-negative [13, 17-20]. Ved PMF ses mutation hos 25-35% af alle patienter og hos 56-88% af de *JAK2*- og *MPL*-negative [13, 14, 21, 22]. Samtidig ses en signifikant øget forekomst af type 1-mutation i forhold til type 2-mutation ved PMF [13, 14].

*CALR*-muteret ET adskiller sig fra *JAK2*-muteret ET ved, at patienterne er yngre [17-19], flere er af mandligt køn [17, 18], har lavere hæmoglobinniveau og lavere leukocytaltal [13, 17-19], højere trombocytaltal [13, 14, 17-19], lavere S-erythropoietinniveau

[18], lavere risiko for tromboemboliske episoder [13, 17-19] og færre mikrovaskulære symptomer [17]. Til gengæld ses der samme blødningsrisiko og risiko for progression til AML hos patienter med *CALR*-muteret ET som hos patienter med *JAK2*-muteret ET [17, 18]. I en enkelt kohorte fandt man øget risiko for post-ET-myelofibrose MF [14], hvilket dog ikke er påvist i et efterfølgende studie [18]. *CALR*-allelbyrden er større end den tilsvarende *JAK2*-allelbyrde hos de *JAK2*-muterede ET-patienter [18]. Type 2-mutation ved ET er ift. type 1-mutation associeret med signifikant højere trombocytaltal og lavere alder [23].

I to studier har man fundet en øget overlevelse for personer med *CALR*-muteret ET end for personer med *JAK2*-muteret ET, men efter justering for alder var forskellen i et af de to studier ikke signifikant [13, 18]. I tre andre studier, hvoraf det ene var et langtidsstudie med en medianfollowupperiode på 12,7 år, blev der ikke påvist nogen forskel i overlevelse [17, 19, 20].

Sammenlignet med *JAK2*-muteret PMF har patienter med *CALR*-mutation lavere alder, færre er anæmiske og transfusionskrævende, og de har lavere leukocytaltal, men højere trombocytaltal. *CALR*-mutation giver væsentligt bedre overlevelse med en medianoverlevelse på 8,2 år sammenlignet med 4,3 år for *JAK2*-muteret PMF [21].

Som ved ET ses der forskel på klinikken mellem type 1- og type 2-*CALR*-muteret PMF, idet type 2-mutation er associeret med leukocytaltal  $> 10 \times 10^9$ , større mængde cirkulerende myeloblaster og en tendens i retning af dårligere overlevelse [22]. I samme studie fandt man en tendens til, at type 2-*CALR*-muteret PMF fænotypisk er mere lig *JAK2*-muteret PMF end type 1-*CALR*-muteret PMF. Grundlaget for denne konklusion er dog meget spinkelt, idet der i studiet kun indgik ti patienter med type 2-muteret PMF [22].

På baggrund af de nye mutationer, herunder bl.a. *CALR*-mutationen og mutationen i *ASXL1*, der koder for det histonregulerende protein *additional sex combs like 1 (Drosophila)*, er der beskrevet nye prognosemodeller, hvor molekylærdiagnostikken indgår, som vigtige prognosemarkører til identifikation af patienter, som kan være kandidater til mere intensiv behandling i form af f.eks. allogent knoglemarvstransplantation [24].

#### TERAPEUTISKE IMPLIKATIONER OG PERSPEKTIVER

Behandling af *CALR*-muteret PMF med JAK-hæmmen ruxolitinib reducerer miltstørrelsen og mængden af cirkulerende trombocytter, og senest er det påvist, at interferon (INF)-alpha2 kan reducere *CALR*-mutationsallelbyrden [25] – helt tilsvarende reduktionen i

*JAK2*-allelbyrden under IFN-behandling [26]. I et retrospektivt studie med 133 patienter, som blev behandlet med allogen knoglemarvstransplantation var fireårsoverlevelsen ved *CALR*-muteret PMF 82% mod 56% ved *CALR*-umuteret PMF,  $p = 0,043$  ved univariat analyse og  $p = 0,094$  ved multivariat analyse [27].

*CALR*-mutationen kan måske få behandlingsmæssig betydning, idet muteret *CALR* muligvis er immunogent. *CALR* udtrykkes på celler i præapoptotisk fase, fungerer som et proapoptotisk signal og stimulerer dendritiske celler til fagocytose, hvilket igen stimulerer til et tumorspecifikt T-cellerespons [9, 11, 28]. Hermed er der skabt grundlag for immunologiske studier, der skal afdække helt nye terapimuligheder – vaccination og monoklonal antistofferterapi. Med komplementære immuncellestudier før og under behandling med IFN vil man yderligere kunne belyse IFN's effekt og virkningsmekanisme ved MPN-sygdommene. Vha. studierne vil man bl.a. kunne klarlægge, om *CALR*-muterede MPN-patienter har forandringer i cirkulerende immunceller identiske med dem, som er beskrevet hos *JAK2*-muterede patienter [29]. Signifikant flere *CALR*-muterede patienter, som har PMF og bliver behandlet med allogen knoglemarvstransplantation, får akut og kronisk *graft versus host disease*, hvilket tyder på, at muteret *CALR* har større immunstimulerende effekt end PMF [27], hvad der måske også vil få terapeutisk og prognostisk betydning.

Øget koncentration af anti-*CALR*-autoantistoffer er påvist hos bl.a. patienter med mave-tarm-cancer [30]. Tilsvarende studier af autoantistofdannelse over for *CALR*-mutationen hos MPN-patienter vil ved påvisning af autoantistoffer åbne op for prospektive studier, hvor man belyser den kliniske, terapeutiske og prognostiske betydning af forekomsten af autoantistoffer, herunder også om de kan anvendes som biomarkører for behandlingseffekt med bl.a. IFN.

## KONKLUSION

*CALR*-mutation er en ny vigtig sygdomsmarkør for MPN, og i Danmark er den allerede implementeret rutinemæssigt som led i udredningen for MPN. *CALR*-mutationsstatus har for PMF vist sig at være af prognostisk værdi, især kombineret med mutationsstatus for *ASXL1*. *CALR*-muteret ET og PMF adskiller sig klinisk fra *JAK2*-muteret sygdom og kan overordnet karakteriseres som værende mere indolent. Muteret *CALR* som mål for immunterapi er en teoretisk mulighed, som potentielt åbner nye perspektiver i forhold til behandling af MPN.

## SUMMARY

Morten Orebo Holmström, Lukas Frans Ocias, Klaus Kallenbach, Lasse Kjær, Thomas Kielsgaard Kristensen, Niels Pallisgaard, Bodil Laub Petersen, Vibe Skov, Karin de Stricker, Thomas Stauffer Larsen & Hans Carl Hasselbalch:

New disease markers within the chronic myeloproliferative neoplasms

Ugeskr Læger 2015;177:V12140653

The chaperone and calcium storing protein calreticulin is coded by *CALR*, and newly identified mutations in *CALR* are found in respectively 49-70% and 56-88% of *JAK2*- and *MPL*-negative patients with essential thrombocytaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). A total of 41 mutations have been identified, all located to exon 9 which codes the protein's C-terminal. *CALR* mutations are present only in myeloid malignancies and confer a more indolent disease than *JAK2*-mutated ET and PMF. *CALR* mutations as a diagnostic and prognostic tool are promising and the mutations are potential targets for immune therapy.

**KORRESPONDANCE:** Hans Carl Hasselbalch, Hæmatologisk Afdeling, Roskilde Sygehus, Køgevej 7-13, 4000 Roskilde. E-mail: hans.hasselbalch@dadlnet.dk

**ANTAGET:** 29. januar 2015

**PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK:** 4. maj 2015

**INTERESSEKONFLIKTER:** Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

## LITTERATUR

- Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006;355:2452-66.
- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6:372-5.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-90.
- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;112:2190-8.
- Larsen T, Pallisgaard N, Christensen J et al. Nye molekylære markører ved de kroniske myeloproliferative sygdomme. II. Janus tyrosinkinase 2-mutationen. *Ugeskr Læger* 2006;39:3299-303.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T et al. *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270.
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T et al. *MPL* 515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472-6.
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM et al. *MPL* mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008;112:141-9.
- Qiu Y, Michalak M. Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:531-8.
- Michalak M, Corbett E, Mesaali N. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 1999;292:281-92.
- Wang W, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:842-6.
- Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D et al. *CALR* exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* 2014;123:2416-9.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369:2379-90.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 2013;369:2391-405.
- Lundberg P, Nienhold R, Ambrosetti A et al. Somatic mutations in calreticulin can be found in pedigrees with familial predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123:2744-5.
- Vannucchi A, Rotunno G, Bartalucci N et al. Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia* 2014;28:1811-8.
- Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2013;123:1552-5.
- 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;123:1544-51.
- Fu R, Xuan M, Zhou Y et al. Analysis of calreticulin mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia: clinical implications in diagnosis, prognosis and treatment. *Leukemia* 2014;28:1912-4.



20. Tefferi A, Wassie E, Lasho TL et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2014;28:2300-3.
21. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28:1472-7.
22. Tefferi A, Lasho TL, Finke C et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* 2014;28:1568-70.
23. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol* 2014;89:E121-4.
24. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* 2014;28:1494-500.
25. Cassinat B, Verger E, Kiladjian J-J. Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2014;371:188-9.
26. Larsen TS, Møller MB, de Stricker K et al. Minimal residual disease and normalization of the bone marrow after long-term treatment with alpha-interferon2b in polycythemia vera. *Hematology* 2009;14:331-4.
27. Panagiota V, Thol F, Markus B et al. Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2014;28:1552-5.
28. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13:54-61.
29. Riley CH, Hansen M, Brimnes MK et al. Expansion of circulating CD56(bright) natural killer cells in patients with JAK2-positive chronic myeloproliferative neoplasms during treatment with interferon- $\alpha$ . *Eur J Haematol* 1. aug 2014 (epub ahead of print).
30. Pekáriková A, Sánchez D, Palová-Jelínková L et al. Calreticulin is a B cell molecular target in some gastrointestinal malignancies. *Clin Exp Immunol* 2010;160:215-22.