Mutations du gène CALR (CALR^{m}) dans les Néoplasies Myéloprolifératives (NMPs): Actualités scientifiques Aspects fonctionnels

Nabih Maslah

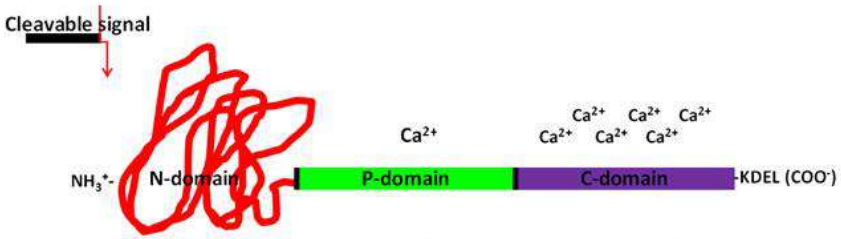
Unité de Biologie Cellulaire

GBMHM

08-10-2019

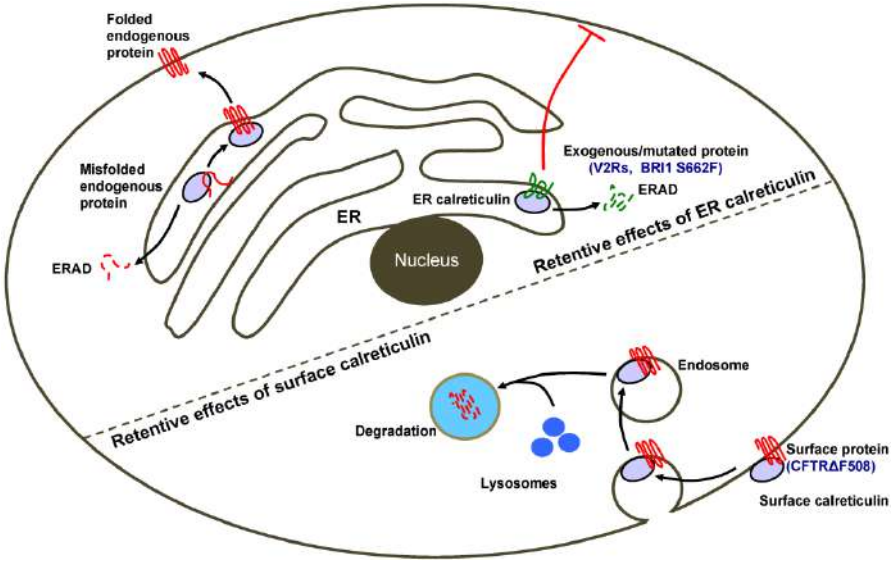
La Calréticuline sauvage (CALR^{WT})

- **Structure**
  - Chr. 19p13.13, 417 AA, 46 kDa
  - N-domaine: Chaperone - lectine
    Séquence signal RE
  - P-domaine: Calcium - lectine
  - C-ter domaine: Calcium - KDEL



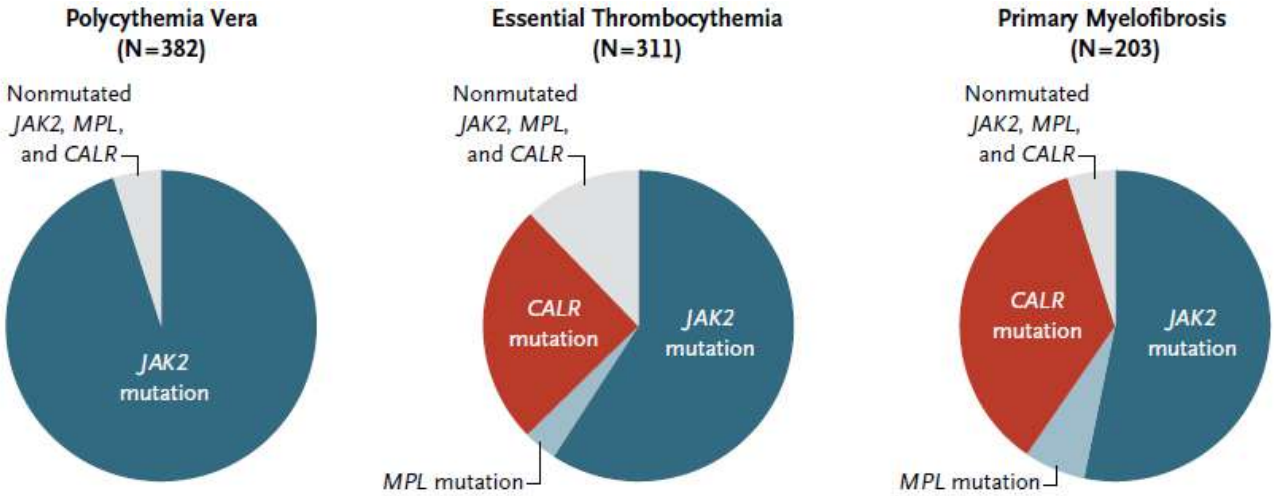
N	P	C
Globular domain Zn^{2+} binding Disulfide bond Chaperone function	Proline-rich Chaperone lectin-like function High affinity Ca^{2+} binding ERp57 binding	Acidic aminoacids Ca^{2+} buffering ER retention signal

- **Rôles physiologiques**:
  - Repliement des protéines
  - Homéostasie Ca2+

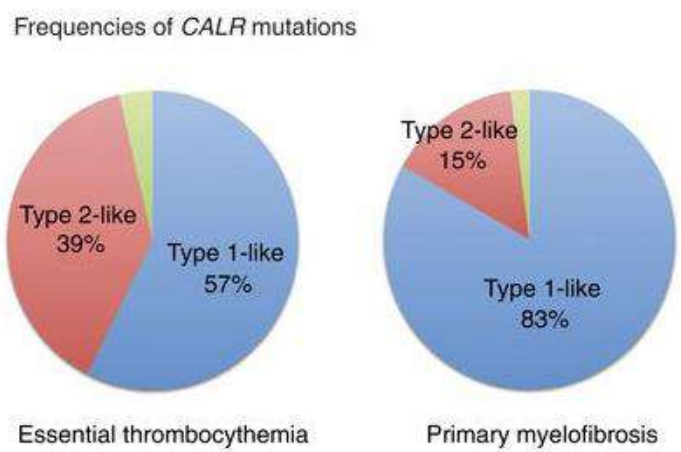


Lu et al, Biomed Res Int, 2015

Mutations CALR^m et NMPs



- Mutations dans 20%-25% des NMPs



Klampfl et al, NEJM, 2013
Nangalia et al, NEJM, 2013
Pietra et al, Leukemia, 2015

Impact clinique des NMPs CALR^{m} : *selon le driver*

		CALR versus *JAK2*	*CALR* versus *MPL*	*CALR* versus Triple Negative
ET	Clinical	Younger; male predominance; lower WBC; lower Hg/Hct; higher platelets	Male predominance; otherwise similar	Male predominance; higher platelets
	Thrombosis	Decreased risk	Decreased risk	Similar
	Post-ET myelofibrosis	Similar to increased	Similar	Similar
	Overall prognosis	Similar	Similar	Similar
PMF	Clinical	Younger; lower WBC; higher Hg/Hct; higher platelets	Younger; higher Hg/Hct; higher platelets	Younger; higher Hg/Hct; higher platelets
	Thrombosis	Similar, possibly decreased risk	Similar	Similar
	Leukemic transformation	Similar	Similar	Improved
	Overall prognosis	Improved*	Improved	Improved

How et al, Blood, 2019

Impact clinique des NMPs CALR^{m} *: selon le type de mutation*

	Type 1/like *CALR*	Type 2/like *CALR*
Most common mutation	52 bp deletion (L367fs*46)	5 bp insertion (K385fs*47)
Prevalence	More common in MF	More common in ET
Clinical (ET)	Similar; lower platelet counts compared to type 2/like	Similar; higher platelet counts compared to type 1/like
Clinical (MF)	Less splenomegaly, leukocytosis, anemia, circulating blasts; lower DIPSS score; higher platelets (all compared to type 2/like)	More splenomegaly, leukocytosis, anemia, circulating blasts; higher DIPSS score; lower platelets (all compared to type 1/like) More similar to *JAK2 V617F*
Post-ET myelofibrosis	Similar to/increased compared to type 2/like	Similar to/decreased compared to type 1/like
Overall prognosis (ET)	Similar to type 2/like	Similar to type 1/like
Overall prognosis (MF)	Improved compared to type 2/like and *JAK2 V617F*	Worsened compared to type 1/like More similar to *JAK2 V617F*

How et al, Blood, 2019

CALR^{m} et NMPs

- **Questions:**

  - **Mutations initiatrices de NMP ?**

  - **Mécanismes menant à un phénotype de NMP ?**

CALR^{m} et NMPs

- **Questions:**

  - **Mutations initiatrices de NMP ?**

  - **Mécanismes menant à un phénotype de NMP ?**

CALR^{m} : Initiation NMP

- **Mutation présente dans les CSH**

- Modèle: Transduction rétrovirale de CALR^{DEL} ou CALR^{INS} → fraction c-kit+ ou Lin-

- CALR^{DEL} et dans une moindre mesure CALR^{INS} :
  - Phénotype type TE
  - Hyperplasie mégacaryocytaire/Expansion CSH
  - CALR^{DEL} : Evolution Myélofibrose++
  - GBs et Ht: Non augmentés

  → Propriétés oncogéniques spécifiques de lignée

Nangalia et al, NEJM, 2013
Elf et al, Cancer Disc. 2016
Li et al, Blood, 2018
Marty et al, Blood, 2016
Shide et al, Leukemia, 2016

CALR^{m} : Initiation NMP

- CALR^{INS} : Propriétés oncogéniques plus faibles – Peu ou pas d'évolution vers une Myélofibrose
- Modèles transgéniques/knock-in (Promoteurs ubiquitaire ou CALR-endogène):
  - Phénotype de TE transplantable
  - Evolution vers la myélofibrose : Homozygotie++
- Phénotypes différents selon les modèles:
  - Cellules d'origine
  - Niveau d'expression des formes mutantes

- Différents modèles *in vivo* transplantables: **Présence HSC++**

Elf et al, Cancer Disc. 2016
Li et al, Blood, 2018
Marty et al, Blood, 2016
Shide et al, Leukemia, 2016

CALR^{m} et NMPs

- **Questions:**

  - **Mutations initiatrices de NMP ?**

  - **Mécanismes menant à un phénotype de NMP ?**

CALR^{WT} et hématopoïèse normale

- Expression au cours de la maturation myéloïde:
  - CD34+

  - CD34+

- CD34+ siCALR^{WT} / CALR^{WT} ++:
  - Différenciation Erythro/Méga
  - AutoR des CSH
  - Stress RE, UPR, inflammation et activation plaquettaire…

Gold et al, FASEB, 2010
Vannuchi et al, Leukemia, 2014
Salati et al, Stem Cell Dev, 2017

CALR^{m} et Hématopoïèse NMPs

- CALR^{m} :
  - Biais mégacaryopoïèse
  - Formation de proplaquettes++

- CALR^{m} exclusif JAK2-MPL:
  - ↘Expression MPL ou JAK2 dans CD34+ de TE: ↘pousse spontanée des progéniteurs mégacaryocytaires
  - Activation constitutive de la voie JAK2/STAT5 via MPL ?
  - GSEA: **signature JAK/STAT**, gènes de l'UPR++

Nangalia et al, NEJM, 2013
Rampal et al, Blood, 2014
Lau et al, Blood, 2015
Han et al, J Hematol Oncol, 2016

Mécanismes nécessaire à l'oncogénèse médiée par CALR^{m}

- **Comment CALR^{m} mènent à l'activation constitutive de la voie JAK2/STAT5 ?**

- Explications biochimiques multiples

CALR^{m} et NMPs: Profil mutationnel

Categorization of *CALR* mutations

Mutation	aa change	Protein
Type 5	E364G+L367fs*46	AAEKQMKDKQDECQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 37	E364fs*55	AAEKQMKDKQDEDAKRRRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 6	Q365fs*50	AAEKQMKDKQDEERRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 1	**L367fs*46**	AAEKQMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 3	L367fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 13	L367fs*52	AAEKQMKDKQDEEQRQRRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 38	K368fs*45	AAEKQMKDKQDEEQRLRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 16	K368fs*51	AAEKQMKDKQDEEQRLQRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 4	K368fs*51	AAEKQMKDKQDEEQRLRRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 18	E369fs*44	AAEKQMKDKQDEEQRLKRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 8	E369fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLKRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 17	E369fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLKRRQWTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 15	K368fs*51	AAEKQMKDKQDEEQRLRRRERTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 39	E371fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEERTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 57	E372fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 54	D373fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEERTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 42	D373fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEKTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 21	D373fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEATKRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 20	D373fs*51	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEESGRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 22	K374fs*55	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDNAKRRRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 55	K375fs*55	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKNAKRRRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 40	E371D+K375fs*49	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEDEDKRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 28	E378fs*45	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 9	E381fs*49	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEERQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 51	E383fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEADRCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 32	K385fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 2	**K385fs*47**	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDNCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 10	K385fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDMCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 33	E386fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDKCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 34	K385fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDTCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 35	K385fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDICRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Type 36	E386fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDKCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-
Wildtype sequence		AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDKEDDEDKDEDEEDEEDKEEDEEEDVPGQAKDEL-

I II III

Negatively charged amino acid stretches

Type 1-like mutations *(stretch II and III deleted)*

Other types *(stretch III deleted)*

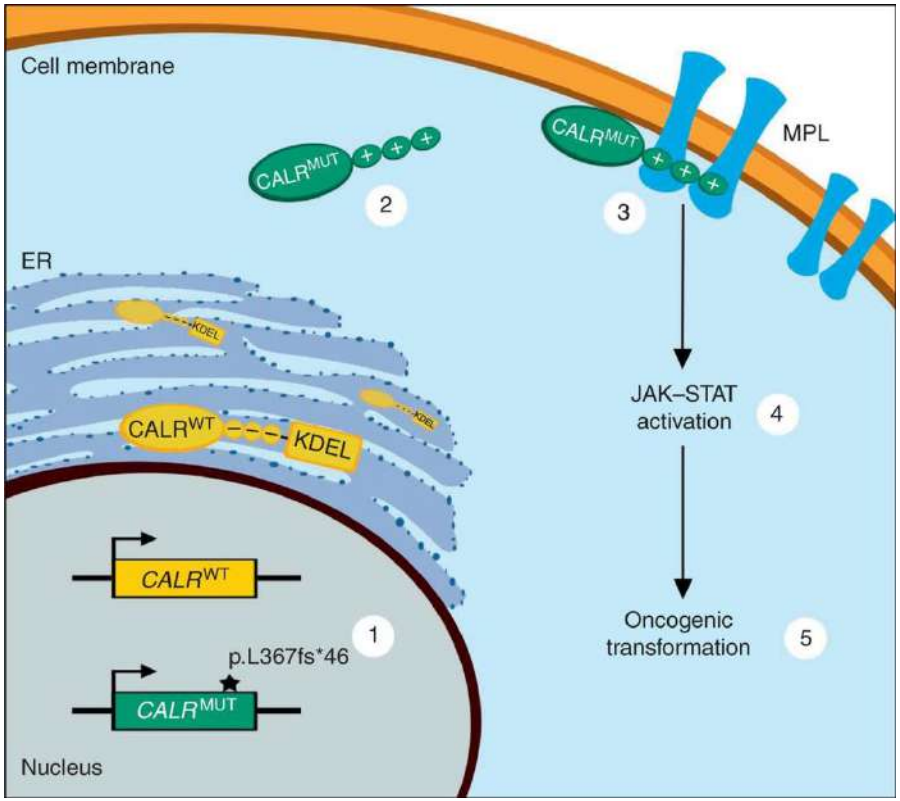
Type 2-like mutations *(stretch I, II and III maintained)*

➔ Formation d'un nouveau domaine C-ter

➔ Gain de fonction

Pietra et al, Leukemia, 2015

Mécanismes nécessaire à l'oncogénèse médiée par CALR^{m}: Perte de charge négative



- CALRm: Perte du domaine KDEL

➔ C-ter chargé +

➔ Affinité pour MPL

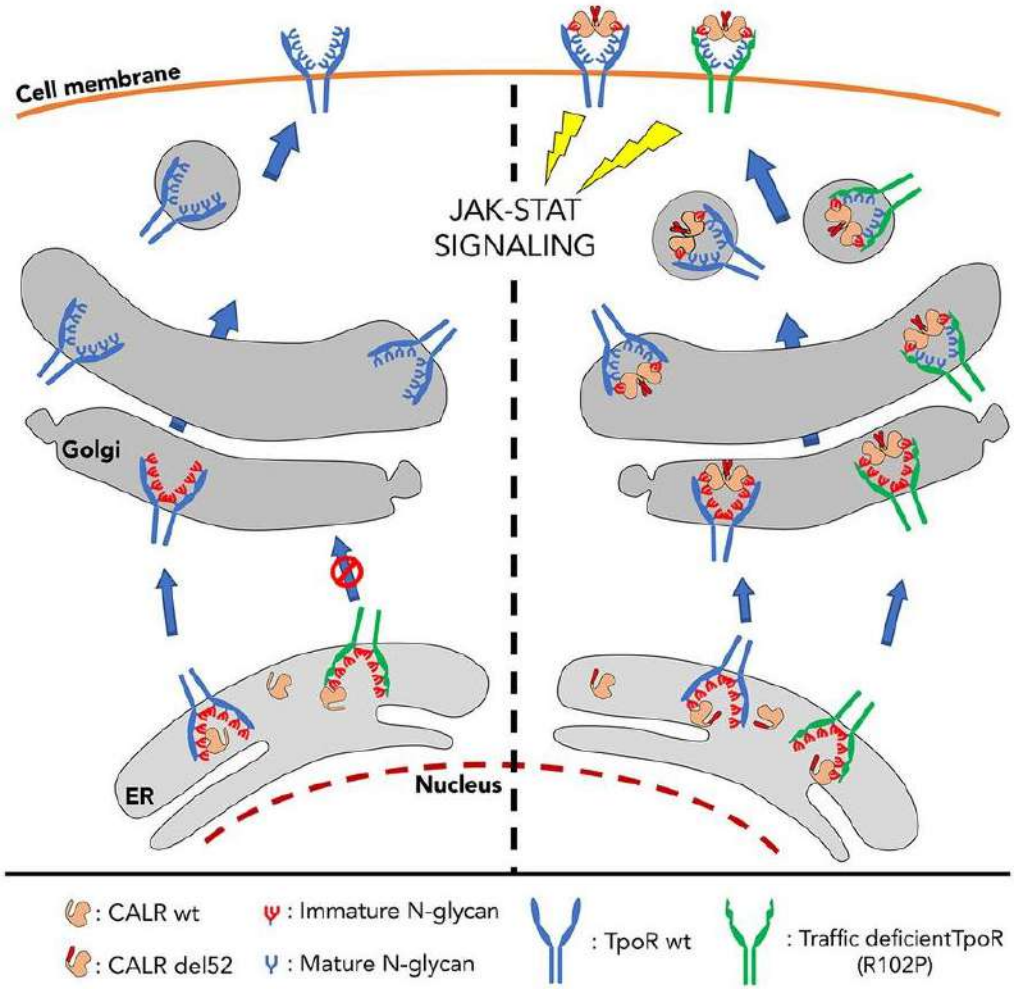
- CALR^{DEL} :perte de la **totalité** des charges -

- CALR^{INS} :perte de la **moitié** des charges -

➔ Phénotype CALR^{DEL} plus sévère

Elf et al, Cancer Disc. 2016
Marty et al, Blood, 2016
Pietra et al, Leukemia, 2016

Mécanismes nécessaire à l'oncogénèse médiée par CALR^{m} : Perte du domaine KDEL



- **Perte du KDEL:**

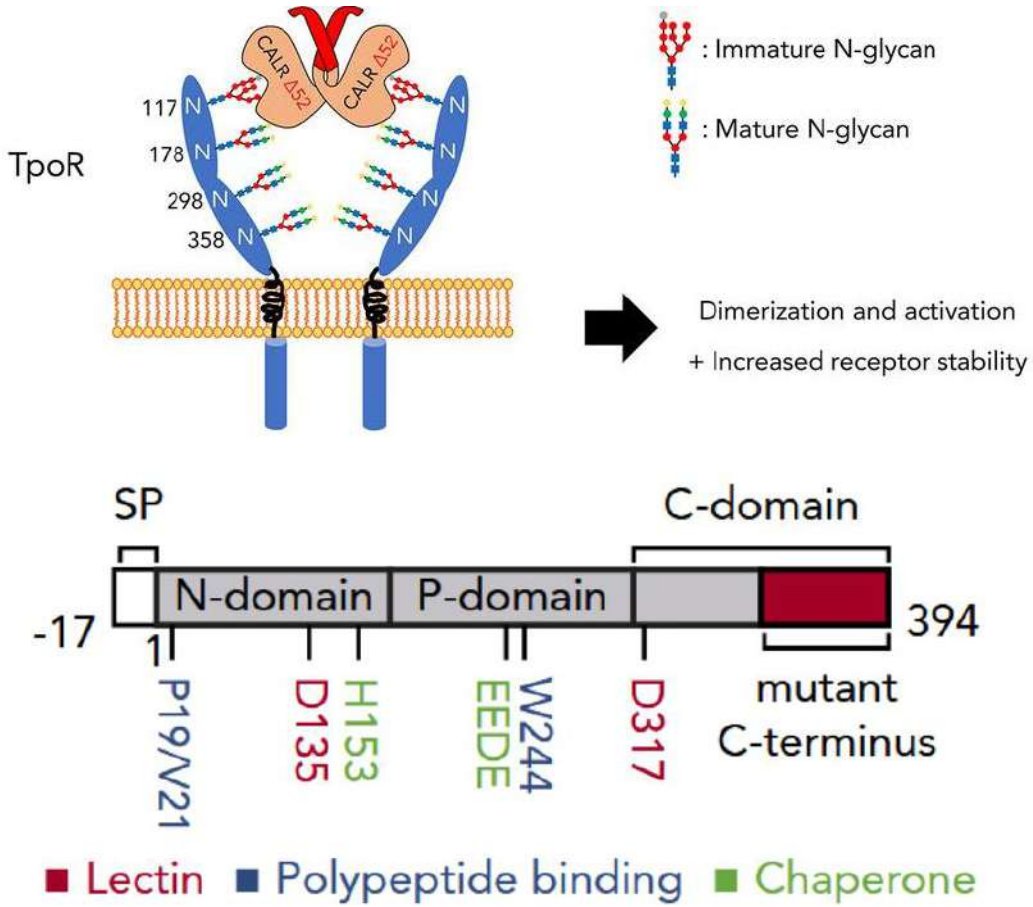
Trafficking par la **voie de sécrétion du RE** des formes des CALR^{m}

→ Golgi

→ Adressage à la membrane

Araki et al, Leukemia, 2016
Pecquet et al, Blood, 2019

Rôle des CALR^{m} sur la maturation de MPL: N-Glycosylation et maturation MPL

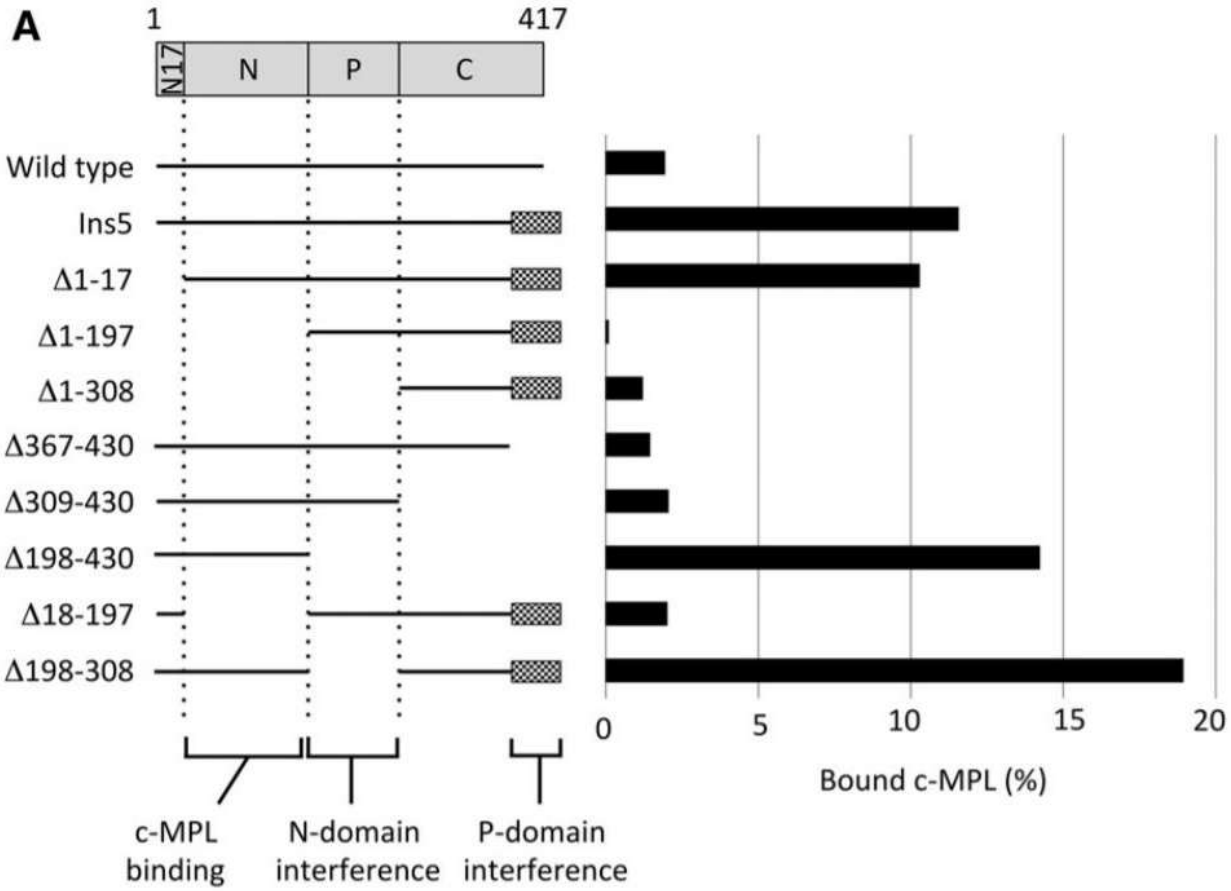


CALR^{m} structure

Fonction chaperone:
Fixation des CALR sur MPL **immature** dans le RE:
➔ Forme mutante reste fixée via domaines **lectines** et empêche maturation glycosidique de MPL

Elf et al, Blood, 2018
Pecquet et al, Blood, 2019

Rôle des CALR^{m} sur leur fixation de MPL: Interaction CALR-MPL

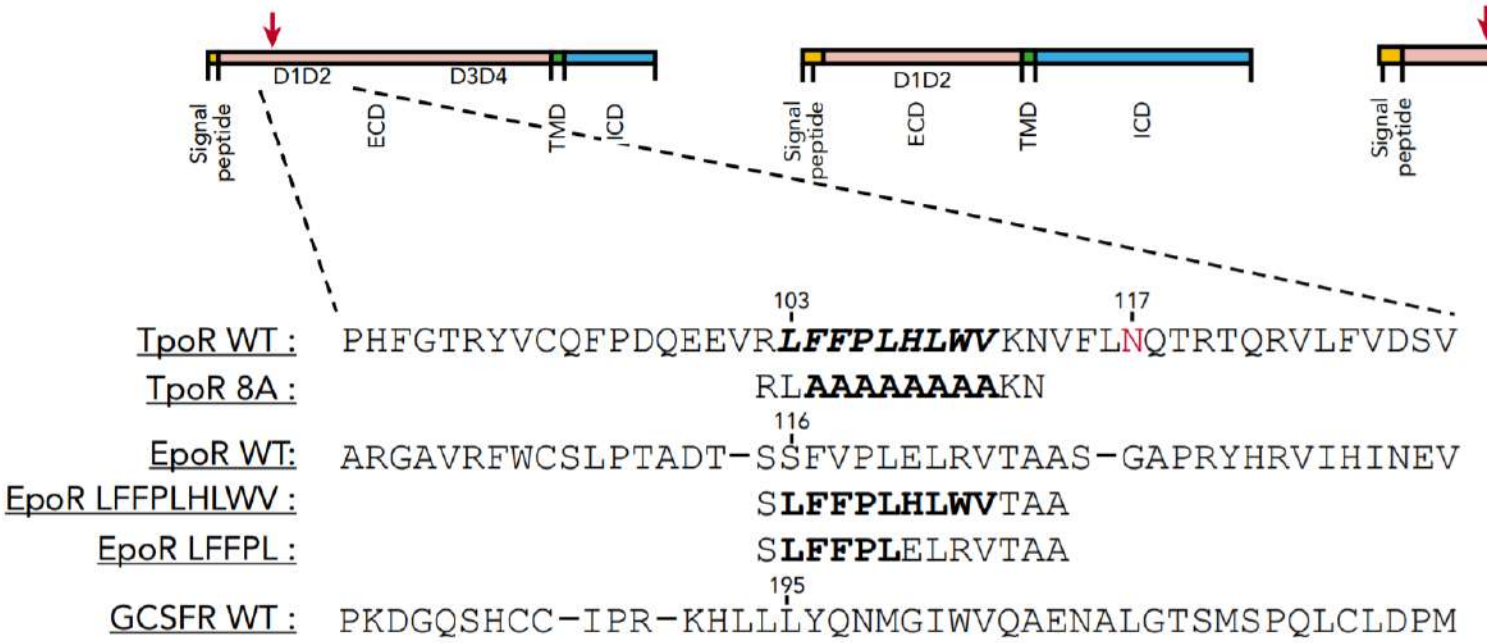


- Interaction via:
  - **domaine N-ter** de CALR
  - **bloquée** par le domaine P
  - **inhibée** par le C-ter muté des CALR^{m}

Araki et al, Blood, 2016
Elf et al, Blood, 2018

Rôle des CALR^{m} sur leur fixation et la maturation de MPL: autres facteurs essentiels

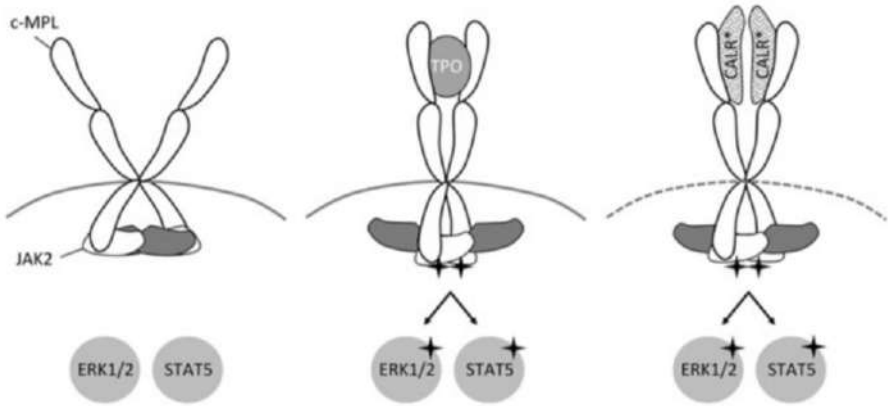
- Activation préférentielle MPL (et G-CSFR) et non d'EPOR:
  - Présence d'une région hydrophobique 8 AA au niveau extracellulaire sur MPL/G-CSFR ≠ EPOR



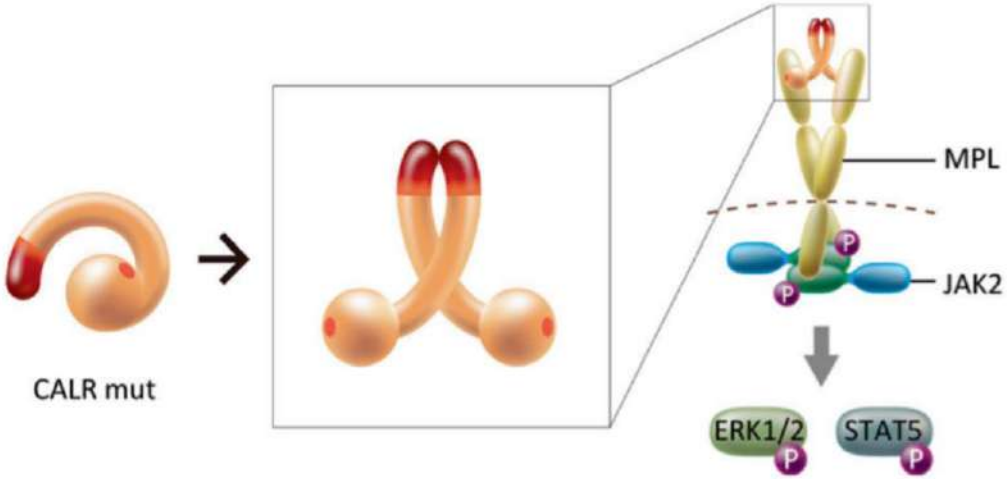
Pecquet et al, Blood, 2019

Rôle des CALR^{m} sur leur fixation et la maturation de MPL: autres facteurs essentiels

- Homodimérisation MPL



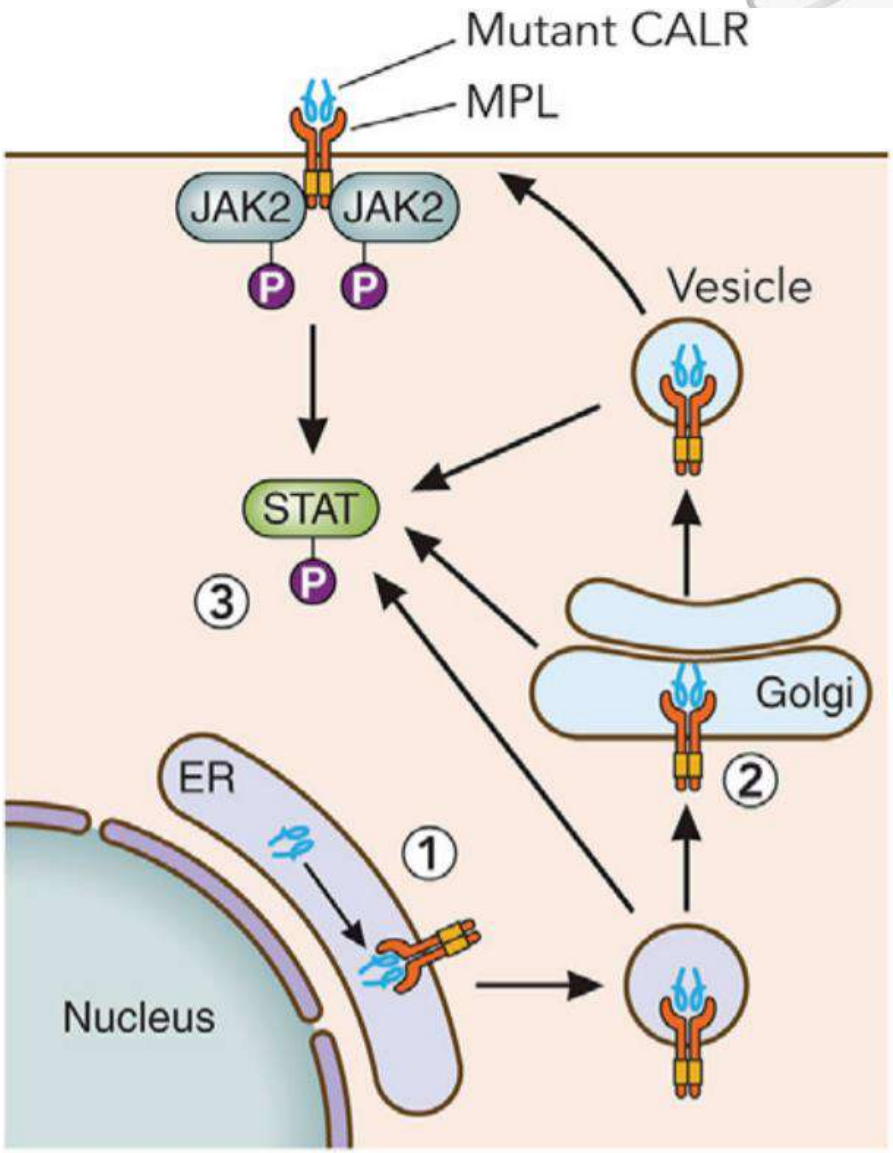
- Homomultimérisation CALR^{m}



Araki et al, Blood, 2016
Araki et al, Leukemia, 2019

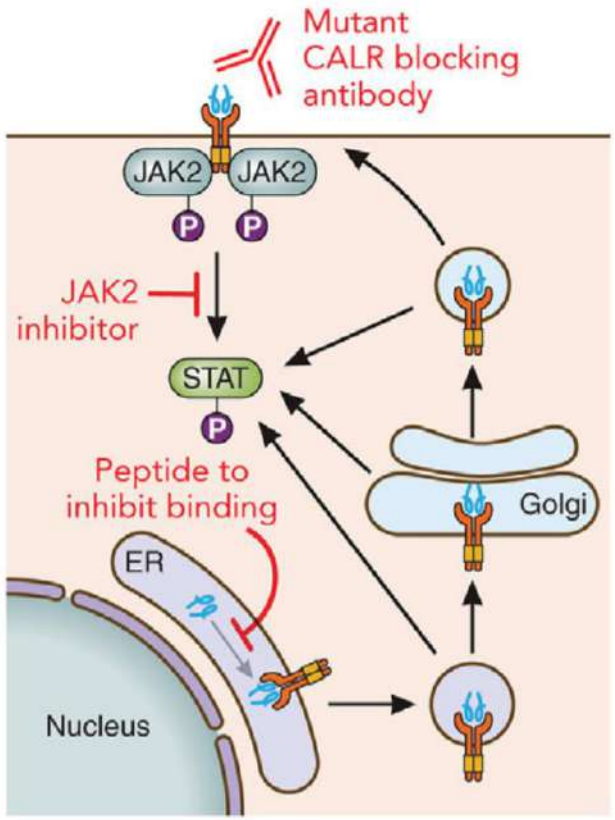
Résumé

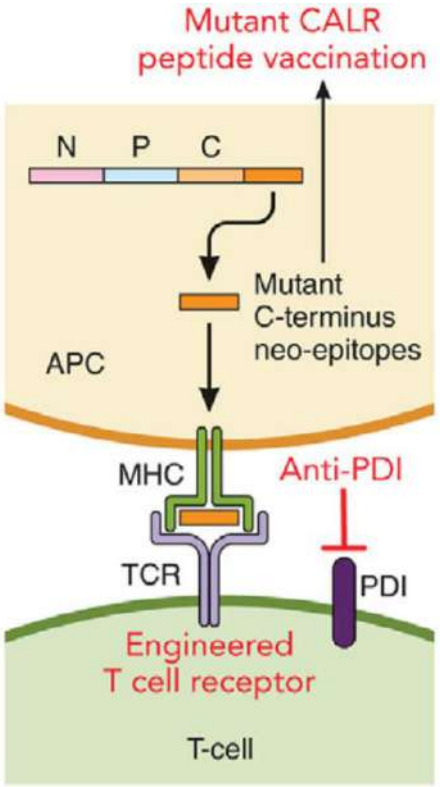
- CALR^{m} exerce son activité oncogénique:
  - **1** Entrée dans la voie de sécrétion du RE (**N-ter séquence signal++**)
  - **2** Hors du RE (**-KDEL**): Complexe stable avec MPL via forme **N-glycosylée immature** (**domaines lectine**++) → Golgi → Surface
  - **3** TPO-indépendante dimérisation de MPL et activation JAK/STAT (= **Homomultimérisation CALR^{m}**)



How et al, Blood, 2019
Pecquet et al, 2019

Stratégies thérapeutiques spécifiques des cellules CALR^m





- **Anticorps antiCALR*m***
- **Peptides inhibant la liaison CALR^m -MPL**

→ actif *in vitro* en association JAKi

- **Stratégie cellules CAR-T:**

→ CALRm néo-Ag processés ?

- **Peptide vaccinal CALR^m Exon9**

→ NCT03566446

- **Thérapie antiPDL1**

How et al, Blood, 2019
Pronier et al, JCI, 2018
Arshad et al, 2018, Holmstrom et al, 2018, 2019, Cimen Bozkus et al, 2019