

Università degli Studi di Firenze

Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali

Scuola di Dottorato di Ricerca in Oncologia Sperimentale e Clinica

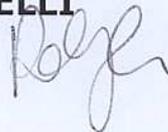
XXIII Ciclo

(MED/04)

Tesi di Dottorato di Ricerca

**CORRELAZIONI TRA GENOTIPO E FENOTIPO NELLE  
SINDROMI MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE Ph-NEGATIVE**

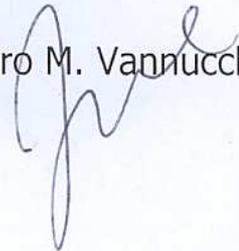
**Candidato: Dr. a PAOLA GUGLIELMELLI**



Coordinatore del Dottorato:  
Prof. Persio Dello Sbarba



Tutor:  
Prof. Alessandro M. Vannucchi



20 Dicembre 2010

# INDICE

<b>1. Introduzione</b>	pag. 3
<ul style="list-style-type: none"><li>• Le Neoplasie Mieloproliferative Croniche Philadelphia negative</li><li>• Policitemia Vera e Trombocitemia Essenziale</li><li>• Mielofibrosi</li><li>• La mutazione JAK2V617F</li><li>• Predisposizione genetica allo sviluppo di MPN JAK2V617F positive: l'aplotipo 46/1</li><li>• Le mutazioni di MPL</li><li>• Nuove mutazioni genomiche nelle NMP ph-negative<ul style="list-style-type: none"><li>- Il gene EZH2</li><li>- I geni IDH1/IDH2</li></ul></li><li>• Altri possibili meccanismi patogenetici nelle NMP ph-negative<ul style="list-style-type: none"><li>- microRNA ed emopoiesi fisiologica</li><li>- Ruolo dei microRNA nelle patologie ematologiche</li><li>- microRNA 16</li></ul></li></ul>	
<b>2. Materiali e metodi</b>	pag. 74
<b>3. Risultati</b>	pag. 105
<ul style="list-style-type: none"><li>• Effetto della mutazione e della carica allelica di <i>JAK2V617F</i> nella Mielofibrosi primaria</li><li>• Effetto della mutazione e della carica allelica di <i>JAK2V617F</i> nella Mielofibrosi secondaria a Policitemia Vera o trombocitemia Essenziale</li><li>• Significato clinico della mutazione JAK2V617F nelle trombosi venose atipiche</li><li>• Significato clinico dell'Aplotipo 46/1 del gene <i>JAK2</i> nella Mielofibrosi Primaria</li><li>• Effetto della mutazione e della carica allelica di <i>MPLW515K/L</i> nella Trombocitemia Essenziale</li><li>• Screening mutazionale dei geni <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i></li><li>• Screening mutazione del gene <i>EZH2</i></li><li>• Ruolo del microRNA 16 nella patogenesi della Policitemia Vera</li></ul>	
<b>4. Conclusioni</b>	pag. 159
<b>5. Bibliografia</b>	pag. 162

# INTRODUZIONE

## NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE CROMOSOMA PHILADELPHIA NEGATIVE

Le Neoplasie Mieloproliferative croniche (NMP) rappresentano un gruppo di disturbi ematologici che originano dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale pluripotente e caratterizzati dalla proliferazione clonale di uno o più progenitori emopoietici nel midollo osseo e in sedi extramidollari (Vannucchi, Guglielmelli et al. 2009).

Nel 1951 W. Dameshek ha raggruppato sotto il termine di malattie mieloproliferative croniche quattro disturbi tra loro correlati fisiopatologicamente e clinicamente: la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (TE), la Mielofibrosi cronica idiopatica (IMF) e la Leucemia mieloide cronica (CML) (Dameshek 1951).

L'identificazione del cromosoma Philadelphia e la presenza di caratteristiche cliniche peculiari ha indotto a considerare la leucemia mieloide cronica come un'entità nosologica a sè stante (Tefferi 2008). Quest'ultima è infatti una neoplasia a cui è stata attribuita un'alterazione citogenetica e molecolare specifica: la traslocazione reciproca t(9;22) (q34; q11) che porta alla formazione sia di un cromosoma denominato Philadelphia e sia, a livello molecolare, di un oncogene di fusione chimerico BCR-ABL che codifica per una fosfoproteina anomala più frequentemente di 210 kD (p210) ad attività tirosinchinasica. Successivamente nel 2001 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization-WHO) ha incluso sotto il termine di malattie mieloproliferative croniche Ph-negative (MPDc) anche entità meno frequenti come la leucemia neutrofilica cronica (CNL), la sindrome ipereosinofila (HES), la leucemia eosinofila cronica (CEL) e la mastocitosi sistemica (SMCD) (Vardiman, Harris et al. 2002).

Le NMP sono malattie relativamente comuni, ad appannaggio soprattutto dell'età media e avanzata, con tassi di incidenza compresi tra 3.5 e 12.6 nuovi casi per 100.000 abitanti l'anno. Inoltre l'incidenza sembra in rapida evoluzione, da un lato a causa del progressivo aumentare dell'età, dall'altro in virtù dell'affinamento delle tecniche diagnostiche.

La diagnosi differenziale tra le NMP Ph-negative risulta spesso difficile a causa della mancanza di alterazioni citogenetiche specifiche e della frequente sovrapposizione dei quadri clinici sia tra le diverse entità sia con sindromi mielodisplastiche/mieloproliferative

(ad es. la leucemia mieloide cronica atipica e la leucemia mielomonocitica cronica) e forme cosiddette reattive (Thiele, Kvasnicka et al. 2006; Orazi and Germing 2008; Tefferi, Skoda et al. 2009). L'analisi citogenetica dimostra la presenza di anomalie cromosomiche in meno del 30% dei casi e nessuno dei difetti riscontrati ricorre abbastanza frequentemente per poter essere considerato specifico di una di queste patologie. Caratteristico è il coinvolgimento dei cromosomi 8, 9 e 20; la perdita dell'eterozigosi del braccio corto del cromosoma 9 è stata riportata come l'anomalia citogenetica più frequente nella PV (Kralovics, Guan et al. 2002). Le alterazioni cromosomiche alla diagnosi non hanno un ruolo nella prognosi, mentre sono indice di evoluzione se compaiono in corso di malattia.

Evidenze sperimentali descrivono nella patogenesi delle diverse malattie il coinvolgimento di geni di fusione ad attività tirosinchinasica che, come BCR-ABL, sono implicati in vie di traduzione del segnale aberranti. Tra questi PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 e JAK2 in rari casi di leucemia mieloide cronica atipica (aCML), leucemia mielomonocitica cronica (CMML) e sindromi mieloproliferative associate ad eosinofilia; e il gene KIT nelle forme di mastocitosi sistemica. Altre osservazioni nei vari sottotipi di NMP mostrano l'ipersensibilità delle cellule mieloidi a fattori di crescita e citochine, incremento dell'espressione del fattore antiapoptotico Bcl-XL e attivazione di STAT3 o STAT5, elementi a valle della via di segnalazione tirosin chinasica (Cross and Reiter 2002; Delhommeau, Pisani et al. 2006; Cross, Daley et al. 2008).

Da un punto di vista biologico, gli elementi che accomunano queste patologie sono il coinvolgimento di un progenitore emopoietico multipotente, la predominanza del clone neoplastico sui progenitori ematopoietici non trasformati, l'eccessiva proliferazione di una o più linee cellulari emopoietiche in assenza di uno stimolo noto, la crescita in vitro di colonie indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita (EPO, IL-3, SCF, GM-CSF, IGF-1), l'emopoiesi extramidollare, che raggiunge il suo massimo nella mielofibrosi, alterazioni sempre più profonde dei processi non solo maturativi ma anche di quelli inerenti la differenziazione cellulare, col risultato finale di un incremento progressivo della componente cellulare blastica fino alla possibile configurazione di un quadro midollare e periferico sovrapponibile a quello della leucemia acuta (Spivak, Barosi et al. 2003).

La patogenesi molecolare di questi disordini è stata ulteriormente definita nel 2005 con la scoperta della prima alterazione genetica ricorrente, che consiste in una mutazione

puntiforme G>T alla posizione 1849 nell'esone 14 del gene JAK2, caratterizzata dalla sostituzione di una valina con una fenilalanina nel codone 617 (V617F). In seguito sono state scoperte la mutazione del gene MPL (recettore per la trombopoietina) rappresentata dalla sostituzione nucleotidica W>L/K/A al codone 515 e le mutazioni, inserzioni o delezioni nell'esone 12 del gene JAK2. La maggior parte dei pazienti con PV risulta positivo per la mutazione V617F del gene JAK2 (circa il 95%) o recante anomalie nell'esone 12 (circa il 2%) mentre mutazione di MPL non sono ancora state riscontrate in questo tipo di disordine; soltanto il 60% dei pazienti con TE e MF risulta avere la mutazione JAK2V617F e in circa l'8% si riscontra la mutazione MPL W515K/L/A o altre infrequenti mutazioni. TE e MF sembrano non coinvolte da anomalie nell'esone 12 (Levine and Gilliland 2007). Queste anomalie molecolari sottolineano una proliferazione clonale e si pongono come il maggior criterio di diagnosi dal 2008 nella nuova classificazione WHO (Tefferi, Thiele et al. 2007). Tali mutazioni, definite come "gain of function" (Cazzola and Skoda 2005), conferiscono alla cellula indipendenza da fattori di crescita e sono in grado di indurre una patologia mieloproliferativa se espresse in modelli murini. L'osservazione delle caratteristiche patologiche riscontrate nei modelli murini sottolineano un ruolo centrale della mutazione V617F nelle NMP, nonostante ciò molti quesiti rimangono ancora insoluti: come, ad esempio, una singola mutazione sia in grado di determinare fenotipi clinici differenti (Vannucchi, Antonioli et al. 2008). A tale proposito sono varie le possibili risposte. La prima fra queste è il diverso livello gerarchico del progenitore staminale coinvolto dall'evento mutazionale. La presenza dell'allele V617F è stata dimostrata nei progenitori linfo-mieloidi comuni sia nelle PV che nelle MF ma recenti osservazioni suggeriscono un'interessante differenza fra i due disordini; la maggior parte delle cellule staminali ematopoietiche con capacità di ripopolamento SCID nelle PMF e nelle mielofibrosi post-policitemiche sono risultate JAK2V617F mutate mentre nelle PV la maggior parte delle cellule staminali risulta JAK2 wild-type. Un'altra considerazione è che differenti patologie sono associate con un diverso livello di attivazione della pathway segnalatoria di JAK/STAT come conseguenza della "quantità" dell'allele mutato JAK2V617F. Si riscontrano comunque differenze nel carico medio dell'allele V617F nei granulociti da sangue periferico, infatti si trovano livelli più alti nei pazienti con PV e minori in quelli con TE. Lo stato omozigote della mutazione V617F, che ha origine dalla ricombinazione mitotica del braccio corto del cromosoma 9, è presente in circa il 30% dei pazienti con PV e PMF mentre è circa il 2-4% nei pazienti con

TE. Proporzioni variabili di progenitori wild-type, eterozigoti e omozigoti sono presenti nella maggior parte dei pazienti con PV, mentre nelle TE risulta rara la presenza di progenitori omozigoti. I progenitori eritroidi mutati sono più sensibili all'eritropoietina rispetto ai progenitori normali e la maggior parte delle colonie eritroidi spontanee (EEC) sono originate da progenitori omozigoti. La correlazione fra carico allelico e fenotipo clinico della patologia è indirettamente supportata anche da osservazioni in modelli animali e i recenti modelli murini transgenici generati suggeriscono come tutte le tre NMP, inclusa la trombocitosi, possano essere riprodotte in dipendenza dal livello dell'allele JAK2 mutato. Dall'altro lato, la possibilità che altri geni, oltre a JAK2V617F e MPLW515K/L/A, siano coinvolti nella patogenesi delle NMP è supportata non solo dal fatto che circa il 40% dei pazienti con ET e IMF ancora non abbia un marcatore molecolare, ma anche dalla mancata correlazione fra il carico dell'allele V617F e la quantificazione dell'ematopoiesi clonale attraverso l'analisi del pattern di attivazione del cromosoma X (X-CIP) o la quota di cellule recanti uno specifico difetto cromosomico, ie del20q- (Antonioli, Guglielmelli et al. 2005; Schaub, Jager et al. 2009). Sebbene la presenza dell'allele V617F sia strettamente associata alla crescita delle colonie eritropoietina-indipendenti, in pazienti con PV sono state riscontrate EEC JAK2 wild-type (Nussenzveig, Swierczek et al. 2007). Inoltre, le cellule blastiche di leucemia mieloide acuta che si sviluppano in pazienti con una precedente NMP JAK2V617F-positiva possono essere JAK2V617F-negative poiché originatesi da una cellula staminale ematopoietica non mutata all'origine della NMP stessa (Theocharides, Boissinot et al. 2007). Infine, ulteriori caratteristiche individuali, comprendenti predisposizioni genetiche, possono essere coinvolti nell'eterogeneità di queste malattie come supportato da recenti studi su un singolo polimorfismo che è stato preferenzialmente associato a PV.

In seguito all'impatto nella diagnostica di questa serie di alterazioni molecolari, nel 2008 il WHO ha rivisto nuovamente la classificazione delle forme mieloproliferative croniche Ph-negative definendole neoplasie mieloproliferative ph-negative (NMP) (Tabella 1) (Tefferi, Thiele et al. 2007; Swerdlow 2008)

**Tabella 1:** Criteri diagnostici per policitemia vera (PV), trombocitemia essenziale (ET) e mielofibrosi primitiva (PMF) secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO 2008)

\*per la diagnosi di PV sono richiesti entrambi i criteri maggiori ed almeno uno dei criteri minori oppure il primo criterio maggiore ed almeno due dei criteri minori.

\* Per la diagnosi di ET sono richiesti tutti i criteri maggiori.

\* Per la diagnosi di PMF sono richiesti tutti e tre i criteri maggiori ed almeno due dei criteri minori.

\*\*\* Megacariociti di piccola o grande taglia con alterato rapporto nucleo-citoplasmatico , nuclei ipolobulati ipercromatici e riuniti in cluster **\*\*oppure** valori di emoglobina (Hgb) o ematocrito o(Hct ) > 99<sup>th</sup> percentile del range di riferimento corretto per età, sesso o altitudine di residenza **oppure** una massa eritrocitaria > 25% del valore medio di normalità.

2008 WHO Diagnostic Criteria						
		PV*		ET*		PMF*
<b>Major criteria</b>	<b>1</b>	Hgb > 18.5 g/dL (men) > 16.5 g/dL (women)  <b>or</b> Hgb > 17 g/dL (men), or > 15 g/dL (women)  if associated with a sustained  increase of ≥ 2 g/dL from baseline that can not be attributed to correction of iron deficiency  <b>or**</b>	<b>1</b>	Platelet count ≥ 450 x 10 <sup>9</sup> /L	<b>1</b>	Megakaryocyte proliferation and atypia*** accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis,  <b>or</b> In the absence of reticulin fibrosis, the megakaryocyte changes must be accompanied by increased marrow cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis (i.e. pre-fibrotic PMF).
	<b>2</b>	Presence of JAK2V617F or similar mutation	<b>2</b>	Megakaryocyte proliferation with  large and mature morphology.  No or little granulocyte or erythroid  Proliferation.	<b>2</b>	Not meeting WHO criteria for CML, PV, MDS, or other myeloid neoplasm
			<b>3</b>	Not meeting WHO criteria for CML, PV, PMF, MDS or other myeloid neoplasm	<b>3</b>	Demonstration of JAK2V617F or other clonal marker  <b>or</b> no evidence of reactive marrow fibrosis
			<b>4</b>	Demonstration of JAK2V617F or other clonal marker  <b>or</b> no evidence of reactive thrombocytosis		
<b>Minor criteria</b>	<b>1</b>	BM trilineage myeloproliferation			<b>1</b>	Leukoerythroblastosis
	<b>2</b>	Subnormal serum Epo level			<b>2</b>	Increased serum LDH
	<b>3</b>	EEC growth			<b>3</b>	Anemia
					<b>4</b>	Palpable splenomegaly

## POLICITEMIA VERA E TROMBOCITEMIA ESSENZIALE

La policitemia vera (PV) è una delle più comuni patologie mieloproliferative croniche, caratterizzata da espansione clonale della linea eritroide, diversamente associata a trombocitosi e leucocitosi.

Ha un'incidenza di circa 0.79 casi/100.000 l'anno, e rappresenta il 45% delle MPNs; la sopravvivenza media a 3 anni è dell'88% (Rollison 2008).

L'età media alla diagnosi è di 60 anni. È altresì documentato che il 5% dei pazienti con PV ha meno di 40 anni, e solo lo 0,1% ne ha meno di 20 (Rollison, Howlader et al. 2008) (Berlin 1975).

La PV è sostenuta da un'iperplasia generalizzata del midollo osseo con espansione prevalente della linea eritroide che è in larga parte indipendente dal fattore di crescita fisiologico, l'eritropoietina (EPO). Questo aspetto si manifesta in vitro con la formazione spontanea di colonie eritroidi in assenza di EPO esogena (Prchal and Axelrad 1974). Le basi molecolari di tali alterazioni sono state attivamente studiate e hanno trovato di recente una possibile spiegazione con l'aumentata funzione della proteina JAK2. Alcuni dati sperimentali hanno dimostrato che i progenitori eritroidi sono ipersensibili anche ad altri fattori di crescita, come il GM-CSF, l'interleuchina 3, IGF-1 e la trombopoietina. Questa osservazione ha suggerito un'anomalia intracellulare più generalizzata, quale un'anomalia della trasduzione del segnale, piuttosto che di uno specifico difetto recettoriale. Si è anche osservato che i precursori eritroidi nel paziente con PV esprimono la proteina anti-apoptotica bcl-xl molto più intensamente rispetto al normale. Inoltre, nella PV, anche le cellule eritroidi più mature, che normalmente non esprimono bcl-xl presentano livelli misurabili della proteina (Fernandez-Luna 1999). Alcuni fattori di crescita emopoietici come IGF-1, agiscono in parte sopprimendo l'apoptosi cellulare. Pertanto l'ipersensibilità ai fattori di crescita presente nella PV potrebbe derivare da una resistenza cellulare intrinseca ai fisiologici meccanismi di apoptosi.

Solo nelle condizioni di Eritrocitosi Ereditaria è stata ipotizzata la mutazione del recettore per l'EPO. Il 20% dei pazienti affetti da eritrocitosi ha una forma trasmessa in maniera autosomica dominante caratterizzata da un'elevata eritropoiesi che si traduce in aumento della massa eritrocitaria con numero di piastrine e leucociti normale e ridotti livelli di EPO; a differenza delle PV non presentano le EEC ma le colonie eritroidi sono ipersensibili a basse concentrazioni di EPO (McMullin 2008). Sono state descritte nove diverse

mutazioni, in ogni caso il dominio intracitoplasmatico del recettore per la EPO è troncato con la perdita del dominio ad attività inibitoria e quindi la successiva attivazione costitutiva del recettore. Sono state descritte anche forme a trasmissione autosomica recessiva caratterizzate da eritrocitosi con elevati livelli di EPO causata da una mutazione puntiforme Arg200Trp nel gene VHL (Kralovics and Prchal 2000); la conseguente parziale perdita di funzione del gene porta ad aumentati livelli di HIF1alfa e iperproduzione di EPO. Questo tipo di mutazioni non sono state però identificate nelle forme di PV e TE.

La PV è caratterizzata dall'incremento della massa eritrocitaria oppure da valori di Hb >18.5 gr/dl negli uomini e >16.5 gr/dl nella donna per almeno 2 mesi; in questi pazienti il volume plasmatico è frequentemente elevato, mascherando non solo il vero grado di espansione della massa eritrocitaria, ma spesso anche la sua stessa presenza (Spivak 2002; Spivak 2003; Spivak and Silver 2008). Leucocitosi e trombocitosi sono presenti in più del 50% dei casi. La morfologia degli eritrociti è quasi sempre normale, solo nelle fasi più avanzate si può assistere alla comparsa di qualche raro eritroblasto, metamielocita e mielocita.

PT, aPTT e fibrinogeno sono riportati falsamente anomali per l'artefatto causato dall'eritrocitosi. Un difetto acquisito del Fattore von Willebrand è riscontrabile in questi pazienti. Il livello di attività della fosfatasi alcalina leucocitaria è aumentato nel 70% dei casi.

Gli iniziali criteri diagnostici utilizzati per la PV sono stati definiti dal Polycythemia Vera Study Group (PVSG), basati esclusivamente su parametri clinici; nel 2001 la definizione di panmielosi alla biopsia osteomidollare è stata inserita tra i criteri minori nella classificazione WHO. L'assenza del bcr/abl consente di escludere le forme di leucemia mieloide cronica, inoltre è importante escludere anche tutte le forme di eritrocitosi secondaria.

La presenza di alterazioni del cariotipo non sembra influenzare la prognosi, ma viene considerata un criterio maggiore per la diagnosi. Le anomalie citogenetiche sono presenti nel 30% dei pazienti alla diagnosi, quelle che più frequentemente si riscontrano sono la trisomia del cromosoma 8 e 9 e la delezione del braccio lungo del cromosoma 20; sono inoltre state descritte anche alterazioni dei cromosomi 5, 7, 12, 13 e duplicazioni del braccio lungo del cromosoma 1. Alcune di queste sono da mettere in relazione con l'uso di agenti alchilanti o 32P (Dewald and Wright 1995).

La crescita di colonie endogene e il dosaggio dell'EPO sierica, nonostante entrambi questi test dal punto di vista tecnico siano considerati affidabili e riproducibili, la loro specificità non è ottimale: per questo sono inseriti tra i criteri minori.

L'acquisizione della presenza di una mutazione di JAK2 virtualmente in tutti i pazienti con PV, ha reso superflui alcuni criteri definiti come A o B nella classificazione del 2001, e sono stati sostituiti appunto dalla presenza delle mutazione JAK2V617F o delle mutazioni a carico dell'esone 12. I criteri A e B sono stati inoltre sostituiti dalla dicitura di criteri maggiori e minori; la soddisfazione di entrambi i criteri maggiori permette di diagnosticare più del 97% dei casi di PV. Per ridurre il rischio conseguente a possibili false positività dei test di laboratorio e per migliorare la specificità diagnostica sono stati introdotti tre criteri minori; la seconda combinazione di criteri permette di porre diagnosi nei casi di PV negativi per le mutazioni di JAK2 o nei casi in cui la carica allelica sia troppo bassa per essere rilevata con le metodiche diagnostiche di routine.

La mortalità nei pazienti con PV aumenta in relazione con l'età, con un incremento rispetto alla popolazione generale di 1.6 e 3.3 volte in pazienti sotto e sopra i 50 anni (Passamonti, Rumi et al. 2004; Cervantes, Passamonti et al. 2008).

L'evoluzione in mielofibrosi o leucemia acuta mieloide (LAM) è responsabile del 13% delle morti in questi pazienti (Marchioli, Finazzi et al. 2005); in particolare si stima una frequenza del 5% di evoluzione in mielofibrosi dopo 15 anni dalla diagnosi di PV (Marchioli 2005).

Lo studio ECLAP ha stimato che l'evoluzione in LAM avvenga nell' 1.3% dei pazienti con PV in media dopo 8.4 anni dalla diagnosi. L'età avanzata, la leucocitosi e la lunga durata di malattia sono fattori di rischio associati all'evoluzione in LAM (Finazzi, Caruso et al. 2005). Il rischio è ulteriormente incrementato dal trattamento con P32 o clorambucil, o dalla somministrazione di più di un agente chemioterapico contemporaneamente o in sequenza (Murphy, Sivakumaran et al. 1995; Murphy 1997; Barbui 2004).

La Trombocitemia Essenziale (TE) è caratterizzata da una da abnorme proliferazione megacariocitaria che determina un aumento del numero di piastrine circolanti. La reale incidenza è sconosciuta. Interessa principalmente soggetti con un'età media alla diagnosi di 50-60 anni e non predilige alcun sesso.

Il meccanismo patogenetico della TE è scarsamente noto; la sopravvivenza piastrinica è normale, la trombocitosi è dovuta ad un aumento della produzione piastrinica a livello

midollare associata a un aumento del volume megacariocitario, del numero di lobulazioni nucleari e della ploidia nucleare (Buss, Cashell et al. 1994; Thiele and Kvasnicka 2003)

Studi sulla clonalità condotti in donne affette da TE, eterozigoti per gli isoenzimi della G6PD, hanno dimostrato il coinvolgimento della cellula staminale ematopoietica pluripotente (Fialkow, Faguet et al. 1981; Fialkow 1990). Questi risultati sono stati successivamente confermati in altri studi che hanno dimostrato la clonalità non solo dei granulociti e delle piastrine ma anche dei linfociti B e dallo studio dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione di geni del cromosoma X (Chen and Prchal 2007). E' stata però documentata la presenza di una popolazione di leucociti non clonali. Ciò indicherebbe che una popolazione di cellule ematopoietiche normali persiste insieme al clone neoplastico che prevale sulla popolazione di precursori ematopoietici normali durante le fasi di progressione di malattia. Questi risultati suggeriscono inoltre la possibilità che la trasformazione maligna che conduce alla genesi della malattia possa manifestarsi a differenti livelli della filiera ematopoietica. Pertanto, il sito dell'iniziale trasformazione oncogenica potrebbe in alcuni casi essere rappresentato dalla cellula staminale pluripotente mentre in altri potrebbero essere coinvolti precursori cellulari più differenziati.

Solo nelle forme di Trombocitemia Ereditaria è stata descritta una mutazione che coinvolge il gene della Trombopoietina (TPO), la principale citochina responsabile della proliferazione e della maturazione dei megacariociti e della formazione delle piastrine attraverso tutti gli stadi di differenziazione a partire dalla cellula staminale ematopoietica (Cazzola and Skoda 2000; Skoda and Prchal 2005; Liu, Martini et al. 2009; Skoda 2009). Ad oggi sono state descritte 4 mutazioni del gene della TPO, a trasmissione autosomica dominante e a penetranza completa; le manifestazioni cliniche si evidenziano durante l'infanzia se non già alla nascita e consistono in trombocitosi accompagnata a normale ematocrito ed elevati livelli sierici di TPO. In tutti i casi l'iperproduzione di TPO è causata da un meccanismo di aumentata trascrizione di mRNA mutato di TPO in quanto la mutazione elimina o riduce l'effetto inibitorio di regioni controllo. Si ritiene che simili mutazioni potrebbero essere presenti anche nella TE, il che spiegherebbe il riscontro di elevati livelli di TPO in alcuni pazienti.

Studi su MPL, il recettore di TPO, hanno dimostrato la ridotta espressione del recettore nelle piastrine di soggetti affetti da TE e questo potrebbe spiegare gli elevati livelli sierici di trombopoietina (Li, Xia et al. 2000). La ridotta espressione si associa anche a

incompleta glicosilazione del recettore stesso. Questo provoca un difetto nell'attivazione della cascata delle chinasi a valle, con conseguente alterazione della fosforilazione delle proteine JAK2 e STAT5, coinvolte nella trasduzione del segnale (Moliterno, Hankins et al. 1998; Moliterno, Siebel et al. 1998).

E' stato ipotizzato che l'attivazione della via di segnalazione JAK/STAT potesse avvenire come conseguenza di mutazioni attivanti di altri recettori per citochine presenti sulle cellule ematopoietiche, tra cui MPL. L'attenzione si è focalizzata sul dominio transmembrana, che è critico per la dimerizzazione e quindi attivazione del recettore, e sul dominio iuxtamembrana, che costituisce il sito di legame per JAK2. L'analisi di questi domini ha permesso di identificare due mutazioni puntiformi a carico del codone 515 del gene, W515L E W515K. Entrambe le mutazioni causano attivazione costitutiva del recettore e quindi della via di segnalazione a valle di esso, in assenza del ligando (Pardanani, Levine et al. 2006; Pikman, Lee et al. 2006). Le mutazioni di MPL sono state inizialmente documentate nell'1% dei soggetti con TE (Pardanani, Levine et al. 2006) ma studi più recenti, anche del mio gruppo, hanno dimostrato che la percentuale si attesta tra il 5 e l'8% (Beer, Campbell et al. 2008; Vannucchi, Antonioli et al. 2008)

Sono state documentate, in pazienti con TE, mutazioni di p53 che probabilmente correlano con la trasformazione leucemica.

Il comportamento biologico dei precursori megacariocitari in corso di TE è stato estesamente studiato. Studi recenti basati su colture in terreni non addizionati hanno mostrato che la formazione delle colonie megacariocitarie dipende in parte dall'aggiunta di citochine, ma in una certa quota di pazienti può essere anche autonoma (Grossi, Vannucchi et al. 1987). Questa è una caratteristica tipica dei disordini mieloproliferativi in genere. Inoltre i precursori megacariocitari nella TE risultano meno responsivi a inibitori della crescita come il TGF- $\beta$ . La maggior parte degli inibitori della megacariocitopoiesi è prodotta dai megacariociti stessi e il TGF- $\beta$  è considerato il più potente tra tali inibitori. I livelli di TGF- $\beta$  risultano aumentati in questi pazienti, il che tuttavia sembra essere una diretta conseguenza dell'aumento della massa piastrinica e megacariocitaria. E' stato ipotizzato che possa esistere un'importante interazione tra TGF- $\beta$  e TPO a livello del microambiente midollare, e cioè che il TGF- $\beta$  stimoli la produzione locale di TPO, la quale a sua volta stimola l'espressione del recettore del TGF- $\beta$  potenziando la suscettibilità all'inibizione della crescita .

Alcuni studi suggeriscono che la formazione spontanea di precursori megacariocitari possa essere dovuta a carenza di fattore piastrinico 4. E' stato infatti dimostrato che questo fattore può inibire la crescita di colonie megacariocitarie nella TE. Sia il fattore piastrinico 4 che il TGF- $\beta$  sono contenuti nei granuli  $\alpha$ , noti per la loro capacità di inibire la formazione di colonie megacariocitarie (Grossi, Vannucchi et al. 1986).

I precursori eritroidi dei soggetti con TE possono proliferare anche in presenza di piccole quantità di citochine presenti nel solo siero: le BFU-E ottenute sia dal midollo che dal sangue periferico formano colonie eritroidi in assenza di eritropoietina esogena, caratteristica condivisa con la Policitemia Vera (Eridani, Pearson et al. 1983; Eridani, Batten et al. 1984).

La TE caratterizzata clinicamente da manifestazioni tromboemboliche a carico dei vasi arteriosi e venosi di grosso e medio calibro e del distretto periferico (Vannucchi and Barbui 2007; Vannucchi 2010).

L'interessamento del microcircolo causa acrocianosi, parestesie ed eritromelalgia; il coinvolgimento del distretto cerebrale comporta sintomatologia neurologica caratterizzata da cefalea, acufeni e vertigini; più rari TIA del circolo cerebrale posteriore o anteriore, disturbi epilettici e convulsioni (Cortelazzo, Viero et al. 1990).

Inoltre sono frequentemente osservate le trombosi a carico dei vasi di grosso e medio calibro, sia arteriose (arti inferiori; arterie carotidi e coronarie; arterie renali; arterie mesenteriche e succlavia) che venose (vena porta; vena splenica, vene della pelvi e degli arti inferiori). Le manifestazioni emorragiche sono principalmente a carico del tratto gastrointestinale. Altri distretti sede di emorragia sono la cute, le congiuntive, le vie urinarie, le mucose rinofaringee. Nel 20-30 % dei pazienti si possono evidenziare sintomi sistemici come perdita di peso, sudorazione, febbre e prurito. Nel 40-50% dei pazienti si riscontra splenomegalia, nel 20% epatomegalia.

Dal punto di vista laboratoristico sono diagnostici valori piastrinici superiori ai 600.000/ $\mu$ L per almeno 6 mesi associati a leucocitosi in genere moderata; allo striscio periferico si possono reperire anomalie della morfologia piastrinica e presenza di megatrombociti.

Sono state descritte inoltre anomalie funzionali piastriniche: difetto nel metabolismo dell'acido arachidonico, a livello in particolare della lipossigenasi; una riduzione del numero di recettori piastrinici per la prostaglandina D<sub>2</sub> e dei recettori adrenergici per l'adrenalina. Le piastrine ottenute da pazienti con pregressi eventi trombotici mostrano un'aumentata produzione di trombossano B<sub>2</sub> e un'aumentata affinità per il fibrinogeno

(Landolfi, Ciabattoni et al. 1992). L'aumento dei livelli di  $\beta$ -tromboglobulina e di trombossano sierico in questi pazienti suggerisce la presenza di un potenziamento dell'attivazione piastrinica in vivo (Cortelazzo, Viero et al. 1981).

La biopsia osteomidollare, documenta un aumento della cellularità associato ad una marcata iperplasia megacariocitaria, con megacariociti pleiomorfici e raccolti in cluster. I megacariociti di TE appaiono morfologicamente maturi, senza gli aspetti displastici più caratteristici della fase prefibrotica della mielofibrosi idiopatica, con la quale la TE va posta in diagnosi differenziale. I depositi midollari di ferro sono frequentemente ridotti; nel 25 % dei casi il contenuto di reticolina nella biopsia è aumentato, ma senza evidente fibrosi. Anomalie citogenetiche sono presenti solo in una minoranza di casi con coinvolgimento principale del cromosoma 1 e del cromosoma 20.

Il decorso della malattia è in genere cronico con una sopravvivenza che si avvicina a quella della popolazione sana corrispondente per età e per sesso.

La trasformazione in leucemia acuta è un evento raro (3-5%) associato alla comparsa di anomalie citogenetiche. E' possibile anche l'evoluzione in mielofibrosi con metaplasia mieloide; alcuni pazienti con una diagnosi di TE possono in realtà essere affetti da una fase pre-fibrotica di mielofibrosi idiopatica.

Il trattamento della TE si basa sulla somministrazione di antiaggreganti piastrinici in pazienti con disturbi del micro-macrocircolo (Beer and Green 2009). Per la terapia mielosoppressiva il farmaco di scelta rimane l'idrossiurea per la rapida azione nel ridurre la conta piastrinica, la capacità di controllarla nel tempo e per la capacità di ridurre gli eventi trombotici in pazienti a rischio (Cortelazzo, Finazzi et al. 1995) (Cortelazzo 1996). Inoltre i pazienti trattati con idrossiurea hanno una bassa incidenza di evoluzione leucemica (3-4%) (Finazzi 2000).

Altri chemioterapici (busulfano; melphalan; chlorambucil; thiotepa) sono stati impiegati in questi pazienti, ma con ridotta efficacia e aumentato rischio di evoluzione blastica (Berk, Goldberg et al. 1981).

Grande interesse ha suscitato lo sviluppo dell'Anagrelide, che agisce inibendo la maturazione megacariocitaria e il rilascio piastrinico (Fruchtman, Petitt et al. 2005; Birgegard 2009). E' stato però dimostrato che nei pazienti affetti da TE il trattamento con idrossiurea è più efficace nella riduzione della conta piastrinica ed è associato ad una ridotta incidenza di eventi trombotici arteriosi e di evoluzione in mielofibrosi, rispetto al trattamento con anagrelide (Harrison, Campbell et al. 2005).

## MIELOFIBROSI

La mielofibrosi, conosciuta anche come Metaplasia Mieloide Agnogenica e Mielosclerosi con Metaplasia Mieloide, presenta un'incidenza di 0,5-1,5 casi su 100.000 all'anno. L'età media alla diagnosi è di 60 anni e sono colpiti in ugual misura i due sessi (Cervantes, Passamonti et al. 2008). Non sussistono importanti differenze di incidenza in relazione all'etnia, tranne una maggior prevalenza negli ebrei Ashkenazi. La malattia può presentarsi in quanto tale, ed allora si parla di Mielofibrosi Primaria (PMF) (Mesa, Verstovsek et al. 2007), oppure può presentarsi come evoluzione di una precedente PV o TE ed è quindi detta "secondaria". Il quadro clinico è caratterizzato da: splenomegalia, leucoeritroblastosi (presenza di elementi mieloidi immaturi e eritroblasti in circolo), anisopoichilocitosi delle emazie con dacriociti, fibrosi midollare di entità variabile, fino alla fibrosi serrata e alla osteosclerosi, ed emopoiesi extramidollare, prevalentemente a carico di milza e fegato, ma potenzialmente presente in qualsiasi organo (Barosi 2003; Tefferi 2003; Tefferi 2006). Circa il 20% dei pazienti è asintomatico alla diagnosi; gli esami ematologici possono mostrare anemia, piastrinosi o piastrinopenia e leucopenia o leucocitosi di entità variabili, anche modeste. La maggior parte dei casi viene invece diagnosticata in una fase più avanzata della malattia, quando i sintomi e le alterazioni ematologiche diventano più evidenti. La fibrosi midollare si aggrava e si osservano una progressiva splenomegalia ed epatomegalia dovute all'ematopoiesi extramidollare, con marcata anemia e leucocitosi, e generalmente piastrinopenia. Possono comparire blasti nel sangue periferico, e la malattia può evolvere in una leucemia mieloide acuta.

La Mielofibrosi è caratterizzata da un'elevata proliferazione cellulare, che rende ragione dell'aumento numerico delle cellule mature delle diverse serie emopoietiche nel sangue periferico, ma anche da alterazioni del processo maturativo, in particolare a carico della linea megacariocitaria. Il clone megacariocitario rilascerebbe stimoli fibrogenici che sarebbero alla base dell'aumento della deposizione di fibre nel microambiente midollare. La mielofibrosi infatti potrebbe originarsi come risposta sia all'elevato numero di megacariociti che alla loro difettosa maturazione per una megacariocitopoiesi inefficace, con conseguente liberazione locale di elevate quantità di fattori di crescita contenuti nei granuli  $\alpha$  (in particolare TGF-beta) (Chagraoui, Komura et al. 2002; Vannucchi, Bianchi et al. 2005).

La Mielofibrosi è causata da un'alterazione clonale della cellula staminale pluripotente. Studi sulla clonalità hanno dimostrato che eritrociti, megacariociti, granulociti, monociti e linfociti B originano dalla stessa cellula staminale e sono quindi monoclonali. Essi mostrano, infatti, l'espressione dello stesso isoenzima della glucosio-6-fosfato deidrogenasi, l'inattivazione dello stesso cromosoma X, dimostrata anche con lo studio dei polimorfismi, un pattern di anomalie cromosomiche non random variabili e mutazioni nella famiglia del gene Ras (Reilly 2002). La clonalità dei linfociti T è stata invece osservata solo in una parte dei pazienti e questo suggerisce che nella maggior parte dei casi la proliferazione origina da un precursore già in parte commissionato. (Tsukamoto,1994). Viceversa la popolazione di fibroblasti midollari risulta essere policlonale, caratteristica che ne esclude l'appartenenza al clone neoplastico (Castro-Malaspina, Gay et al. 1982; Castro-Malaspina and Jhanwar 1984) (Greenberg, Woo et al. 1987; Wang, Lang et al. 1992). Il midollo dei pazienti con MF mostra tuttavia un aumento del numero di cellule stromali, dei livelli di proteine della matrice extracellulare, dell'angiogenesi e dell'osteosclerosi, oltre alla alterazione dei livelli di varie citochine intra ed extracellulari (Martyre, Romquin et al. 1994; Martyre, Le Bousse-Kerdiles et al. 1997).

La fibrosi midollare è una condizione patologica caratterizzata dalla aumentata deposizione di proteine della matrice extracellulare nel midollo osseo. Queste proteine si organizzano in fibre, il cui aumento determina via via la perdita della funzione ematopoietica del midollo. L'emopoiesi extramidollare, che si sviluppa in sedi eterotopiche, in particolare la milza e il fegato, non ha però il significato di emopoiesi "vicariante" o sostitutiva quella midollare, come suggerisce il fatto che la splenectomia, che rappresenta una delle opzioni terapeutiche della malattia, non solo non influenza negativamente il fenomeno della emopoiesi ma al contrario tende a migliorare la conta delle cellule ematiche per la rimozione di una sede di pooling e/o di sequestro.

La fibrosi è un evento secondario, causato dal rilascio di fattori di crescita da parte del clone neoplastico. Questa ipotesi è confermata dalla potenziale reversibilità di questa alterazione, come dimostrato dalla sua regressione dopo trapianto allogenico di midollo osseo o dopo prolungata somministrazione di chemioterapici o interferone (Manoharan 1998).

Le citochine coinvolte nello sviluppo della fibrosi sono il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (b-FGF), il fattore piastrinico 4, il fattore di crescita e trasformazione  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la  $\beta$ -tromboglobulina, la calmodulina,

l'interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). Queste citochine sono prodotte principalmente da due popolazioni cellulari: megacariociti e monociti.

Una particolare attenzione è posta sui megacariociti in relazione ad una serie di osservazioni e considerazioni: 1- nei reperti istologici midollari (biopsia osteomidollare) di pazienti con MF è stata osservata una loro iperplasia, displasia o necrosi, e si ha inoltre aumento degli stessi e dei loro precursori in circolo; 2- la associazione della fibrosi midollare con la leucemia megacariocitica acuta; 3- la presenza mielofibrosi nella sindrome della piastrina grigia, un disordine ereditario a carico dei granuli  $\alpha$  delle piastrine; 4- le caratteristiche dei modelli animali della mielofibrosi, nei quali risulta essere sempre associata ad una intensa proliferazione megacariocitaria. Sia i megacariociti che le piastrine presentano un aumentato contenuto e anomalie di produzione e secrezione di PDGF, fattore piastrinico 4, TGF- $\beta$ , b-FGF e calmodulina, tutti contenuti nei granuli  $\alpha$ ; la frammentazione e/o la lisi del citoplasma dei megacariociti ne provoca il rilascio nel microambiente midollare, dove esplicano i loro effetti senza influenzare la concentrazione dei granuli  $\alpha$  nelle piastrine circolanti (Villevall, Cohen-Solal et al. 1997; Taskin, Cohen-Solal et al. 1998; Vannucchi, Migliaccio et al. 2005).

Studi istomorfologici e di microscopia elettronica hanno permesso di caratterizzare nei dettagli il processo della emperipolesi come uno dei possibili meccanismi che portano alla deposizione di fibre nel midollo di animali modificati geneticamente ed esprimenti un fenotipo paragonabile a quello della mielofibrosi umana. E' stato, infatti, documentato che nel midollo e nella milza di questi topi la emperipolesi di neutrofili all'interno dei megacariociti è nettamente aumentata; i neutrofili fondono le loro membrane con quelle del sistema di demarcazione all'interno dei megacariociti e vanno incontro a lisi con rilascio del contenuto dei granuli (Centurione, Di Baldassarre et al. 2004). Questo può in parte spiegare le alterazioni midollari: il PDGF è un potente agente mitogeno per i fibroblasti, e chemiotattico per fibroblasti, neutrofili e monociti, ma stimola solo moderatamente la produzione di collageno .

Il TGF- $\beta$  è un importante induttore della sintesi della maggior parte delle proteine della matrice extracellulare, che risultano presenti in eccesso nel midollo dei pazienti con MF, quali il collagene di tipo I, III, V e VI, l'acido ialuronico, il condroitin ed il dermatan-solfato, i proteoglicani, le glicoproteine non collageniche come fibronectina, vitronectina e tenascina e le componenti della membrana basale collagene di tipo IV e laminina.

La fibrosi reticolinica è causata da una iperproduzione del normale pattern di fibre del midollo ed è costituita da collagene di tipo I e III e da fibronectina. La fibrosi collagenica, invece, è responsabile del sovvertimento dell'architettura del midollo osseo ed è presente nella mielofibrosi sia primitiva sia secondaria.

La fibrosi non dipende solo dall'accumulo di collagene, ma anche dall'equilibrio che si stabilisce fra produzione e distruzione. L'incremento delle proteine di questo metabolismo alterato si riflette anche nella composizione sierica, soprattutto dei pazienti con malattia attiva, dove sono aumentate le concentrazioni dei peptidi carbossi-terminali del procollagene di tipo I (PICP), degli amino-terminali del collagene di tipo III (PIIIP) e dei peptidi correlati al collagene di tipo IV e alla laminina .

La sintesi di collagene di tipo III è predominante, soprattutto negli stadi precoci, e comporta il rilascio in circolo del peptide amino-terminale della molecola di procollagene. Questi peptidi, detti PC III, possono essere dosati, ed è possibile che i loro livelli riflettano la sintesi di collagene più fedelmente del contenuto totale in collagene del midollo osseo (Hasselbach,1991).

Nelle fasi più avanzate della malattia la fibrosi è caratterizzata anche da una aumentata deposizione di fibronectina, tenascina e citroneutrina, fino a quadri di vera osteomielosclerosi.

Il TGF- $\beta$  riduce inoltre la sintesi delle metalloproteasi deputate a degradare la matrice extracellulare e incrementa quella degli inibitori delle proteasi come l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno I. Esso induce inoltre la formazione di osso e di vasi, proprietà che spiegano in parte l'osteosclerosi e la neoangiogenesi che accompagna la mielofibrosi (Mesa, Hanson et al. 2000).

Sui progenitori ematopoietici in particolare agli stadi precoci, il TGF- $\beta$  agisce regolandone negativamente la proliferazione: è stato infatti dimostrato che l'espressione del recettore del TGF- $\beta$  di tipo II è ridotta sulle cellule CD 34+ dei pazienti (Le Bousse-Kerdiles, Chevillard et al. 1996) (LeBousse-Kerdilès,1996).

La calmodulina è una proteina legante il calcio che, in sede extracellulare, agisce da mitogeno per vari tipi cellulari fra cui i fibroblasti; l'escrezione urinaria della calmodulina è significativamente aumentata in questi pazienti rispetto a quelli affetti da altre sindromi mieloproliferative in assenza di fibrosi .

Più recentemente è stato dimostrato un ruolo nella patogenesi di questa malattia anche della popolazione clonale dei monociti-macrofagi, in quanto fonte di TGF- $\beta$ , PDGF e IL-1.

Nel midollo dei pazienti con MF i monociti sono aumentati di numero e nel siero si trovano alti livelli del fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF), una citochina implicata nella proliferazione e differenziazione dei macrofagi (Gilbert, Praloran et al. 1989). L'attivazione dei monociti avviene, almeno in parte, tramite l'interazione fra le molecole di adesione, in particolare CD44, e la matrice extracellulare, che esita nell'up-regolazione del TGF- $\beta$  intracitoplasmatico. A conferma del ruolo indispensabile di queste cellule nello sviluppo della osteomielifibrosi secondaria, sono stati effettuati studi con modelli animali. In topi affetti da varie sindromi da immunodeficienza ereditarie è stata indotta la iperespressione del gene della trombopoietina, e si è osservato che negli animali in cui il difetto immunitario coinvolgeva soltanto i linfociti B e T si sviluppava una sindrome con caratteristiche paragonabili alla mielofibrosi. D'altro canto, i topi con un difetto coinvolgente anche i monociti-macrofagi non mostravano alcuna alterazione in senso fibrotico del midollo osseo (Frey,1998).

La Metaplasia Mieloide è una condizione caratteristica della Mielofibrosi. Per spiegarne il meccanismo patogenetico venne inizialmente ipotizzato che essa fosse causata dalla riattivazione di cellule staminali che giacevano quiescenti nella milza e nel fegato dalla vita fetale. È tuttavia poco probabile che ciò avvenga, poiché l'ematopoiesi splenica dei pazienti ha caratteristiche diverse da quella fetale: la milza del feto infatti contribuisce solo marginalmente all'ematopoiesi, e contiene soprattutto precursori eritroidi a stadi tardivi, mentre è povera di precursori eritroidi precoci o granulocitari. Nella MF al contrario l'ematopoiesi splenica è abbondante. Inoltre la metaplasia può coinvolgere anche organi e apparati non responsabili dell'ematopoiesi durante la vita fetale, quali il polmone, il sistema nervoso centrale, l'apparato gastrointestinale e quello genitourinario. Più recentemente è stata proposta la "teoria della filtrazione", secondo cui l'ematopoiesi extramidollare originerebbe da un trasferimento di cellule mieloidi immature dal midollo osseo ad altri organi. La fibrosi infatti distorce i sinusoidi, permettendo l'ingresso al loro interno delle cellule progenitrici, che accedono così al circolo sanguigno. L'ematopoiesi all'interno dei sinusoidi è una caratteristica che viene frequentemente riscontrata nella biopsia midollare di questi pazienti. Il fegato e la milza filtrano dal circolo e trattengono queste cellule, e più di altri organi permettono loro di giungere alla differenziazione terminale. Questa teoria è supportata dal riscontro di significative differenze fra il numero di cellule ematopoietiche immature presenti nella milza e nel midollo osseo (Thiele, Kvasnicka et al. 2005).

Non è conosciuta una specifica anomalia cariotipica che abbia permesso di focalizzare l'attenzione su un gene importante per la patogenesi della MF. Tre difetti citogenetici costituiscono tuttavia il 65% delle anomalie riscontrate alla diagnosi. Sono state infatti individuate la delezione del braccio lungo del cromosoma 13, correlata ad una precoce trasformazione leucemica (Mesa, Hanson et al. 2009), la delezione del braccio lungo del cromosoma 20 e la trisomia parziale del braccio lungo del cromosoma 1 (Reilly 2002). La trisomia del cromosoma 8 e la delezione del braccio corto del cromosoma 12 sembrano avere un significato prognostico negativo importante (Tefferi, 2001). Possono quindi essere coinvolti numerosi geni oncosoppressori, fra cui quello del retinoblastoma (RB-1), che è localizzato nella regione 13q14 e per il quale la perdita dell'eterozigosi è stata riscontrata nel 23% dei pazienti con PMF. La presenza di alterazioni cromosomiche è stata associata ad una prognosi infausta in numerosi studi (Dupriez, Morel et al. 1996). La risposta alla terapia infatti sembra essere inferiore nei pazienti con anomalie del cariotipo.

Durante il corso della malattia possono essere acquisite altre alterazioni citogenetiche che possono essere responsabili della progressione verso la fase leucemica: in particolare la mutazione del gene p53, la perdita dell'omozigosi del gene p16 e anomalie molecolari che coinvolgono i proto-oncogeni della famiglia RAS.

La presenza nel sangue periferico di cellule progenitrici ematopoietiche è una caratteristica comune delle sindromi mieloproliferative, ma in particolare riguarda la MF. Le cellule più rappresentate sono le CD34<sup>+</sup>, di cui è presente un numero molto maggiore rispetto alle altre Neoplasie Mieloproliferative Croniche Ph-. Il CD34 è un marcatore di superficie che identifica e permette l'isolamento delle cellule staminali ematopoietiche e dei precursori, poiché non è espresso sulle cellule differenziate. Analizzando questa popolazione cellulare utilizzando altri marcatori di superficie, come il CD38, è emerso che le cellule CD34<sup>+</sup> che lasciano il midollo dei pazienti con MF hanno diversi livelli di differenziazione. Il CD38 è infatti una molecola di membrana che è scarsamente espressa o del tutto assente sulle cellule ematopoietiche dotate di alto potenziale di autorigenerazione e di capacità differenziativa; il CD38 risulta coespresso con il CD34 nelle cellule in circolo in questi pazienti in percentuale molto variabile, dal 23 al 99% (Barosi, Viarengo et al. 2001).

Il numero delle cellule CD34<sup>+</sup> circolanti è un parametro importante per la diagnosi di MF: è stato infatti dimostrato che il numero di queste cellule è 360 volte più alto nei pazienti

rispetto alla popolazione sana, e da 18 a 30 volte maggiore rispetto ai casi di PV e TE. La soglia di  $15 \times 10^6/L$  permette di discriminare i casi di MF non in terapia citoriduttiva rispetto alle altre Neoplasie Mieloproliferative Croniche Ph-negative con un valore predittivo positivo del 98,4% e negativo dell'85%. In media, il numero di cellule CD34<sup>+</sup> tende ad aumentare durante l'evoluzione della malattia, ma soprattutto correla sia con il numero di blasti mieloidi in circolo che con l'entità della splenomegalia; nel complesso, quindi, questo valore è correlato con la progressione della malattia ed è un marcatore di metaplasia mieloide (Barosi, Viarengo et al. 2001) (Barosi, 2001). Questo valore tende inoltre a ridursi in seguito ad una efficace terapia citoriduttiva, suggerendo che i livelli di cellule CD34<sup>+</sup> varino in rapporto alla entità della massa tumorale, caratteristica che li renderebbe un marcatore di attività della malattia. A livello prognostico, è stata riscontrata una correlazione fra il numero di cellule CD34<sup>+</sup> circolanti e l'evoluzione verso la trasformazione leucemica: pazienti con valori maggiori di  $300 \times 10^6/L$  hanno il 50% di probabilità di sviluppare la fase blastica negli 11 mesi successivi.

Rispetto ai controlli, nei pazienti con MF sono presenti in circolo anche molte più cellule pluripotenti, in particolare le unità formanti le colonie CFU-MK (megacariocitarie), e in misura minore CFU-GM (granulo-monocitarie), BFU-E (unità formanti i bursts eritrocitari), CFU-GEMM (granulocitarie, eritroidi, monocitarie, megacariocitarie). I pazienti con PMF hanno molti più precursori circolanti anche rispetto ai pazienti con fibrosi midollare secondaria ad altre cause, come l'invasione midollare da metastasi di tumori solidi o in corso di fibrosi polmonare idiopatica. In questo caso la distruzione del sistema microvascolare del midollo indotta dalla fibrosi può essere sufficiente a spiegare la presenza di progenitori circolanti, mentre l'elevato numero che caratterizza la MF è indicativo della partecipazione anche di un difetto intrinseco delle cellule ematopoietiche. I meccanismi biologici e molecolari responsabili della proliferazione clonale sono tuttora sconosciuti, sebbene il vantaggio proliferativo sia dimostrato dalla crescita in vitro delle cellule appartenenti al clone mutato in maniera indipendente dai fattori di crescita o comunque con aumentata sensibilità ad essi (Taskin, Cohen-Solal et al. 1998).

**c-KIT.** Fra tutti i meccanismi molecolari analizzati, è stata riportata sia l'elevata espressione, sia una mutazione puntiforme di c-kit, il recettore per lo stem-cell factor (SCF) presente sulle cellule staminali circolanti. La mutazione avviene a carico di un codone localizzato nel dominio molecolare che stabilizza il sito di legame dello SCF e potrebbe essere la causa dell'aumento dell'attività tirosin-chinasica associata al recettore.

**b-FGF.** E' stato anche ipotizzato che l'evento alla base dell'anormale ematopoiesi nella IMF sia una deregolazione nella via di trasmissione del segnale del fattore di crescita dei fibroblasti (b-FGF). Questo fattore è prodotto da molti tipi cellulari tra cui le cellule ematopoietiche e stromali ed ha azione mitogena per le cellule stromali del midollo osseo. Inoltre è un potente fattore angiogenetico ed agisce sulla crescita delle cellule staminali legandosi ad un recettore associato a una tirosina chinasi. Nelle cellule CD34+ dei pazienti con IMF sia l'espressione del b-FGF sia la densità del recettore sono significativamente aumentati, in contrasto con la ridotta espressione del recettore del TGF- $\beta$ . (LeBousse-Kerdilès,1996).

**JAK2.** Recenti studi hanno suggerito il coinvolgimento della via di segnalazione costituita dalle proteine JAK/STAT, attraverso l'attivazione costitutiva di STAT-5 sia nelle cellule CD34<sup>+</sup> sia nei megacariociti (Komura, Tonetti et al. 2005). Recentemente è stata infatti descritta una mutazione somatica nell'esone 14 del gene *JAK2*, che codifica per una proteina con attività tirosin-chinasica associata al dominio citoplasmatico di molti recettori per citochine. Questa mutazione coinvolge il nucleotide 1849 e consiste nella sostituzione di una guanina con una timina, che origina un codone codificante una valina invece di uno per la fenilalanina (*JAK2V617F*). La sostituzione aminoacidica cade all'interno del dominio pseudo-chinasico della proteina, che esplica un'attività di controllo auto-inibitorio sull'attività chinasica di JAK2. La mutazione comporta la perdita di questa auto-inibizione e quindi un'attivazione costitutiva di JAK2 e di tutta la cascata di segnalazione a valle. Vari esperimenti hanno dimostrato che la mutazione *JAK2V617F* provoca la crescita cellulare indipendente da fattori di crescita e una ipersensibilità verso i fattori di crescita, come dimostra anche la crescita di colonie eritroidi spontanee (BFU-E) in pazienti con Policitemia Vera. Questa mutazione può pertanto rappresentare il primo marker molecolare della MF, anche se la maggior frequenza con cui si riscontra nella Policitemia Vera, suggerisce che vi siano altre possibili alterazioni metaboliche e molecolari alla base della patogenesi di questa malattia (Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005).

**MPL.** Recenti studi hanno identificato la presenza di mutazioni puntiformi a carico del gene *MPL* in pazienti affetti da Mielofibrosi Primaria e Trombocitemia Essenziale *JAK2* mutato negativi. Le mutazioni *MPLW515L* e *MPLW515K* conferiscono alla cellula un vantaggio proliferativo per attivazione costitutiva del recettore della TPO. Queste

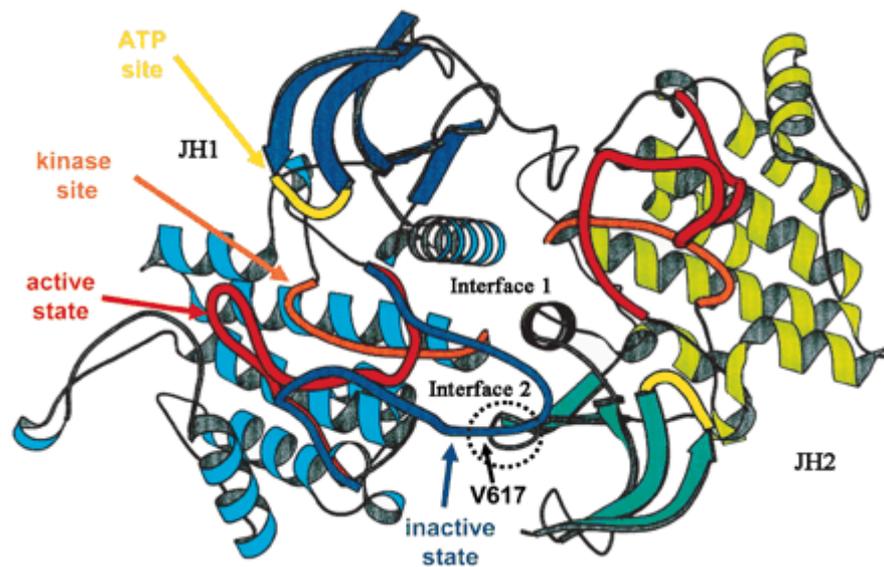
mutazioni sono presenti nel 5% circa dei pazienti affetti da mielofibrosi (Pardanani, Levine et al. 2006; Pikman, Lee et al. 2006).

Studi recenti si sono focalizzati sull' identificazione di ulteriori mutazioni in pazienti con malattie mieloproliferative croniche; tra queste, le mutazioni del gene TET2 (tet oncogene family member 2), IDH1 (Isocitrate dehydrogenase) / IDH2 e EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) sono di notevole interesse per i disordini mieloidi.

## LA MUTAZIONE JAK2 V617F

JAK2 è un membro della famiglia delle Janus Chinasi, proteine ad attività tirosin-chinasica che svolgono un ruolo chiave nella trasduzione del segnale intracellulare (Ihle and Kerr 1995; Ihle and Gilliland 2007).

Ogni proteina è costituita da 7 domini omologhi; il dominio C-terminale ha attività chinasica (JH1), il dominio pseudochinasico cataliticamente inattivo (JH2) svolge importanti funzioni regolatorie, il dominio SH2 è costituito dalle regioni JH3 e JH4 con capacità di legame specifiche per la fosforilazione e il dominio banda 4.1, costituito dalle regioni JH4-JH7, ha attività di interazione proteina-proteina (Figura 1) (Vainchenker, Dusa et al. 2008). La presenza dei due domini simili JH1 e JH2 nella proteina, uno attivo e l'altro inattivo, ricorda il dio romano Janus che aveva la capacità di guardare in due direzioni opposte, da qui il nome della proteina (Vannucchi 2008).

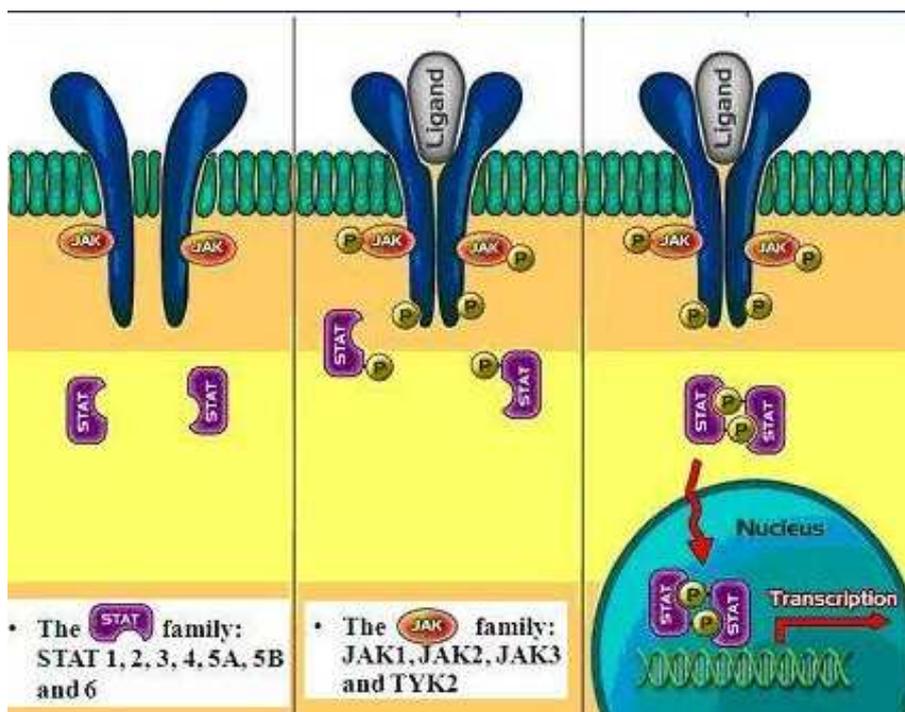


**Figura 1.** Struttura della proteina JAK2 con evidenziati i siti JH1 e JH2 e la mutazione V617F

Le proteine JAK funzionano come intermediari tra i recettori di membrana e messaggeri intracellulari. Quando una particolare citochina o un fattore di crescita si lega al recettore specifico sulla superficie cellulare, le proteine JAK associate alla regione

intracitoplasmatica del recettore si fosforilano e a loro volta facilitano la fosforilazione di secondi messaggeri intracellulari, in particolare quelli che appartengono alla famiglia di STAT.

STAT una volta attivata entra nel nucleo e agisce come fattori di trascrizione. JAK2 sembra essere attivato in particolare quando i recettori legano fattori di crescita emopoietici come l'EPO, IL-3, IL-5, G-CSF, GM-CSF e TPO (Figura 2). In effetti JAK2 è stato funzionalmente associato ai recettori per fattori di crescita omodimerici di tipo I, cioè non dotati di attività chinastica intrinseca. Oltre al suo ruolo nella trasmissione del segnale, JAK2 funziona come molecola di trasporto e contribuisce alla stabilizzazione di MPL espresso in membrana (questa ultima funzione potrebbe rendere ragione delle anomalie di espressione di MPL sopra ricordate) (Delhommeau, Pisani et al. 2006; Staerk, Lacout et al. 2006).



**Figura 2.** Ruolo delle proteine JAK2 nella trasduzione del segnale

Recenti studi hanno identificato nel gene JAK2, localizzato sul braccio corto del cromosoma 9 (p24), una mutazione puntiforme specifica delle forme mieloproliferative Ph negative. La mutazione è dovuta allo shift di una G → T nel codone 617, all'esone 12; questo porta alla sostituzione di una valina con una fenilalanina. Questa mutazione è localizzata nel dominio pseudo-chinastico JH2 di JAK2 che ha una funzione inibitoria nei

confronti della attività tirosin-chinasica. JH2 normalmente interagisce e blocca il loop di attivazione del dominio chinasico attivo JH1; la mancanza di inibizione porta ad una attivazione costitutiva del recettore per il mantenimento dell'autofosforilazione di JAK2 con una conseguente anormale risposta alle citochine (Levine and Gilliland 2007). Infatti le cellule trasdotte con il gene mutato acquisiscono indipendenza dal fattore di crescita e mostrano una risposta abnorme a concentrazioni fisiologiche della citochina specifica.

V617F non rappresenta un polimorfismo genico, ma una mutazione somatica della cellula emopoietica, riscontrata nella linea mieloide e in alcuni casi anche in quella linfoide, mentre è assente nelle cellule non emopoietiche, ad esempio le cellule della mucosa buccale.

Studi *in vitro* hanno evidenziato che, in seguito all'attivazione costitutiva del recettore dovuta alla mutazione, i progenitori eritroidi acquisiscono la capacità di crescita e di maturazione indipendente dall'eritropoietina (Epo) e da fattori di crescita come IL-3.

La frequenza di JAK2V617F è molto alta nei pazienti affetti da PV (Tefferi 2006; Tefferi, Strand et al. 2007; Vannucchi, Antonioli et al. 2007); infatti, secondo gli ultimi dati riportati da Campbell et al.(2006), applicando metodiche di laboratorio più sensibili, si possa riscontrare la mutazione nella quasi totalità dei pazienti con diagnosi di PV (Campbell and Green 2006).

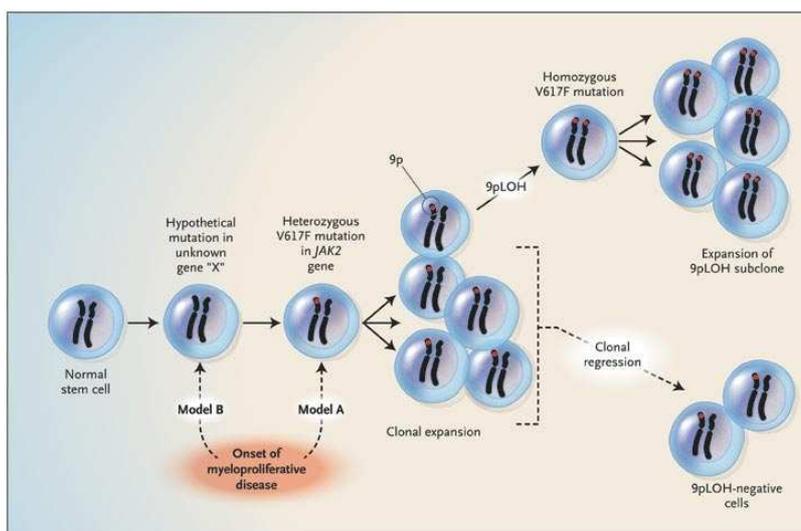
La mutazione V617F non è comunque specifica per PV dal momento che si trova nel 50-70% dei pazienti con TE o con Mielofibrosi Primaria (PMF).

Circa il 25-30% dei pazienti affetti da PV o da PMF, e soltanto il 2-4% dei pazienti affetti da TE, presentano la mutazione V617F di JAK2 in uno stato di omozigosi. Questa condizione è caratterizzata da una quota di allele JAK2 mutato maggiore del 51% nei granulociti; mediante FISH e PCR quantitativa Taqman è stato osservato che la presenza di omozigosi è secondaria ad un meccanismo di ricombinazione mitotica a livello del cromosoma 9p con duplicazione dell'allele mutato, e non ad una delezione allelica.

Kralovics riporta una associazione significativa tra la presenza di omozigosi e una più lunga durata di malattia nelle diverse forme di MPN; l'osservazione è stata confermata da altri sollevando la possibilità che lo stato omozigote per l'allele mutato sia un evento evolutivo che sopraggiunge nel tempo. Kralovics (2005) ha quindi proposto un modello a 2 step per il ruolo di JAK2 nell'evoluzione delle MMPC.

1°step: la mutazione somatica è acquisita nel progenitore emopoietico o nella cellula staminale. Questo porta successivamente all'espansione di un clone eterozigote che sostituisce l'emopoiesi normale.

2°step: ricombinazione mitotica nella cellula staminale eterozigote da cui origina una cellula omozigote che poi si espande e avendo un vantaggio proliferativo sostituisce anche l'emopoiesi eterozigote. (Figura 3)



**Figura 3.** Possibile ruolo della mutazione JAK2 V617F e della ricombinazione mitotica nella patogenesi delle sindromi mieloproliferative croniche.

La stessa mutazione è stata inoltre riscontrata meno frequentemente nelle sindromi mielodisplastiche, nella mastocitosi sistemica, nella leucemia neutrofilia cronica, nelle sindromi ipereosinofile e in altri disordini mieloproliferativi atipici (Jelinek, Oki et al. 2005; Jones, Kreil et al. 2005; Steensma, Dewald et al. 2005), in particolare nelle anemie refrattarie con sideroblasti e trombocitosi (Ceesay, Lea et al. 2006; Schmitt-Graeff, Teo et al. 2008; Malcovati, Della Porta et al. 2009; Wardrop and Steensma 2009).

Invece è infrequente nella leucemia mielomonocitica cronica e nelle leucemie acute, ed è assente nelle forme linfoproliferative acute e croniche.

Nelle forme familiari di MPN, per i pazienti affetti da PV o TE, la presenza della mutazione in forma omozigote è associata ad un maggior rischio di complicazioni tra cui una più frequente evoluzione in LAM e in PMF (Bellanne-Chantelot, Chaumarel et al. 2006).

Successivamente Vannucchi et al hanno valutato l'impatto dello stato di omozigosi sul fenotipo clinico di pazienti con PV e TE in un ampio studio retrospettivo multicentrico eseguito su 1035 pazienti. È stata dimostrata una correlazione diretta tra la quota di allele

mutato e i valori di leucociti, ematocrito, LDH e ALP, e i livelli di espressione di PRV-1 ed una correlazione inversa con MCV e la conta piastrinica. Inoltre pazienti con livelli elevati di quota allelica (JAK2V617F >75%) presentavano un quadro clinico fortemente sintomatico, caratterizzati più frequentemente da splenomegalia, prurito, eventi trombotici e necessità di effettuare terapia citoriduttiva oltre ai salassi per tenere sotto controllo la malattia (Vannucchi, Antonioli et al. 2007). Lo stesso tipo di valutazione eseguita su 260 pazienti affetti da TE descriveva come i pazienti JAK2<sup>V617F</sup> positivi presentassero livelli elevati di ematocrito e leucociti e ridotti livelli di plt senza che ci fosse però una chiara correlazione tra i parametri ematici e la quota di allele mutato (Antonioli, Guglielmelli et al. 2008). Viene descritta un'associazione tra la frequenza della splenomegalia e l'incidenza di eventi trombotici soprattutto di tipo arterioso, e la quota allelica. Si ipotizza che ciò potrebbe essere legato alla quantità di allele mutato: il valore medio nelle ET è  $23\pm 17\%$ , significativamente inferiore a quello trovato in pazienti con PV ( $54\pm 24\%$ ) o in pazienti con PMF ( $43\pm 42\%$ ) o con forme secondarie post-PV e post-TE ( $60\pm 35\%$ ).

**PREDISPOSIZIONE GENETICA ALLO SVILUPPO DI NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE  
CRONICHE Ph-NEGATIVE: L'APLOTIPO 46/1**

La mutazione V617F del gene JAK2 si riscontra nel 95% dei soggetti affetti da PV e circa nel 60% dei pazienti con TE o MF. Non è ancora chiaro come questa stessa mutazione possa originare tre patologie clinicamente differenti. E' probabile che ci siano delle alterazioni ancora sconosciute che modulano il fenotipo clinico associato alla mutazione JAK2 V617F.

Studi recenti hanno valutato l'ipotesi che fattori ereditari possano predisporre allo sviluppo di MPN V617F positive (Jones, Chase et al. 2009; Kilpivaara, Mukherjee et al. 2009; Olcaydu, Harutyunyan et al. 2009). Sono stati analizzati un gruppo di SNP che coinvolgono il gene JAK2 in soggetti con MPN che presentavano un clone omozigote per la mutazione V617F, con % allele V617F>50. Il clone si originava per disomia uniparentale acquisita (aUPD) del braccio corto del cromosoma 9 (9p), fenomeno che si riscontra frequentemente in PV e MF, mentre è più raro nelle TE. Questa analisi ha rivelato che il 77% degli alleli V617F avevano un identico aplotipo, denominato 46/1 o "GGCC" (combinazione degli aplotipi 46 e 1 che differiscono per un unico SNP). (Tabella 2).

Haplotype number	rs7864782	rs10124001	rs10758669	rs1327493	rs6476934	rs10815144	rs7046736	rs2149556	rs12342421	rs10974944	rs10119004	rs10974947	rs12343867*	rs12340895*	rs2031904	rs10491652	rs11793659	rs17425637	rs17425819	rs10815160
1	G	C	C	C	T	A	A	T	G	G	A	G	C	G	G	C	G	T	T	T
8	G	C	A	C	T	A	C	T	C	C	A	A	T	C	A	C	A	C	C	G
32	G	C	.	C	T	G	.	C	.	C	G	.	T	C	.	C	A	C	C	T
38	G	C	A	G	G	A	C	T	C	C	A	A	T	C	G	C	A	C	C	G
46	A	C	C	C	T	A	A	T	G	G	A	G	C	G	G	C	G	T	T	T
55	A	C	.	C	T	A	.	T	.	C	A	.	T	C	.	C	A	C	C	G
71	A	C	A	C	T	G	C	C	C	C	A	G	T	C	G	C	A	C	C	T
76	A	C	A	C	T	G	C	C	C	C	G	G	T	C	G	C	A	C	C	T
88	A	T	A	C	T	G	A	T	G	C	G	G	T	C	G	C	G	T	T	T

**Tabella 2.** SNP che definiscono l'aplotipo 46/1

Questo indicava che l'omozigosi per V617F non era acquisita casualmente ma avveniva preferenzialmente quando la mutazione era presente su un particolare aplotipo. E' stata

poi comparata la frequenza dell'aplotipo 46/1 in una popolazione di soggetti sani rispetto ad un gruppo di soggetti con MPN eterozigoti per V617F ed è risultato che la frequenza del 46/1 nella popolazione sana è più bassa. Sono state proposte due ipotesi sulla ragione di questa associazione tra l'aplotipo 46/1 e le NMP. La prima ipotesi, cosiddetta dell'ipermutabilità, sostiene che la presenza dell'aplotipo 46/1 determini un aumento del rate mutazionale in questa regione. Secondo l'ipotesi del "terreno fertile", invece, l'aplotipo 46/1 sarebbe in linkage disequilibrium con una variante funzionale sconosciuta che interagendo con la mutazione V617F rende più probabile lo sviluppo della malattia clinicamente manifesta, rispetto alle forme V617F positive ma con un aplotipo diverso. Alcuni studi hanno successivamente sostenuto che l'aplotipo 46/1 possa predisporre anche allo sviluppo di NMP con mutazioni dell'esone 12 di JAK2 ( Olcaydu et al. Leukemia 2009) o mutazioni del gene MPL (Jones, Campbell et al. 2010) (Jones et al. Blood 2010). Tuttavia il meccanismo molecolare alla base dell'associazione tra questo aplotipo e le NMP, così come il suo significato prognostico, rimangono ancora da chiarire.

Per valutare se JAK2 con aplotipo 46/1 sia funzionalmente diverso è stata valutata la capacità dell'aplotipo di influenzare la formazione di colonie mieloidi in soggetti normali. E' stato riscontrato che individui con almeno un allele 46/1 hanno una ridotta crescita di colonie granulocito-macrofagiche (CFU-GM) ma non c'è effetto sulle colonie eritroidi (BFU-E) (Jones et al. Nature Genetics 2009)

Un altro studio ha recentemente dimostrato che soggetti con MPN hanno la tendenza ad acquisire mutazioni di JAK2 con una frequenza maggiore rispetto a quella che ci si aspetterebbe da un fenomeno di mutagenesi casuale (Olcaydu et al. Nature Genetics 2009). E' stato infatti dimostrato che possono verificarsi acquisizioni multiple della mutazione V617F nello stesso individuo. L'analisi di 109 soggetti con MPN JAK2V617F positivi ed eterozigoti per un polimorfismo nell'introne 14 del gene (rs12343867), ha rivelato, attraverso la genotipizzazione del locus polimorfo, che circa il 3% dei soggetti avevano acquisito indipendentemente la mutazione su entrambi gli alleli. L'acquisizione multipla di mutazioni oncogene nello stesso gene non era stata precedentemente dimostrata in neoplasie ematologiche, mentre era un meccanismo già noto per KRAS e KIT nei tumori solidi. Lo studio ha inoltre rivelato che la distribuzione della mutazione V617F non era uguale tra i due alleli parentali. Nell'85% dei soggetti infatti la mutazione era acquisita sull'allele portatore della variante C del polimorfismo rs12343867. Confrontando lo stesso gruppo di pazienti con una

popolazione di controllo costituita da soggetti con MPN JAK2V617F negativi è risultato che i soggetti eterozigoti per il polimorfismo rs12343867 o omozigoti per la variante C erano più frequentemente V617F positivi. Questo dimostrava l'esistenza di uno specifico aplotipo che aumenta la suscettibilità alla mutazione JAK2V617F. Per meglio definire questo aplotipo sono stati analizzati un totale di 8 SNP del gene JAK2. Quattro di questi sono risultati associati alla mutazione V617F ed in particolare due aplotipi, definiti TCTT e GGCC, sono risultati molto frequenti nei soggetti con MPN JAK2V617F positivi. Ulteriori analisi sono state svolte in soggetti con disomia uniparentale acquisita del 9p, fenomeno che si osserva nel clone JAK2V617F positivo e che determina l'acquisizione di uno stato omozigote mutato per perdita dell'allele JAK2 WT. Gli individui con 9pUPD sono quindi omozigoti anche per l'aplotipo che ha acquisito la mutazione V617F. L'analisi di 17 soggetti con 9pUPD ha dimostrato che nel 88% dei casi la mutazione V617F viene acquisita sull'aplotipo GGCC (SNP rs3780367 rs10974944 rs12343867 rs1159782). Questo aplotipo è in parte sovrapponibile al 46/1. (Olcaydu et al. Nature Genetics 2009).

L'associazione tra l'aplotipo GGCC e le MPN JAK2V617F positive è stato dimostrato anche in un altro studio in cui è visto che la mutazione V617F viene acquisita preferenzialmente in CIS rispetto all'allele G di rs10974944. Questo suggerirebbe un'interazione diretta tra la variante genica specifica dell'aplotipo e l'acquisizione di mutazioni secondarie sullo stesso filamento. (Kilpivaara et al. Nature Genetics 2009)

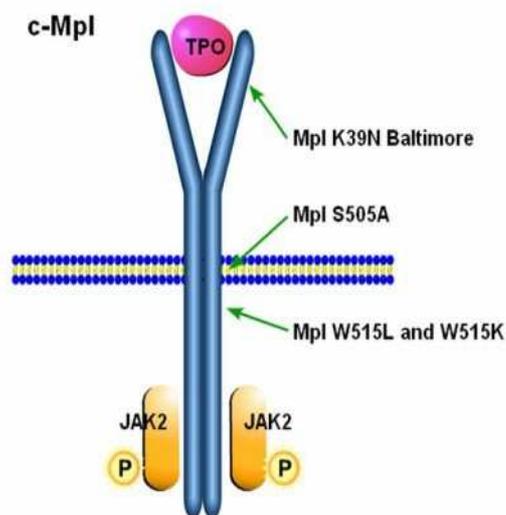
Ulteriori studi condotti sull'aplotipo 46/1 hanno recentemente dimostrato che lo SNP rs12343867 è un indicatore prognostico nelle Mielofibrosi Primarie. La genotipizzazione di 130 pazienti affetti da PMF ha rilevato che frequenza dell'allele C è del 50% nell PMF V617F positive e del 36% nelle PMF V617F negative, entrambe significativamente più alte della frequenza nella popolazione di controllo, confermando nuovamente il ruolo di questa variante genica quale fattore di rischio per lo sviluppo di MPN JAK2 positive. Inaspettatamente la correlazione clinica ha dimostrato che il genotipo T/T per rs12343867 è un indice prognostico negativo per la sopravvivenza dei pazienti affetti da PMF (Tefferi, Lasho et al. 2010) (Tefferi et al. Leukemia 2010).

L'incidenza dello SNP rs12343867 è stata valutata anche in soggetti affetti da Trombocitemia Essenziale. Anche in questa classe di pazienti la frequenza dell'allele C risulta aumentata rispetto alla popolazione di controllo. Non sembra esserci

differenza nell'incidenza dell'allele C tra TE JAK2 V617F positive con V617F allele burden < 10% e TE JAK2 negative. Nei soggetti con carica allelica V617F maggiore del 10% invece si nota una frequenza dell'allele C pari al 57%, contro il 38% delle TE JAK2 negative. L'aplotipo 46/1 predispone quindi allo sviluppo di TE ma la sua presenza non sembra influenzare il fenotipo clinico o la prognosi (Pardanani et al. Leukemia 2010). La causa di questa associazione tra un particolare aplotipo e l'acquisizione della mutazione JAK2V617F e lo sviluppo di Neoplasie Mieloproliferative Croniche Ph negative non è ancora chiara. Si ipotizza che gli aplotipi contribuiscano alla malattia modificando l'espressione del gene oppure modificando la funzionalità proteica. Un'altra ipotesi è che le varianti geniche possano aumentare la mutabilità di una certa regione causando aumento dei danni al DNA o aumento dell'infedeltà replicativa e pertanto risultare strettamente associati ad una malattia.

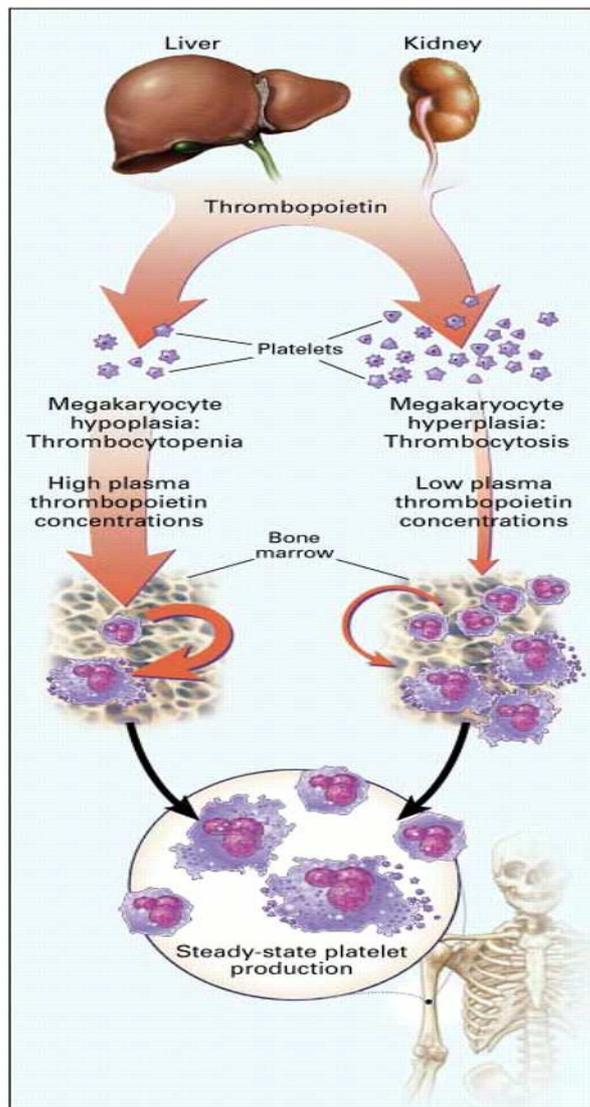
## LE MUTAZIONI DI MPL

Il recettore MPL (Figura 4) è una proteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei recettori delle citochine ematopoietiche. Il gene codificante è localizzato sul cromosoma 1p34 ed è composto da 12 esoni. Il dominio extracitoplasmatico è simile alla catena beta condivisa dai recettori per IL-3, IL-5 e GM-CSF. MPL sembra funzionare come un omodimero dopo il “binding” del ligando, e non forma complessi eterologhi con nessuna catena conosciuta. Immediatamente dopo il dominio idrofobico transmembrana di 25 aminoacidi vi è un dominio di trasmissione di 122 aminoacidi altamente conservato, che non presenta una significativa omologia con altre proteine note. Il promoter del gene MPL regola la sua espressione sulla superficie cellulare dei precursori megacariocitari, dei megacariociti maturi, delle piastrine e delle cellule staminali emopoietiche e contiene i siti di legame per proteine quali GATA- 1, Ets e Sp1 11.



**Figura 4:** Il recettore MPL

MPL è il recettore per la trombopoietina (TPO), la principale citochina responsabile della proliferazione e della maturazione dei megacariociti e della formazione delle piastrine attraverso tutti gli stadi di differenziazione a partire dalla cellula staminale ematopoietica. La trombopoietina regola quindi i livelli di piastrine circolanti, causando un aumento del numero di megacariociti a livello midollare (Kaushansky 2005; Kaushansky 2008) (Figura 5).



**Figura 5:** Meccanismo di azione e regolazione della Trombopoietina

Quando viene stimolato dal legame con TPO, MPL forma un omodimero e lega Jak2, una proteina ad attività tirosino-chinasica che è coinvolta nella via di trasduzione del segnale di molti recettori. Una volta legatosi al recettore, Jak2 si attiva e fosforila MPL e molti altri substrati, in particolare la famiglia di proteine STAT. A loro volta queste molecole, una volta attivate, agiscono nel nucleo come fattori di trascrizione.

È stato visto che la maggior parte dei pazienti con Policitemia Vera e IMF presentano una riduzione dell'espressione di MPL nelle piastrine, associata con un'incompleta glicosilazione del recettore stesso. Questo provoca un difetto nell'attivazione della cascata delle chinasi, con conseguente alterazione della fosforilazione delle proteine JAK2 e STAT5, coinvolte della trasduzione del segnale. (Moliterno, 1998).

L'anormalità dell'effetto del legame TPO-recettore può spiegare l'indipendenza del clone neoplastico dai fattori di crescita normalmente essenziali e dare ragione degli elevati livelli di trombopoietina nel siero dei pazienti, in assenza dell'atteso aumento della massa di megacariociti e piastrine. Tuttavia questa alterazione non è specifica della IMF, essendo stata riscontrata anche nella maggioranza dei pazienti affetti da Policitemia Vera, sebbene il difetto venga acquisito durante la progressione verso la splenomegalia e la fibrosi. Questo potrebbe suggerire un comune meccanismo patogenetico per PV e IMF. (Moliterno,1998)

Sono stati creati dei modelli animali con questo difetto, anche se non è ancora certo se essi possano essere considerati delle fedeli riproduzioni della malattia umana (Villevall, Cohen-Solal et al. 1997). Nei topi l'iperespressione del gene della trombopoietina porta a trombocitosi, iperplasia dei megacariociti nella milza e nel midollo, ematopoiesi extramidollare, mielofibrosi ed osteosclerosi, insieme ad elevati livelli di TGF- $\beta$  e PDGF(Chagraoui, Komura et al. 2002; Chagraoui, Tulliez et al. 2003; Chagraoui, Wendling et al. 2006; Lacout, Pisani et al. 2006). Lo stesso risultato si ottiene facendo esprimere in modo ridotto ai topi il gene GATA-1, a seguito di una delezione mirata di specifiche sequenze regolatrici, con conseguente ridotta espressione di questo fattore di trascrizione importante nella differenziazione terminale di eritrociti e megacariociti. La fibrosi in questi animali è correlata con la proliferazione megacariocitaria, in conseguenza della loro ridotta differenziazione legata alla mutazione di GATA-1 (Vannucchi, Bianchi et al. 2002; Vannucchi, Bianchi et al. 2004).

In ogni caso rimane fondamentale la produzione di TGF- $\beta$ , in quanto topi knockout per questo gene sviluppano iperplasia megacariocitaria ma non fibrosi. (Chagraoui, Komura et al. 2002; Gastinne, Vigant et al. 2007).

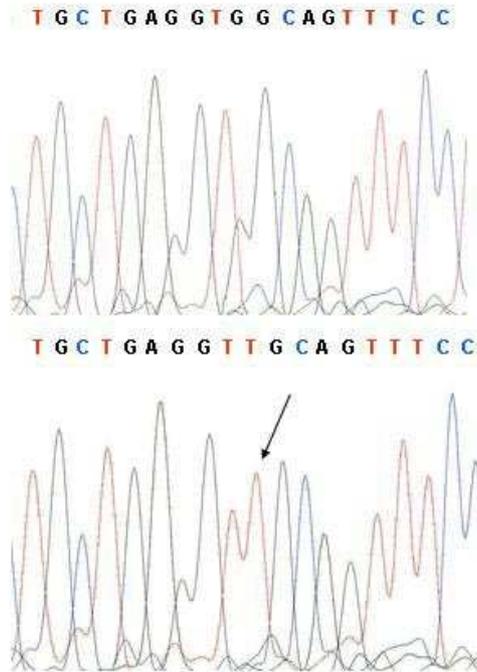
Studi su cellule Ba/F3 trasfettate con il gene di MPL, hanno rilevato l'insorgere di una mutazione spontanea nel dominio intracellulare, con sostituzione aminoacidica di un triptofano con una serina in posizione 508. Questa mutazione induce l'attivazione costitutiva di MPL e causa proliferazione cellulare indipendente da fattori di crescita. (Abe, 2002). Successivamente, in alcuni pazienti affetti da MPD, è stata individuata, nel dominio extracellulare del recettore, una mutazione puntiforme a carico del nucleotide 1238 che consiste nella sostituzione di una guanina con una timida e comporta la variazione dell'amminoacido codificato da lisina ad asparagina (K39N). La mutazione,

denominata Mpl Baltimore, è stata associata a trombocitosi e ad una ridotta espressione piastrinica di MPL (Moliterno, Williams et al. 2004).

Nonostante la recente scoperta della mutazione JAK2V617F, permane una elevata percentuale di pazienti con IMF che non presentano questa alterazione e per i quali non è ancora noto un meccanismo molecolare che possa spiegare l'insorgere della malattia. Per questo è stato ipotizzato che l'attivazione della via di segnalazione JAK/STAT potesse avvenire come conseguenza di mutazioni attivanti di altri recettori per citochine presenti sulle cellule ematopoietiche, tra cui MPL. L'attenzione si è focalizzata sul dominio transmembrana, che è critico per la dimerizzazione del recettore, e sul dominio iuxtamembrana, che costituisce il sito di legame per JAK2.

L'analisi di questi domini ha permesso di identificare, in pazienti con IMF JAK2V617F-negativi, una mutazione puntiforme a livello del nucleotide 1544, con sostituzione di una guanina con una timida. Questa mutazione si riflette a livello proteico nella sostituzione di un triptofano con una leucina in posizione 515 (MPLW515L) (Figura 6). Analisi comparative del DNA prelevato da cellule della mucosa orale hanno dimostrato che MPLW515L è una mutazione somatica presente solo nelle cellule ematopoietiche derivanti dal clone neoplastico. (Pikman, 2006). Per valutare gli effetti della mutazione sono stati creati tramite esperimenti di trasfezione dei modelli murini esperimenti MPLwt e MPLW515L. Nei topi esperimenti il recettore mutato è stata osservata la comparsa di una MPD letale, caratterizzata da marcata trombocitosi e leucocitosi, splenomegalia, epatomegalia e fibrosi midollare reticolinica. Cellule provenienti dalla milza di questi animali sono state testate per la loro capacità di originare colonie megacariocitarie (CFU-MK) e solo le cellule provenienti da topi esperimenti MPLW515L hanno mostrato la capacità di formare colonie in assenza di citochine. È stato così dimostrato che la mutazione MPLW515L induce attivazione della via di segnalazione JAK/STAT, in assenza di ligando. Quest'ultima osservazione è sicuramente interessante per comprendere lo status di malattia dei pazienti con IMF che non presentano alterazione di JAK2.

## MPL<sup>W515L</sup>



**Figura 6:** Cromatogramma del gene MPLwt (sopra) con la tripletta TGG codificante per il triptofano e del mutante MPLW515L (sotto) con la tripletta TTG codificante una leucina.

Ulteriori studi su MPL hanno rilevato, in alcuni pazienti affetti da MPD, un'altra mutazione a carico del codone 515 (MPLW515K) (Figura 7). Si tratta di una doppia sostituzione nucleotidica che modifica la tripletta da TGG del wt ad AAG del mutato, determinando una sostituzione da triptofano a lisina nella catena amminoacidica. (Pardanani, 2006). Anche questa mutazione causa attivazione costitutiva del recettore e quindi della via di segnalazione a valle di esso.



**Figura 7:** Cromatogramma della sequenza di MPLW515K.

Questi studi hanno sottolineato l'importanza del motivo anfipatico KWQFP (che comprende il codone 515), presente nella zona di giunzione tra dominio transmembrana e dominio citoplasmatico, nella patogenesi delle MPD. È stato infatti osservato che la delezione di questo segmento del recettore, sia umano che murino, causa attivazione della cascata di segnalazione in assenza di ligando (Staerk, Kallin et al. 2005). Inoltre era stata precedentemente identificata una mutazione attivante nel dominio transmembrana di MPL (MPLS505N) in un caso di TE familiare (Ding, Komatsu et al. 2009).

Complessivamente le mutazioni MPLW515L/K sono presenti con una frequenza del 5-8% nei pazienti con PMF (Guglielmelli, Pancrazzi et al. 2007), del 5% nei pazienti con TE e, al momento non si sono osservate in pazienti affetti da PV. Studi molto recenti hanno dimostrato che le mutazioni JAK2V617F e MPLW515L/K possono coesistere in pazienti affetti da IMF. È stata valutata la carica allelica delle due mutazioni ed è stato osservato che un clone mutante MPL più grande si accompagna solitamente ad un clone mutante JAK2 meno rilevante. Entrambe le mutazioni sembrano essere eventi precoci della malattia e si ipotizza che le variazioni fenotipiche siano dovute non solo alla presenza della mutazione ma soprattutto alle fluttuazioni della carica allelica nel tempo. (Lasho, 2006).

La ricerca delle mutazioni del recettore MPL, nei pazienti affetti da Mielofibrosi Idiopatica assume una notevole importanza poiché esiste tuttora una quota di pazienti per i quali non è stato individuato un marcatore molecolare che spieghi la presenza della malattia. In uno studio pubblicato sul BJH nel 2007 (Guglielmelli et al. BJH 2007) è stata analizzata una popolazione di soggetti affetti da PMF e la frequenza delle mutazioni MPLW515L/K è risultata dell'8.2%, confermando dati precedentemente riportati in letteratura.

Le due alterazioni W515L e W515K si presentano in questo gruppo di pazienti con la stessa frequenza, diversamente da quanto riportato in precedenti studi che segnalavano un rapporto di 3:1 per la mutazione W515L rispetto all'altra. (Pardanani et al. 2006).

Dal punto di vista clinico, la presenza della mutazione MPL è risultata associata ad un'anemia più marcata rispetto a quella dei pazienti wild type. Di conseguenza i soggetti mutati risultano più frequentemente dipendenti da trasfusioni.

L'analisi statistica dimostrava una correlazione significativa fra la presenza di mutazione e il sesso femminile, inoltre i pazienti con MPLW515L/K erano in media più vecchi dei

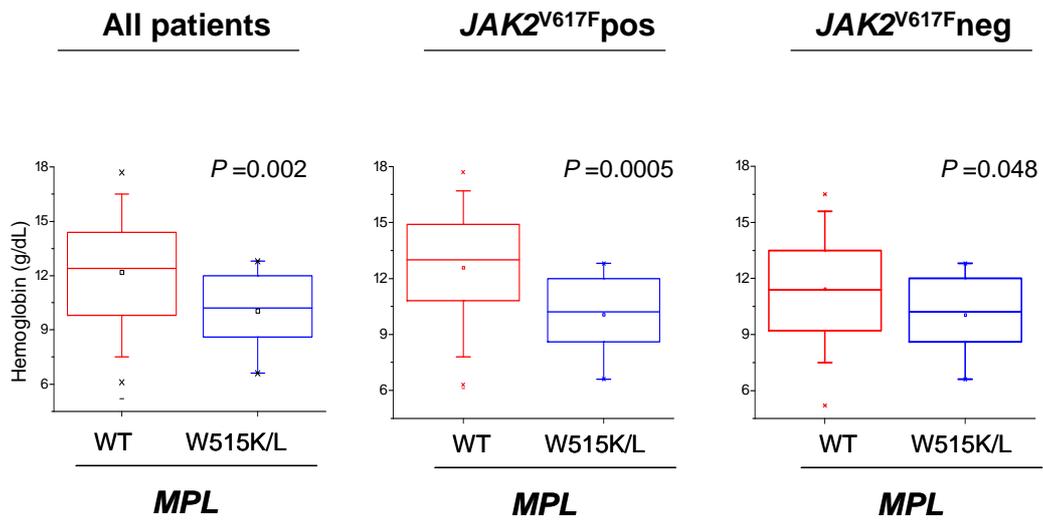
pazienti WT. Non vi era invece alcuna differenza statisticamente rilevante nella durata della malattia. L'analisi dei parametri clinici dei pazienti sono riportate nella tabella 3.

I dati mostravano che non vi erano differenze nella conta dei globuli bianchi, delle cellule CD34+ circolanti, dei blasti circolanti, delle piastrine o nella superficie della milza, dipendenti dallo status di MPL. I livelli di emoglobina invece significativamente più bassi nei pazienti mutati. Nel gruppo dei pazienti MPLW515L/K positivi inoltre, il 38.9% risultava dipendente da trasfusioni, contro il 14% dei pazienti negativi per la mutazione. La mutazione di MPL sembra quindi determinare un fenotipo caratterizzato da una anemia più severa rispetto ai pazienti WT.

La mutazione MPL coesisteva con la mutazione JAK2V617F in 4 pazienti, pari al 22.2%, di cui due ciascuno con la mutazione W515K e W515L; in 3 dei 4 casi la mutazione JAK2V617F era presente in forma eterozigote.

La presenza della mutazione JAK2V617F, che si accompagna generalmente a valori di emoglobina più elevati in pazienti con tutte e tre le sindromi mieloproliferative croniche, non modificava in maniera significativa i livelli di emoglobina nei pazienti MPL mutati. Infatti il valore di Hb era di 9.9 g/dL nei pazienti doppio-mutati (JAK2 e MPL) rispetto ai 10.1 g/dL nei pazienti MPL mutati/JAK2 wild-type. D'altro canto, nei pazienti MPL wild-type il valore di emoglobina risultava significativamente più elevato in presenza della mutazione JAK2V617F rispetto a quelli che erano JAK2 wild-type (13.0 g/dL versus 11.5 g/dL,  $P=0.0012$ ). (Figura 8)

Nell'analisi statistica multivariata al fine di valutare il reale peso della mutazione MPL nella anemia dei pazienti con PMF MPL mutati, risultava essere indipendentemente associata alla anemia con  $p=.03$ .



**Figura 8.** La figura mostra il valore medio di emoglobina in rapporto alla presenza o meno della mutazione JAK2V617F e MPL W515K/L nei pazienti con IMF. I rettangoli indicano il range che contiene il 50% dei valori, la linea orizzontale il valore mediano, e le linee verticali il range globale dei valori. La significatività statistica è indicata.

## NUOVE MUTAZIONI GENOMICHE NELLE NMP Ph-NEGATIVE

Nonostante la determinante scoperta delle mutazioni a carico dei geni JAK2 ed MPL nella maggior parte dei pazienti affetti da NMP ph-negative, sta aumentando l'evidenza che queste mutazioni non sono in grado di spiegare completamente la patogenesi delle NMP. Basti considerare che, nonostante l'identificazione di queste mutazioni, rimane una quota di circa il 30-40% dei pazienti con TE o PMF che non hanno un marcatore genetico. L'identificazione di un numero via via crescente di nuove mutazioni geniche identificate nell'ultimo anno a carico di diversi geni quali TET oncogene family member 2 (TET2), Additional Sex Combs-Like 1 (ASXL1), Casitas B-lineage lymphoma protooncogene (CBL), Isocitrate dehydrogenase (IDH1/IDH2), IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1) e Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) (Tefferi 2010), seppur riscontrabili in una minoranza di pazienti, ha permesso di definire le NMP come disordini dalla patogenesi molecolare complessa, multifattoriale ed ancora da caratterizzare appieno. Il significato patogenetico nello sviluppo delle NMP resta ancora da definire in larga parte. Da un punto di vista funzionale, le alterazioni sopra elencate sembrano comportare la deregolazione della via di segnalazione JAK-STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), una anomala modulazione epigenetica della trascrizione e un accumulo eccessivo di oncoproteine. Tuttavia nessuna di queste mutazioni risulta MPN specifica. Sono molti infatti, tuttora, i dati da chiarire : se tali alterazioni sono riconducibili ad un clone ancestrale comune, se e come contribuiscono all'avvio della malattia, all'evoluzione clonale e/o alla trasformazione neoplastica. Infatti, le mutazioni in questione sono state dimostrate in tempi diversi dall'evoluzione clonale delle NMP, in quanto possono manifestarsi sin dall'esordio della malattia, in alcuni casi ancora prima dell'acquisizione delle mutazioni di JAK2 o MPL, in altri variamente nel decorso, in altri in coincidenza della trasformazione leucemica. Quest'ultimo aspetto in particolare è di interesse , in quanto i meccanismi molecolari che portano alla trasformazione della malattia da una forma cronica alla fase terminale leucemica, assolutamente orfana di terapia, sono largamente sconosciute.

Le caratteristiche funzionali delle mutazioni TET2, EZH2, ASXL1, CBL, IDH e IKZF1 sono ancora da definire; studi recenti dimostrano che l'incidenza generale in pazienti con Neoplasie Mieloproliferative Croniche varia da 0 a 17%, e sono riscontrabili anche in altri disordini quali la leucemia mieloide cronica (TET2, ASXL1,CBL) la leucemia

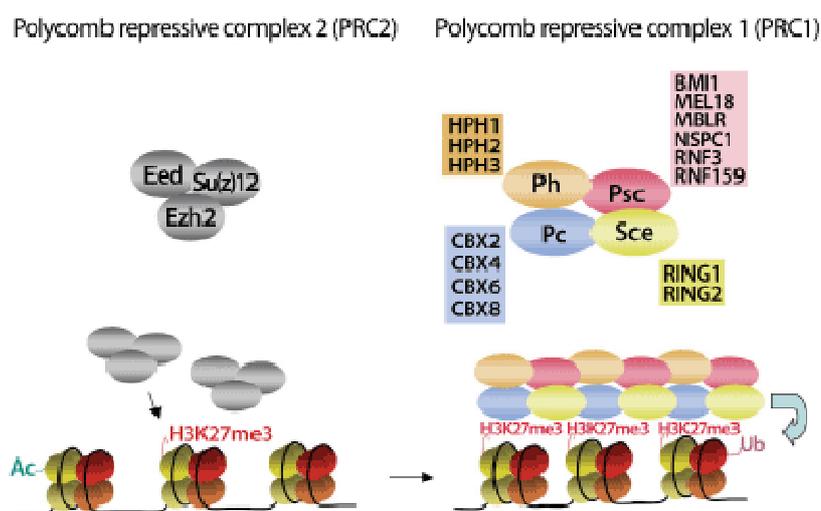
mielomonocitica, (CBL), la mastocitosi (TET2), le sindromi mielodisplastiche (TET2, ASXL1) e la leucemia mieloide acuta secondaria a MPN (IDH, ASXL1, IKZF1). Mutazioni del gene EZH2, invece, sono state riscontrate nelle sindromi mielodisplastiche e, tra le MPN, nella mielofibrosi primaria con conseguente inattivazione dell'attività metiltrasferasica della proteina stessa, suggerendone un ruolo come soppressore tumorale nei disordini mieloidi. Nell'ambito delle Neoplasie Mieloproliferative Croniche, la Mielofibrosi e la Trombocitemia Essenziale, a differenza della Policitemia Vera, non risultano completamente associate ad una specifica alterazione molecolare. Come già detto precedentemente, per circa il 40 % dei pazienti affetti non esiste un marker diagnostico di riferimento.

L'impatto clinico delle nuove mutazioni, in termini di fenotipo di malattia e di prognosi non è stato ancora definito compiutamente per il piccolo numero di pazienti inclusi nei diversi studi che sono stati pubblicati fino ad ora. In questa ottica, pertanto, la ricerca di tutte le alterazioni molecolari, oltre ad essere utile per la diagnosi differenziale tra le NMP e le forme reattive, porterebbe ad identificare sottogruppi di pazienti con le stesse caratteristiche cliniche e di laboratorio. Questo dato oltre ad essere utile nella gestione clinica dei pazienti, identificherebbe un preciso pattern molecolare di alcune forme di MPN con possibili endpoint prognostici e terapeutici.

Durante i tre anni di dottorato mi sono prevalentemente focalizzata sulla caratterizzazione avanzata, attraverso metodologie diagnostiche basate su "direct sequencing", real-time PCR e high resolution Melting-HRM, di un congruo numero di campioni cellulari ottenuti da pazienti affetti da mielofibrosi, per due geni attualmente conosciuti come bersaglio di eventi mutazionali nelle NMP: EZH2 e IDH1/IDH2.

## IL GENE EZH2

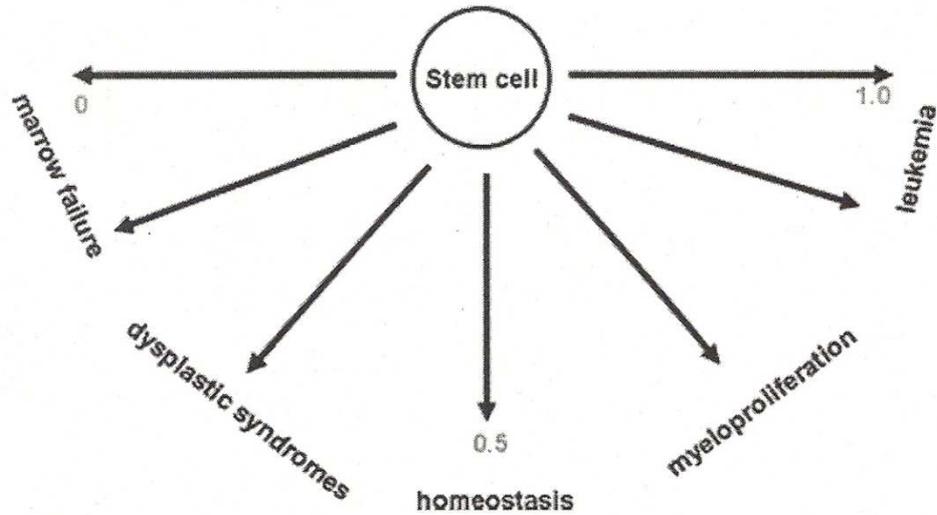
Il gene EZH2, Enhancer of zeste homolog 2 , è un membro della famiglia delle Polycomb group proteins (PcG), un gruppo di proteine originariamente identificato nella *Drosophila* come regolatore fondamentale dell' espressione dei geni omeotici, homeobox-containing ( Hox), insieme al gruppo Trithorax. I prodotti genici del gruppo Polycomb e Trithorax agiscono in complessi multi proteici a livello della cromatina: i primi mantengono i geni omeotici in uno stato inattivo, i secondi, al contrario ,garantiscono il mantenimento del loro stato di attivazione (Cardoso, Timsit et al. 1998; Cardoso, Mignon et al. 2000). I due complessi PcG meglio descritti nell' uomo sono il PRC1 e il PRC2, localizzati a livello di specifici siti noti come *Polycomb repressive elements* (PRE). Il più piccolo dei due complessi, PRC2, è composto da tre proteine PcG: Enhancer of zeste 2 (EZH2), Embryonic ectoderm development (EED) e Suppressor of zeste 12 homolog (SUZ2). Insieme, le tre proteine rappresentano il core catalitico del complesso: EZH2 ha un' attività metiltransferasica ; EED funge da proteina scaffold nel legame tra EZH2 e i suoi substrati (istone H3); SUZ 2 è necessaria per il riconoscimento del nucleosoma e la stabilità di EZH2 (Pasini, Bracken et al. 2004; Pasini, Bracken et al. 2007)(Nekrasov et al.,2005; Pasini et al.,2004). Il PRC1 invece, contiene le proteine BMI-1, RING-1, Human Polyhomeotic (HPH), Human chromodomain protein (HPC) e probabilmente le proteine MEL-18 (Alkema et al.,1997;Bardoset al.,2000).( Figura 9)



**Figura 9:** complessi multiproteici PcG.

La corretta struttura dei due complessi PcG è importante per la stabilità dei singoli componenti: se uno di essi viene alterato, a causa di una mutazione, anche gli altri tendono a subire modificazioni post-trascrizionali, o degradazione a livello proteico, impedendo il corretto assemblaggio dell'intero complesso. Le proteine PcG sono coinvolte nel silenziamento genico, durante la fase di embriogenesi, e nel processo di differenziazione tissutale, mediante il rimodellamento della cromatina in modo tale da renderla compatta e quindi inaccessibile e non responsiva a fattori di trascrizione. Tale funzione è inoltre mediata dal reclutamento di metiltransferasi a livello di numerosi geni target : il loro intervento nei livelli di espressione di tali geni mediante modificazione del core istonico può contribuire alla crescita neoplastica. BMI1, membro del PRC1 e ad oggi proteina PcG meglio caratterizzata, è coinvolta nel fenomeno dell'emopoiesi e nella regolazione del self-renewal. Più recenti sono, invece, le nozioni relative al coinvolgimento della proteina EZH2, nel mantenimento del self-renewal e quindi nel mantenimento del compartimento staminale. In condizioni di omeostasi fisiologica il destino cellulare è regolato da un delicato equilibrio tra auto-rinnovamento e differenziazione terminale. Se l'auto-rinnovamento delle cellule staminali adulte è alterato durante l'invecchiamento, l'omeostasi dei tessuti non può essere mantenuta: in condizioni di stress replicativo, infatti, questo prezioso equilibrio gioca a favore della differenziazione terminale, con conseguente esaurimento del pool di cellule staminali emopoietiche ; se invece le cellule staminali sviluppano un self renewal incontrollato si ha eccessiva proliferazione del compartimento staminale e rischio di una anomala crescita neoplastica (Figura 10) (Kamminga, Bystrykh et al. 2006).

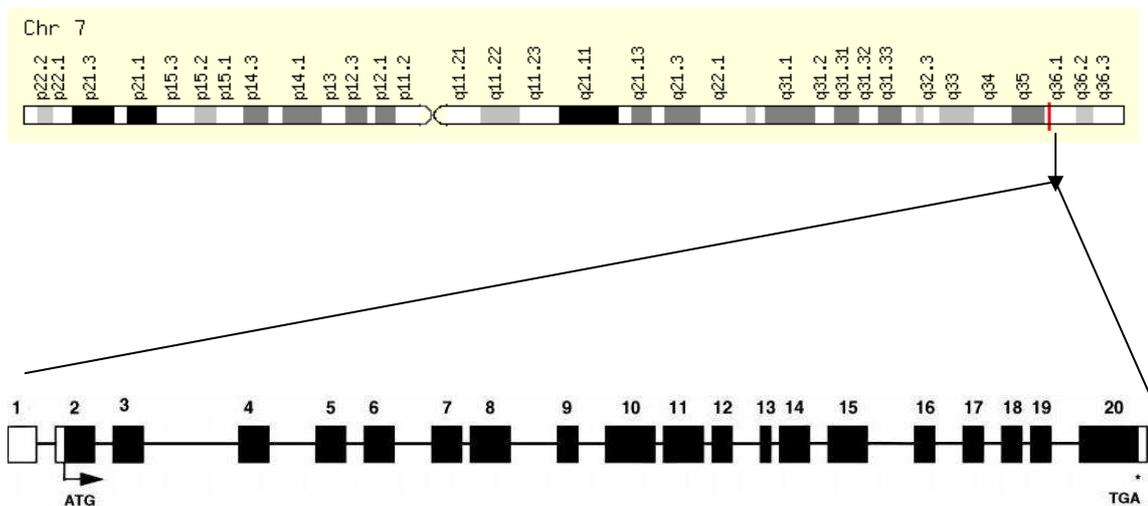
## Self-renewal probabilities during disease



**Figura 10:** il *self-renewal* delle cellule staminali emopoietiche è attentamente regolato. In condizioni fisiologiche si ha un *self-renewal* di 0.5, indicando che la metà delle cellule mantiene le caratteristiche di cellula staminale e l'altra metà va incontro a differenziazione. Un valore di *self-renewal* inferiore a 0.5 causa una diminuzione della cellularità midollare, al contrario un valore superiore a 0.5 comporta l'iperproliferazione delle cellule.

Recenti studi dimostrano che l'iperespressione della proteina EZH2 a livello di cellule CD34+ correla con l'evoluzione delle Sindromi Mielodisplastiche (MDS) in Leucemia Acuta (AML).

Il gene EZH2 mappa sul braccio lungo del cromosoma 7 in posizione 7q35, è composto da 20 esoni e si estende per 40 kb. (Figura 11)



**Figura 11:** cromosoma 7, la freccia indica la posizione del gene EZH2. Struttura esonica del gene EZH2.

Codifica per una proteina lunga 751 aa, tre sono i domini principali: SANT DNA BINDING domain 1 e 2 e SET, suppressor of variegation 3-9, enhancer of zeste and trithorax (SET) domain. Il dominio SET, COOH terminale, rappresenta il dominio catalitico responsabile dell'attività metiltransferasica specifica per la Lisina (K) dell'istone H3 (H3K27) responsabile del silenziamento genico tipico del complesso PRC2 (Figura 12).

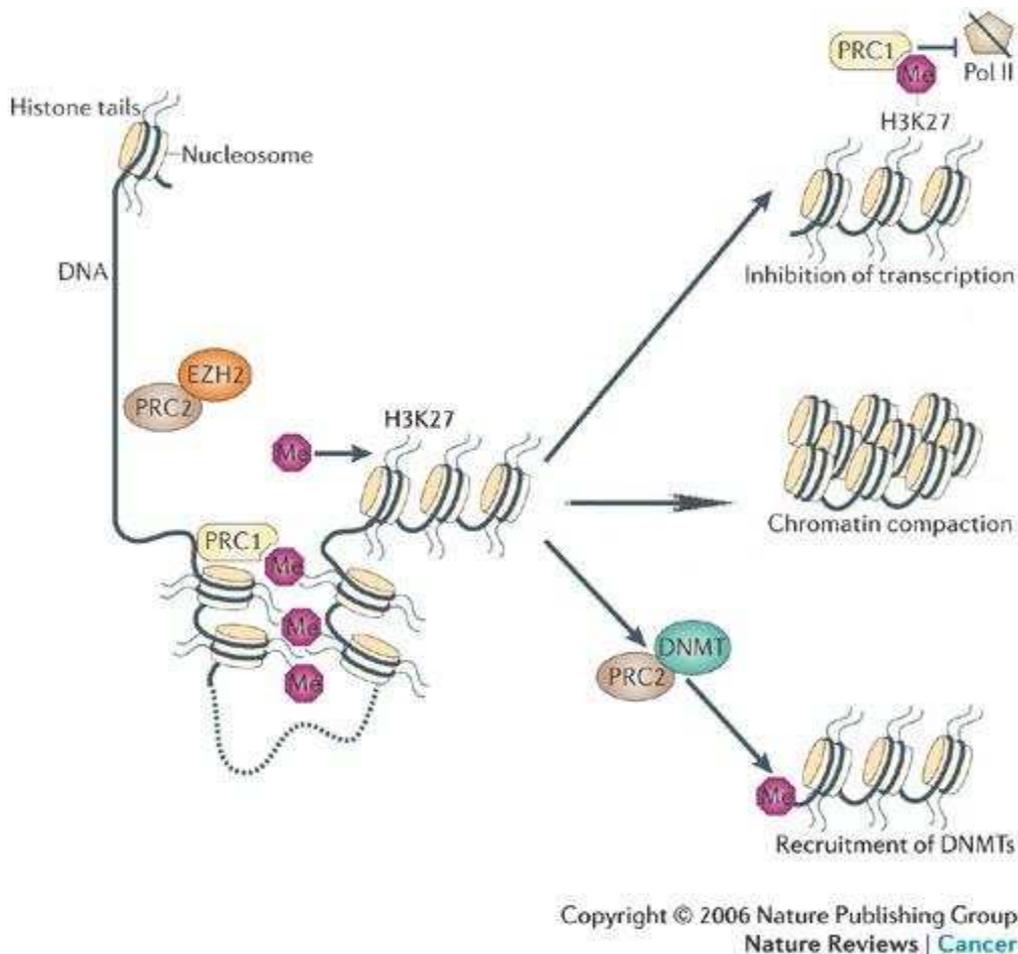
PROTEINA EZH2



**Figura 12:** struttura in domini della proteina EZH2

Studi dimostrano che il silenziamento genico mediato al complesso PRC2 può essere causato o dall'azione diretta della proteina EZH2 a livello dell' H3K27 oppure dall'interazione di questa con altri sistemi epigenetici: DNA metiltransferasi (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) e istone deacetilasi (HDACs). Due classi di enzimi regolano rispettivamente l' acetilazione e la de acetilazione dei residui di lisina all' estremità amino terminale degli istoni (Taunton et al.,1996): l' HATs interagisce con la cromatina attivando la trascrizione, l' HDACs al contrario, provocano la condensazione della cromatina e quindi la repressione della trascrizione (Glozak et al.,2005). La proteina EZH2 interagisce in vivo con HDACs, coadiuvata dalla subunità EED, mantenendo inattiva la trascrizione dei geni target (Tonini, Bagella et al. 2004; Tonini, D'Andrilli et al. 2008). Studi condotti su cellule staminali embrionali hanno rilevato l'esistenza di tre gradi di metilazione della lisina 27 dell' istone 3: mono, di e tri metilazione. La down regolazione del gene EZH2 determina una diminuzione dello stato di di-trimetilazione (Schwartz e Pirrotta,2008), mentre resta inalterato quello di monometilazione che sembra essere mantenuto in parte dall'attività metiltransferasica del gene EZH1. Xiaohua Shen et al, nel 2008, hanno dimostrato che la proteina EZH1 è parte di un complesso PRC2 "non canonico" importante nel prevenire la de repressione dei geni target del PRC2 "canonico" mediante l'aggiunta di gruppi metili a livello dell'H3K27. Ad oggi, comunque, sono ancora da definire gli effetti dei singoli stati di mono,di e trimetilazione. Si pensa che la di-metilazione possa essere coinvolta nel ciclo cellulare. E' certo soltanto che lo stato di trimetilazione funge da segnale per il

reclutamento di altri gruppi proteici, ad esempio il PRC1, necessario al mantenimento, mediante processo di metilazione del DNA e non, del silenziamento genico. (Figura 13)



**Figura 13:** azione diretta della proteina EZH2 a livello della H3K27 e interazione di questa con DNMT.

L'iperespressione della proteina EZH2 è stata associata a aumento dell'aggressività e prognosi negativa in diversi tumori solidi: cancro alla mammella, prostata e vescica. Le cellule neoplastiche di pazienti affetti da linfomi B e non-Hodgkin mostrano una forte coespressione di BMI-1 e EZH2; al contrario, la loro espressione risulta assente nei tessuti sani (Raaphorst, van Kemenade et al. 2000; van Kemenade, Raaphorst et al. 2001; van Leenders, Dukers et al. 2007; Vekony, Raaphorst et al. 2008). Inoltre, la natura della proteina EZH2 e la sua localizzazione cromosomica (7q35-q36) in una regione critica per i disordini mieloidi, permettono di proporre il gene EZH2 come gene coinvolto nella patogenesi delle neoplasie mieloidi.

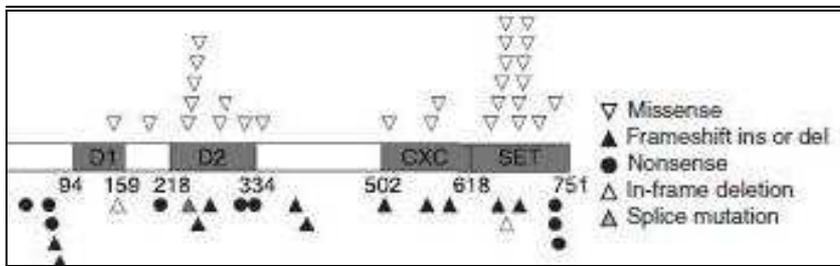
Recenti studi hanno evidenziato il ruolo della proteina EZH2 come soppressore tumorale nei meccanismi molecolari alla base di differenti neoplasie di tipo mieloide. Nikoloski e

collaboratori, dopo aver analizzato una coorte di 127 pazienti con Sindrome mielodisplastica, mediante metodica di SNP array, hanno messo in evidenza un gruppo di alterazioni coinvolgenti il cromosoma 7 (del 7, del 7q). Molto frequente è risultata la delezione del 7q 36.1, esattamente il locus in cui mappa il gene EZH2. Un successivo screening di sequenza del gene, in tutti i pazienti presentanti delezioni e micro delezioni del 7q, ha evidenziato la presenza di mutazioni di tipo missenso e frameshift in circa il 6% dei soggetti screenati (Nikoloski, Langemeijer et al. 2010). Contemporaneamente uno studio condotto da Ernst et al. su un gruppo di 614 soggetti con disordini mieloidi (AML, CML, MPN e MDS), ha rilevato la presenza di 49 mutazioni mono o bialleliche a livello del gene EZH2 (Ernst, Chase et al. 2010). Nello specifico, in una coorte di 90 pazienti affetti da Neoplasie Mieloproliferative Croniche Classiche (30 PMF, 30 PV, 30 ET), il 13% dei soggetti con Mielofibrosi e il 3% dei pazienti con PV presentavano mutazioni a livello di regioni codificanti del gene (Tabella 3).

Disease	WHO subtype	Subjects analyzed	Number EZH2 mutated	%
MDS (n = 154)	RA	27	3	11
	RAFR-I	36	2	6
	RAEB-II	10	0	
	RARS	28	0	
	RARS-T	4	1	25
	RCMD	10	0	
	RCMD-RS	6	0	
	5q-syndrome	12	1	8
	MDS-U	19	2	11
Post-MDS AML	2	0		
MDS/MPN (n = 219)	aCML	70	9	13
	CMMML	118	15	13
	MDS/MPN-U	31	3	10
Classic MPN (n = 90)	PV	30	1	3
	ET	30	0	
	MF	30	4	13
Other MPN	CEL/HES	30	1	3
	FIP1L1-PDGFRα positive CEL	7	0	
	SM	30	0	
AML chr-7/7q		54	0	0
CML-BC	Myeloid	30	0	
	Lymphoid	10	0	
Cell lines		21	2	10
<b>Total</b>		<b>645</b>	<b>44</b>	<b>7</b>

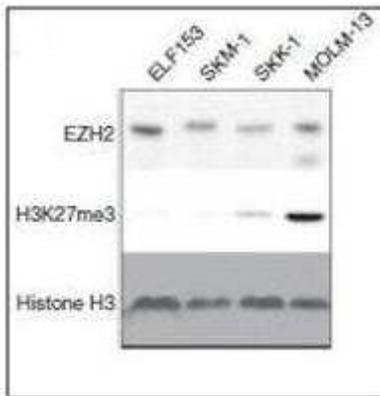
**Tabella 3:** soggetti analizzati nello studio condotto da Ernst et al. e mutazioni del gene EZH2.

Da entrambi i lavori è emerso che le mutazioni sono più frequenti a livello del dominio catalitico SET responsabile dell'attività metiltransferasica con conseguente inattivazione della stessa (Figura 14).



**Figura 14:** struttura in domini del gene EZH2 e posizioni delle mutazioni riscontrate nei pazienti.

Analizzando mediante western blot due linee mutate per il gene EZH2 e due linee non mutate si può notare la presenza della proteina EZH2 in tutte le linee, ma la mancanza della trimetilazione dell' istone H3 (H3K27me3) nelle 2 linee mutate (Figura 15).

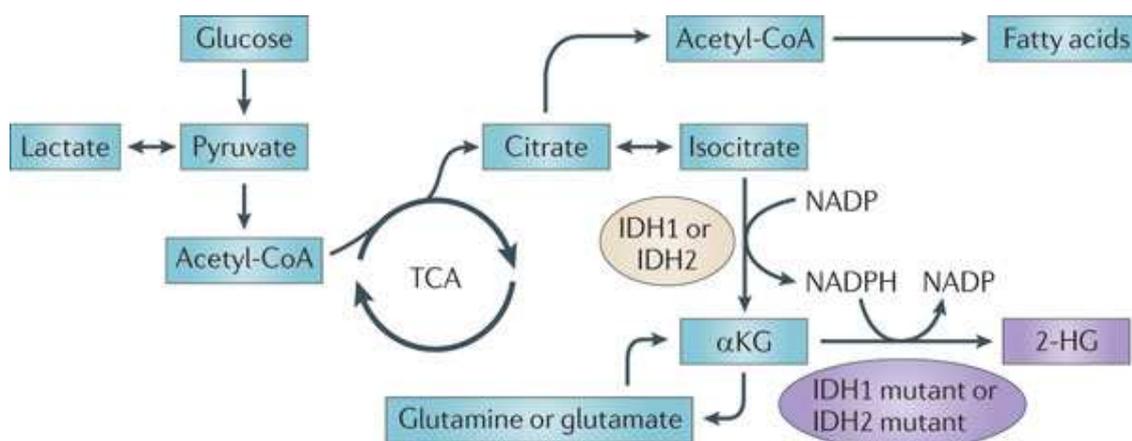


**Figura 15:** l' analisi western blot mostra la perdita della trimetilazione dell' istone H3K27, ma anche la presenza del gene EZH2 nelle linee ELF-153 e SKM-1 EZH2-mutate confrontate con le linee SKK-1 e MOLM-13 EZH2-non mutate.

L'analisi degli effetti clinici delle mutazioni ha messo in evidenza che i pazienti mutati per il gene EZH2 mostrano una sopravvivenza ridotta rispetto a quelli non mutati. La sopravvivenza diminuisce ulteriormente se la mutazione è presente in uno stato di omozigosi. Recentemente è stata descritta nei linfomi (Nikoloski et al., 2010) una mutazione monoallelica a livello del dominio SET con conseguente perdita di funzione della proteina. Questo, insieme ai dati precedentemente discussi, suggerisce il ruolo del gene EZH2 come oncosoppressore che, insieme ad altri componenti del PRC1 e PRC2, potrebbe inattivare la via di segnalazione JAK-STAT. Al contrario, in altre neoplasie, l'iperespressione del gene EZH2 ne suggerisce un ruolo come oncogene. Non è quindi ancora possibile definire chiaramente e completamente il suo possibile meccanismo di azione: le mutazioni del gene EZH2 comportano una modulazione epigenetica differente in base al contesto cellulare e alle vie oncogeniche coinvolte.

## I GENI IDH1/IDH2

I geni IDH1 e IDH2 codificano per gli enzimi isocitrato deidrogenasi 1 e 2, rispettivamente. IDH1 (localizzato nel locus 2q33.3) localizzato prevalentemente a livello citoplasmatico e dei perossisomi e IDH2 (localizzato nel locus 15q26.1) a localizzazione mitocondriale sono due enzimi che partecipano al ciclo dell'acido citrico, catalizzando la carbossilazione ad alfa-chetoglutarato dell'isocitrato (Gross, Cairns et al. 2010) come mostrato in Figura 13. La normale attività enzimatica di entrambe le proteine sembra essere fondamentale per la protezione cellulare allo stress ossidativo. La presenza invece di mutazioni comporta la perdita di affinità delle proteine all'isocitrato, acquistando una maggior attività catalitica nei confronti dell' alfa-chetoglutarato con riduzione dei livelli di quest'ultimo ed un aumento nella cellula dei livelli di 2-idrossiglutarato (2-HG) (Figura 16). Sembra ormai appurato che questi cambiamenti intracellulari siano in grado di facilitare la trasformazione neoplastica, incluso l'attivazione di HIF-1 $\alpha$ .

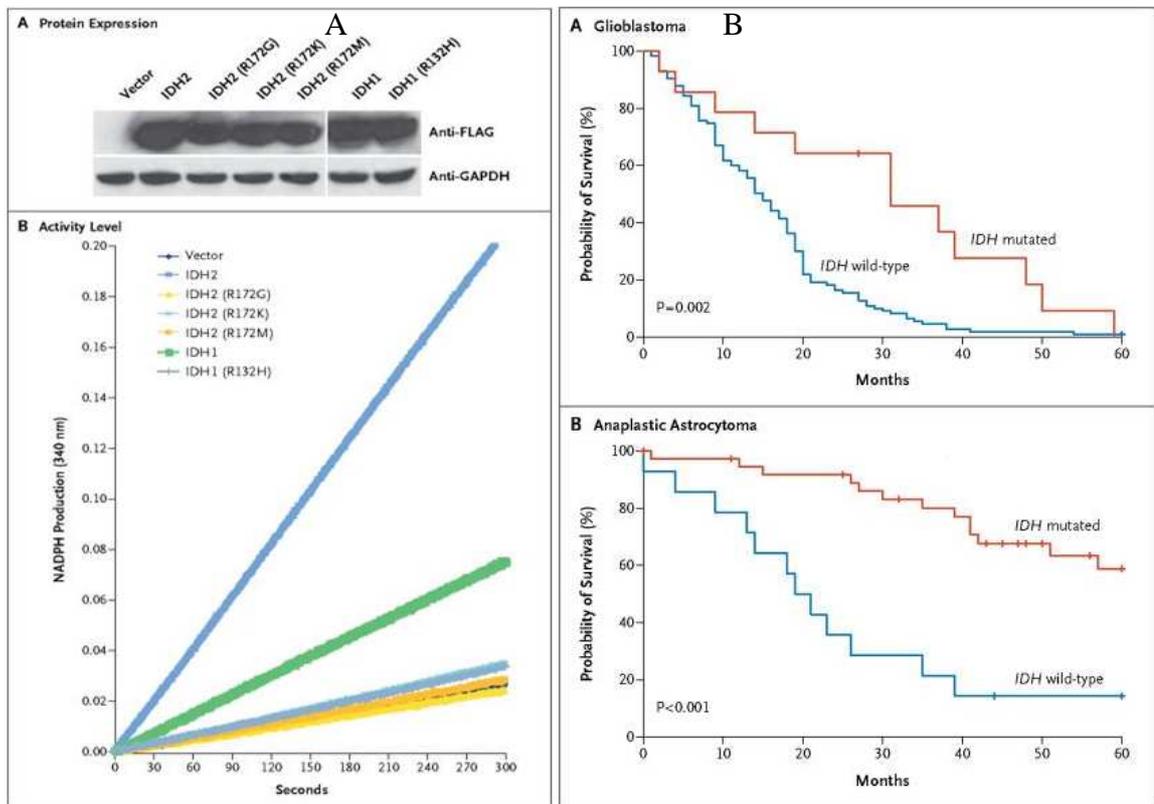


**Figura 16.** Mutazioni somatiche di residui di arginina degli enzimi IDH1 (localizzato a livello citoplasmatico) ed IDH2 (localizzato a livello mitocondriale) sono responsabili di un aumento dell'attività enzimatica. La presenza delle mutazioni comporta un aumento della produzione di 2-HG con consumo di NADPH.

Nel 2008 Parsons et al. (Parson et al. Science 2008) identificarono mutazioni somatiche nel codone 132 della IDH1 in circa il 12% dei pazienti con glioblastoma multiforme, il tipo più frequente e letale di cancro cerebrale. In uno studio successivo (Yan et al. NEJ 2009), gli autori rilevarono le stesse mutazioni somatiche in oltre il 70% dei gliomi. Nella maggior parte dei casi, l'arginina 132 era sostituita dall'istidina (R132H).

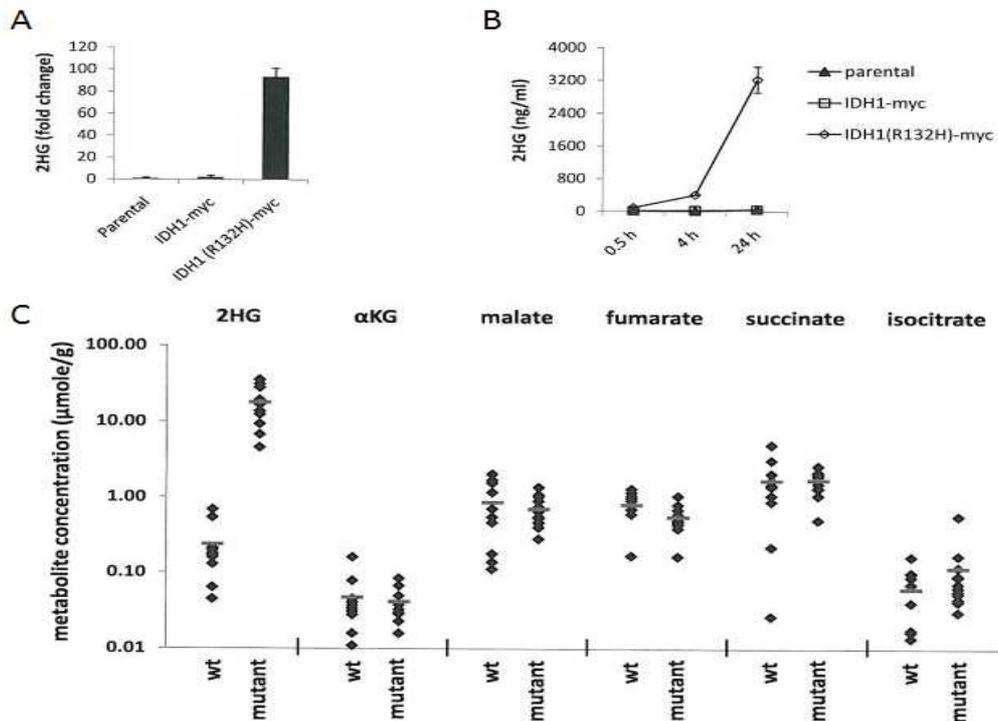
Alcuni tumori privi di mutazioni di IDH1 avevano mutazioni che interessavano l' analogo aminoacido (R172) del gene IDH2, suggerendo un ruolo delle mutazioni delle

deidrogenasi isocitrato NADP-dipendenti nella patogenesi di queste neoplasie. In generale, i tumori cerebrali con mutazioni di IDH1 o IDH2 rappresentano un sottogruppo distintivo dei gliomi a basso grado con una prognosi migliore rispetto a quella dei tumori con geni IDH wild-type (Figura 17).



**Figura 17.** A. Attività enzimatica delle proteine IDH in base allo stato mutazionale; B. Curva di sopravvivenza di pazienti adulti con gliomi maligni in riferimento allo stato mutazione per i geni IDH.

Dal momento che una sola copia del gene IDH1 o IDH2 è mutata nei gliomi umani, Dang e collaboratori (Dang, White et al. 2009; Dang, Jin et al. 2010; Dang, White et al. 2010) hanno ipotizzato che le mutazioni non comportano una semplice perdita di funzione. Hanno infatti dimostrato che la sovrapproduzione di 2-idrossiglutarato (2-HG) è associata ad un elevato rischio di tumori cerebrali in pazienti con errori congeniti del metabolismo, suggerendo che l'accumulo di un eccesso di 2-idrossiglutarato in vivo contribuisce alla formazione e progressione dei gliomi maligni, stabilendo un legame tra anomalie del metabolismo e neoplasie (Figure 18).



**Figura 18.** A e B mostrano l'aumento dei livelli di 2-HG in cellule esprimenti la mutazione R132 del gene IDH1; in C è mostrata l'aumentata concentrazione di 2-HG in un gruppo di pazienti con gliomi maligni che presentano la mutazione R132 del gene IDH1.

Queste osservazioni hanno importanti implicazioni cliniche, in quanto i pazienti con forme iniziali o a basso grado di glioma potrebbero beneficiare dalle terapie che inibiscono la produzione di 2-idrossiglutarato.

#### *Mutazioni somatiche di IDH1 e IDH2 nelle neoplasie mieloidi*

Nel 2009 Mardis e collaboratori (Mardis, Ding et al. 2009) analizzando l'intero genoma leucemico di un paziente con leucemia mieloide acuta de novo, citogeneticamente normale e con maturazione minima, hanno identificato 12 mutazioni somatiche nelle sequenze codificanti di vari geni, tra cui IDH1 (R132C). È interessante notare che mutazioni somatiche al codone 132 della IDH1 sono state osservate in 15 di 187 genomi di AML: tutte queste mutazioni erano eterozigoti e presenti generalmente in casi con normale citogenetica.

Recentemente, numerosi studi sono stati pubblicati sulle mutazioni somatiche di IDH1 e IDH2 nella LAM (Chou, Hou et al. ; Gross, Cairns et al. 2010; Marcucci, Maharry et al. 2010; Ward, Patel et al. 2010) . In base ai loro risultati si può concludere che: mutazioni somatiche di IDH1 IDH2 si osservano principalmente, anche se non esclusivamente, in casi di AML citogeneticamente normali, nelle quali – con poche eccezioni – esse si escludono a

vicenda. In media, circa il 30% dei pazienti con LMA con citogenetica normale hanno un gene IDH1 o IDH2 mutante, e in questa categoria le mutazioni IDH2 sono più frequenti rispetto a quelle di IDH1.

La stragrande maggioranza delle mutazioni somatiche di IDH1 e IDH2 interessano i residui di IDH1 R132, o R172 e R140 di IDH2. Questo permette uno screening rapido e sensibile per le mutazioni IDH1 e IDH2, oltre che un importante strumento diagnostico; il significato prognostico delle mutazioni somatiche di IDH1 e IDH2 nella LAM è attualmente non definito, ma i risultati disponibili indicano che esse possano conferire un rischio genetico intermedio-alto (Abbas, Lugthart et al. 2010; Paschka, Schlenk et al. 2010).

Due recenti studi (Gross et al. J Exp Med 2010; Ward et al. Cancer Cell 2010) hanno dimostrato che le cellule AML con mutazioni eterozigoti di IDH1 o IDH2 accumulano 2-idrossiglutarato. Questa osservazione suggerisce che il 2-idrossiglutarato è un onco-metabolita che gioca un ruolo non solo nella patogenesi dei gliomi, ma anche nella trasformazione leucemica, e potrebbe avere implicazioni terapeutiche per il trattamento della leucemia mieloide acuta. In effetti, il blocco dell'accumulo di 2-idrossiglutarato attraverso l'inibizione degli enzimi IDH mutanti potrebbe rappresentare un obiettivo terapeutico. Un paio di piccole molecole in grado di inibire gli enzimi IDH sono già entrate in studi pre-clinici o sono in corso di sviluppo clinico. Mutazioni somatiche di IDH1 e IDH2 sono state osservate anche nelle malattie mieloproliferative croniche, nelle sindromi mielodisplastiche e leucemie mieloidi acute secondarie (Figura 16).

In particolare, per quanto riguarda le NMP, il gruppo inglese di Green (Green and Beer 2010) ha analizzato lo stato mutazione di IDH1/IDH2 di 16 pazienti con LAM secondaria ad una precedente NPM. Cinque pazienti presentavano almeno una mutazione somatica dei geni IDH: 3 mutazioni erano localizzate nel gene IDH1 (R132) e due nel gene IDH2 (R140); mentre non hanno individuato mutazioni in 180 pazienti affetti da PV e TE in fase cronica. Più recentemente il gruppo americano afferente alla Mayo Clinic (Pardanani, Lasho et al. 2010) oltre a confermare l'aumentata incidenza di queste mutazioni nelle forme di LAM secondaria a NMP (7 casi di mutazioni dei geni IDH in 34 pazienti studiati), hanno identificato una mutazione dei geni IDH anche in 3 su 166 pazienti studiati con PMF in fase cronica.

Pertanto, le prove disponibili suggeriscono che le mutazioni somatiche di IDH1 e IDH2 rappresentano un meccanismo di progressione a leucemia mieloide acuta nelle MPN e MDS, anche se l'ipotesi attende una validazione prospettica (Cazzola 2010) (Figura 19)

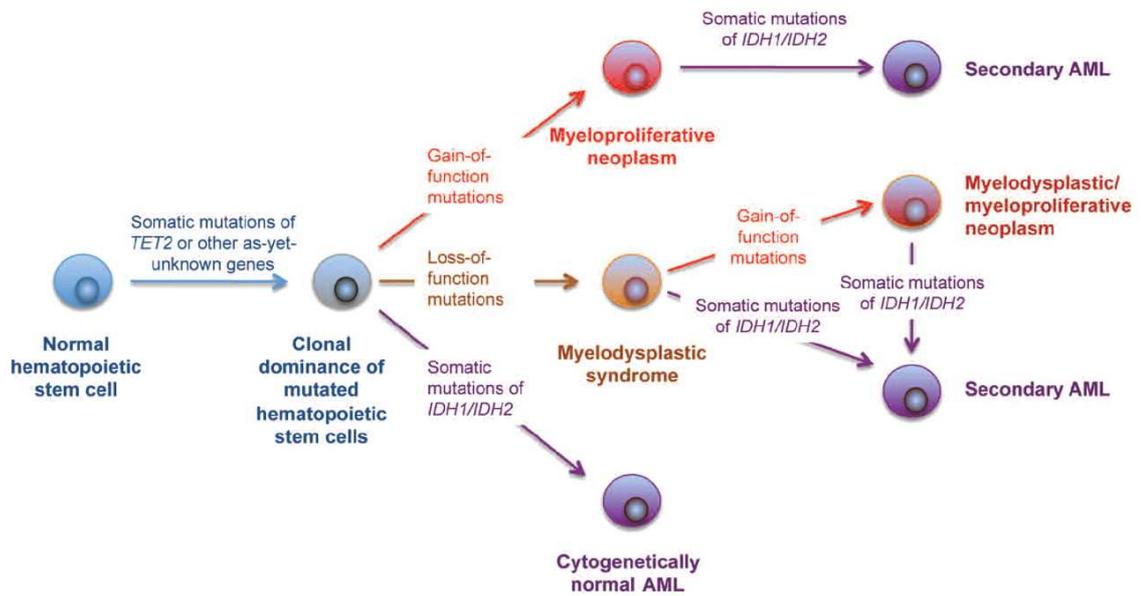


Figura 19.

## **ALTRI POSSIBILI MECCANISMI PATOGENETICI NELLE NMP Ph-NEGATIVE**

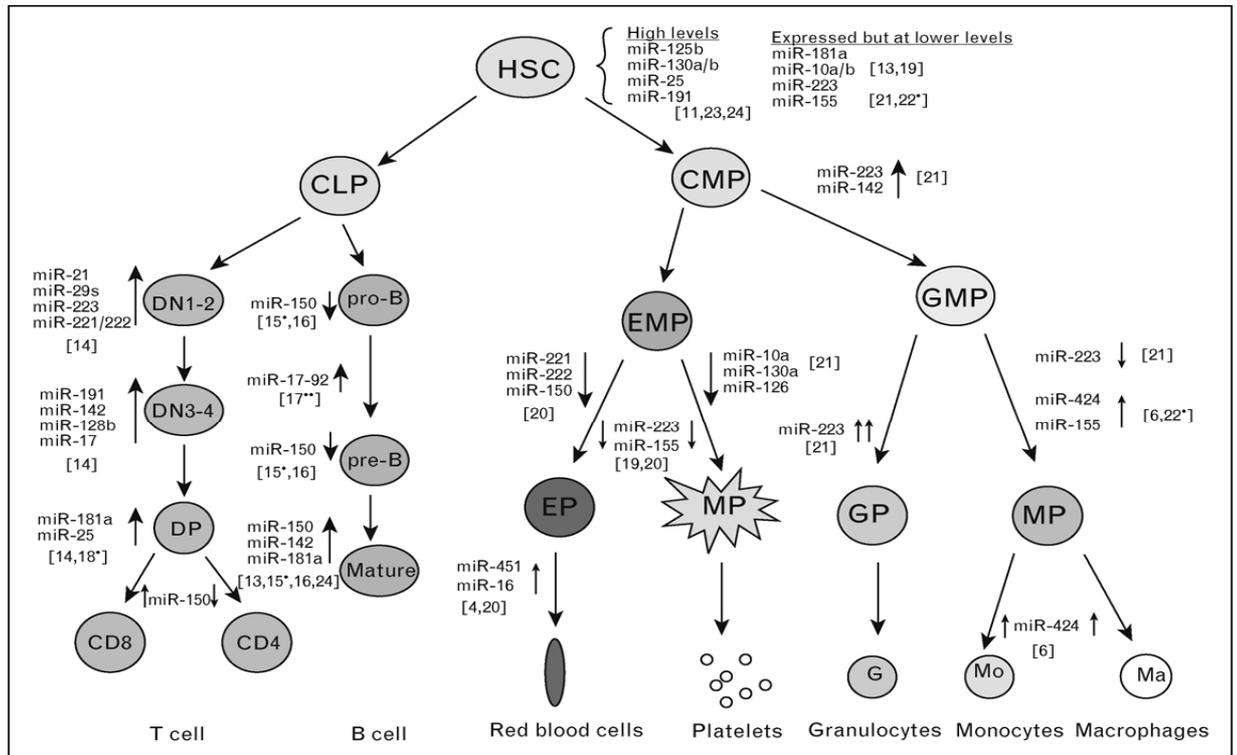
La nostra conoscenza circa la fisiopatologia delle neoplasie mieloproliferative è stata rivoluzionata dalla scoperta della mutazione JAK2V617F nel 2005. Questa scoperta ha portato in seguito all'identificazione di nuove mutazioni somatiche a carico di geni quali MPL, JAK2 (divrese dalla V617F) LNK, TET2, IDH1/IDH2, EZH2, ASXL1 e TP53, che giocano un ruolo importante nella patogenesi e nella progressione delle neoplasie mieloproliferative. Come in altre neoplasie solide ed ematologiche la formazione e lo sviluppo nelle NMP è scandito dal susseguirsi di eventi mutazionali, riarrangiamenti cromosomici e alterazioni epigenetiche, che coinvolgono geni codificanti elementi chiave nei processi di signaling, crescita cellulare, ciclo cellulare ed apoptosi, i cosiddetti proto-oncogeni e geni oncosoppressori. Nell'ultimo decennio il ruolo dei fattori epigenetici nella modulazione dell'espressione genica e quindi nel controllo dello sviluppo ha assunto notevole rilievo. Le modificazioni epigenetiche introducono cambiamenti nell'espressione genica senza modificare la sequenza nucleotidica del genoma. Ciò si verifica attraverso alterazioni della metilazione del DNA o mediante la modificazione degli istoni.

In questo quadro di alterazioni si inseriscono anche i microrna, che svolgono un'importante funzione di regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale.

### **microRNA ED EMATOPOIESI FISIOLGICA**

L'ematopoiesi comprende tutta quella serie di processi che garantiscono l'omeostasi della componente cellulare del sangue sia in condizioni fisiologiche sia in risposta a condizioni particolari, come la perdita o la distruzione di tali cellule oppure un aumento della richiesta da parte dell'organismo. L'elemento chiave che sta a monte di tutto questo complesso meccanismo è la cellula staminale ematopoietica, cellula multipotente capace di divisione asimmetrica. La regolazione dell'ematopoiesi è infatti dovuta alla combinazione di due fattori essenziali: l'auto-rinnovamento della cellula staminale, che consente il mantenimento di un pool costante, e la differenziazione dei progenitori a valle della cellula staminale, che perdono gradualmente la multipotenzialità e acquistano sempre maggiore specializzazione funzionale, andando infine a costituire tutti gli elementi figurati del sangue. A livello cellulare tutto ciò si traduce in una intricata rete costituita da citochine, fattori di crescita, fattori di trascrizione, interazioni cellula-cellula, che si

combinano tra di loro in diversi modi regolando il commissionamento, la proliferazione, l'apoptosi e la maturazione dei vari elementi costituenti il continuum staminale.

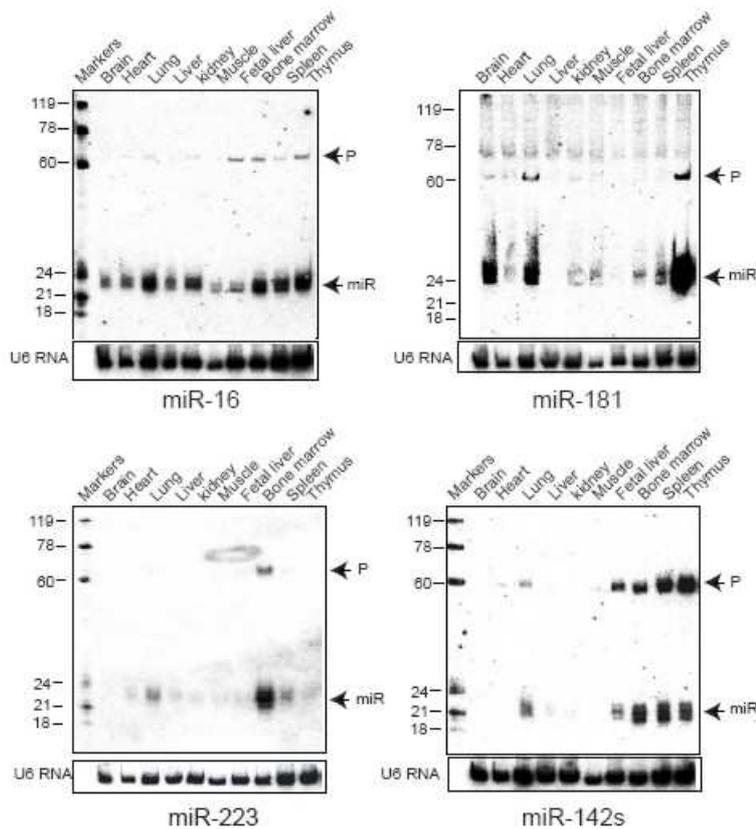


↑, upregulation; ↓, downregulation; CLP, common lymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; DN, double negative T cell precursors; DP, double positive (CD4+CD8+ T-cells); EMP, erythrocyte–megakaryocyte precursor; EP, erythrocyte precursor; GMP, granulocyte–monocyte precursor; GP, granulocyte precursor; HSC, hematopoietic stem cells; MP, megakaryocyte precursor.

**Figura 20.**

Studi piuttosto recenti (Chen, Li et al. 2004) hanno dimostrato che anche i micro-RNA hanno un ruolo nel modulare il differenziamento della cellula staminale emopoietica, costituendo pertanto un ulteriore elemento regolatorio che rende ancora più complesso tutto questo meccanismo.

Analizzando l'espressione dei miRNA nei vari tessuti, ne sono stati individuati alcuni espressi differenzialmente nei tessuti ematopoietici, in particolare modo il mir-181, il mir-223 e il mir-142s il cui gene si trova in un sito soggetto frequentemente a traslocazione in una forma aggressiva di leucemia a cellule B.



**Figura 21:** Espressione di mir-181, mir-223, mir-142s e mir-16 in vari tessuti, come controllo di reazione è stato utilizzato lo snRNA U6. Sono indicate inoltre le lunghezze in nucleotidi degli RNA, la banda del miRNA maturo (miR) e del presunto precursore (P).

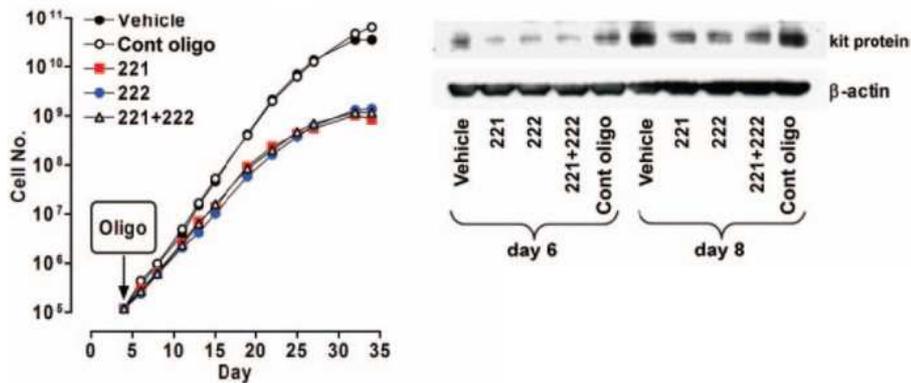
L'espressione di questi tre miRNA è significativamente alta nel timo per quanto riguarda il mir-181, nel midollo per il mir-223, nella milza, nel midollo e nel timo per il mir-142s; nei mammiferi adulti questi tre tessuti svolgono importanti ruoli nell'ematopoiesi, e si può quindi pensare che i vari tipi di cellule ematopoietiche, che risiedono in maniera diversa in questi tre tessuti, esprimano anche miRNA diversi. Separando in base ai marcatori di linea le cellule del midollo, è stata studiata l'espressione dei tre micro-RNA in questione all'interno dei diversi stipiti differenziativi; il mir-181 risulta essere overespresso nei linfociti B maturi, il mir-142s è espresso a bassi livelli nei linfociti T e nelle cellule della serie eritroide, ad alti livelli nei linfociti B e nelle cellule della serie mieloide, il mir-223 è invece espresso selettivamente dalla linea mieloide. I livelli di espressione dei tre miRNA nei progenitori indifferenziati sono invece piuttosto bassi, evidenza del fatto che probabilmente la loro produzione è indotta durante il differenziamento; questi due fattori, ovvero l'espressione differenziale nelle varie linee e la loro scarsa concentrazione nei progenitori fa pensare ad un loro possibile ruolo nel differenziamento di queste cellule. Per verificare ciò sono stati costruiti dei vettori retrovirali esprimenti i mir-181,

mir-223, mir-142s e il mir-30 (usato come controllo perché espresso nel rene e nel polmone, ma non nei tessuti ematopoietici) con i quali sono stati infettati i progenitori ematopoietici, con il fine di evidenziare un commissionamento differenziale di queste cellule. L'espressione ectopica del mir-181 produce un aumento di circa due volte dei linfociti B, ma nessun sostanziale cambiamento nel numero dei linfociti T, mentre l'espressione dei mir-223 e 142s porta all'effetto opposto con un aumento maggiore delle cellule appartenenti alla linea T rispetto ai B; infine effetti più modesti si evidenziano in entrambi i casi per quanto riguarda le cellule mieloidi. L'espressione infine del mir-30 di controllo non determinava alcun effetto. Effettuando lo stesso studio in vivo su topi irradiati letalmente, sono stati ottenuti risultati sovrapponibili. Questi dati in conclusione hanno dimostrato che l'espressione differenziale dei tre miRNA influenza il commissionamento cellulare, prova quindi importante del ruolo di queste molecole nell'ematopoiesi, e probabilmente più in generale nello sviluppo dei mammiferi.

*Differenziamento eritrocitario e megacariocitario:*

Il coinvolgimento dei miRNA nell'ematopoiesi è confermato anche da altri studi, recentemente è stato infatti dimostrato il ruolo svolto dai mir-221 e 222 nell'eritropoiesi e nella proliferazione di cellule di eritroleucemia (Felli, Fontana et al. 2005).

Effettuando uno studio sul profilo di espressione dei miRNA in colture di cellule staminali CD34+ mediante arrays, è stato notato che l'espressione dei mir-221 e 222 diminuisce gradualmente nelle colture eritropoietiche, sbloccando probabilmente la produzione di fattori chiave nel differenziamento eritroide. Analisi bioinformatiche seguite poi da conferme sperimentali con costrutti contenenti il gene della luciferasi hanno dimostrato che uno dei bersagli dei due miRNA è l'mRNA codificante per *kit*. Il declino dei due micro-RNA si traduce infatti con un graduale aumento della proteina c-KIT nelle cellule. La produzione ectopica dei mir-221 e 222 sia in colture eritropoietiche di CD34+, sia in colture di cellule di eritroleucemia, produce come prevedibile l'inibizione della sintesi di c-IT e della crescita cellulare, a dimostrazione del fatto che la riduzione della loro espressione è un evento chiave durante la normale differenziazione eritroide, anche se non è escluso che vi siano altri miRNA coinvolti in questo processo. Non è d'altra parte escluso neppure il fatto che i mir-221 e 222 possano regolare l'espressione di altre proteine, oltre al recettore c-KIT.



**Figura 22:** Effetti della produzione ectopica dei mir-221 e 222 sulla proliferazione cellulare (a sinistra). Inibizione della sintesi di c-KIT in cellule trasfettate con i due miRNA (a destra).

Una delle molecole che giocano un ruolo fondamentale nell'eritropoiesi è GATA-1, fattore di trascrizione che regola l'espressione di geni come quelli delle  $\alpha$  e  $\beta$  globine, enzimi coinvolti nella biosintesi dell'eme, il recettore per l'eritropoietina, geni coinvolti nei processi di morte cellulare e del ciclo cellulare, e altri fattori di trascrizione. Utilizzando una linea cellulare che presenta una forma di GATA-1 inducibile dagli estrogeni (G1E-ER4), sono stati caratterizzati alcuni micro-RNA attivati da questo fattore di trascrizione. In particolare modo i microRNA 144 e 451, che presentano la maggior variazione in risposta all'induzione di GATA 1c (Dore, Amigo et al. 2008).

L'aumento di espressione di questi due microRNA era già stato osservato in molti studi durante il differenziamento eritroide (Bruchova, Yoon et al. 2007).

I due geni infatti sono inclusi nello stesso cluster sul cromosoma 11 nel topo (nell'uomo sul cromosoma 17) e lo studio delle regioni regolatorie e la successiva conferma sperimentale mediante immunoprecipitazione della cromatina, ha permesso di individuare e caratterizzare due regioni consenso per GATA-1 a 2.8 e 6.6 kb a monte del sito di inizio della trascrizione. Il ruolo di questi due miRNA nell'eritropoiesi è stato inoltre confermato in vivo mediante RNAi utilizzando come modello sperimentale embrioni di zebrafish. La down-regolazione dell'espressione del mir-451 porta ad una netta riduzione del differenziamento eritroide nelle fasi tardive, in modo simile, ma meno marcato rispetto alla down-regolazione di GATA-1.

Per definire il profilo di espressione dei micro-RNA durante le varie fasi di sviluppo megacariocitario è stata utilizzata anche la tecnologia dei microarrays (Garzon, Pichiorri et al. 2006; Garzon, Pichiorri et al. 2007). L'analisi è stata effettuata su colture di cellule

staminali CD34+ stimulate verso il differenziamento megacariocitario. I risultati mostrano una netta down-regolazione di alcuni miRNA durante le varie fasi di differenziamento facendo ipotizzare un meccanismo simile a quello dimostrato nel lavoro precedente: il declino dell'espressione di questi miRNA può portare un aumento della sintesi di fattori importanti nel differenziamento megacariocitario. Effettivamente, utilizzando un approccio bio-informatico, è stato visto che uno dei possibili bersagli del mir-130a (uno dei miRNA fortemente down-regolati), è il fattore di trascrizione MAFB, che risulta indotto durante il differenziamento megacariocitario, risultato che è stato successivamente confermato mediante test con la luciferasi. Nel medesimo studio è stato valutato anche il profilo di espressione dei miRNA in cellule derivanti da una forma di leucemia acuta megacarioblastica, che confrontato con i dati precedenti ha riscontrato una up-regolazione dell'espressione di alcuni micro-RNA implicati nel differenziamento dei megacariociti nelle cellule leucemiche rispetto a quelle normali.

A	miRNA	Chromosomal location	Fold change	Putative targets
	<i>hsa-mir-010a*</i>	17q21	50.00	<i>HOXA1, HOXA3, HOXD10, CRK, FLT1</i>
	<i>hsa-mir-126*</i>	9q34	8.33	<i>CRK, EVI2, HOXA9, MAFB, CMAF</i>
	<i>hsa-mir-106*</i>	xq26.2	2.86	<i>TAL1, FLT1, SKI, RUNX1, FOG2, FLI, PDGFRA, CRK</i>
	<i>hsa-mir-010b†</i>	2q31	11.11	<i>HOXA1, HOXA3, HOXD10, ETS-1, CRK, FLT1</i>
	<i>hsa-mir-130a*</i>	11q12	4.76	<i>MAFB, MYB, FOG2, CBFβ, PDGFRA, SDFR1, CXCL12</i>
	<i>hsa-mir-130a-prec†</i>	11q12	7.69	NA*
	<i>hsa-mir-124a</i>	8q23	2.78	<i>TAL1, SKI, FLT1, FOG2, ETS-1, CBFβ, RAPI, MYB</i>
	<i>hsa-mir-032-prec</i>	9q31	3.57	NA*
	<i>hsa-mir-101</i>	1p31.3	3.33	<i>TAL1, CXCL12, MEIS1, MEIS2, ETS-1, RUNX1, MYB</i>
	<i>hsa-mir-30c</i>	6q13	2.56	<i>CBFβ, MAFB, HOXA1, SBF1, NCOA2, ERG</i>
	<i>hsa-mir-213†</i>	1q31.3	2.38	<i>MAX-SATB2</i>
	<i>hsa-mir-132-prec</i>	17p13	4.17	NA*
	<i>hsa-mir-150†</i>	19q13.3	5.26	<i>MYB, SDFR1</i>
	<i>hsa-mir-020</i>	13q31	2.17	<i>TAL1, SKI, RUNX-1, FLT1, CRK, FOG2, RARB</i>
	<i>hsa-mir-339</i>	7p22	3.03	<i>SKI, ETV6, GATA2, FLT1, RAPIB, JUNB, MEIS2</i>
	<i>hsa-let-7a</i>	9q22	2.94	<i>HOXA1, HOXA9, MEIS2, ITGB3, PLDN</i>
	<i>hsa-let-7d</i>	9q22	2.17	<i>HOXA1, HOXD1, ITGB3, RUNX1, PDGFRA</i>
	<i>hsa-mir-181c</i>	19p13	2.50	<i>RUNX-1, KIT, HOXA1, MEIS2, ETS-1, ETV6, PDGFRA</i>
	<i>hsa-mir-181b</i>	1q31.3	2.13	<i>RUNX-1, KIT, ITGA3, HOXA1, MEIS2, ETS-1, SDFR1</i>
	<i>hsa-mir-017</i>	13q31	1.82	<i>TAL1, SKI, FLT1, RUNX1, CRK, FOG1, ETS-1, MEIS1</i>

B	miRNA	Chromosomal location	Fold change	Putative targets
	<i>hsa-mir-101</i>	1p31.3	11.85	<i>MEIS2, RUNX1, ETS-1, C-MYB, FOS, RARB, NFE2L2</i>
	<i>hsa-mir-126</i>	9q34	11.97	<i>V-CRK</i>
	<i>hsa-mir-099a</i>	21q21	6.83	<i>HOXA1, EIF2C, FOXA1</i>
	<i>hsa-mir-099b-prec</i>	21q21	7.59	NA
	<i>hsa-mir-106</i>	xq26.2	3.33	<i>FLT1, SKI, E2F1, NCOA3, PDGFRA, CRK</i>
	<i>hsa-mir-339</i>	7p22	3.36	<i>HOXA1, FLT1, PTRF/A1, RAPIB</i>
	<i>hsa-mir-099b</i>	19q13	4.19	<i>HOXA1, MYCBP2</i>
	<i>hsa-mir-149</i>	2q37	3.53	<i>RAPIA, MAFF, PDGFRA, SPI, NFIB</i>
	<i>hsa-mir-032</i>	2q13	3.23	<i>PDGFRA, HIF1A, MEIS2</i>
	<i>hsa-mir-135</i>	3p21	3.97	<i>SPI, HIF1A, SP3, HNRPA1, HOXA10, RUNX1</i>

**Tabella 4:** (A) miRNA down-regolati durante il differenziamento megacariocitario. (B) miRNA up-regolati nei megacarioblasti.

### *Differenziamento granulocitario:*

Il microRNA -223 costituisce un marker di differenziamento granulocitario, esso è espresso a bassi livelli in cellule positive al marcatore CD34, è up-regolato nel corso della maturazione granulocitaria, mentre è represso nella linea monocitaria (Johnnidis et al. (2008) Nature). In accordo con questi dati è stato osservato che l'espressione del mir-223 aumenta anche in cellule di pazienti con leucemia promielocitica (PML) e in linee cellulari derivate da PML trattate con acido retinoico (Fazi, Rosa et al. 2005).

La leucemia promielocitica è un sottotipo di leucemia mieloide acuta in cui si osserva il blocco maturativo del progenitore mieloide a livello del promielocita. Questa patologia è caratterizzata da una specifica traslocazione cromosomica che coinvolge il gene per il recettore per l'acido retinoico (RAR $\alpha$ ), con la formazione della proteina di fusione PML/RAR $\alpha$ , che causa l'arresto maturativo della cellula. Il trattamento con dosi farmacologiche di acido retinoico porta al superamento del blocco e induce il differenziamento terminale della cellula. Tra i target di PML/RAR $\alpha$  vi sono le proteine enhancers C/EBPs, coinvolte nella regolazione della crescita cellulare e differenziamento di numerosi tipi cellulari; in particolar modo C/EBP $\alpha$  è attivata precocemente nel progenitore mieloide e dirige il differenziamento verso il lineage granulocitario. Tra i target di C/EBP $\alpha$  è stato identificato anche il mir-223. Analizzando il promotore del miRNA con metodi in silico, sono state evidenziate due possibili regioni consenso per C/EBP $\alpha$  a monte della regione codificante il pre-microRNA, successivamente validate con saggi funzionali e immunoprecipitazione della cromatina. Uno dei due siti di riconoscimento per C/EBP $\alpha$  coincide con la sequenza di consenso per un altro fattore di trascrizione, NFI-A, che risulta essere tra i target regolati dal mir-223. E' stato pertanto proposto un modello di interazione tra il microRNA e i due fattori di trascrizione: NFI-A lega la specifica sequenza di riconoscimento a monte del microRNA attivando solo debolmente la trascrizione; il trattamento con acido retinoico porta all'induzione di C/EBP $\alpha$ , che sostituisce NFI-A e attiva la trascrizione del microRNA in maniera più specifica. Quest'ultimo infine inibisce la traduzione del messaggero di NFI-A. In questo modo la trascrizione del microRNA viene mantenuta e le cellule procedono nel differenziamento. L'importanza del ruolo del mir-223 è supportata anche da esperimenti di iperespressione e silenziamento genico mediante trasfezione delle cellule con lentivirus; nel primo caso si osserva un aumento della quota di cellule positive al marker CD11b (marker

granulocitario) ma non della quota di cellule positive al Cd14 (marker monocitario), viceversa nel secondo caso.

Questi dati sono stati in parte messi in discussione in uno studio successivo nel quale viene individuata una regione regolatoria più distante e più conservata, che contiene siti di riconoscimento per PU.1 e C/EBP $\beta$ . Valutando l'effetto di questi fattori sull'espressione del mir-223, sembra che questa regione abbia una maggiore importanza (Fukao et al. (2007).

Sebbene questi dati siano ancora incompleti e possano sembrare talvolta contraddittori, in realtà dimostrano quanto siano complessi i meccanismi di regolazione dell'espressione dei geni all'interno delle cellule, e quanto importante sia il ruolo dei microRNA in questo complesso panorama.

Un meccanismo a feedback di interazione tra microRNA e fattori di trascrizione è stato proposto anche per il differenziamento monocitario, durante il quale si assiste al declino dell'espressione dei microRNA -17, -5p, -20a e -106a che bloccano l'espressione di AML1. L'induzione di questo fattore di trascrizione porta all'espressione del recettore per l'M-CSF. AML1 inoltre agisce regolando negativamente l'espressione dei microRNA -17, -5p, -20a e -106a(Fontana, Pelosi et al. 2007)

#### *Differenziamento linfocitario:*

L'ontogenesi linfocitaria è un processo strettamente regolato di sequenziale maturazione del progenitore linfoide attraverso vari stadi ben caratterizzati. Durante queste fasi vengono accesi o spenti numerosi geni che consentono il passaggio da uno stadio al successivo, se questa serie di ordinati eventi non avviene correttamente, la cellula va incontro ad apoptosi; questo è un importante meccanismo di controllo della funzione immunitaria, che previene la formazione di cellule "difettose". Mediante clonaggio della frazione di RNA a basso peso molecolare è stata quantificata l'espressione di molti microRNA durante le varie fasi dello sviluppo linfocitario, evidenziando una regolazione dinamica di questi geni (Neilson, Zheng et al. 2007). Questo tipo di analisi ha dimostrato che tutti i microRNA clonati vengono espressi ad un livello basale in ogni stadio maturativo, tuttavia in un certo numero di casi, alcuni singoli miRNA presentano variazioni più sensibili in stadi diversi. Nella maggior parte dei casi si osserva

l'iperespressione di un singolo miRNA rispetto alla down-regolazione. In particolar modo il mir-181 sembra svolgere una funzione importante a livello del timocita doppio positivo (CD4+,CD8+), in questa fase si nota infatti l'up-regolazione di questo microRNA. Tra i target del mir-181 vi sono geni importanti nella maturazione e nella selezione dei linfociti T, in particolar modo *BCL2*, *CD69* e il gene per il TCR. I livelli di espressione del mir-181 presentano una correlazione inversa con quelli dei geni target sopracitati, che vengono poi ristabiliti nella fase successiva, dopo che il timocita è stato indirizzato verso il compartimento CD8+ o CD4+. Successivi esperimenti, confermano la specifica regolazione di *BCL2*, *CD69* da parte del mir-181, è possibile ipotizzare quindi che come la de-regolazione del CD69 influenzi il passaggio dei timociti verso l'ultima fase di sviluppo, anche una iperespressione del mir-181 possa sortire effetti paragonabili.

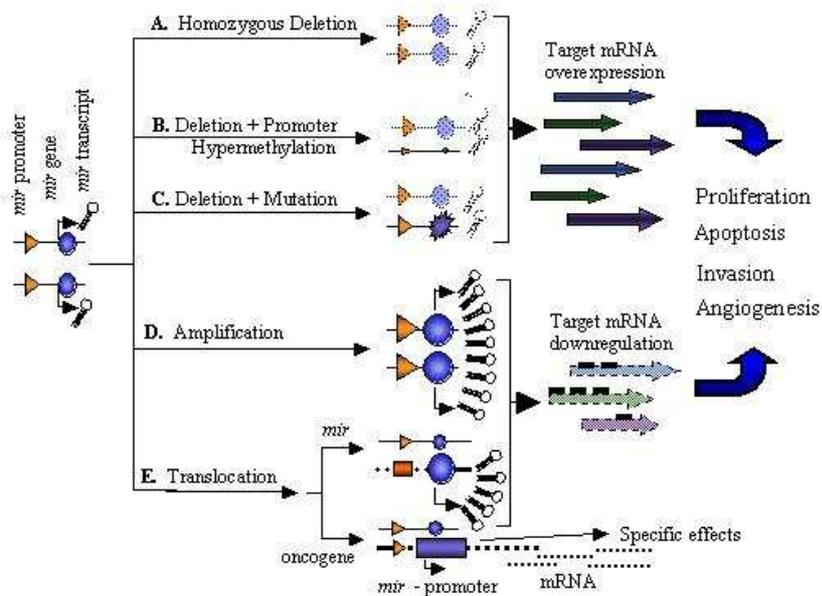
Anche l'ontogenesi B, parallelamente a quella T, prevede step che si susseguono fino ad arrivare al linfocita maturo e che sono finemente controllati da numerosi fattori. Il microRNA 150 è espresso a livello del linfocita B maturo, ma non nei precursori, pertanto, come nei casi precedenti, si può pensare che esso svolga una specifica funzione nel differenziamento delle cellule B (Xiao and Rajewsky 2009). Uno dei target del mir-150 è c-Myb, che specularmente viene espresso nei linfociti a livello dei precursori, ma non nelle cellule mature, come confermato da luciferase assay che dimostra il legame tra le due molecole. Studi funzionali effettuati sui linfociti B in modelli transgenici hanno convalidato questa teoria, l'espressione ectopica del mir-150 infatti produce nei topi uno sbilanciamento nella produzione di linfociti B, ma non nella controparte T.

La regolazione da parte di questi piccoli RNA è pertanto un elemento importante nei processi di differenziamento cellulare e anche nella modulazione della risposta immunitaria in momenti successivi, come dimostrato da altri studi (Thai, Calado et al. 2007).

## **RUOLO DEI microRNA NELLE PATOLOGIE EMATOLOGICHE**

Studi piuttosto recenti hanno dimostrato che anche i micro RNAs (molecole di RNA antisense) funzionano da regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica ; è quindi plausibile ipotizzare un loro possibile ruolo nella patogenesi tumorale. Studi sulla localizzazione dei geni miRNA hanno evidenziato la loro associazione a zone frequentemente alterate in numerosi tipi di tumori, regioni che vanno in contro a

traslocazioni, delezioni, amplificazioni, perdita di eterozigosi e siti fragili. Circa il 19% dei geni miRNA sono localizzati all'interno o vicino a siti fragili, il 52% circa in regioni alterate nei tumori (Sevignani, Calin et al. 2006). I micro-RNA possono quindi funzionare come oncogeni od oncosoppressori: la delezione di un gene miRNA può ad esempio portare ad una maggiore espressione di un oncogene bersaglio, viceversa l'amplificazione può invece inibire l'espressione di un gene oncosoppressore.



**Figura 23.** possibili meccanismi di patogenesi tumorale guidata da miRNA

L'analisi dell'espressione dei miRNA mediante l'utilizzo di microarrays si è rivelata un utile strumento per la classificazione delle varie neoplasie, molto più preciso e specifico rispetto al profilo di espressione dei geni codificanti proteine. Questo può essere semplicemente dovuto al fatto che i geni codificanti proteine con funzione regolatoria sono solo una piccola parte del nostro genoma, mentre i dati che si ottengono dall'analisi del profilo di espressione dei miRNA danno molte più informazioni su tali meccanismi. La definizione di specifici pattern di espressione di queste molecole può assumere quindi notevole importanza dal punto di vista diagnostico, prognostico e terapeutico.

#### *Leucemie:*

La leucemia linfatica cronica (LLC) è il più comune tipo di leucemia che colpisce in età adulta nei paesi occidentali ed è caratterizzata da una frequente alterazione cromosomica, la delezione 13q14. Questo tipo di mutazione ricorre frequentemente

anche in altre patologie, facendo ipotizzare la presenza di uno o più oncosoppressori in questo locus e quindi un diretto coinvolgimento nella loro patogenesi. Questa regione è stata interamente sequenziata e caratterizzata da molti gruppi, ma non è stato dimostrato un ruolo patogenetico per nessuno degli 8 geni presenti. Nel 2002 il gruppo di Calin (Calin, Dumitru et al. 2002; Calin, Ferracin et al. 2005) ha individuato due microRNA localizzati all'interno di un introne del gene DLEU2, in una piccola regione deleta nel 65% dei casi di LLC, ovvero i microRNA15a e 16-1, che risultano infatti down-regolati negli stessi pazienti. In un lavoro successivo viene individuato BCL2 come possibile target dei due microrna, in base alla complementarietà dei primi 9 nucleotidi con una sequenza sull'mRNA del gene; questa ipotesi viene inoltre supportata dall'evidenza di una correlazione inversa tra l'espressione dei microrna 15/16 e BCL2 nelle cellule di LLC e nei linfociti normali. Inoltre l'espressione ectopica dei due microRNA in una linea cellulare che presenta la delezione 13q14 (MEG-01) e quindi normalmente non esprime mir-15/16, produce una diminuzione del trascritto di BCL2 e un aumento dell'apoptosi poiché questo gene codifica per una proteina con funzione anti-apoptotica (Cimmino, Calin et al. 2005).

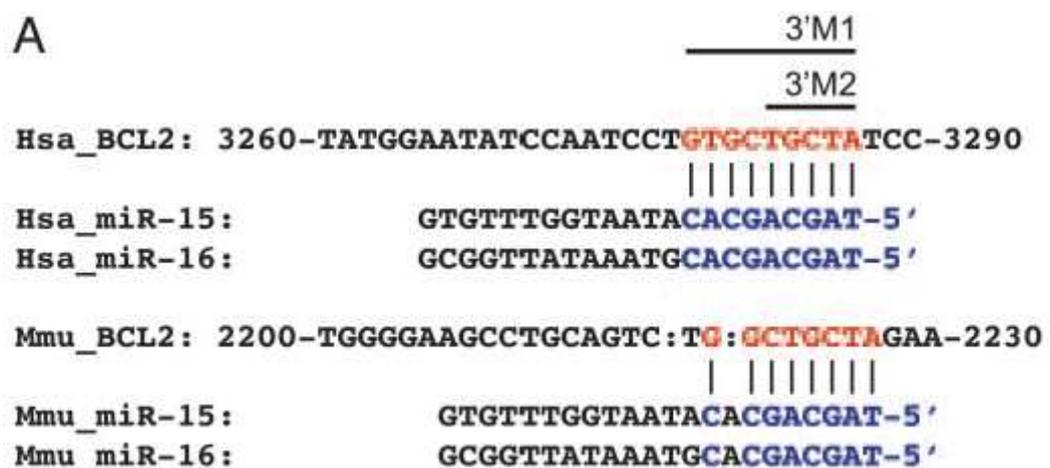


Figura 24.

Successivamente è stata identificata anche una mutazione all'interno del precursore del mir-16-1 correlata ad una ridotta espressione del microRNA maturo in due pazienti con documentata familiarità per LLC, suggerendo che non solo la delezione, ma anche la mutazione di questi geni potrebbe avere un ruolo nella patogenesi della LLC e di altri tipi di tumori (Calin et al. (2005) *N. Engl. J. Med.*).

La LLC si presenta con forme a diverso decorso clinico caratterizzate da due marcatori specifici: l'espressione di Zap-70 e il riarrangiamento della regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgVh). La forma più aggressiva di LLC presenta elevata espressione di Zap-70 e le IgVh non riarrangiate, mentre la forma con andamento più indolente si presenta con bassa espressione di Zap-70 e mutazioni dei geni IgVh. Mediante l'utilizzo di arrays è stata studiata l'espressione dei micro-RNA in cellule leucemiche confrontandole con linfociti B normali, ed è stato osservato che vi è una netta distinzione nell'espressione di alcuni miRNA tra la situazione normale e quella patologica; il pattern di espressione di queste molecole consente quindi di discriminare le cellule tumorali da quelle sane. In secondo luogo è stato definito un preciso profilo molecolare che permette di distinguere le due varianti della malattia con diverso decorso clinico. In base all'espressione di Zap-70 e alla presenza di riarrangiamento del gene delle IgVh, si possono distinguere due gruppi principali di pazienti, un gruppo a prognosi più infausta (esprime Zap-70 e senza mutazioni delle IgVh) e un gruppo a decorso più indolente (con Zap-70 non espresso e geni IgVh non mutati). Mediante analisi statistica, è stato individuato un set di 13 miRNA, che permettono di discriminare efficientemente le due diverse situazioni, in perfetta correlazione con i precedenti marcatori.

Il sequenziamento di alcuni geni codificanti miRNA nei pazienti con LLC ha evidenziato mutazioni in 5 dei 42 geni testati, nel 15% dei campioni esaminati, talvolta in associazione con una certa ricorrenza familiare di LLC o altri tumori ematopoietici o solidi (Calin, Ferracin et al. 2005).

La maggior parte degli studi sull'espressione dei microrna nelle leucemie sono volti alla definizione di un profilo che possa discriminare differenti sottotipi patologici, nell'ottica di una possibile applicazione clinica assieme alle tecniche utilizzate routinariamente nella diagnosi, prognosi e terapia di queste malattie.

Un esempio è stato lo studio dei miRNA differenzialmente espressi nella leucemia linfoblastica acuta (LLA) rispetto alla leucemia mieloide acuta (LMA). Queste due patologie geneticamente molto differenti costituiscono le più frequenti forme acute di leucemia nei bambini e negli adulti rispettivamente. La LLA coinvolge progenitori ematopoietici commissionati verso la linea linfoide e più frequentemente verso la linea B, mentre la LMA deriva da progenitori mieloidi a livelli diversi di differenziamento, entrambe le patologie presentano un quadro complesso di alterazioni molecolari che delineano sottogruppi a diverso decorso clinico. Lo studio dell'espressione di geni

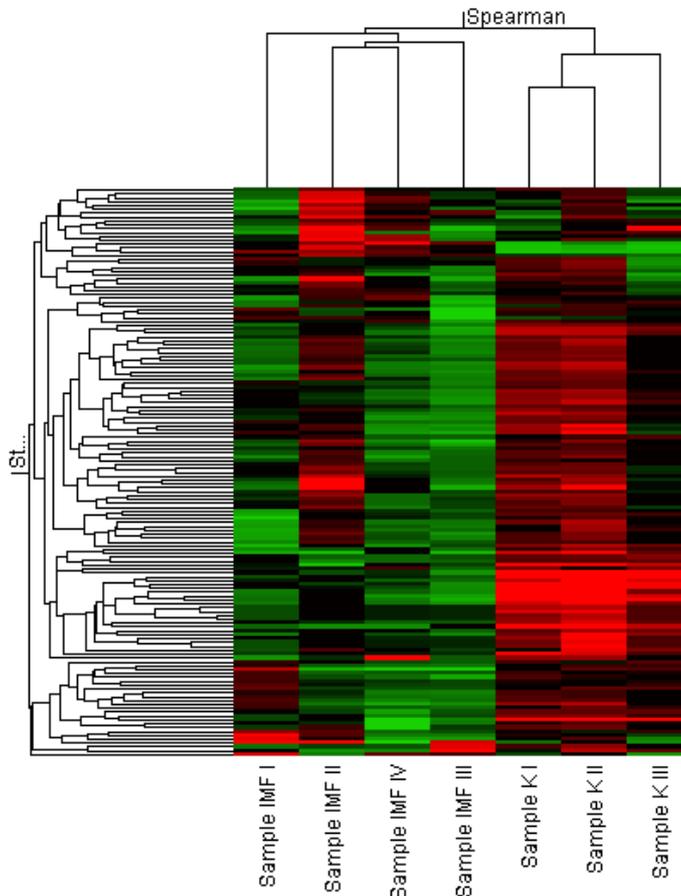
codificanti proteine aveva già dimostrato la possibilità di distinguere i due tipi di leucemia sulla base di un pattern di geni “accesi” o “spenti” in modo specifico. Allo stesso modo è possibile delineare un'impronta digitale altrettanto specifica basandosi sull'analisi di espressione dei microrna; infatti, recentemente sono stati isolati 23 microrna espressi differenzialmente tra LLA e LMA tra i quali in particolar modo i mir-128a e 128b iperespressi nella LLA, let-7b e il microrna 223 iperespressi nella LMA. Valutando il potere predittivo di questi geni è stato stimato che l'analisi di due microRNA tra i sopracitati permette di raggiungere un'accuratezza superiore al 95% nella discriminazione delle due patologie (Mi, Lu et al. 2007).

Lo stesso tipo di approccio permette di distinguere non solo due patologie differenti, ma anche sottogruppi della stessa patologia con diverse caratteristiche cliniche, associati alla presenza/assenza di alterazioni genetiche note. Le mutazioni dei geni NPM e FLT3, sono frequentemente riscontrabili in pazienti con LMA con cariotipo normale, e distinguono due gruppi con diversa prognosi. La mutazione di NPM è associata a prognosi favorevole (in assenza della mutazione di FLT3), mentre le due mutazioni del gene FLT3 sono associate ad una patologia più aggressiva, questi diversi sottogruppi presentano anche un differente pattern di espressione di microrna up e down regolati. Tra questi geni sono state identificate tre famiglie di miRNA oncosoppressori descritte in altri studi: i mir-15a/16-1, mir-29a/b/c, let-7a/b/f. Uno dei microrna down- regolati, il mir-204 inoltre è in grado di riconoscere l'mRNA di HOXA10 e MEIS1, ciò suggerisce un possibile ruolo del miRNA nell'up- regolazione di questi due geni, che spesso è osservata nei pazienti con mutazione della nucleofosmina (Garzon, Garofalo et al. 2008). Il microrna -155, è invece up regolato nei pazienti con mutazione FLT3- TID (Tandem Internal Duplication). Esperimenti successivi hanno dimostrato che questa iperespressione è indipendente dalla via di segnalazione di FLT3, questo dato insieme ad altri studi suggeriscono un ruolo diretto del microRNA nella definizione del fenotipo patologico.

#### *Sindromi mieloproliferative croniche:*

Nonostante in letteratura non siano ancora presenti molti dati sull'espressione dei microrna nelle sindromi mieloproliferative croniche philadelphia negative, studi recenti dimostrano il coinvolgimento di queste molecole in tali patologie. Infatti, l'analisi del profilo di espressione dei microrna in granulociti di pazienti affetti da Mielofibrosi

Idiopatica ha evidenziato un set di geni distintivo per tale patologia (Figura 22)(Guglielmelli, Tozzi et al. 2007).



**Figura 25.**

Tra i 12 microrna con maggiore rilevanza statistica , tre risultano up- regolati (miR-190, -182, -183) mentre gli altri 9 down-regolati (miR-31, -150, -95, -34a, -342, -326, -105, -149, -147) tra i granulociti di Mielofibrosi e i controlli sani; 4 geni (miR-190, -150, -31, -95) risultano inoltre essere diversamente espressi rispetto a pazienti con Policitemia Vera e Trombocitemia Essenziale, dimostrando quindi la notevole specificità di queste molecole. La mutazione del gene JAK2 è l'alterazione genetica più frequente in questo gruppo di patologie, con una frequenza di circa il 90% nei pazienti con Policitemia Vera e circa il 50-60% nei pazienti con Mielofibrosi Idiopatica e Trombocitemia Essenziale; l'espressione dei 12 microrna sopracitati è stata correlata con la carica allelica della mutazione JAK2V617F negli stessi pazienti ed è stato osservato che due miRNA (miR-182, -183) presentano una

relazione lineare con essa. Questo dato è di notevole importanza in quanto dimostra come l'alterazione patologica di un sistema di segnalazione agisca a vari livelli, interessando in maniera specifica anche meccanismi di regolazione molto fini quali i microRNA, che quindi concorrono nel delineare un preciso fenotipo tumorale. Tra i geni regolati dal gruppo di miRNA alterati nella Mielofibrosi vi sono infatti proto-oncogeni (MYC, MYCN), geni che codificano fattori di trascrizione (BACH2, FOXA1, FOP1, AKT3, RARB), proteine regolatrici del ciclo cellulare (BCL-2, NPM1, CCND2, CASP2), proteine di trasduzione del segnale (ARF4, PDGFRA, SOCS4,5,7) e geni della famiglia HOX. Tra questi geni target alcuni presentano una correlazione inversa rispetto all'espressione del microRNA specifico come ad esempio DTR/miR182,-183 e HMGA2/ miR-150, -149, MYB/miR-150, -149, -105.

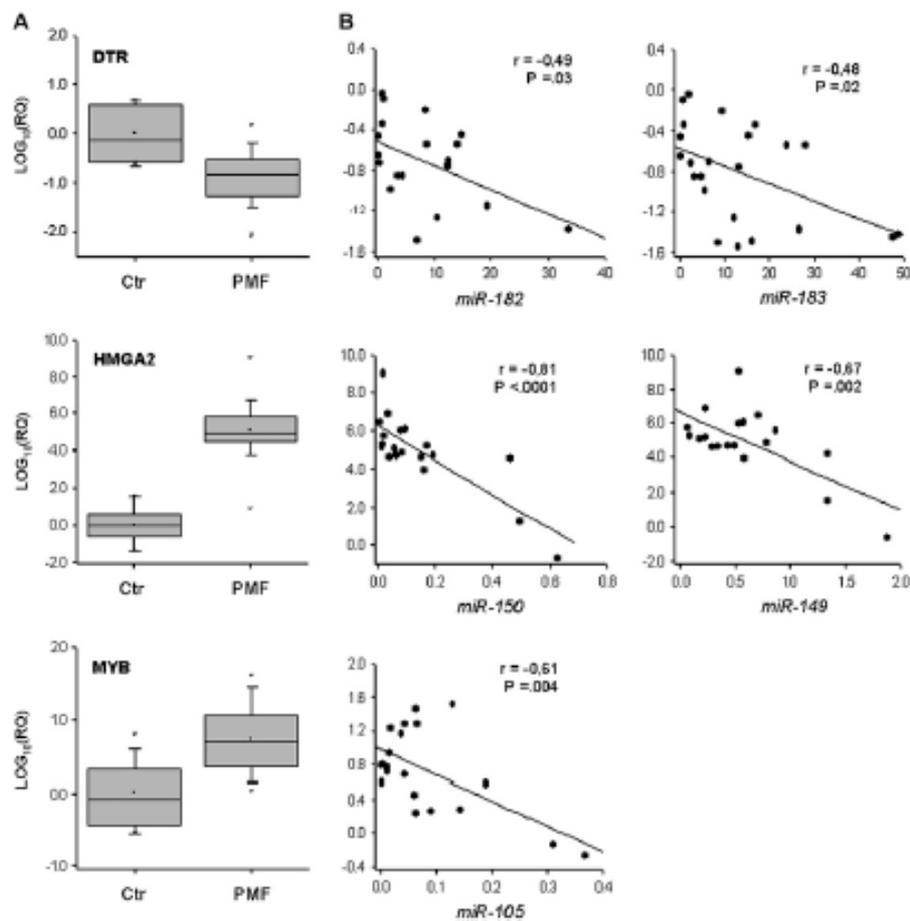


Figura 26.

Sono stati pubblicati due studi sulla alterata regolazione dei microRNA nelle policitemia vera; in un primo lavoro è stata studiata la differente espressione dei miRNA in colture

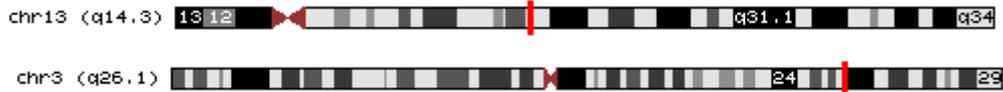
eritroidi ottenute da cellule mononucleate di PV, a tempi diversi, confrontandole a controlli sani. Soltanto un microRNA presenta una significativa down-regolazione in ogni fase analizzata, rispetto ai controlli, il miR-150. Tutti gli altri miRNA studiati presentano variazioni durante il differenziamento eritroide, ma in modo del tutto sovrapponibile tra cellule di pazienti con Policitemia Vera e controlli (Bruchova, Yoon et al. 2007). Nello studio successivo sono stati individuati altri 7 microRNA diversamente espressi tra PV e controlli sani in varie sottopopolazioni isolate da sangue periferico (let-7a, miR-182, -143, -145, -223, -26b, -30b,c), oltre al miR-150 riconfermato essere down-regolato nei reticolociti. Alcuni tra questi microRNA correlano con la carica allelica di JAK2 mutato se si suddividono i pazienti in due gruppi, "omozigoti" (>50% JAK2V617F) o "eterozigoti" (<50% JAK2V617F), dato che sottolinea l'importanza di considerare la frequenza allelica di JAK2V617F in studi comparativi.

Altri invece risultano alterati allo stesso modo anche nelle altre sindromi mieloproliferative croniche Ph-negative (Bruchova, Merkerova et al. 2008).

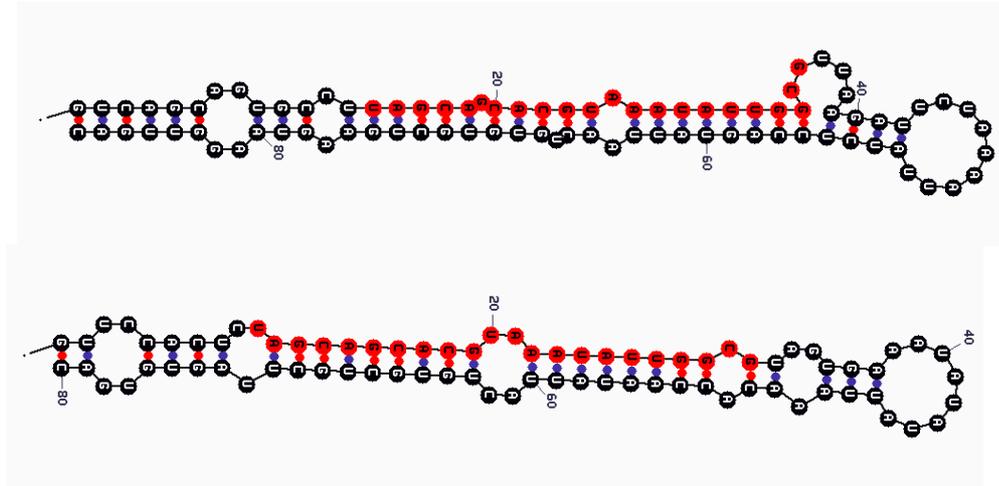
### **microRNA 16**

Il miR-16 è codificato da due geni, miR-16-1 e miR-16-2, localizzati rispettivamente sul cromosoma 13 e sul cromosoma 3; Il miR-16-1 si trova sul braccio lungo del cromosoma 13 (13q14.3) all'interno di un introne del gene DLEU2 e forma un cluster con il microRNA-15a. Questa regione è deleta in più della metà dei casi di leucemia linfatica cronica. Il miR-16-2 forma un cluster con il microRNA-15b sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q26.1), all'interno di un introne del gene SMC4. I due geni codificano per due diversi pre-miRNA, che successivamente vengono processati da due RNase III, prima da Drosha, poi da Dicer nella stessa molecola matura. I geni codificanti i microRNA-15a e -15b danno origine invece a due molecole mature diverse, che presentano la medesima sequenza del miR-16 nelle prime 9 posizioni.

A



B



C

```
miR-15a TAGCAGCACATAATGGTTTGTG
          : : : : : : : : : : : :
miR-15b TAGCAGCACATCATGGTTTACA
          : : : : : : :
miR-16  TAGCAGCACGTAAATATTGGCG
```

**Figura 27.** A. Localizzazione cromosomica dei cluster miR-16-1/-15a e del cluster miR-16-2/-15b. B. Struttura secondaria dei due precursori (pre-miR-16-1 in alto, pre-miR-16-2 in basso). C. Sequenza dei microRNA 15a, 15b, 16 maturi.

Questi 9 nucleotidi costituiscono la “seed sequenze”, ovvero la sequenza che riconosce e lega l’ mRNA bersaglio; questa interazione è stata ampiamente caratterizzata nel caso di BCL2, è ormai infatti dimostrata la regolazione di questa proteina con funzione anti-apoptotica da parte dei microRNA della famiglia 15/16. Questo meccanismo è stato messo in luce soprattutto dagli studi sulla leucemia linfatica cronica (LLC), nei quali è stata osservata una correlazione inversa fra i livelli di espressione dei microRNA 15a/16-1 e i livelli di proteina. Saggi funzionali hanno confermato questo dato, trasfettando infatti la

linea cellulare MEG-01 (linea cellulare con delezione di un allele e alterazione dell'altro locus contenente i microRNA 15a/16-1, iperesprimente BCL2) con un vettore di espressione contenente la sequenza dei due microRNA, è stato dimostrato l'abbattimento dei livelli di BCL2 a livello di proteina, ma non a livello di RNA messaggero. Questo dato suggerisce che i microRNA-15 e -16 agiscono bloccando la traduzione del messaggero di BCL2, ma non incidono sulla sua stabilità. Saggi effettuati con geni reporter hanno permesso di escludere una interazione indiretta mediante secondi mediatori tra BCL2 e i due miRNA. L'abbattimento della proteina BCL2 nella linea MEG-01 si traduce con l'aumento dell'apoptosi, osservato mediante tecniche diverse (Cimmino, Calin et al. 2005).

BCL2 costituisce soltanto uno dei target del miR-16. Tra i molti geni che sono stati descritti essere silenziati da questo microRNA, vi sono anche alcuni importanti elementi del complesso sistema di regolazione del ciclo cellulare. In un recente studio è stato osservato che l'espressione del miR-16 è in grado di influire sul ciclo cellulare inducendo un accumulo delle cellule in fase G0/G1; questo può essere spiegato dall'azione sinergica del miRNA su geni come CDK6, CDC27, CARD10 e c10orf46, implicati nella regolazione del ciclo cellulare a diversi livelli (Linsley, Schelter et al. 2007). In uno studio successivo, utilizzando un diverso approccio, sono stati individuati ulteriori geni regolati dal miR-16 e coinvolti nel passaggio dalla fase G1 alla fase S: CCND1, CCND3, CCNE1. Come nel lavoro precedente è stato dimostrato che la loro down-regolazione produce l'arresto del ciclo cellulare e l'accumulo di cellule in fase G0/G1 (Liu, Fu et al. 2008). Un dato interessante che è stato osservato in entrambi gli studi, è che inibendo singolarmente questi geni mediante siRNA specifici, si ottiene un effetto sul fenotipo cellulare, sensibilmente inferiore a quello ottenuto mediante trasfezione del microRNA, nonostante l'effetto inibitorio del siRNA sul target sia superiore a quello del microRNA. Questo si spiega considerando che un solo microRNA agisce contemporaneamente su più target generando un effetto sinergico molto più forte. Un'altra importante considerazione deriva dal fatto che nei modelli sperimentali utilizzati nel secondo studio riportato, non è stato osservato un aumento dell'apoptosi, come invece era stato dimostrato nelle MEG-01, per effetto dell'inibizione di BCL2. L'azione di un microRNA è infatti diversa da un tipo cellulare all'altro ed è dipendente da innumerevoli fattori che nel complesso conferiscono alla cellula un determinato fenotipo, e ne determinano la risposta. E' quindi difficile

stabilire a priori l'azione di un microRNA in un contesto biologico complesso, quale la cellula.

# MATERIALI E METODI

## CELLULE DI PAZIENTI

Dopo aver ottenuto il consenso informato, è stato prelevato sangue periferico e midollare da pazienti affetti da Neoplasie mieloproliferative croniche Ph-negative e da soggetti volontari sani o donatori di cellule staminali ai fini trapiantologici; e' stata eseguita una revisione dei dati clinici, laboratoristici e istologici originali per una ulteriore conferma della diagnosi. La diagnosi è stata posta secondo i criteri WHO (Tabella 1) ; quando possibile i pazienti sono stati stratificati secondo le rispettive categorie di rischio prognostico e/o trombotico (tabella). Tutti i pazienti sono risultati negativi alla ricerca del riarrangiamento BCR/ABL con tecnica FISH su cellule del sangue midollare o periferico. In alcuni dei pazienti analizzati è stata eseguita anche un'analisi del cariotipo .

*Stratificazione dei pazienti con Policitemia Vera e Trombocitemia Essenziale per il rischio trombotico*

<b>Categoria di rischio</b>	<b>Età&gt;60 o storia di pregressa trombosi</b>	<b>Fattori di rischio cardiovascolari (*)</b>
<b>Basso</b>	NO	NO
<b>Intermedio</b>	NO	SI
<b>Alto (**)</b>	SI	---

(\*) Ipertensione, ipercolesterolemia, diabete, fumo, trombofilia familiare (il cui contributo nella valutazione del rischio trombotico è ancora controverso)

(\*\*)  $PLT > 1500 \times 10^9/L$  definiscono pazienti con TE ad alto rischio di manifestazioni emorragiche nei quali l'uso di aspirina non è indicato per la comparsa di una malattia di von Willebrand acquisita.

*Fattori prognostici validi per le sole forme di Mielofibrosi Primaria.*

1. Lille Score: (Dupriez, Morel et al. 1996)

- Emoglobina < 10g/dL
- Leucociti <4 o > 30 x10<sup>9</sup>/L

<b>Numero di fattori presenti</b>	<b>Gruppo di rischio</b>	<b>Mediana di Sopravvivenza (mesi)</b>
0	Basso	93
1	Intermedio	26
2	Alto	13

2. International Prognostic Scoring System (IPSS) (Cervantes, Dupriez et al. 2009)

- Età > 65 anni
- Sintomi costituzionali
- Emoglobina < 10g/dL
- Leucociti > 25 x10<sup>9</sup>/L
- Blasti nel sangue periferico ≥ 1%

<b>Numero di fattori presenti</b>	<b>Gruppo di rischio</b>	<b>Mediana di Sopravvivenza (mesi)</b>
0	Basso	135
1	Intermedio-1	95
2	Intermedio-2	48
≥ 3	Alto	27

## LINEE CELLULARI

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state ottenute dalla American Type Culture Collection (Manassas, VA, <http://www.atcc.org>). Le cellule sono state mantenute in terreno RPMI supplementato con 10% FCS.

### *HEL*

La linea cellulare HEL è stata derivata dal sangue periferico di un uomo di 30 anni con leucemia acuta eritroblastica (LAM-M6) insorta dopo trattamento per linfoma di Hodgkin. Le cellule mostrano una morfologia tondeggianti, appaiono grandi, occasionalmente giganti e polinucleate; mostrano capacità di sintesi indotta e spontanea di globina, non possiedono i marcatori cellulari CD3 e CD19, mentre sono positive per i marcatori CD13, CD41, CD42, CD71, GlyA. La linea HEL presenta nel proprio genoma più copie della mutazione  $JAK2^{V617F}$  (Quentmeier, MacLeod et al. 2006). Possono presentare le seguenti alterazioni citogenetiche: cariotipo triploide umano con 2.3% di poliploidia; 63(60-64)<3n>XYY, -2, -9, -10, -10, -11, -14, -16, -16, -17, -19, +20, +21, +2mar, del(2)(q32), t(3;6)(p13;q16), der(5)t(t(5;17)(q10;q10), der(6)t(1;6)(p13;p21), der(7)add(7)(p14;q32), add(8)(p21), der(9)t(9;?)(?;11)(p24;?)(?;q13), del(11)(q13), add(15)(p11), del(20)(q13), r(20)(p11q11), dup(21)(q11q22.3-qter), psu dic(22;9)t(9;?)(?;22)(p24;?)(?;p11-13); (Martin, 1982).

### *K562*

La linea cellulare K562 è stata derivata dal versamento pleurico di una donna caucasica di 53 anni affetta da leucemia mieloide cronica; le cellule hanno una morfologia linfoblastica. Presentano un cariotipo diploide umano con 46 cromosomi in cui si riscontra la delezione terminale del braccio lungo del cromosoma 22 (del(22)(q12), cromosoma Philadelphia; si riscontra inoltre una traslocazione reciproca sbilanciata di uno dei cromosomi 17 sul braccio lungo di uno del cromosoma 15. La maggioranza delle cellule mononucleate sono indifferenziate e non producono immunoglobuline, non mostrano attività di fosfatasi alcalina e mieloperossidasi e non sono in grado di fagocitare particelle inerti (Baker, Gerard et al. 2002).

### *HL60*

La linea cellulare HL60 è stata derivata nel 1976 dal sangue periferico di una donna di 36 anni affetta da leucemia mieloide acuta. Le cellule assomigliano ai promielociti e possono essere indotte a differenziare *in vitro* o verso i granulociti o verso monociti-macrofagi. Mostrano un cariotipo pseudodiploide e le cellule appaiono di forma rotondeggiante, crescendo in sospensione. (Collins, 1977; Gallagher, 1979; Dalton, 1988; Collins, 1987).

### *Ba/F3*

La linea cellulare Ba/F3 è stata derivata da cellule murine pro-B IL-3 dipendenti da sangue periferico della razza murina BALB/c. Mostrano morfologia rotonda, alcune appaiono polimorfe, si ritrovano singolarmente in sospensione o occasionalmente in gruppi. Mostrano un cariotipo diploide murino con 33% di poliploidia (40 (36-42) 2n).

## **PREPARAZIONE DEI CAMPIONI CELLULARI**

Per la valutazione dei marker molecolari e per gli studi cellulari sono stati prelevati 30 ml di sangue periferico oppure 5-8 ml di sangue midollare per raccogliere le cellule mononucleate, i granulociti e le sottopopolazioni cellulari

### *Recupero dell' anello leucocitario*

Il campione di sangue periferico è stato stratificato su Lymphoprep e centrifugato a 1600 rpm per 30 min a 18°C. È stato recuperato l'anello delle cellule mononucleate, che sono state lavate in PBS sterile a 4° e centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti a 8°C per due volte. Le cellule sono state contate mediante camera di Burker con un fattore di diluizione di 1:200.

### *Recupero dei granulociti*

Per il recupero dei granulociti, dopo la centrifugazione su gradiente di densità ed il recupero della frazione mononucleata, è stato aspirato il soprannatante, e la pellet è stata risospesa in 40 ml di NaCl 0.2% per la lisi eritrocitaria. Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti a 8°C, il soprannatante è stato eliminato ottenendo la pellet granulocitaria, che è stata sottoposta ad una seconda lisi in 40 ml di NaCl 0.2% e nuova centrifugazione a

1500 rpm per 10 minuti a 8°C. La pellet risospesa in 2 ml di PBS è stata poi trasferita in due eppendorf sterili e centrifugata a 3000 rpm per 5 minuti.

#### *Purificazione delle cellule CD34+*

La purificazione delle cellule CD34+ da sangue periferico o aspirati midollari è stata effettuata mediante separazione immunomagnetica secondo la procedura Miltenyi.

Reagenti:

Buffer 1 (tampone di lavaggio e diluizione): PBS Ca-Mg free, EDTA 2Mm;

Buffer 2 (tampone di separazione): PBS Ca-Mg free, 0,5% BSA, EDTA 2mM;

FcR blocking reagent. Human IgG;

MACS CD34 microbeads: Microbeads super-paramagnetiche coniugate a anticorpi monoclonali murini anti-human CD34 (isotipo: mouse IgG1).

La pellet delle cellule mononucleate viene sottoposta a due lavaggi con buffer 1, centrifugata a 1000rpm per 10 minuti e poi risospesa in buffer 2 per un volume finale di 300µl contenenti  $10^8$  cellule mononucleate.

Alla sospensione in buffer 2 abbiamo poi aggiunto 100µl di FcR blocking reagent e 100µl di CD34 microbeads per ogni  $10^8$  cellule totali; il tutto è incubato per 30 minuti a 4°C e periodicamente agitato. Terminata l'incubazione abbiamo aggiunto buffer 2 fino ad un volume di 10ml e centrifugato a 1000rpm per 10 minuti a 8°C; rimosso molto accuratamente il sopranatante, abbiamo risospeso la pellet in un volume finale di 500µl di buffer 2 ogni  $10^8$  cellule totali.

Dopo aver lavato la colonna MACS MS+ di separazione inserita nel supporto magnetico con 500µl di buffer 2, abbiamo applicato alla colonnina la sospensione cellulare che viene poi lasciata defluire per gravità recuperando la frazione CD34-negativa; abbiamo effettuato poi 3 lavaggi della colonnina ciascuno con 500µl di buffer 2 e si sono lasciati defluire raccogliendo ancora come frazione CD34-negativa. Quindi sono stati aggiunti ulteriori 500µl di buffer 2 nella colonnina, che è stata velocemente staccata dal supporto magnetico per recuperare la frazione CD34-positiva tramite pressione con un pistone all'interno della colonnina. In alcuni casi è stato necessario eseguire ulteriori passaggi di purificazione della frazione CD34-positiva recuperata in una nuova colonnina fino ad un massimo di tre purificazioni (ulteriori passaggi non aumentano la purezza).

## **TECNICHE DI COLTURE CELLULARI**

### Colture liquide

#### *a) Differenziamento eritroide e megacariocitario*

Per ottenere la crescita di cellule eritroidi o megacariocitarie sincrone durante il loro differenziamento in vitro sono state utilizzate colture in due fasi: una prima fase proliferativa di espansione del pool di progenitori ed una seconda fase differenziativa. Cellule CD34 positive isolate da sangue midollare e periferico di pazienti con Neoplasie mieloproliferative croniche ph-negative e donatori sani sono state piastrate alla concentrazione di  $2 \times 10^5$ /mL in terreno SYN.H (serum-free medium for expansion of hematopoietic cells, AbCys S.A.) con l'aggiunta di Penicellina/Streptomicina all'1%, L-Glutammina all'1%.

*TERRENO SYN.H: Clinical grade human albumin, synthetic iron carrier, rh-insulin, nucleosides, L-glutamine,  $\alpha$ -monothioglycerol, synthetic lipids, synthetic Iscove base medium.*

Nelle colture per il differenziamento eritroide è stato aggiunto un cocktail di citochine per la fase proliferativa, composto da:

Human IL-3 2ng/mL;

Human IL-6 2ng/mL;

SCF 10ng/mL

Nelle colture per il differenziamento megacariocitario sono state aggiunte, per la fase proliferativa :

Human IL-3 2ng/mL;

Human IL-6 2ng/mL;

TPO 50ng/mL;

Human IL11 40ng/mL

Dopo 6 giorni di coltura le cellule sono state lavate in PBS, contate e nuovamente piastrate per ulteriori 6 giorni alla concentrazione di  $1,5 \times 10^5$ /mL per la fase differenziativa; per quest'ultima fase è stato utilizzato il terreno STEM- $\alpha$  (serum-free

medium without citokines for human hematopoietic cells, STEM- $\alpha$ ) con addizionati Penicillina/Streptomicina all'1%, L-Glutammina all'1%.

*TERRENO STEM- $\alpha$ : Clinical grade human albumin, synthetic iron carrier, rh-insulin, nucleosides, L-glutamine,  $\alpha$ -monothioglycerol, synthetic lipids, synthetic Iscove base medium.*

Per ottenere il differenziamento eritroide è stato aggiunto un cocktail di citochine per la fase differenziativa, composto da:

Human IL-3 2ng/mL;

Human IL-6 2ng/mL;

Human EPO 3U/mL

Per il differenziamento megacariocitario sono state aggiunte, per la fase differenziativa:

Human IL-3 2ng/mL;

Human IL-6 2ng/mL;

TPO 50ng/mL;

Human IL11 40ng/mL

#### *b) Linee cellulari*

Il terreno utilizzato per le linee cellulari esaminate, quali Hel,K562 e HL60, è costituito da terreno RPMI 1640, supplementato dal 10% di siero fetale bovino, 1% di P/S e 1% di L-Glut.

#### *c) Cellule CD34+*

Il terreno utilizzato per le cellule CD34+ è costituito da IMDM , supplementato dal 10% di siero fetale bovino, 1% di P/S e 1% di L-Glut.

#### Colture Semisolide

Sono state aggiunte  $2.5 \cdot 10^5$  MNCs / mL ad aliquote da 2.5 mL di terreno semisolido (metilcellulosa), in medium di coltura IMDM (Cambrex, Belgium),

Penicillina/Streptomina (ICn Biomedicals Inc, USA) e L-Glutamina (Cambrex,Belgium) 2mM; le cellule sono state successivamente piastrate in Capsule Petri (Tissue Culture Dish, 35x10 mm,Falcon,USA).

Sono stati utilizzati due terreni semisolidi:

una preparazione di metilcellulosa contenente una miscela ottimale di citochine (METHOCULT GF H4434, StemCell Technologies Inc, USA) per indurre la crescita di colonie mieloidi (con rh SCF, rh GM-CSF e rh IL-3) ed eritroidi ( con rh IL-3 e rh EPO);

una preparazione di metilcellulosa “base” (METHOCULT H4531, StemCell Technologies Inc, USA), senza alcuna citochina, per la crescita delle colonie spontanee eritroidi (EEC).

<i>METHOCULT GF H4434</i>	<i>METHOCULT H4531</i>
<i>1.0 % Metilcellulosa in IMDM</i>	<i>1.0 % Metilcellulosa in IMDM</i>
<i>30 % Siero Fetale Bovino (FBS)</i>	<i>30 % Siero Fetale Bovino (FBS)</i>
<i>1 % BSA</i>	<i>1 % BSA</i>
<i>10<sup>-4</sup>M 2-Mercaptoetanolo</i>	<i>10<sup>-4</sup>M 2-Mercaptoetanolo</i>
<i>2mM L-Glutamina</i>	<i>2mM L-Glutamina</i>
<i>50ng/mL rh Stem Cell Factor</i>	<i>10 % Agar Leukocyte Conditioned Medium</i>
<i>10ng/mL rh GM-CSF</i>	
<i>10ng/mL rh IL-3</i>	
<i>3 unita' /mL rh Eritropoietina (EPO)</i>	

**Tabella 5:** descrizione medium semi-solidi

Dopo 14 giorni di coltura in incubatore a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, le colonie emopoietiche sono state riconosciute come appartenenti alla linea mieloide o eritroide in base ai criteri morfologici convenzionali e alla presenza o meno di pigmento emoglobinico con l'esame al microscopio invertito e contate.

Per la valutazione delle colonie megacariocitarie e' stato utilizzato il terreno MegaCult-C serum-free (Stem Cell Technologies inc, USA) (Tabella III) a cui sono state aggiunte cellule CD34-positve purificate tramite separazione immunomagnetica alla concentrazione di 1,1x10<sup>5</sup>/ml in un volume finale di 3ml costituito da 0,1ml di sospensione cellulare, 1,7ml di MegaCult-C Medium non supplementato con citochine e 1,2ml di Collagen Solution.

Sono stati poi aggiunti al medium 50ng/ml di Trombopoietina, 10ng/ml di human IL-6 e 10ng/ml di human IL-3.

<i>Componenti</i>	<i>Concentrazione finale</i>
<i>Collageno</i>	<i>1,1 mg/ml</i>
<i>Albumina sierica bovina</i>	<i>1%</i>
<i>Insulina umana ricombinante</i>	<i>10 µg/ml</i>
<i>Transferrina umana</i>	<i>200 µg/ml</i>
<i>L-glutamina</i>	<i>2 mM</i>
<i>2-Mercaptoetanololo</i>	<i>10<sup>-4</sup> M</i>
<i>IscoV's MDM</i>	

**Tabella 6:** descrizione medium MegaCult-C serum-free

Dopo 12 giorni di coltura in incubatore a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, sono state riconosciute e contate le colonie megacariocitarie (CFU-MK) in base alla loro morfologia tipica.

## **TECNICHE CITOFUORIMETRICHE**

### *Valutazione delle cellule CD34+ circolanti*

Le cellule CD34+ nel PB di pazienti con PMF sono state valutate usando 50 µl di sangue con EDTA come anticoagulante, marcato con gli anticorpi CD45-FITC e CD34+PE (entrambi Becton Dickinson , USA) 15 min a temperatura ambiente, protetto dalla luce. Successivamente è stata aggiunta la 7-aminoactinomicyna D (BD Pharmingen, San Diego, USA) per escludere le cellule morte e lasciata incubare per 5 min (in accordo con le linee guida internazionali).

Infine si è aggiunto 1ml per tubo di Auto Lyse (BioSource) e dopo ulteriori 10 min il campione è stato valutato con FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

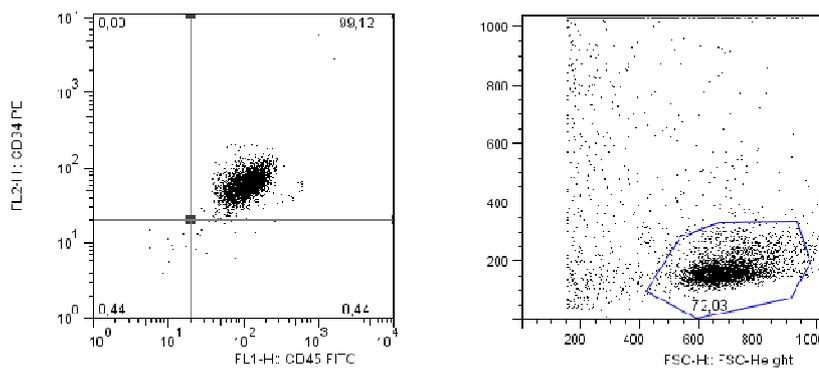
### *Valutazione della purezza delle cellule CD34+ immunoselezionate*

La valutazione della purezza è stata effettuata tramite analisi citofluorimetrica comparando un'aliquota contenente 100µl di tampone FACS (per 50 mL 0.8 mL EDTA 0.5 M e 49.2 mL Cell Wash) e 5x10<sup>4</sup> cellule prelevate dalla sospensione cellulare prima della separazione immunomagnetica, ad un'aliquota contenente 100µl di tampone FACS e

$5 \times 10^4$  cellule prelevate dalla frazione recuperata. L'aliquota contenente la sospensione cellulare prelevata prima della separazione immunomagnetica è stata utilizzata come controllo ed è stata marcata con  $2 \mu\text{l}$  di anticorpo  $\gamma 1 / \gamma 1$ , mentre l'aliquota prelevate dalle frazioni CD34+ recuperata dopo separazione immunomagnetica, è stata marcata con  $2 \mu\text{l}$  di anticorpo (Anti-human CD34 e CD45 (entrambi Becton Dickinson).

Dopo l'aggiunta dell'anticorpo è stata eseguita un'incubazione al buio a  $6^\circ\text{C}$  per 20 minuti, quindi si è effettuato un lavaggio con 1 ml di tampone FACS a 1000rpm per 10 minuti.

Eliminato il sovrantante la pellet è stata risospesa in  $100 \mu\text{l}$  di tampone FACS, sono stati poi aggiunti  $5 \mu\text{l}$  di 7 AAD (BD Pharmingen) e si è proceduto alla valutazione citofluorimetrica; il valore di purezza delle frazioni recuperate è risultato compreso tra il 97 e il 99%. (Figura 28).



**Figura 28.** Valutazione della purezza delle cellule CD34 positive.

### *Valutazione del differenziamento eritroide e megacariocitario*

#### *Anticorpi utilizzati:*

*anti-Glicoforina A PE;*

*anti-CD36 FITC;*

*anti-CD71 FITC;*

*anti- CD41a PE;*

*anti- CD61 FITC.*

Sono state prelevate  $1 \times 10^5$  cellule per ogni singola valutazione, lavate in 1 mL di PBS a 4°C tramite centrifugazione a 1200 rpm per 5 minuti ed incubate con 2  $\mu$ l di anticorpo in ghiaccio e al riparo dalla luce per 15 minuti. Per il controllo è stato utilizzato l'anticorpo  $\gamma 1/\gamma 1$  (Beckton Dickinson, USA), per la valutazione della differenziazione la combinazione di anticorpi anti-Glicoforina A (GPA) (Beckton Dickinson, USA), marcato con fluoroforo PE e anti-CD36, marcato con fluoroforo FITC (Beckton Dickinson, USA) e la combinazione di anticorpi anti-Glicoforina A, marcato con fluoroforo PE e anti-CD71, marcato con fluoroforo FITC (BD Pharmingen, USA). Il CD71, recettore della transferrina, è un marcatore della differenziazione eritroide e mieloide; CD36 e GPA sono marcatori rispettivamente precoce e tardivo della differenziazione eritroide.

Per la valutazione del differenziamento megacariocitario sono stati utilizzati per il controllo l'anticorpo  $\gamma 1/\gamma 1$  e la combinazione CD41a PE e CD61 FITC, marcatori rispettivamente precoce e tardivo.

Le valutazioni sono state effettuate al FACS Scan (Beckton Dickinson) utilizzando il software Cell Quest Pro; le successive analisi dei dati sono state effettuate con il software WinMDI (versione 2.9; <http://facs.scrips.edu/software.html>).

### **ESTRAZIONE DEL DNA**

Il DNA genomico è stato estratto dai granulociti con QIAmp DNA Blood kit (Quiagen, Germany). La pellet granulocitaria è stata risospesa in 200  $\mu$ l di PBS e sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di Proteinase K e 200  $\mu$ l di Buffer AL. Dopo incubazione a 56° per 10 minuti sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di etanolo e la mix è stata trasferita su colonnina Qiagen e centrifugata a 6000 rpm per 2 minuti e successivamente a 12.000 rpm per 1 minuto. Dopo aver trasferito la colonnina su un nuovo tubo sono stati aggiunti 500  $\mu$ l di BUFFER AW1. Dopo centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto sono stati aggiunti 500  $\mu$ l di BUFFER AW2. Dopo centrifugazione a 12.000 rpm per 4 minuti sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di BUFFER AE e si è lasciata la mix a incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Infine dopo centrifugazione a 12.000 rpm per 1 minuto l'eluato ottenuto è stato trasferito in eppendorf sterile, e il DNA raccolto misurato mediante assorbimento spettrofotometrico a 260 nm (tecnologia NanoDrop).

*Estrazione del DNA dalle cellule della mucosa buccale:*

Per escludere la presenza di eventuali polimorfismi, abbiamo estratto del DNA dalle cellule dell'epitelio buccale. Le tecniche di prelievo utilizzate sono tipicamente scarsamente invasive, la procedura di campionamento del DNA si basa sul prelievo di cellule di sfaldamento della mucosa orale effettuato mediante sfregamento di un'apposita spazzola (buccal swab) sulle pareti interne della bocca. Seguendo il protocollo QIAamp DNA, il tampone utilizzato per prelevare le cellule della mucosa buccale è stato posto in un tubo da 2 ml in cui sono stati aggiunti 600 µl di PBS, 20 µl di QIAGEN proteasi e 600 µl di buffer AL. Dopo una breve agitazione il tampone è stato incubato a 56° C per 10 minuti. Sono stati aggiunti 600 µl di etanolo (96-100 %) e, dopo aver vortexato, 700 µl della mix sono stati trasferiti all'interno della QIAamp spin column (tubo da 2 ml fornito dal kit). Dopo una successiva centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto la spin column è stata trasferita in un tubo di raccolta e sottoposta ad un doppio lavaggio con 500 µl di buffer AW1 e 500 µl di buffer AW2 rispettivamente. Di seguito la spin column è stata trasferita in un nuovo tubo di raccolta da 2 ml e si è centrifugato al massimo per 1 min. Dopo aver trasferito la spin column in un tubo di raccolta, sono stati aggiunti 150 µl di buffer AE di eluizione prontamente centrifugati a 8000 rpm per 1 min dopo un breve periodo di incubazione di 1 min.

L'eluizione con 100 µl di buffer aumenta significativamente la concentrazione di DNA, ma potrebbe ridurre leggermente il recupero totale. Una seconda eluizione con 150 µl di eluato contenente DNA aumenterà significativamente il recupero. Il DNA recuperato viene poi conservato a -20°C.

Un tampone buccale solitamente permette di recuperare 0.5-3.5 µg di DNA in 150 µl di buffer (3-23 ng/µl).

### **ESTRAZIONE DELL'RNA**

La purificazione di RNA è stata realizzata mediante estrazione del campione risospeso in Trizol guanidina tiocianato/fenolo, che lisa le cellule e inibisce le RNasi (Invitrogen-Life Technologies, Inc.), seguendo le indicazioni della ditta. Brevemente la pellet di granulociti risospesa in trizol, viene incubata a temperatura ambiente per 2-3 minuti, dopo l'aggiungono 0.2 ml di cloroformio si centrifuga a 12000 per 15 min a 4°C. In tal modo si ottengono tre fasi: una rossa, una bianca e un interfaccia. Si recupera la fase acquosa

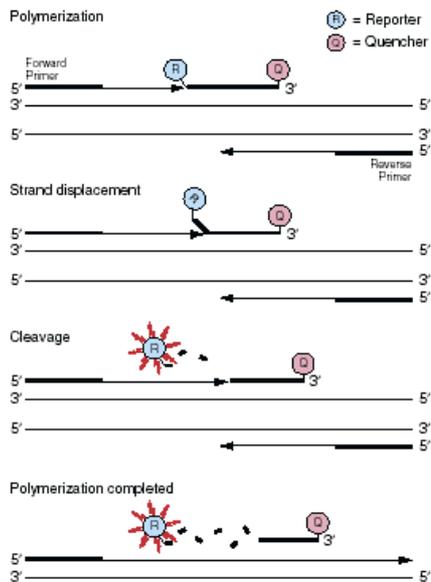
superiore e si aggiunge 2 µl di glicogeno e 0.5 ml di isopropanolo per precipitare l'RNA. Si incuba a temperatura ambiente per 10 min agitando per inversione poi si centrifuga a 12000 rpm per 10 min a 4°C. La pellet di RNA viene quindi lavata con etanolo al 75% ed infine centrifugata a 7500 rpm per 5 min a 4°C. Si lascia asciugare la pellet per 5 min e si risospinde in 20 µl di acqua sterile (Eurobio). L'RNA così ottenuto è quantificato mediante dosaggio spettrofotometrico a 260 nm (tecnologia Nanodrop)

## **TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

### *RT-PCR quantitativa (TaqMan)*

Caratteristiche della metodica PCR RTq:

La reazione di PCR RTq si esplica sfruttando l'attività 5' esonucleasica della AmpliTaq Gold DNA polimerasi che permette di tagliare la sonda durante la fase di amplificazione della PCR. La sonda è un oligonucleotide contenente un marcatore fluorescente, il reporter, all'estremità 5' (FAM dye) e un marcatore, il quencher, all'estremità 3' (TAMRA dye) legati covalentemente. Durante la reazione, il taglio della sonda separa il marcatore fluorescente reporter dal quencher, con il risultato di un aumento della fluorescenza emessa dal reporter a ciascun ciclo del processo di PCR. L'accumulo dei prodotti di PCR è valutato direttamente monitorando l'aumento della fluorescenza emessa dal reporter ed è registrato dallo strumento ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Tale metodo si basa sull'uso di due primers specifici per la sequenza di interesse e di una sonda fluorogena la cui sequenza target è localizzata dentro l'amplicone generato tra i primers. La figura sotto mostra il processo descritto:



**Figura 29.**

Quando la sonda è intatta, la vicinanza del reporter fluorescente e del quencer determina la soppressione della fluorescenza del reporter in seguito al fenomeno di trasferimento di energia Förster-type (Förster, 1948; Lakowics, 1983). Durante la PCR, se il target di interesse è presente, la sonda si lega in maniera specifica alla sequenza presente tra il primer reverse e il forward. L'attività 5'-3' esonucleasica dell'enzima AmpliTaq Gold taglia la sonda tra il reporter ed il quencer solo se la sonda ibridizza con il target. I frammenti della sonda sono poi staccati dal target e la polimerizzazione dell'elica continua. L'estremità 3' del probe è bloccata per prevenire l'estensione del probe durante la PCR. Questo processo avviene ad ogni ciclo e non interferisce con l'accumulo esponenziale del prodotto di PCR. L'aumento del segnale fluorescente è misurato solo se la sequenza target è complementare alla sonda ed è amplificata durante la PCR. Grazie a queste caratteristiche, la specificità delle reazioni è elevata.

Il buffer utilizzato contiene un marcatore di riferimento passivo (ROX) che non partecipa alla reazione di PCR. Questo fa da standard interno di riferimento con cui il segnale del reporter può essere normalizzato durante l'analisi dei dati. La normalizzazione è necessaria per correggere le fluttuazioni di fluorescenza dovuta ai cambiamenti nelle concentrazioni o nei volumi dei campioni. La normalizzazione è accompagnata dalla divisione dell'intensità di emissione di fluorescenza del reporter per l'intensità di emissione del marcatore passivo, ottenendo un rapporto definito  $R_n$  (reporter normalizzato) per ciascun tubo di reazione.

Il quantitativo di cDNA amplificato viene valutato come  $C_t$ .

Il  $C_t$  o ciclo soglia è il ciclo in cui un aumento statisticamente significativo nel  $R_n$  è per primo individuato. La soglia è definita come la deviazione standard media di  $R_n$  per i cicli early moltiplicato per un fattore di correzione. Il ciclo soglia è quello corrispondente al momento in cui il Sistema di misurazione (Sequence Detecion System) inizia a rilevare l'aumento nel segnale associato con una crescita esponenziale del prodotto di PCR (Figura 30)

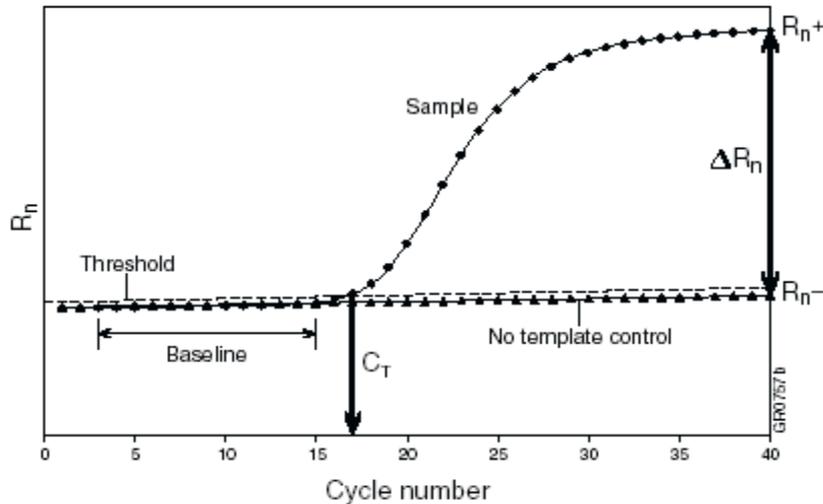


Figura 30.

I risultati della PCR quantitativa sono espressi come differenze nei livelli di espressione tra il gene di interesse e il gene di riferimento (HOUSEKEEPING) per ciascun campione, quindi dalla differenza del ciclo soglia  $C_t$  del gene di riferimento con quello del gene di interesse si ottiene il  $\Delta C_t$ . Per ciascun campione viene poi calcolato il  $\Delta\Delta C_t$  sottraendo alla media del  $\Delta C_t$  del campione del paziente patologico il  $\Delta C_t$  calcolato nell'intera popolazione di soggetti sani. Il valore di quantificazione relativa (RQ) era espresso come  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

#### valutazione quantitativa di JAK2:

Sono stati usati per questa valutazione:

FORWARD PRIMER (5'AAGCTTTCTCACAAGCATTGGTTT-3')

REVERSE PRIMER (5'-AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTT-3')

Una sonda fluorogena specifica per l'allele JAK2 wilde-type  
(VIC-5'-TCTCCACAGACACATAC-3'-MGB)

Una sonda fluorogena specifica per l'allele JAK2 mutato  
(FAM-5'-TCCACAGAAACATAC-3'-MGB).

La Tabella IV riporta in dettaglio la composizione della miscela di reagenti utilizzata per la procedura di amplificazione.

Componenti di reazione	Volume ( $\mu\text{L}$ ) per campione	Concentrazione finale
TaqMan Universal Master mix (2x)	10	1x
Forward primer	1.5	350 nM
Reverse primer	1.5	350 nM
TaqMan probe VIC	1	125 nM
TaqMan probe FAM	1	125 nM
Campione + H <sub>2</sub> O	5	-
Totale	20	-

**Tabella 7.** mix finale per RT-PCR quantitativa (TaqMan)

STEP	UNG incubazione	Attivazione della Taq	PCR	
	HOLD	HOLD	Cicli (50 cicli)	
			Denaturazione	Annealing/estensione
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tempo	2 min	10 min	15 sec	1 min
Volume totale	20 $\mu\text{L}$			

**Tabella 8 .** Condizioni di esecuzione di ogni PCR

I risultati della PCR quantitativa sono stati espressi come differenze nei livelli di espressione tra il gene JAK2 mutato e il gene JAK2 normale (wild-type, WT) per ciascun

campione, quindi dalla differenza tra il ciclo soglia  $C_t$  del gene mutato e quello del gene WT ( $C_T^{JAK2V617F} - C_T^{JAK2WT}$ ), ottenendosi il valore  $\Delta C_t$ . La quota di allele mutato di ciascun campione è stata ottenuta comparando il valore di  $\Delta C_t$  a diluizioni seriali di DNA plasmidico WT e mutato.

#### *Genotipizzazione del locus rs12343867:*

Il polimorfismo rs12343867 è uno degli SNP che definiscono l'aplotipo 46/1. Si tratta di una variante puntiforme del nt 5064189 nell'introne 14 del gene JAK2. L'allele parentale contiene in questa posizione una timina, mentre l'allele minore contiene una citosina.

L'attribuzione del genotipo per il polimorfismo rs12343867 è stata eseguita mediante Allelic Discrimination Assay su ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystem) utilizzando il kit SNP Genotyping Assay C\_31941689\_10 (Applied Biosystem).

L'Allelic Discrimination Assay è una particolare applicazione della PCR real time che non consente di quantificare il target presente ma permette invece di distinguere le due varianti alleliche presenti.

Il kit utilizzato contiene le due sonde fluorogeniche specifiche per le due varianti dello SNP in esame, marcate con un reporter dye diverso. La raccolta dei dati avviene alla fine della reazione. In base alle fluorescenze rilevate dallo strumento, il software elabora un plot in cui i campioni sono divisi in tre gruppi: omozigoti per allele X, omozigoti per allele Y, eterozigoti.

Per ogni campione da genotipizzare sono stati amplificati 20 ng di DNA genomico secondo il seguente protocollo di reazione: denaturazione a 95° C per 10 minuti seguita da 40 cicli di amplificazione (92° C 15 sec, 60° C 1 minuto). La mix di reazione conteneva l'assay specifico per lo snp rs12343867 contenente i primer e le due sonde fluorogeniche, oltre alla Taqman 2x Universal Pcr Master Mix (Applied Biosystem) contenente DNA polimerasi, dNTPs e sonda Rox.

#### *valutazione quantitativa di MPL:*

Per la valutazione della mutazione di MPL sono state eseguite per ogni campione tre diverse reazioni di PCR (pancrazio et al. JMD 2008). In tutte sono stati utilizzati due

primers per amplificare la zona di interesse entrambi in concentrazione 300 nMol. In ciascuna delle tre reazioni è stata invece utilizzata una sonda fluoro genica LNA diversa: una complementare alla sequenza wild type, una specifica per la mutazione MPLW515L e una per la mutazione MPLW515K. Tutte le sonde sono state utilizzate in concentrazione 200nMol (Tabella 9) Il metodo che è stato sviluppato si basa sull'uso di sonde di acidi nucleici "molecular beacon" modificate con metodologia LNA (locked nucleic acid) e marcate con fluorocromo FAM. La scelta delle sonde tipo LNA è basata sul fatto che, rispetto alle sonde convenzionali, queste hanno una maggior stabilità termica e specificità di ibridazione a ragione della loro più elevata Tm, che le rendono particolarmente idonee per la discriminazione allelica, come nel caso appunto delle mutazioni puntiformi. La scelta delle sonde selezionate è derivata dallo studio di un ampio pannello di sonde convenzionali e di sonde LNA, oltre che da una ricerca e simulazione computerizzata delle sequenze e del calcolo della Tm.

Real-time PCR primers/probes	Sequence
MPL forward primer	5'-agcctggatctccttggtgac-3'
MPL reverse primer	5'-accgccagtcctcctgcct-3'
MPL wild-type probe	5'-ctgctg+Aggt+ <u>Ggc</u> +Agtttc-3'
MPL 515W>L probe	5'-ctgc+Tgagg+ <u>T</u> +Tgcag+T+Ttc-3'
MPL 515W>K probe	5'-tgc+Tgctgagg+ <u>A</u> + <u>Ag</u> cagtttc-3'

LNA bases are indicated by a capital letter with a plus sign before it. Probes were labeled with 5-carboxyfluorescein at their 5' termini while Black Hole Quencher-1 was attached to the 3' termini. The underlined nucleotides correspond to the 515 codon; the wild-type sequence is TGG, the W515L sequence is TTG, and the W515K sequence is AAG.

**Tabella 9:** Sequenza dei primer e dei probe per l'analisi quantitative delle mutazioni di MPL W515

Per ogni campione sono stati utilizzati 20 ng di DNA. La mix di reazione conteneva inoltre la Taqman 2x Universal Pcr Master Mix contenente la polimerasi, dNTP e la sonda Rox. È stato poi seguito il seguente protocollo di PCR: denaturazione a 50° C per 2 minuti e 95° C per 10 minuti e poi amplificazione (95° C per 15 secondi, 60° C per 1 minuto) per 40 cicli utilizzando la macchina StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystem) .

Per ogni campione è stato calcolato il  $\Delta C_t$  che è dato dalla differenza tra ciclo soglia medio della reazione che utilizza il probe per il mutato e ciclo soglia medio della reazione con il probe wt ( $\Delta C_t = C_t \text{ mutato} - C_t \text{ wt}$ ).

Il ciclo soglia è tanto più basso quanto maggiore è il numero di copie della sequenza riconosciuta dal probe presenti nel campione. Un campione mutato ad esempio, in una reazione che utilizzi una sonda specifica per la mutazione presente, avrà sicuramente un ciclo soglia molto più basso di un campione che non presenti quella mutazione, poiché contiene copie della sequenza. Quindi il  $\Delta C_t$  di un campione mutato sarà diverso da quello di un campione wt e questo permette di distinguere i due campioni.

Per verificare la specificità della metodica utilizzata sono stati inoltre testati, con lo stesso procedimento, 17 campioni di DNA provenienti da donatori sani.

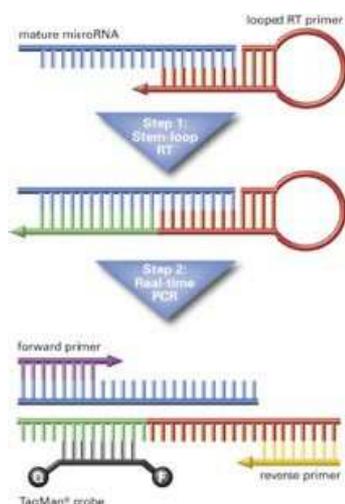
In questo esperimento è stato utilizzato come riferimento interno di reazione una serie di campioni con percentuale nota di MPLwt e MPLmut. Questi campioni contenevano quantità variabili da 100% a 0% di allele mutato in DNA wt. Valutando i loro  $\Delta C_t$  sono state create delle curve standard che hanno permesso sia di poter dire per ogni campione se esso presentasse o meno la mutazione che di poter discriminare se i mutati fossero eterozigoti o omozigoti. Le curve standard confermano inoltre l'elevata sensibilità della metodica, che è in grado di segnalare fino a 1 copia di allele mutato su 1000 di wt.

Questa tecnica è stata messa a punto nel nostro laboratorio ed è attualmente coperta da brevetto internazionale ("ANALISI MUTAZIONALE DELLE MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE", PCT/IB2008/055122)). Si tratta inoltre di una metodica specifica, sensibile e riproducibile che oltre a rappresentare un importante test diagnostico ha determinato anche un contenimento dei costi eliminando la necessità del sequenziamento.

#### *Analisi del profilo di espressione dei geni miRNA*

La metodica utilizzata differisce da una Taqman convenzionale sotto alcuni aspetti, in quanto il Taqman® MicroRna Assay Human Panel Early Access Kit (Applied Biosystems) consente di analizzare l'espressione di 157 geni miRNA umani e prevede 2 steps:

1. Step di retrotrascrizione in cui l'RNA viene retrotrascritto a cDNA utilizzando un looped-primer specifico per i micro RNA.
2. Step di PCR in cui il cDNA viene amplificato utilizzando i primers contenuti nel kit. La sonda è marcata in 5' con il FAM, mentre in 3' è presente un quencher non fluorescente al quale è legato un minor groove binder (MGB), modifica in grado di incrementa la  $T_m$  senza aumentare la lunghezza del probe.



**Figura 31.**

Step 1: la RT master mix viene preparata con i reagenti contenuti nell'High-Capacity cDNA archive Kit; 15  $\mu\text{L}$  di RT-mix contengono 5  $\mu\text{L}$  di campione, 3  $\mu\text{L}$  di primers, 7  $\mu\text{L}$  di master mix:

Component	MasterMix Volume/15- $\mu\text{L}$ Reaction <sup>†</sup>
100mM dNTPs (with dTTP)	0.15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50U/ $\mu\text{L}$ §	1.00
<b>10X Reverse Transcription Buffer</b>	1.50
RNase Inhibitor, 20U/ $\mu\text{L}$ ††	0.188
Nuclease-free water	4.162
Total	7.00

**Tabella 10.**

Step 2: Il volume di reazione raccomandato è 20  $\mu\text{L}$  per pozzetto ed è composto da 10  $\mu\text{L}$  di Taqman 2x Universal Pcr Master Mix (no AmpErase UNG), 6.67  $\mu\text{L}$  di acqua da PCR, 2  $\mu\text{L}$  di TaqMan MicroRNA Assay Mix (10x), 1.33  $\mu\text{L}$  del prodotto di reazione della RT.

I dati sono stati analizzati utilizzando il metodo comparativo per  $C_T$  in base al quale è possibile normalizzare i livelli di espressione del gene di interesse con il controllo interno che per i micro-RNA è rappresentato dall'assay hsa-let-7a. Ogni piastra inoltre contiene un duplicato dell'assay hsa-miR-16 gene che risulta essere molto espresso in numerosi tessuti umani e linee cellulari, e 4 miRNA come controlli negativi.

### Taqman di conferma sui singoli miRNA:

La conferma dei singoli miRNA è stata fatta utilizzando i rispettivi Taqman® MicroRNA Human Assay, anche questi prevedono uno step di retrotrascrizione utilizzando il looped-primer e uno step di PCR utilizzando i primers specifici per il singolo miRNA.

Step 1: la RT master mix presenta la stessa composizione del precedente kit.

Step 2: il volume di reazione raccomandato è di 20 µL per pozzetto ed è composto da 10 µL di Taqman 2x Universal Pcr Master Mix (no AmpErase UNG), 7.67 µL di acqua da PCR, 1 µL di TaqMan MicroRNA Assay (20x), 1.33 µL del prodotto di reazione della RT.

I dati sono stati analizzati utilizzando il metodo comparativo per  $C_T$  in base al quale è possibile normalizzare i livelli di espressione del gene di interesse con il controllo interno che per i micro-RNA è rappresentato dall'assay hsa-miR-16.

### *Metodica di Trasfezione*

#### Trasfezione pre-mir-16:

La trasfezione di cellule CD34+ è stata effettuata mediante elettroporazione con Nucleofector II (Amaxa). Sono state trasfettate circa  $5 \cdot 10^5$  cellule con il pre-mir-16 (Pre-miR™ miRNA Precursor Molecule, Ambion) e con un mirNA di controllo (Pre-miR™ miRNA Precursor Negative Controls, Ambion). Come controllo negativo inoltre sono state trasfettate cellule in assenza di costrutto ectopico (mock). Le cellule sono state risospese nel buffer di trasfezione (Human CD34 Nucleofector Kit, Amaxa) e trasfettate utilizzando il settaggio specifico consigliato dalla ditta produttrice (programma U-001). L'efficienza di trasfezione è stata valutata dopo 24 ore di coltura mediante analisi dei livelli di mir-16 con PCR real-time.

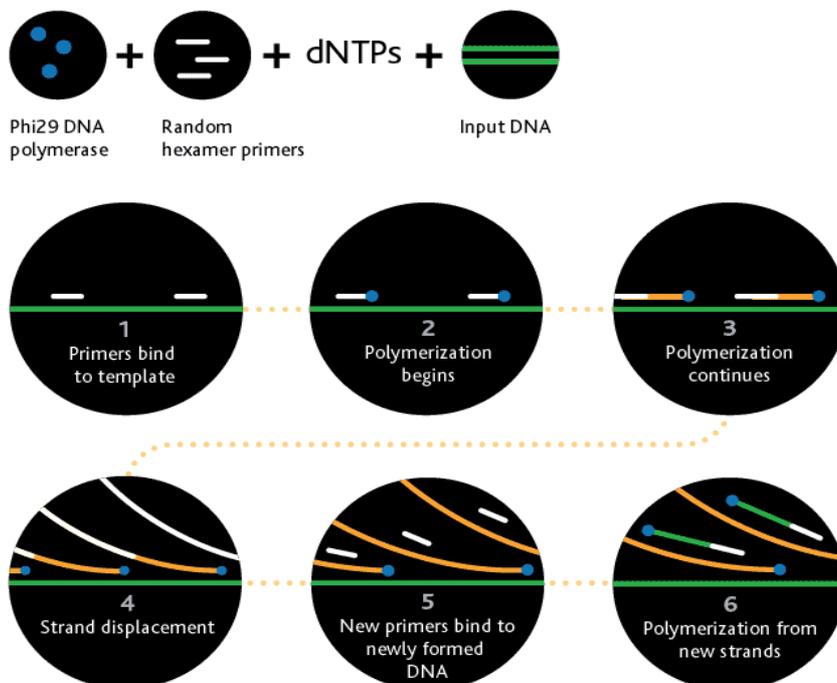
#### Trasfezione SiRNA:

La trasfezione di cellule CD34+ è stata effettuata mediante elettroporazione con Nucleofector II (Amaxa). Sono state trasfettate circa  $2.5 \cdot 10^5$  cellule con SiRNA anti mir-16-1 e anti mir 16-2 GFP positivi (miRCURY LNA™ microRNA Knockdown Probes, Exiqon); come controllo è stato utilizzato anche un costrutto "Scramble" (miRCURY LNA™ microRNA Knockdown Probes, Exiqon), anch'esso marcato con la GFP. Come controllo negativo inoltre sono state trasfettate cellule in assenza di costrutto ectopico (mock). Le cellule sono state risospese nel buffer consigliato (Human CD34 Nucleofector Kit, Amaxa)

e trasfettate utilizzando il settaggio specifico indicato dalla ditta produttrice (programma U-001). L'efficienza di trasfezione è stata valutata dopo 24 ore di coltura mediante analisi dei livelli di mir-16 con PCR real-time e mediante citofluorimetria.

## WHOLE GENOME AMPLIFICATION

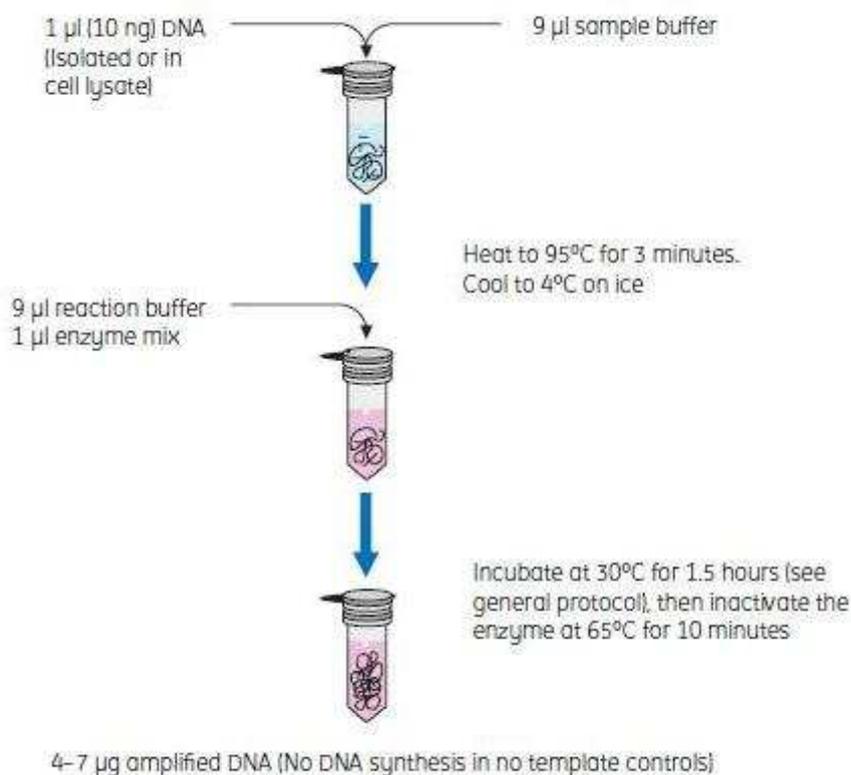
Per alcuni dei soggetti indagati la quantità di DNA estratto non risultava sufficiente per eseguire il numero di analisi molecolari previste, pertanto si è deciso di amplificare il DNA genomico utilizzando il *GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences)*. Il Kit utilizza la DNA polimerasi del batteriofago Phi29, un enzima con un'elevata processività che amplifica il materiale di partenza di circa mille volte, mediante l'utilizzo di dNTPs e random primers. La reazione di amplificazione permette di ottenere diversi microgrammi di DNA (~ 10µg) ad alto peso molecolare (10-50Kb), partendo da pochi nanogrammi (~ 10ng). Il DNA che si ottiene è una copia rappresentativa di tutto il campione di partenza. (Figura 32)



**Figura 32:** procedura seguita dal GenomPhi V2 DNA Amplification Kit

Dopo aver aggiunto 9  $\mu$ l di sample buffer a 10 ng di DNA diluiti in un volume di 1  $\mu$ l, i campioni sono stati incubati a 95° C per 3 minuti al fine di garantirne il processo di denaturazione. Subito dopo averli riposti in ghiaccio, sono stati aggiunti ad ogni campione 10  $\mu$ l di Master Mix ( 9  $\mu$ l reaction Buffer + 1  $\mu$ l di enzima) e incubati prima a 30 °C per 90 min (per permettere la reazione di amplificazione) e successivamente a 65°C per 10 min necessari per l'inattivazione dell'attività esonucleasica dell'enzima (che potrebbe altresì degradare i prodotti di amplificazione) (Figura 33).

I prodotti di amplificazione vengono successivamente conservati a -20°C.



**Figura 33.** schematica rappresentazione del protocollo del Genomiphi V2 DNA Amplification Kit

Il DNA così amplificato è stato in seguito purificato mediante CLEANUP, efficace metodo di rimozione di contaminanti di reazione (primers, dNTPs, sali) per ultrafiltrazione .Il protocollo di purificazione seguito (Montage PCR 96 Cleanup Kit, Millipore) prevede che il prodotto di amplificazione, posto su una membrana di ultrafiltrazione ,venga messo sotto vuoto fino a completa filtrazione. Dopo aver eliminato tutti i contaminanti, il DNA rimasto adeso alla membrana viene recuperato mediante aggiunta di un buffer di lavaggio e una breve incubazione di 1-3 minuti (Figura 34).

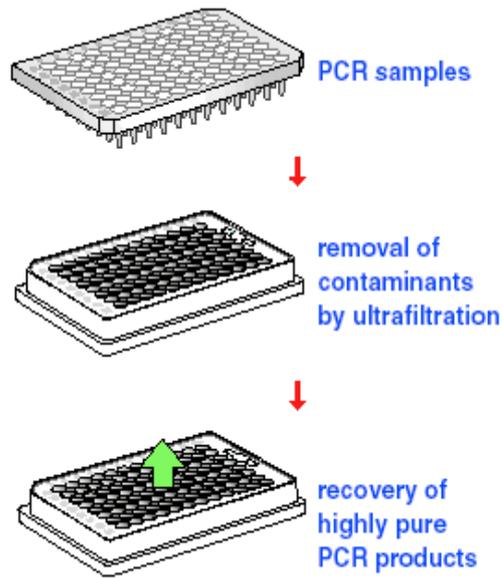


Figura 34. illustrazione del processo di cleanup.

### HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS (HRMA)

L'High Resolution Melting Analysis è una metodica che permette di analizzare la curva di dissociazione di un frammento di DNA a doppio filamento grazie all'utilizzo di intercalanti fluorescenti il cui spettro di assorbimento ed emissione varia quando essi sono legati al DNA rispetto all'intercalante libero (Figure 35 e 36).

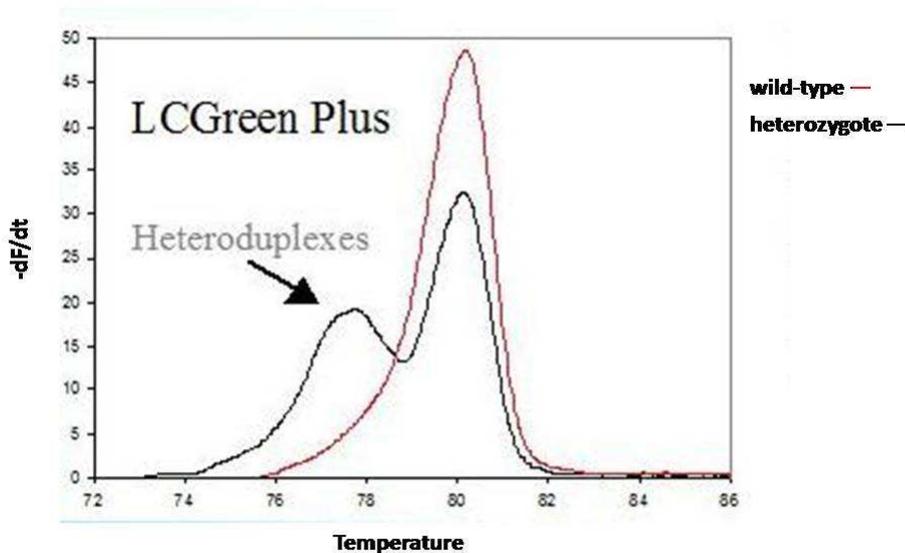
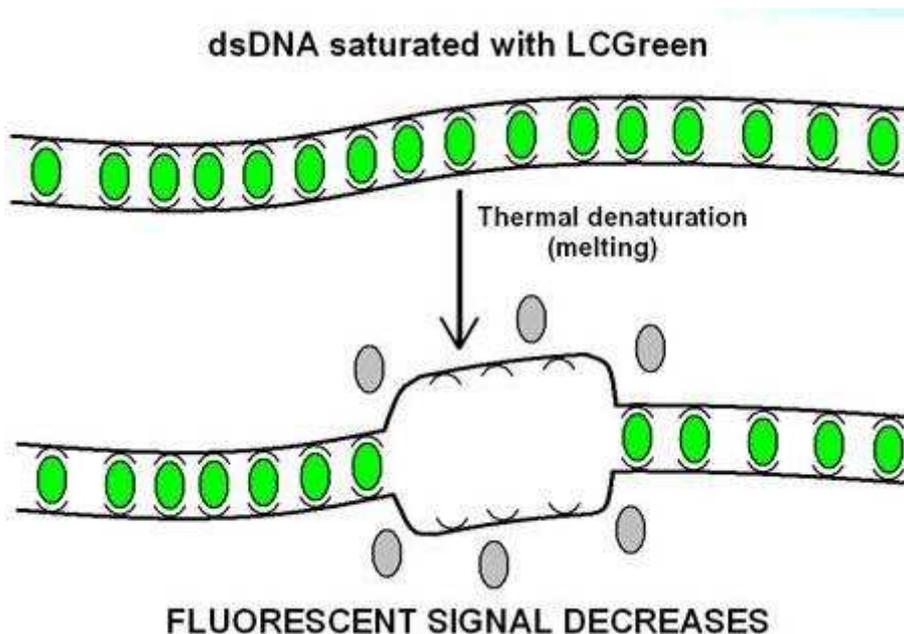


Figura 35. L'immagine mette in evidenza come LCGreen Plus rileva gli eteroduplex



**Figura 36.** La denaturazione del dna comporta la diminuzione della fluorescenza.

L'intercalante utilizzato, LC Green Plus( Labogen), viene incorporato nel dsDNA di nuova sintesi durante l'amplificazione mediante Real Time PCR eseguita utilizzando lo strumento Rotor-Gene Q (Corbett Life Science).

Per ogni campione si utilizzano 20 ng di DNA precedentemente amplificato mediante WGA. La Tabella IV e la Tabella V riportano rispettivamente la composizione della miscela di reagenti utilizzata per la procedura di amplificazione e la cinetica di reazione.

BUFFER TITANIUM	1 $\mu$ L
TAQ TITANIUM	0.04 $\mu$ L
dNTPs	0.25 $\mu$ L
PRIMER FORWARD	0.2 $\mu$ L
PRIMER REVERSE	0.2 $\mu$ L
LC GREEN PLUS	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	5.31 $\mu$ L
CAMPIONE (DNA)	2 $\mu$ L

**Tabella 11:** mix per la reazione di amplificazione

STEP	TIME	TEMP.
Hold 1	5 min	95° C
Cycling		
denaturation	15 sec	95° C
annealing	30 sec	55° C
extension	30 sec	72° C
Hold 2	5 min	72° C
Hold 3	5 sec	95° C
Hold 4	30 sec	50° C
HRM	Ramp from 70 degrees to 95 degrees	
	Rising by 0.2 degrees each step	
	Wait for 90 sec of pre-melt conditioning on first step	
	Wait for 1 sec for each step afterwards	

**Tabella 12:** cinetica di reazione

Durante la fase di HRM l'intercalante LC Green viene eccitato con una luce laser a lunghezza d'onda di 500 nm. La fluorescenza emessa dal campione viene rilevata a 530 nm ad intervalli di tempo molto ravvicinati durante la denaturazione del DNA. Quando il DNA si denatura la fluorescenza emessa dall' LC Green diminuisce progressivamente originando una curva sigmoide nel grafico della variazione di fluorescenza in rapporto alla variazione di temperatura.

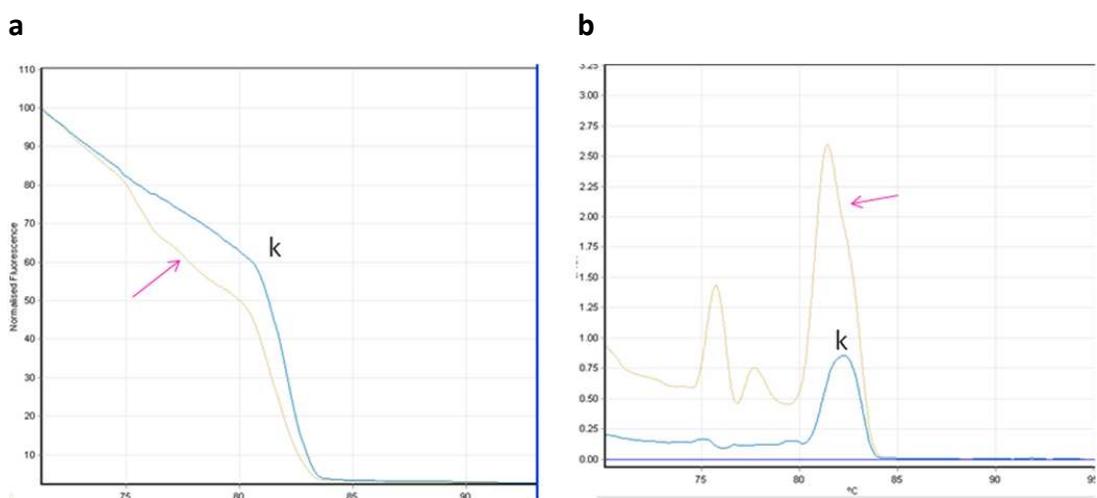
Questa curva presenta almeno un punto di flesso che corrisponde alla temperatura di dissociazione (melting) dell'amplicone. L'andamento della curva e la temperatura di melting sono determinate dalla lunghezza dell'amplicone e dalla sua sequenza nucleotidica. Due ampliconi che differiscano anche di una sola base originano profili di melting diversi e questo permette di discriminarli. Una fase iniziale di completa denaturazione del DNA è seguita da uno step a bassa temperatura che favorisce la rinaturazione con formazione di eteroduplex. Gli eteroduplex si hanno in caso di eterozigosi per la mutazione analizzata quando il filamento che contiene la mutazione si appaia a quello che non lo contiene. L'appaiamento presenta quindi un mismatch e

questo determina una variazione della temperatura di melting dell'eteroduplex rispetto all'omoduplex (due filamenti perfettamente complementari, siano essi portatori o meno della mutazione).

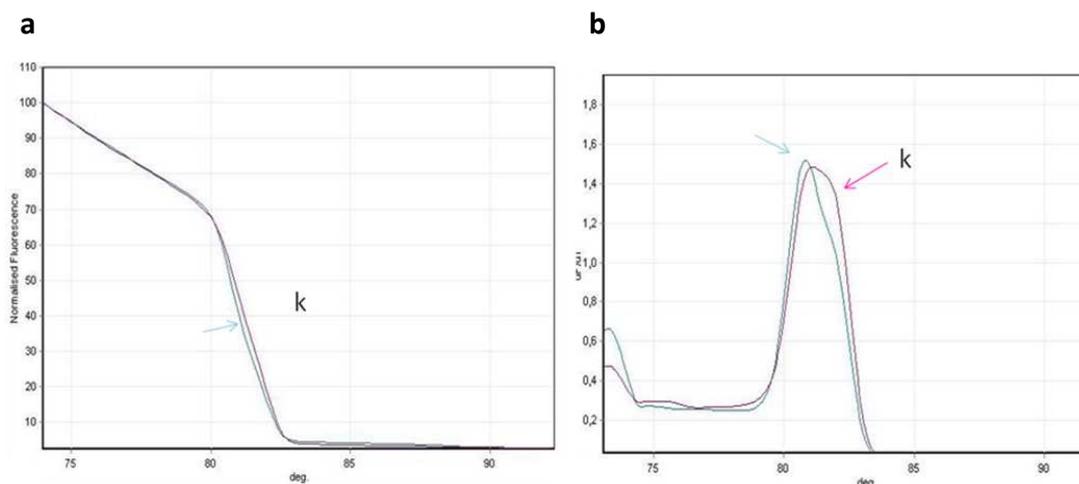
Successivamente i campioni che hanno originato una curva con un unico dominio di melting, cioè i campioni omozigoti per un'eventuale mutazione o per la sua assenza, sono stati analizzati in una seconda HRM seguendo lo stesso protocollo. Ogni campione è stato amplificato e analizzato in doppio: una provetta conteneva 100% DNA del paziente in esame e l'altra conteneva 90% DNA del paziente in esame e 10% di un DNA di controllo che era noto essere negativo per ogni mutazione come confermato dalla sequenza.

In questo modo è possibile evidenziare i pazienti mutati in omozigosi [-/-] in quanto il loro DNA miscelato con DNA NON mutato da' luogo, durante la fase di denaturazione e rinaturazione, agli eteroduplex e origina quindi una curva di melting sovrapponibile a quella dei DNA eterozigoti.

Dalle figure sottostanti (Figura 37 e Figura 38) è possibile notare come due ampliconi che differiscono anche di una sola base originino profili di melting diversi.



**Figura 37.** mostra la curva di HRM (a) e il profilo di melting (b) di un soggetto mutato in eterozigosi.



**Figura 38.** mostra la curva di HRM (a) e il profilo di melting (b) di un soggetto mutato in omozigosi.

Per validare la specificità della metodica i campioni, il cui profilo di melting risultava diverso da quello dei controlli sani, sono stati sottoposti a SEQUENZIAMENTO, che ha confermato il genotipo assegnato tramite HRM.

A tale scopo sono state eseguite reazioni di PCR CONVENZIONALE utilizzando coppie di primers specifici per gli esoni che, utilizzati in HRM, hanno dato curve di HRM anomale. La Tabella 13 e la Tabella 14 riportano in dettaglio rispettivamente la composizione della miscela di reagenti utilizzata per la procedura di amplificazione e la cinetica utilizzata per l' amplificazione.

Componenti di reazione	Volume ( $\mu$ L) per campione
Buffer PCR 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
dNTPs	0.5
DNA + H <sub>2</sub> O	10
Taq Gold	0.25

**Tabella 13:** mix finale per PCR convenzionale

STEP	Attivazione della Taq	Cicli (35 cicli)		Estensione
		Denaturazione	T° Annealing	
Temperatura	95°C	95°C	50-65°C	72°C
Tempo	13 min	30 sec	30 sec	30 sec

**Tabella 14:** Cinetica di esecuzione della PCR.

La reazione è stata eseguita nello strumento Applied Biosystems 2770. Il DNA così amplificato è stato separato in gel di agarosio all'1% e successivamente analizzato mediante Kodak 1 DLE 3.6 .

*Screening mutazione per il gene EZH2:*

Exon	Forward primer	Reverse primer	Product length (bp)
2	GGTGATCATATTCAGGCTGG	AAACTTATTGAACTTAGGAGGGG	257
3	TTTCTCCTTTCCTCTCCTTCA	TCCAATAGCATAAACCAAAAGATG	251
4	GGCTACAGCTTAAGGTTGTCTT	CTGTCTTGATTACCTTGACAAT	270
5	AAATCTGGAGAAGTGGGTAAGAC	TCATGCCCTATATGCTTCATAAAC	316
6	AGGCTATGCCTGTTTTGTCC	AAAAGAGAAAGAAGAACTAAGCCC	332
7	CTGACTGGCATTCCACAGAC	AAGTGTAGTGGCTCATCCGC	380
8	CATCAAAAGTAACACATGGAAACC	TTGTAATAAATGATAGCACTCTCCAAG	348
9	TCCATTAATTGACTTTTTCCAGTG	ACCTCCACCAAAGTGCAAAG	246
10	TTCTCTCCATCAAAATGAGTTTTAG	TCCTCACAACACGAACCTTTCAC	360
11	GAGTTGCTCATCTTTTCGC	CCAAGAATTTTCTTTGTTGGAC	362
12	AAGAATGGTTTGCCTAAATAAGAC	CCTTGCCTGCAGTGTCTATC	212
13	TCTTGGCTTTAACGCATTCC	CAAATTGGTTTAAACATACAGAAGGC	289
14	TGATCGTTTCCATCTCCCTG	AGGGAGTGCTCCCATGTTC	278
15	GAGAGTCAGTGAGATGCCAG	TTTGCCCCAGCTAAATCATC	371
16	TTTTTGATGATGTGATTGTGTTTT	TGGCAATTCATTTCCAATCA	239
17	TTCTGTCAGGCTTGATCACC	CTCGTTTCTGAACACTCGGC	220
18	AGGCAAACCCTGAAGAACTG	TTCCAATTCTCACGTCAAAGGTA	217
19	CCGTCTTCATGCTCACTGAC	AAAAACCCTCCTTTGTCCAGA	204
20	CTCAGCAGGCTTTGTTGTG	GGGGAGGAGGTAGCAGATG	163

**Tabella 15:** Sequenze dei primer utilizzati per l'analisi in HRM e per il sequenziamento del gene EZH2

*Screening mutazionale dei geni IDH1 e IDH2:*

Primers per il sequenziamento del gene IDH1 (residui aminoacidici 41–138):

Forward 5'-TGTGTTGAGATGGACGCCTA-3'

Reverse 5'-GGTGTACTCAGAGCCTTCGC-3'.

Primers per il sequenziamento del gene IDH1 (residui aminoacidici 125–226):

Forward 5'-CTGCCTCTTTGTGGCCTAAG-3'

Reverse 5'-ATTCTGGTTGAAAGATGGCG-3'.

Il sequenziamento diretto dell'esone 4 è stato eseguito utilizzando i seguenti primers:

per l'IDH1:

Forward 5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3'

Reverse 5'-CACATTATTGCCAACATGAC-3'

per l'IDH2:

Forward 5'-CCACTATTATCTCTGTCCTC-3'

Reverse 5'-GCTAGGCGAGGAGCTCCAGT-3'

### **ANALISI STATISTICA**

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software SPSS (versione 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL USA). Le variabili continue sono espresse come medie  $\pm$  deviazione standard, le variabili categoriche come numeri o percentuali. Il confronto tra variabili continue è stato effettuato mediante il test t per variabili appaiate con numerosità dissimile, mentre il confronto tra variabili categoriche è stato effettuato mediante Chiquadrato o Fisher exact-test. L'analisi del tempo di sopravvivenza nei diversi gruppi di pazienti è stata condotta con il metodo di Kaplan-Meier e le differenze tra i gruppi sono state valutate con il log-rank test. La sopravvivenza globale è stata calcolata dalla data di diagnosi a quella di decesso o dell'ultimo follow-up. Le analisi sono state stratificate per i fattori prognostici ritenuti attualmente validi. Variabili clinico-patologiche, come il sesso, l'età, la splenomegalia, gli eventi trombotici e/o emorragici, la progressione in leucemia cuta sono state correlate alla sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier. Le correlazioni tra le diverse variabili (conta leucocitaria, emoglobina (Hb), conta piastrinica, percentuale di bkasti nel sangue periferico, conta CD34+ nel sangue periferico, livelli di LDH) sono state valutate con il test esatto di Fisher. Le analisi univariate e multivariate sono state condotte anche con il modello dei rischi proporzionali di Cox ed il likelihood-ratio test. Sono stati riportati gli intervalli di confidenza del 95% (IC 95%) per la sopravvivenza. I risultati dell'analisi statistica sono stati considerati significativi per  $P < 0.05$ .

La significatività dei livelli di espressione dei mRNA maturi e dei microRNA tra i diversi pool è stata valutata mediante il test ANOVA (ANalysis Of VAriance).

I programmi GraphPad InStat software (GraphPad Software, Inc., San Diego, <http://www.graphpad.com>) o Origin software (version 7.5; Origin Lab, Northampton, MA, <http://www.originlab.com>) sono stati utilizzati per l'interpretazione dei dati .

Bioinformatica:

La ricerca dei geni target per i miRNA differenzialmente espressi è stata svolta utilizzando due motori di ricerca: PICTAR (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) e miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/>).

# RISULTATI

## EFFETTO DELLA MUTAZIONE E DELLA CARICA ALLELICA DI JAK2V617F NELLE MIELOFIBROSI PRIMARIA

In numerosi studi è stata sottolineata la rilevanza dello stato mutazionale e della carica allelica della mutazione di JAK2V617F su caratteristiche ematologiche e sulla presentazione clinica nelle NMP. In pazienti con PV e TE la carica allelica è stata trovata essere positivamente associata ad elevati livelli di emoglobina, leucociti ed inversamente correlata con la conta piastrinica; inoltre è stato osservato che più alta era la carica allelica e più elevato era il rischio di presentare prurito acquagenico, di sviluppare splenomegalia, di soffrire di eventi cardiovascolari maggiori e di richiedere terapia citotossica (Vannucchi et al. Leukemia 2008). Al contrario in letteratura le informazioni relative a pazienti affetti da MF erano limitate a pochi studi che generalmente includono pazienti genotipizzati a tempi variabili dalla diagnosi e utilizzando metodiche semiquantitative o quantitative diverse (Cambell et al. Blood 2006; Barosi et al. Blood 2007; Tefferi et al. BJH 2005, Tefferi et al. Leukemia 2008).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di determinare la presenza di correlazioni tra lo stato mutazionale o la carica allelica di JAK2V617F con aspetti prognostici che includono la sopravvivenza e la trasformazione in leucemia acuta in pazienti affetti da PMF. Abbiamo inoltre determinato se la presenza della mutazione JAK2V617F oppure della sua carica allelica correlava con caratteristiche cliniche quali la splenomegalia, la presenza di sintomi costituzionali o prurito e lo score prognostico, e caratteristiche di laboratorio come l'emocromo, la percentuale di blasti nel sangue periferico, la conta di cellule CD34+ ed i livelli di LDH.

Lo studio è stato condotto analizzando lo stato mutazionale di JAK2V617F mediante real-Time PCR in granulociti purificati dal sangue periferico di 186 pazienti con PMF entro 6 mesi dalla diagnosi, in accordo ai criteri proposti dalla WHO del 2008 (Swerdlow 2008).

I risultati dell'analisi molecolare hanno mostrato che il 68.3% dei pazienti era mutato per JAK2V617F con un valore medio di carica allelica del 54% (range 55-100%), come riportato nella tabella 16.

Feature	JAK2 WT	JAK2 V617F	P
No.	59	127	
Median age, y (range)	57 (21-88)	62 (21-90)	.47
Median follow-up, mo (range)	27 (1-185)	29 (1-237)	.72
Females, no. (%)	18 (30.5)	51 (40.1)	.23
Median white blood cell count, $\times 10^9/L$ (range)	7.70 (1.9-90.78)	10.10 (3.01-16.15)	.009*
Median hemoglobin, g/L (range)	106 (46-190)	128.5 (54-180)	<.001*
Median platelets, $\times 10^9/L$ (range)	251 (8.0-1488)	386 (42-2011)	.02*
Blast $>1$ , no. (%)	16 (30.5)	38 (29.9)	.89
Median LDH, U/L (range)	704 (197-2970)	718 (120-2981)	.96
Median CD34 <sup>+</sup> cell, % (range)	0.25 (0.0-6.6)	0.19 (0-34)	.65
Median CD34 <sup>+</sup> cell, $\times 10^9/L$ (range)	18.84 (0.0-3417)	22 (0.3-800)	.77
Median JAK2V617F allele burden (range)	—	54 (5-100)	—
Splenomegaly $>15$ cm from LCM, no. (%)	11 (18.6)	26 (19.7)	.89
Constitutional symptoms, no. (%)	15 (25.4)	38 (29.9)	.15
Leukemia transformation, no. (%)	6 (10.1%)	9 (7.1)	.45
Deaths, no. (%)	8 (13.5)	15 (11.8)	.64
Lille score, no. (%)			
0	22 (37.2)	80 (63.0)	.017*
1	26 (44.0)	38 (30.0)	
2	11 (18.8)	9 (7.0)	
IWG-MRT score, no. (%)			
low	18 (30.5)	47 (37.0)	.60
Intermediate-1	15 (25.5)	32 (25.2)	
Intermediate-2	16 (27.1)	20 (15.7)	
High	10 (16.9)	28 (22.1)	

— indicates not applicable; and IWG-MRT, International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment.  
\*Statistically significant difference.

**Tabella 16.** Caratteristiche cliniche ed ematologiche alla diagnosi in pazienti con PMF in accordo allo stato mutazionale per JAK2V617F.

La distribuzione dei pazienti mutati in accordo alla carica allelica di JAK2V617F, mostrata nella tabella 17, corrisponde ad una frequenza pari al 13.0% nel primo quartile, 33.8% nel secondo, 24.4% nel terzo e 28.3% nel quarto.

Feature	JAK2V617F allele burden (%)				P
	1-25	26-50	51-75	76-100	
No.	17	43	31	36	
Median age, y (range)	58 (38-90)	63 (28-90)	65 (28-77)	60.31 (21-86)	.72
Median follow-up, mo (range)	16 (1-46)	24 (1-84)	26 (3-101)	45 (1-237)	<.001*
Females, no. (%)	4 (23.5)	21 (48.8)	12 (38.7)	14 (38.9)	.40
Median JAK2 V617F allele burden (range)	15.5 (5-25)	41 (27-50)	66 (52-75)	90.5 (77-100)	—
Median white blood cell count, $\times 10^9/L$ (range)	10.26 (3.01-26.85)	9.47 (3.73-106.15)	9.40 (3.70-40.0)	13.40 (3.40-40.60)	.03*
Median hemoglobin, g/L (range)	128 (54-173)	122 (61-175)	134 (70-171)	136 (56-180)	.05*
Median platelets, $\times 10^9/L$ (range)	380.5 (45-1392)	386 (49-1089)	410 (42-1088)	379 (75-2011)	.95
Median LDH, U/L (range)	712 (193-2981)	745 (162-2497)	600 (120-1958)	700 (225-2166)	.83
Blast $\geq 1$ , no. (%)	10 (58.8)	9 (33.3)	7 (35)	12 (50)	.21
Median CD34 <sup>+</sup> cell, % (range)	0.23 (0-3.1)	0.19 (0.01-34)	0.09 (0.02-3.43)	0.25 (0.02-1.32)	.98
Median CD34 <sup>+</sup> cell, $\times 10^9/L$ (range)	22.8 (1.4-244)	17.54 (0.26-800)	7.06 (2.72-476)	43.0 (3.0-130.0)	.93
Splenomegaly $>15$ cm from LCM, no. (%)	1 (5.8)	7 (16.2)	8 (25.8)	9 (25.0)	.003*
Constitutional symptoms, %	4 (23.5)	11 (25.6)	6 (19.3)	17 (47.2)	.04*
Leukemia transformation, no. (%)	0	4 (9.3)	2 (6.4)	3 (8.3)	.09
Deaths, no. (%)	6 (35.3)	7 (16.3)	1 (3.2)	1 (2.8)	.007*

— indicates not applicable; and LCM, left costal margin.  
\*Statistically significant difference.

**Tabella 17.** Caratteristiche cliniche ed ematologiche alla diagnosi in pazienti con PMF in accordo alla carica allelica di JAK2V617F.

A contrario non abbiamo trovato correlazioni statisticamente significative tra lo stato mutazione o la carica allelica e l'età o il sesso. 94 pazienti presentavano alla diagnosi l'informazione relativa all'analisi citogenetica; l'81.9% dei pazienti valutabili presentavano un cariotipo favorevole mentre il restante 18.1% presentava anomalie citogenetiche sfavorevoli (Hussein, Huang et al. 2009; Tam, Abruzzo et al. 2009).

JAK2V617F allele burden, percentage	Patients with cytogenetic information available		Cytogenetic categories	
	No.	Percentage of total	Favorable, no. (%)	Unfavorable, no. (%)
0	26	44.0	20 (76.9)	6 (23.0)
1-25	8	47.0	7 (87.5)	1 (12.5)
26-50	17	39.5	15 (88.2)	2 (11.7)
51-75	17	54.8	12 (70.5)	5 (29.4)
76-100	26	72.2	23 (88.4)	3 (11.5)
Total	94	50.5	77 (81.9)	17 (18.1)

Favorable cytogenetic category included sole deletion of 13q or 20q or trisomy 9, and a normal karyotype; unfavorable cytogenetic category included abnormalities of chromosome 5 and/or 7 and complex cytogenetics.

**Tabella 18.** Anomalie citogenetiche in pazienti con PMF in accordo alla carica allelica di JAK2V617F

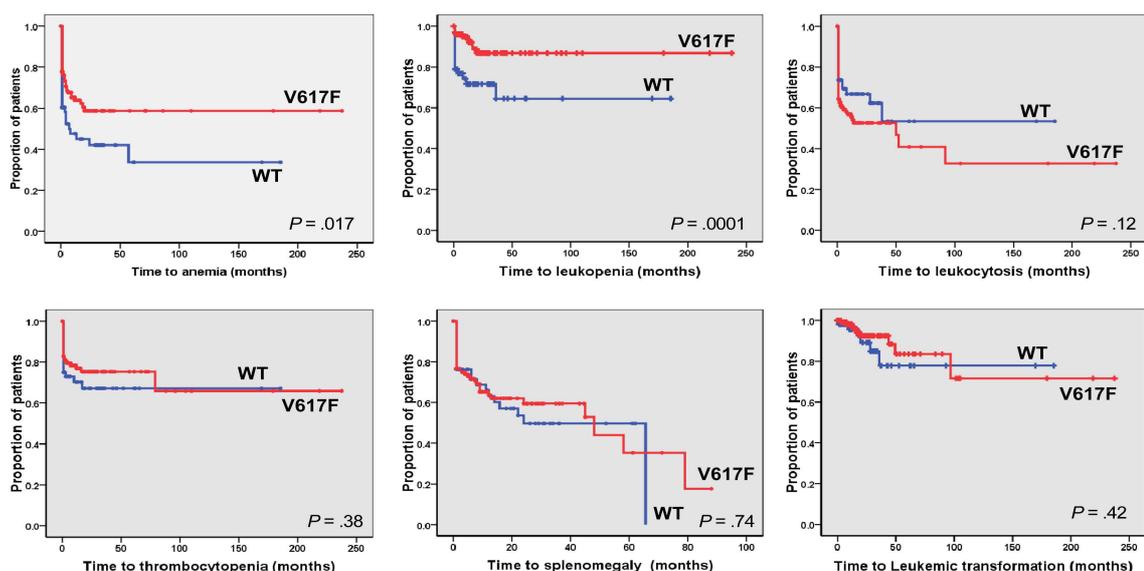
Dall'analisi dell'associazione tra il genotipo mutato per JAK2 e le caratteristiche cliniche ed ematologiche è emerso che i pazienti mutati presentavano significativi elevati livelli di emoglobina ( $p < .001$ ), di leucociti ( $p = .009$ ) e di piastrine ( $p = .02$ ) rispetto ai pazienti WT per la mutazione (come mostrato nella tabella 1X). Di conseguenza la proporzione di pazienti anemici ( $Hb < 10g/dL$ ) era significativamente più bassa nei pazienti mutati rispetto ai WT (22% vs 44%;  $p = .03$ ). Considerando le diverse categorie di pazienti in dipendenza della carica allelica abbiamo osservato una associazione statisticamente significativa con la leucocitosi ( $p = .03$ ) ed un trend quasi significativo per elevati livelli di emoglobina ( $p = .05$ ). Al contrario non abbiamo osservato un effetto del genotipo mutato o della carica allelica su altri parametri ematologici, incluso la percentuale di blasti nel sangue periferico, livelli di LDH e la conta delle cellule CD34+ circolanti.

I pazienti mutati per JAK2 non differivano dai WT per quanto riguarda la splenomegalia e la presenza di sintomi costituzionali. Considerando invece i soli pazienti mutati abbiamo osservato un aumento significativo della frequenza di splenomegalia e sintomi costituzionali in relazione alla carica allelica ( $p = .003$  e  $p = .04$  rispettivamente, come mostrato nella tabella 17).

Al fine di analizzare se lo stato mutazionale di JAK2V617F correlava con il sistema di score prognostico, abbiamo valutato la distribuzione di pazienti in differenti categorie di rischio utilizzando sia lo score prognostico di Dupriez (Dupriez et al. Blood 1996) che il più recente

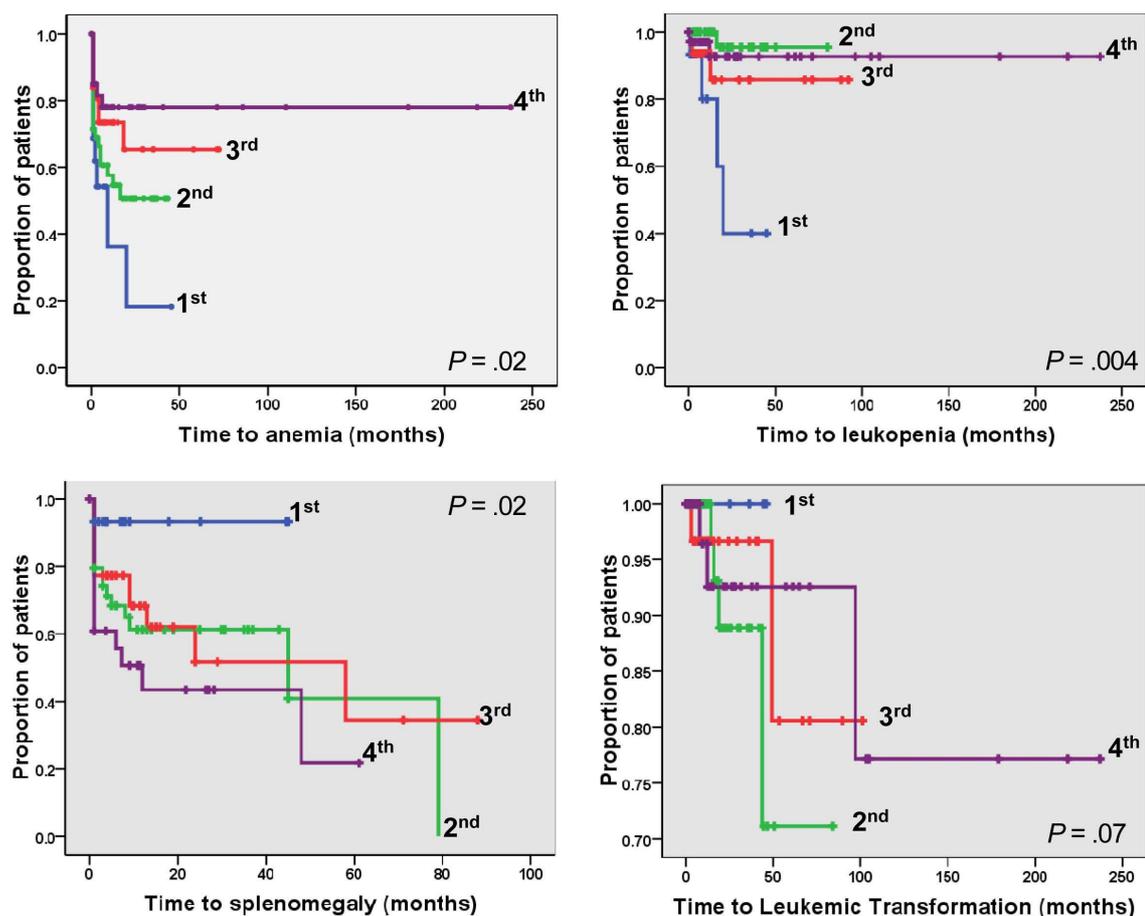
IPSS proposto dall'IWG-MRT (Cervantes et al. Blood 2009). A causa del ridotto numero di pazienti inclusi nei quartili abbiamo utilizzato differenti sottogruppi di analisi. Dall'analisi è emerso che il numero di pazienti JAK2 mutati nella categoria di rischio bassa secondo il Lille score era significativamente più alta rispetto ai pazienti non mutati ( $p=.017$ ), probabilmente legato agli elevati livelli di emoglobina nei pazienti mutati. Al contrario la distribuzione dei pazienti nelle 4 categorie di rischio proposte dall'IPSS era indipendente dalla presenza della mutazione JAK2V617F.

Al fine di valutare l'impatto della mutazione JAK2V617F o della sua carica allelica su parametri associati alla progressione di malattia abbiamo calcolato il tempo necessario all'insorgenza di un evento clinico od ematologico dalla diagnosi includendo: l'insorgenza di anemia (definita come livelli di Hb < 10 g/dL), leucopenia (definita come una conta leucocitaria <  $4 \times 10^9/L$ ) o leucocitosi (definita come una conta leucocitaria >  $25 \times 10^9/L$ ), trombocitopenia (definita come una conta piastrinica <  $100 \times 10^9/L$ ), lo sviluppo di splenomegalia massiva (definita come un aumento delle dimensioni spleniche <15cm dall'arcata costale in pazienti che presentavano una modesta splenomegalia alla diagnosi), e l'evoluzione in leucemia acuta. Confrontando i pazienti mutati con quelli WT abbiamo osservato che il tempo di insorgenza dell'anemia e della leucopenia era significativamente più lungo nei pazienti che presentavano la mutazione. ( $p=.017$  e  $p=.0001$  rispettivamente), mentre non sono state osservate correlazioni con gli altri parametri, come mostrato nella figura 38.



**Figura 38.** Analisi di Kaplan-Meier sul tempo di insorgenza di eventi clinici ed ematologici in pazienti con PMF in accordo allo stato mutazione di JAK2V617F.

Il rischio relativo (RR) associato allo stato non mutato era 1.64 ( intervallo di confidenza (CI) del 95%: 1.04-2.58) per l'anemia e 3.43 (CI 95%: 1.59-7.41) per la leucopenia. In particolare abbiamo osservato che la mutazione di JAK2V617F non rappresentava un fattore di rischio per la trasformazione leucemica. Considerando invece i soli pazienti mutati abbiamo osservato che quelli inclusi nel primo quartile sviluppavano più rapidamente anemia ( $p=.02$ ) e leucopenia ( $p=.004$ ); il corrispondente RR era 2.11 (CI 95%: 1.1-4.43) per l'anemia e 6.84 (CI 95%: 1.9-24.59) per la leucopenia. Abbiamo inoltre osservato che i pazienti inclusi nell'ultimo quartile presentavano una rapida insorgenza di splenomegalia massiva dalla diagnosi rispetto ai quartili più bassi ( $p=.02$ ). Al contrario non abbiamo trovato alcuna correlazione tra i diversi quartili e il tempo di progressione verso una leucemia acuta, come mostrato in figura 39) . Di particolare interesse è risultata l'osservazione che nessuno dei pazienti inclusi nel primo quartile evolveva in leucemia acuta.



**Figura 39.** Analisi di Kaplan-Meier sul tempo di insorgenza di eventi clinici ed ematologici in pazienti con PMF in accordo alla carica allelica di JAK2V617F.

Dopo una mediana di follow-up di 17.2 mesi, 23 pazienti della nostra casistica sono deceduti, pari al 13.5% e 11.8% tra soggetti mutati o WT per JAK2 ( $p=.64$ ); di cui il 10.1% e il 7.1% rispettivamente di leucemia acuta ( $p=.078$ ). La sopravvivenza era quindi simile tra le due popolazioni di pazienti. (fig 40A). Stratificando i pazienti in base alla carica allelica abbiamo però osservato una differenza per quanto riguarda la sopravvivenza, che risultava essere significativamente più breve nel primo quartile rispetto ai quartili superiori ( $p=.001$ , figura 40B), così come nei confronti dei pazienti WT ( $p=.006$ , figura 40A). La percentuale di pazienti deceduti nel primo quartile era del 35.3% confrontata con il 16.3%, il 3.2% ed il 2.8% rispettivamente dei quartili superiori ( $p=.007$ , tabella 17). Di interesse è emerso che la sepsi e l'insufficienza multiorgano erano tra le principali cause di decesso dei pazienti del primo quartile, mentre non abbiamo osservato casi di evoluzione in leucemia acuta.

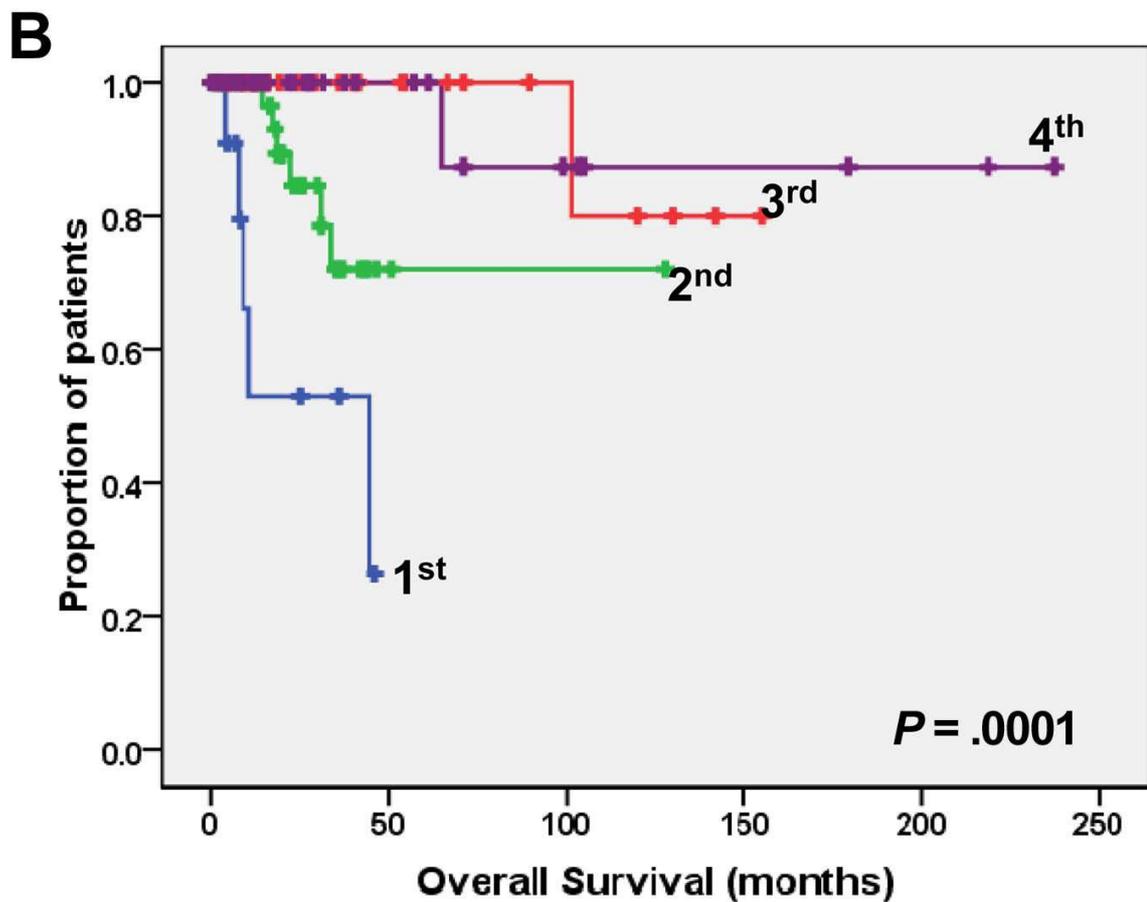
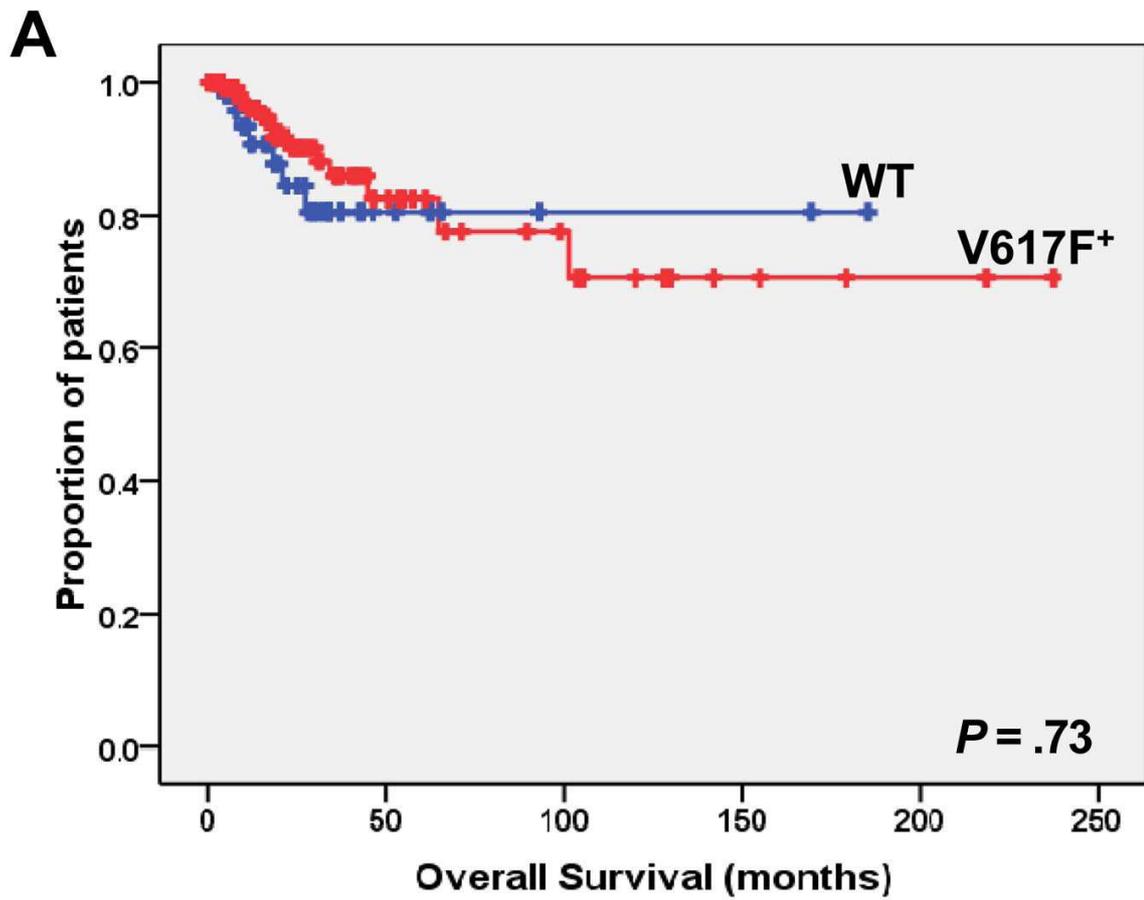


Figura 40. Analisi di Kaplan-Meier della sopravvivenza globale in pazienti con PMF.

Come riportato nella Tabella 18 non abbiamo osservato una preferenza significativa nel gruppo di pazienti con anomalie citogenetiche sfavorevoli in nessuna delle differenti categorie di carica allelica. ( $p=.073$ ,  $\chi^2$  test for trend)

Tra le variabili che abbiamo trovato essere associate alla sopravvivenza sia in nell'analisi univariata che multivariata da annoverare : l'età, la conta dei blasti nel sangue periferico ed una carica allelica di JAK2V617F inferiore al 25%, come illustrato nella tabella 19

Variable	HR (95% CI)	P
<b>Univariate</b>		
Age	1.12 (1.07-1.18)	< .001
Female sex	7.58 (1.76-32.63)	.007
Hemoglobin level	0.77 (0.66-0.89)	.001
Leukocyte count	1.04 (1.02-1.05)	< .001
PB blasts > 1%	1.30 (1.16-1.45)	< .001
Splenomegaly (> 15 cm LCM)	2.41 (1.09-5.29)	.028
V617F burden < 25%	0.09 (0.03-0.32)	< .001
<b>Multivariate</b>		
Age	1.21 (1.08-1.34)	.001
PB blasts > 1%	1.57 (1.13-2.16)	.022
V617F burden < 25%	0.023 (0.002-0.24)	.002

**Tabella 19.** Modello ad hazard proporzionali di Cox di fattori predittivi indipendenti la sopravvivenza globale in pazienti con PMF.

I risultati di questo studio hanno chiaramente dimostrato che, come per i pazienti con PV e TE, anche i pazienti affetti da PMF presentano una associazione significativa tra la presenza della mutazione JAK2V617F e un evidente fenotipo mieloproliferativo; in particolare abbiamo mostrato come lo stato mutazionale influisca sull'insorgenza tardiva di anemia o breve di leucocitosi. Queste osservazioni sono in accordo con i risultati ottenuti sia dal gruppo inglese (Campbell, Griesshammer et al. 2006) che da quello italiano GIMEMA (Barosi, Bergamaschi et al. 2007), a cui abbiamo partecipato attivamente, mentre sono discordanti con quelli presentati dal gruppo americano della Mayo Clinic (Tefferi, Lasho et al. 2005) in cui i livelli di emoglobina non si modificavano significativamente in presenza della mutazione. Abbiamo inoltre osservato che gli "outcome" dello studio, rappresentati dalla sopravvivenza globale e la progressione in leucemia acuta, non sono influenzate dalla presenza della mutazione; questi dati concordano con i risultati del gruppo americano mentre non sono in accordo con quelli del gruppo inglese che riporta un hazard rischio per una breve sopravvivenza del 3.3 (CI 95%: 1.26-8.68) nei pazienti JAK2 mutati, e con quelli del gruppo GIMEMA in cui si mostrava una aumentata frequenza di evoluzioni in leucemia acuta nei pazienti mutati. La

ragione di queste discrepanza non è ovvia e può essere ascrivibile ad una serie di variabili quali differenti caratteristiche dei pazienti arruolati, differenti metodi quantitativi per la determinazione della mutazione di JAK2V617F o l'utilizzo di diverse sorgenti di materiale genomico. Comunque una possibile conclusione del presente studio è che lo stato mutazionale di JAK2 *per se* non riflette in una prognosi peggiore nella PMF.

Inoltre in questo studio abbiamo utilizzato una metodica di PCR quantitativa altamente sensibile al fine di stratificare i pazienti in quartili in base alla carica allelica di JAK2 (Vannucchi et al. Leukemia 2007). L'analisi statistica ha mostrato che i pazienti inclusi nel primo quartile presentano una rapida progressione verso l'anemia e la leucopenia, mentre al contrario impiegano molto tempo per sviluppare una marcata splenomegalia rispetto ai quartili superiori. Di maggior interesse, abbiamo osservato che la sopravvivenza di questi pazienti è significativamente ridotta rispetto agli altri quartili od ai pazienti WT per la mutazione, e che la ridotta sopravvivenza non sembra essere legata ad un aumento del rischio di evoluzione in leucemia acuta ma più frequentemente ad un' aumentata incidenza di infezioni sistemiche. In conclusione possiamo affermare che una bassa carica allelica di JAK2V617F alla diagnosi è preferenzialmente associato con un fenotipo mielodepletivo piuttosto che mieloproliferativo, rappresentando un fattore di rischio indipendente per una ridotta sopravvivenza in questi pazienti. I risultati di questo studio sono stati pubblicati nella rivista Blood (Guglielmelli, Barosi et al. 2009).

EFFETTO DELLA MUTAZIONE E DELLA CARICA ALLELICA DI JAK2V617F NELLA  
MIELOFIBROSI SECONDARIA A POLICITEMIA VERA O TROMBOCITEMIA ESSENZIALE

In letteratura anche le informazioni relative al ruolo di Jak2V617F nei pazienti con MF secondarie è limitata a pochi casi. In un articolo pubblicato su Blood nel 2006 Passamonti et al. dimostra che la carica allelica in una piccola coorte di 16 pazienti affetti da PPV-MF era significativamente più elevata rispetto a pazienti con PMF oppure MF prefibrotica; e che la carica allelica correlava con il numero di cellule CD34+ circolanti nel sangue periferico. Tefferi et al. in un articolo pubblicato sul BJH nel 2005 dimostra invece che i pazienti con PPV-MF erano più frequentemente Jak2V617F mutati rispetto ai pazienti affetti da PTE-MF (91% vs 38.9%) e con una carica allelica superiore al 50% (18% vs 11.1%). Comunque in nessuno di questi studi è stata fatta una correlazione tra il genotipo mutazionale e le caratteristiche cliniche ed ematologiche in questi pazienti.

Al fine quindi di dare una risposta a questo quesito e stabilire un possibile ruolo prognostico della mutazione di Jak2V617F in questa sottopopolazione di pazienti, abbiamo studiato la presenza della mutazione di Jak2V617F e della relativa carica allelica in 65 pazienti affetti da PPV-MF e PTE-MF (Guglielmelli, Barosi et al. 2009) le cui caratteristiche sono riassunte nella tabella 20. 49 pazienti presentavano la mutazione a carico del gene JAK2.

	JAK2 WT	JAK2V617F		JAK2V617F allele burden		
		PPV-MF	PET-MF	1-50%	51-75%	76-100%
Patient N.	16	49		11	14	24
PPV/PET-MF	0/16	4/30	0/6	8/3	13/1	22/2
Age, years, median (range)	62 (33-77)	62 (36-78)	59 (49-70)	52 (36-70)	64 (52-78)	67 (48-77) <sup>2</sup>
Gender, female/male	11/5	20/23	4/2	7/4	6/8	11/13
N. patients with previous thrombosis history <sup>1</sup> (%)	0/9 (0)	10/28 (36)	1/6 (17)	3/10 (33)	2/8 (25)	6/16 (37)
N. patients with previous chemotherapy <sup>1,2</sup> (%)	4/9 (44)	6/25 (24)	0/6 (0)	1/6 (17)	4/10 (40)	1/15 (7)
JAK2V617F allele (%), median (range)	–	78 (10-100)	45 (24-100)	28 (10-50)	62 (51-73)	97 (78-100)
White blood cell count ( $\times 10^9/L$ ), median (range)	10.1 (5.0-53.9)	12 (3.4-48.9)	9.0 (2.5-15.5)	9.4 (2.5-17.2)	11.8 (6.2-48.9)	13 (4.4-47.7) <sup>2</sup>
Hemoglobin (g/dL), median (range)	11.9 (8.8-14.9)	14.2 (8.6-18)	12.0 (8.5-14.7)	13.9 (8.5-18)	13.6 (11-15.9)	13.5 (8.6-16.3)
Platelet count ( $\times 10^9/L$ ), median (range)	722 (136-1,538)	408 (102-1,500)	496 (87-904)	337 (87-900)	384 (102-641)	541 (140-1,500)
N. patients with PB blasts $> 1\%$ <sup>1</sup> (%)	2/9 (22)	2/33 (6)	0/6 (0)	1/11	1/14	0/14
LDH, U/L, median (range)	722 (426-1,723)	447 (223-1,500)	1,160 (745-1,525)	444 (240-1,525)	306 (223-859)	674 (286-1,500)
CD34 <sup>+</sup> cell count (%), median (range)	0.98 (0-6.95)	0.19 (0.01-4.1)	1.0 (0.02-7.0)	1.3 (0.02-7)	0.12 (0.01-4.1)	0.36 (0.03-3.6)
CD34 <sup>+</sup> cell count, ( $\times 10^9/L$ ), median (range)	102.7 (0.7-2,000)	59.7 (1.4-3,000)	160.8 (2.1-417)	7.6 (3.3-417)	48 (1.4-309)	98 (3.1-3,000) <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Referred to the number of patients for whom the information was available. <sup>2</sup> all patients treated with chemotherapy had received hydroxyurea alone or in association/sequence with busulfan, no patient had received interferon. <sup>3</sup>  $p < 0.05$  according to Spearman's rank test.

**Tabella 20.** Principali caratteristiche cliniche ed ematologiche alla diagnosi in pazienti con PPV/PTE-MF

In accordo ai dati riportati in letteratura tutti i pazienti con PPV-MF presentavano la mutazione (Tefferi, Lasho et al. 2005; Passamonti, Rumi et al. 2006)(Tefferi et al, BJH 2005; Passamonti et al. Blood 2006), al contrario la mutazione era presente solamente nel 27% dei pazienti affetti da PTE-MF. I pazienti con PPV-MF presentavano anche una più elevata carica allelica rispetto ai pazienti con PTE-MF (72% vs 50%), e significativamente più elevato rispetto ad un gruppo di 173 PV e 260 TE precedentemente riportato ( Vannucchi et al. Leukemia 2007; Antonioli et al. Haematologica 2008); inoltre il 78% dei pazienti presentavano una carica allelica superiore al 50%, confermando l'importanza dell'alta carica allelica di JAK2V617F nella trasformazione in mielofibrosi. Questi risultati suggeriscono che l'accumulo degli alleli JAK2 mutati hanno un ruolo fondamentale nel meccanismo di evoluzione in MF di pazienti con PV e TE JAK2V617F positivi. La mediana di tempo tra la diagnosi di PV o TE e la comparsa di MF era di 112 mesi ( range 30-317) per la PPV-MF e 137 mesi (range 29-266) per la PTE-MF. La mediana di follow-up dalla diagnosi di evoluzione in MF era simile nei due gruppi ( 39 mesi, range 6-275). Durante questo periodo 7 degli 8 pazienti che hanno sviluppato una leucemia acuta sono deceduti con una mediana di sopravvivenza di 26 mesi (range 1-40) dalla diagnosi di LAM. A parte una conta piastrinica significativamente più bassa nei pazienti JAK2V617F mutati non abbiamo trovato altre significative correlazioni con lo stato mutazione di JAK2, sia in termini di dimensioni spleniche, incidenza di eventi trombotici o emorragici, sia per quanto riguarda l'evoluzione in LAM. Abbiamo inoltre valutato le possibili correlazioni tra la carica allelica , la prognosi e la presentazione clinica in questi pazienti. Dividendo i pazienti in quartili in base alla distribuzione allelica di JAK2V617F abbiamo trovato che la carica allelica correla con l'età più avanzata, con elevati livelli di leucociti e cellule CD34+ circolanti; mentre non abbiamo trovato correlazioni statisticamente significative con la splenomegalia, l'incidenza di trombosi e emorragie e l'evoluzione in LAM. Ad oggi questi risultati rappresentano il primo studio che dimostra la rilevanza clinica della mutazione di JAK2V617F in pazienti con PV e TE che evolvono in MF. I dati presentati dimostrano comunque che lo stato mutazione e la carica allelica di JAK2V617F sembrano avere una rilevanza per il fenotipo clinico o la prognosi in questo "setting" di pazienti. I risultati di questo studio sono stati pubblicati nella rivista Haematologica (Guglielmelli et al. 2009)

## SIGNIFICATO CLINICO DELLA MUTAZIONE JAK2V617F NELLE TROMBOSI VENOSE ATIPICHE

I meccanismi patogenetici alla base delle trombosi localizzate in sede atipiche, quali le vene splancniche, le vene retiniche, dei seni cerebrali o della placenta causa di aborti ricorrenti, sono ancora poco conosciuti.

Recentemente è stato mostrato che molti dei pazienti con una diagnosi di trombosi venosa splancnica, anche in assenza di parametri ematologici alterati, presentano la mutazione di JAK2V617F (Kiladjian, Cervantes et al. 2008) e sono in realtà NMP misconosciute. In un lavoro pubblicato recentemente dalla Mayo Clinic (Pardanani, Lasho et al. 2008) su 664 pazienti con trombosi venose splancniche sono stati individuati solamente sei pazienti mutati che non presentavano comunque segni di una NMP anche dopo un follow-up di 40 mesi. Simili risultati sono stati osservati anche in altri studi che includevano pazienti con trombosi arteriose o venose ricorrenti (Sene, Elalamy et al. 2008) sia in sedi comuni che atipiche (Pardanani, Lasho et al. 2007; Remacha, Estivill et al. 2007) Inoltre in un ampio studio su 6000 gravidanze, la presenza della mutazione di JAK2 è stata identificata solamente nel 0.2% dei casi, ma associata ad un aumentato rischio di perdita fetale o dell'embrione (Mercier, Lissalde-Lavigne et al. 2007).

Prendendo spunto da queste osservazioni, in collaborazione con il centro trombosi dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria di Careggi (AOUC) abbiamo condotto uno studio per valutare l'incidenza della mutazione di JAK2V617F in pazienti con trombosi ricorrenti atipiche, in cui la ricerca di fattori trombofilici predisponenti od altre alterazioni locali o sistemiche avevano dato esito negativo.

Sono stati quindi genotipizzati per la mutazione JAK2V617F con metodica quantitativa due gruppi di pazienti afferenti al centro trombosi dell' AOUC nel periodo 2003-2006. Il primo gruppo era rappresentato da 66 pazienti con trombosi retinica; il 53.3% dei pazienti erano di sesso maschile con una età mediana di 61 anni (range 27-83 anni) mentre il 46.7% erano pazienti di sesso femminile con una età mediana di 70 anni (range 27-79 anni). Il secondo gruppo era invece rappresentato da 74 donne con episodi ricorrenti di aborti durante il primo trimestre di gravidanza con una età mediana di 35 anni (range 25-46 anni); il 41.9% aveva presentato almeno un aborto nel primo trimestre, il 33.8%, almeno due episodi e il 24.3% tre perdite fetali.

Tutti i pazienti inclusi nello studio avevano parametri ematologici nella norma, in particolare nessuno presentava una conta piastrinica abnorme.

Dall'analisi abbiamo individuato un solo paziente JAK2V617F mutato, con una carica allelica del 15%, appartenente al gruppo di pazienti con trombosi retinica in cui è stato successivamente possibile porre diagnosi di TE.

In conclusione i risultati di questo studio, che è stato pubblicato nella rivista *Thrombosis Research* (Guglielmelli 2008) suggeriscono che la scoperta di una NMP latente, che può essere eventualmente rilevata mediante la determinazione della mutazione di JAK2V617F, in manifestazioni trombotiche atipiche come le trombosi retiniche o gli aborti ricorrenti, sono estremamente inusuali. Ovviamente questo non deve escludere la possibilità che eventi vascolari di questo tipo rappresentino la presentazione iniziale di una NMP.

Risulta quindi evidente che la ricerca della mutazione di JAK2 in questa sottopopolazione di pazienti è giustificata solo in presenza di un forte sospetto clinico oppure in caso di parametri ematologici alterati, piuttosto che rappresentare un esame di routine. I risultati di questo studio sono stati pubblicati in *Thrombosis Research* nel 2008 (Guglielmelli et al. 2008)

SIGNIFICATO CLINICO DELL'APLOTIPO 46/1 DEL GENE JAK2  
NELLA MIELOFIBROSI PRIMARIA

La scoperta di fattori di rischio genetici che predispongono allo sviluppo di NMP rappresenta un importante passo verso una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base di tali patologie. La caratterizzazione ulteriore di tali varianti geniche sarà utile anche a fini prognostici, come già dimostrato da studi recenti.

Alcune evidenze portano a ipotizzare che la mutazione V167F del gene JAK2 non sia l'evento clonogenico iniziale ma che esista invece un'alterazione "pre-JAK2".

Recentemente è stato dimostrato che fattori ereditari possono influenzare la patogenesi delle NMP (Jones et al. Nature Genetics 2009). L'analisi di una serie di polimorfismi (SNP) che coinvolgono il gene JAK2 in soggetti con NMP ha evidenziato la ricorrenza di un particolare aplotipo del gene, denominato 46/1. Questo aplotipo risulta strettamente associato con la mutazione V167F di JAK2. La sua frequenza è infatti maggiore nella classe dei pazienti affetti da NMP rispetto alla popolazione sana di controllo.

Visto l'interesse suscitato dagli studi sui fattori di rischio genetici che possono predisporre allo sviluppo delle NMP, abbiamo studiato le possibili correlazioni cliniche e prognostiche dell'aplotipo 46/1, attraverso la caratterizzazione del polimorfismo rs12343867 che risulta in completo linkage disequilibrium con l'aplotipo stesso, in 202 pazienti con PMF.

Tutti i pazienti inclusi nello studio erano in fase fibrotica, escludendo dall'analisi i pazienti con diagnosi di mielofibrosi pre-fibrotica. Lo screening per l'aplotipo 46/1 è stato eseguito su DNA di granulociti al momento della diagnosi.

Lo SNP consiste nello shift di una timina (T) con una citosina (C), e l'allele C è quello associato all'aplotipo 46/1.

Nella Tabella 21 sono riportate le principali caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti inclusi nello studio.

	rs 12347867 genotype				P
	All patients	CC	CT	TT	
No.	202	39	84	79	
Age <sup>a</sup>	58 (16–90)	60 (16–83)	57 (26–90)	57 (19–89)	0.38
Follow-up, months <sup>b</sup>	65.6 (1–312)	58.5 (2.4–237.3)	68.5 (3.0–312.0)	66.2 (1.0–308.9)	0.51
Females, no. (%)	75 (37.1)	21 (53.8)	30 (35.7)	24 (30.3)	0.05
JAK2V617F, no (%)	133 (65.8)	31 (79.5)	56 (64.3)	48 (60.7)	0.13
JAK2V617F burden <sup>a</sup>	50 (5–100)	63 (11–100)	53 (12–100)	46 (5–100)	0.06
WBC × 10 <sup>9</sup> /l <sup>a</sup>	9.3 (0.6–106.1)	10.6 (1.4–37.7)	8.8 (1.9–90.8)	9.3 (0.6–106.1)	0.37
Hb g/l <sup>a</sup>	123 (46–180)	122 (77–170)	125 (56–175)	119 (46–180)	0.45
PLT × 10 <sup>9</sup> /l <sup>a</sup>	355 (19–2522)	346 (19–1300)	347 (38–1568)	367 (41–2522)	0.44
LDH U/l <sup>a</sup>	614 (162–3426)	757 (198–2645)	602 (162–3426)	548 (202–2981)	0.65
Blast ≥ 1%, no (%) <sup>c</sup>	51 (30.2)	14 (41.2)	19 (27.1)	18 (27.7)	0.49
CD34 <sup>+</sup> cells % <sup>a</sup>	0.24 (0–9.5)	0.22 (0–5.58)	0.25 (0.01–9.5)	0.25 (0–7.55)	0.98
CD34 <sup>+</sup> cells × 10 <sup>9</sup> /l <sup>a</sup>	26.2 (0–5454)	47.0 (0–789)	22.5 (0.73–5020)	27.97 (0–5454)	0.70
Spleen > 15 cm from LCM, no (%)	60 (29.7)	17 (43.6)	18 (21.4)	25 (31.6)	0.15
Constitutional symptoms, no (%) <sup>c</sup>	72 (43.7)	19 (55.9)	28 (40.0)	25 (38.4)	0.26
<i>MWG-MRT score, no (%)<sup>c</sup></i>					
Low	61 (36.1)	7 (20.6)	28 (40.0)	26 (40.0)	
Int-1	38 (22.5)	8 (23.5)	16 (22.8)	14 (21.5)	0.40
Int-2	40 (23.7)	9 (26.5)	18 (25.7)	13 (20.0)	
High	30 (17.7)	10 (29.4)	8 (11.4)	12 (18.5)	
Leukemia transformation, no. (%)	25 (12.4)	4 (10.2)	11 (13.9)	10 (12.6)	0.95
Deaths, no (%)	42 (20.8)	11 (28.2)	14 (16.7)	16 (20.2)	0.33

Abbreviations: PMF, primary myelofibrosis; IWG-MRT, International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment.

<sup>a</sup>Values are expressed as the median (range).

<sup>b</sup>Values expressed as the mean (range)

<sup>c</sup>Information were available in 169 patients.

**Tabella 21.** Caratteristiche cliniche e di laboratorio di 202 pazienti con PMF stratificati in base al genotipo rs12343867

La mediana di follow-up era di 65.4 mesi con un range da 1 a 312 mesi; 42 ( 20.8%) pazienti muoiono durante il periodo di osservazione, mentre il 12.4% dei pazienti evolve in leucemia acuta. In accordo all'IPSS score i pazienti valutabili (n=169) sono stati distribuiti in base alle diverse categorie di rischio (36.1, 22.5, 23.7, e 17.7%, rispettivamente). Il 65.8% dei pazienti risultava mutato per JAK2V617F con una carica allelica mediana del 50% (range 5-100 %); stratificando i pazienti in base alla carica allelica abbiamo identificato il 11.3, 39.1, 22.5 e 27.1% per ogni quartile.

La frequenza dell'allele C era significativamente più elevata nei pazienti con PMF se confrontata con quella di una popolazione locale di controllo includenti 235 soggetti (0.386 vs 0.253; p=6.37x10<sup>-6</sup>), come mostrato nella tabella 22.

	No. of cases	No of C alleles	No. of T alleles	Frequency of C allele	vs local controls		vs WTCCC controls	
					P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)
Local controls	235	119	351	0.253	—	—	0.9817	0.99 (0.80–1.25)
WTCCC	1492	757	2227	0.252	0.9817	0.99 (0.80–1.25)	—	—
All patients	202	156	237	0.386	6.37 × 10 <sup>-6</sup>	1.94 (1.45–2.59)	1.84 × 10 <sup>-9</sup>	1.93 (1.55–2.41)
JAK2 wt	69	46	92	0.333	0.063	1.47 (0.98–2.22)	0.036	1.47 (1.02–2.11)
JAK2 V617F-pos	133	110	145	0.413	8.29 × 10 <sup>-7</sup>	2.24 (1.62–3.09)	7.69 × 10 <sup>-10</sup>	2.23 (1.72–2.90)
<i>V617F allele burden</i>								
<25%	15	10	20	0.333	0.331	1.47 (0.67–3.24)	0.319	1.47 (0.68–3.15)
≥25%	118	98	125	0.416	7.83 × 10 <sup>-7</sup>	2.31 (1.65–3.24)	1.43 × 10 <sup>-9</sup>	2.30 (1.75–3.04)
1–25%	15	10	20	0.333	0.434	1.47 (0.67–3.24)	0.319	1.47 (0.68–3.15)
26–50%	52	39	65	0.375	0.012	1.77 (1.13–2.77)	0.0051	1.76 (1.18–2.65)
51–75%	30	25	35	0.416	0.007	2.11 (1.21–3.66)	0.004	2.10 (1.25–3.53)
76–100%	36	36	25	0.500	5.14 × 10 <sup>-8</sup>	4.25 (2.45–7.37)	3.07 × 10 <sup>-9</sup>	4.23 (2.52–7.10)

Abbreviation: WTCCC, Wellcome Trust Case Control Consortium.<sup>9</sup>

**Tabella 22.** Risultati della genotipizzazione dell'aplotipo 46/1 (SNP rs12343867) in relazione allo stato mutazione di JAK2.

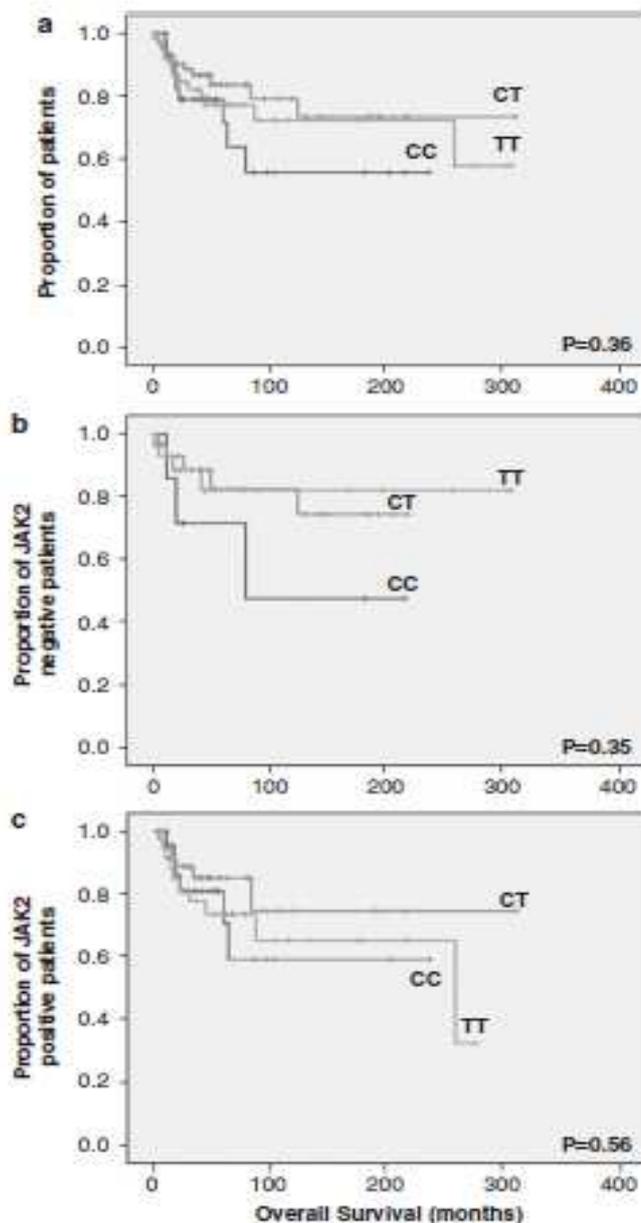
La definizione di omozigosi o di eterozigosi per lo SNP è stata effettuata utilizzando criteri già pubblicati (Jones et al. Natural genetics 2009); nei pazienti in cui la carica allelica di JAK2 era superiore al 90% solamente un allele (C o T) era incluso nell'analisi statistica considerando che l'informazione relativa allo SNP nella porzione residua JAK2WT era minima.

Differenze significative sono in gran parte legate allo stato mutazionale di JAK2 (frequenza dell'allele C: 0.413;  $p=8.29 \times 10^{-7}$  rispetto alla popolazione locale di controllo). I pazienti JAK2 WT presentano un aumento seppur non statisticamente significativo dell'allele C (frequenza di 0.333;  $p=.063$ ). Al contrario, utilizzando un'altra popolazione di riferimento, WTCCC, che include 1942 soggetti sani, la significatività dei pazienti JAK2WT veniva mantenuta ( $p=.036$ ). Questi dati supportano l'associazione dell'aplotipo 46/1 con la PMF indipendentemente dallo stato mutazione di JAK2, anche se il potere di associazione con i pazienti JAK2 WT è inferiore rispetto ai mutati.

Nei pazienti JAK2V617F mutati con una carica allelica inferiore al 25% la frequenza dell'allele C era 0.333, simile a quello osservata per i pazienti JAK2 WT (0.331); mentre la frequenza dell'allele C era significativamente maggiore nei pazienti con una carica allelica superiore al 25% rispetto ai controlli (0.416;  $p=7.83 \times 10^{-7}$ ). Osservando le frequenze dell'allele C nei diversi quartili abbiamo trovato un aumento progressivo da 0.333 a 0.500 ( $p<.0001$ ,  $\chi^2$  test for trend).

Dall'analisi genomica dei nostri pazienti è emerso che 7 su 190 valutabili presentavano mutazioni a carico del gene MPL: 2 W515K e 5 W515L. La frequenza dell'allele C in questi pazienti era del 0.500, statisticamente significativa se confrontata con la popolazione di controllo ( $p=.038$ ).

Dall'analisi di correlazione tra la presenza dell'aplotipo con caratteristiche cliniche e di laboratorio non abbiamo trovato differenze in termini di parametri ematologici, splenomegalia, presenza di sintomi costituzionali, categoria di rischio secondo l'IPSS, di trasformazione leucemica o di mortalità. Inoltre non abbiamo trovato differenze in termini di OS nemmeno dopo stratificazione dei tre diversi genotipi (CC, CT, TT) in base allo stato mutazionale di JAK2, come mostrato nella figura 41.



**Figura 41.** Analisi di Kaplan-Maier sulla OS di pazienti con PMF. I plot mostrano l'OS in base al genotipo dello SNP rs12343867 in tutti i 202 pazienti dello studio (a), nei soli 69 pazienti JAK2WT (b) oppure nei 133 pazienti JAK2V617F mutati (c).

Considerando i tre diversi genotipi dello SNP rs12343867 non abbiamo trovato associazioni tra questi e variabili cliniche od ematologiche; in particolare non abbiamo trovato una associazione con la progressione in LAM, le diverse categorie di rischio o con l'OS. Questi risultati contraddicono in parte l'osservazione del gruppo americano (Tefferi et al. Leukemia 2010) in cui si dimostrava una correlazione tra l'omozigosi per l'allele T ed una ridotta sopravvivenza in pazienti con PMF JAK2WT. Una possibile spiegazione di questa discrepanza può essere legata al maggior numero di pazienti deceduti nella casistica americana (59% vs 21%).

I risultati di questo studio quindi confermano l'associazione tra un particolare aplotipo, il 46/1, e l'acquisizione della mutazione JAK2V617F e lo sviluppo di Neoplasie Mieloproliferative Croniche Ph negative. Si ipotizza che questo tipo di aplotipo possa contribuire alla malattia modificando l'espressione del gene oppure modificando la funzionalità proteica.

I risultati di questo studio sono stati successivamente pubblicati in Leukemia (Guglielmelli et al. 2010).

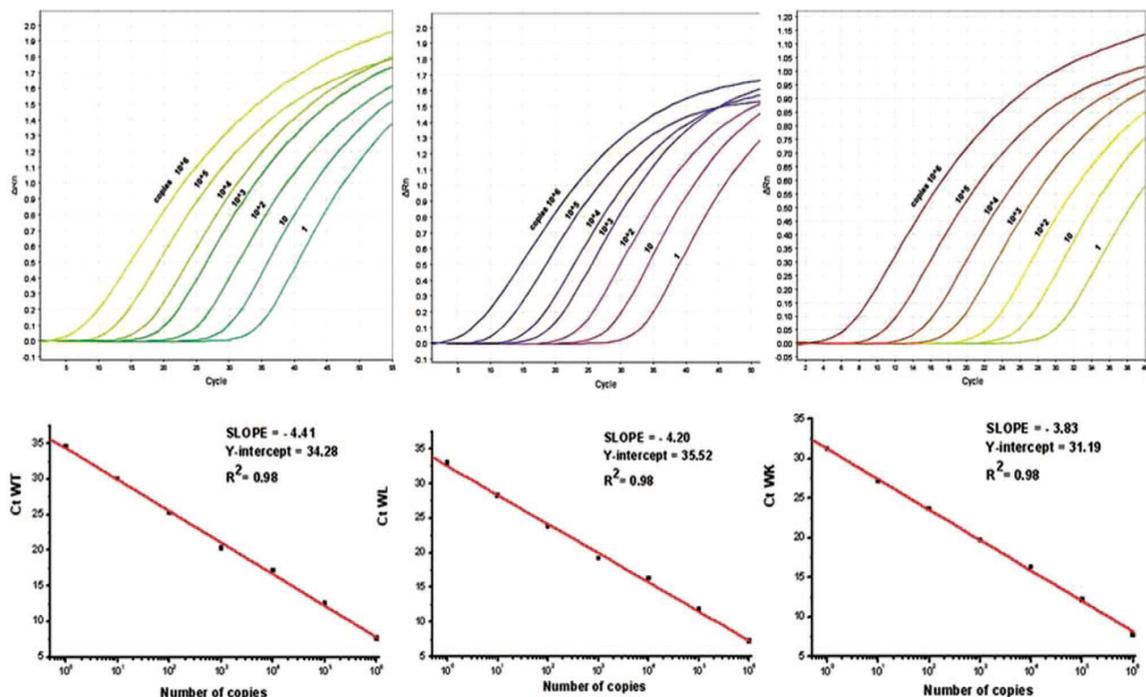
EFFETTO DELLA MUTAZIONE E DELLA CARICA ALLELICA DI MPLW515K/L NELLA  
TROMBOCITEMIA ESSENZIALE

La trombocitemia essenziale (TE) è un disordine ematologico per il quale non è stato ancora individuato un unico evento patogenetico che spieghi l'insorgenza della malattia e chiarisca il fenotipo clinico della malattia. La diagnosi si basa su dati clinici e criteri di esclusione, e fino a pochi anni fa l'unico test molecolare utile ai fini diagnostici era rappresentato dall'analisi della mutazione *JAK2V617F*, che peraltro risulta positivo in poco più della metà dei casi, e dalla valutazione istopatologica, che è comunque soggetta ad interpretazioni variabili nei casi meno tipici. Risulta pertanto chiara l'importanza di identificare nuovi marcatori molecolari che, oltre a permettere la diagnosi, possano anche dare informazioni sullo stato della malattia e sulla sua progressione. L'identificazione della mutazione *MPL 515W>K/L*, specifica per la trombocitemia essenziale e la mielofibrosi, rappresenta un importante progresso sia nella fase diagnostica che in quella di applicazione terapeutica, in quanto la via delle tirosin-cinasi attivate costitutivamente dalla proteina mutata rappresenta un potenziale target per farmaci inibitori specifici, ed ha riaperto l'interesse sullo studio del pathway Trombopoietina-Recettore e del ruolo patogenetico in questo disordine.

Il primo obiettivo di questo studio è stato quello di determinare la frequenza della mutazione *MPLW515L/K* in una popolazione di 994 pazienti affetti da trombocitemia essenziale, correlando la presenza delle mutazioni alle caratteristiche fenotipiche alla diagnosi, sia cliniche che di laboratorio, con lo scopo di identificare eventualmente un particolare subset di pazienti con peculiari caratteristiche. Ci interessava inoltre ricercare se esistevano rapporti tra la presenza della mutazione puntiforme di *MPL 515W>K/L* e alcuni markers cellulari, molecolari e istomorfologici di malattia mieloproliferativa cronica Ph negativa, quali la ricerca della mutazione di *JAK2V617F*, la formazione di colonie eritroidi spontanee (EEC), la iperespressione del gene *PRV-1*, la cellularità, la morfologia megacariocitaria e l'eventuale grado di fibrosi midollare. Un ulteriore obiettivo di questo studio è stato quello di sviluppare un test diagnostico quantitativo per la determinazione della percentuale di allele mutato, e che fosse idoneo per studi in ampie popolazioni di soggetti.

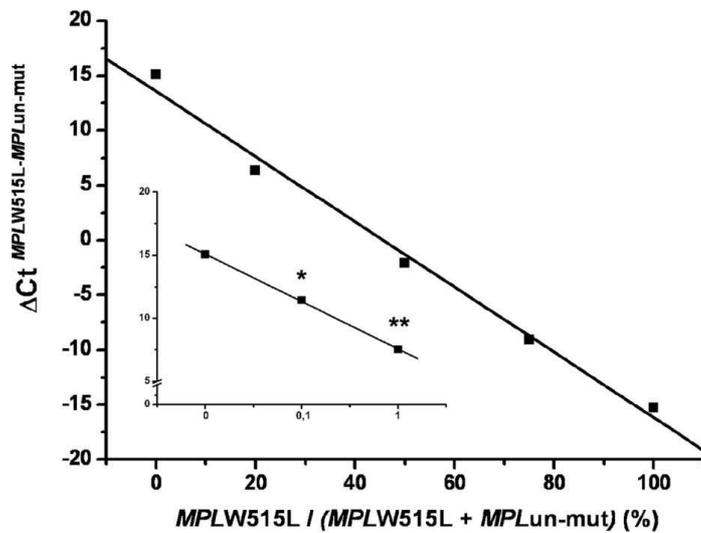
La ricerca delle mutazioni di *MPL515W>K/L* è stata valutata in 994 pazienti affetti da TE afferenti a 6 diversi centri italiani di ematologia nell'ambito del Gruppo Italiano per le Malattie EMatologiche dell'Adulto (GIMEMA) nelle NMP.

La prima metodica descritta in letteratura per l'analisi delle mutazioni di *MPL* era rappresentata dalla classica tecnica di sequenziamento diretto di frammenti amplificati mediante PCR. Dato l'elevato numero di pazienti che ci proponevamo di includere in questo studio, e in previsione di un più ampio studio cooperatore con altri Centri italiani, è stato sviluppato un nuovo metodo per la analisi del polimorfismo genico dovuto alle mutazioni mediante real-time PCR; tra i vantaggi di questo, va segnalata la rapidità del sistema, la possibilità di allestire analisi di un numero elevato di campioni in tempi brevi, ed i costi decisamente più contenuti. La performance dei reagenti utilizzati per l'analisi quantitativa degli alleli mutati per le due diverse mutazioni è stata valutata utilizzando un sistema convenzionale di Real-Time Quantitative PCR, ma con l'uso di sonde di acidi nucleici modificati con tecnologia LNA. Di seguito viene descritta la metodica finale (come riportato nella sezione dei Materiali e Metodi), risultato della ottimizzazione della stessa. Si utilizzano 10 ng di DNA genomico, estratto da granulociti del sangue periferico, allestendo tre diverse reazioni in triplicato, ciascuna contenente la sonda specifica che si intende analizzare e la coppia di primer comuni. La Figura 42 descrive la performance delle reazioni di calibrazione del sistema.

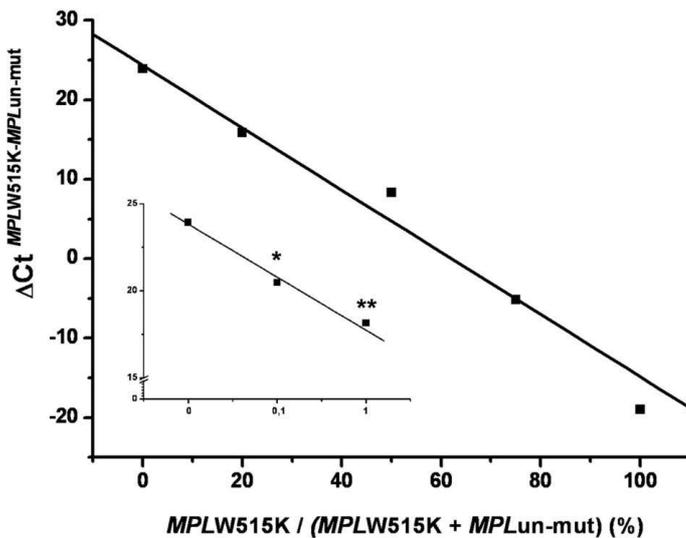


**Figura 42.** Calibrazione del sistema con curve standard, che mostrano l'ottimale livello di sensibilità ( $r=1$ ) nel range compreso tra 1 e  $10^6$  copie di ciascun frammento clonato del gene *MPL*.

La performance del sistema in campioni biologici di DNA genomico, individualmente per le due mutazioni, è invece presentata nella Figura 43A e 43B. Il sistema mima esattamente l'impiego diagnostico della procedura nelle analisi di routine su campioni di granulociti ottenuti mediante purificazione su gradienti di densità da sangue periferico di pazienti recanti le mutazioni di *MPL*.



**Figura 43A.** Curva di dosaggio relativa alla mutazione W>L



**Figura 43B.** Curva di dosaggio relativa alla mutazione W>K

I plot piccoli mostrano la linearità di risposta del sistema nel range <0.01%-<1.0% di allele mutato in miscela di DNA wild-type, rispettivamente per l'allele 515 W>L e W>K. I plot interi mostrano la intera performance del sistema nel range 1-100% di allele mutato in miscela da 99% a 0% di DNA wild-type.

Trenta dei 994 pazienti con TE analizzati presentavano una delle due mutazioni; pertanto, la frequenza globale della mutazione *MPL515W*, pari al 3.0%, è risultata significativamente maggiore di quella riportata inizialmente in letteratura, essendo riportata essere pari all'1% (Pikman et al. Plos Med 2006). Tra i pazienti mutati, 18 presentavano la mutazione 515W>L (60%) e 12 (40%) la mutazione 515W>K. Nel 50% dei pazienti mutati 515W>K la mutazione era presente in forma omozigote rispetto al 17% dei pazienti con la mutazione W515L ( $p=.04$ ). Il 55.7% dei pazienti presentava la mutazione *JAK2617V>F*, di cui il 4.5% in forma omozigote. Il 27% (3 pazienti con la mutazione W515L e 5 con la mutazione W515K coesprimevano la mutazione di *JAK2V617F*, mentre nessuno dei pazienti presentava entrambe le mutazioni di *MPL*; la percentuale di allele mutato per *JAK2* era significativamente più basso nei pazienti mutati per *MPL* (8%) rispetto ai WT (26%;  $p=.002$ ).

L'analisi di associazione tra la presenza delle mutazioni *MPL515W>K/L*, stratificate in base allo stato mutazione di *JAK2* e le caratteristiche cliniche e laboratoristiche sono riassunte nella TABELLA 23. Dall'analisi è emerso che i pazienti mutati per *MPL* avevano un'età significativamente più avanzata, mentre non sono state riscontrate differenze per sesso, sebbene nel nostro campione ci fosse una quota elevata di pazienti femmine arruolate nel corso di studi precedenti. D'altro canto, abbiamo osservato che la prevalenza delle mutazioni *MPL* era sovrapponibile negli stessi campioni genotipizzati alla diagnosi, ad un anno e dopo 3 anni di follow-up (3.3%, 3.8% e 2.5%), ad indicare che la mutazione non viene acquisita durante il corso della malattia ma si presenta fin dalla diagnosi.

	MPL, mutant (A)	MPL wild-type		P		
		JAK2, wild-type (B)	JAK2V617F, mutant (C)	(A) vs (B)	(A) vs (C)	(B) vs (C)
Number of patients	30	418	546	—	—	—
Male, no (%)	9 (30%)	144 (34%)	170 (31%)	.7	.9	.3
Median age, y (range)	56 (22-84)	50 (8-87)	56 (15-97)	.006	.33	<.001
MPL mutant allele burden, %*	39 ± 27	—	—	—	—	—
JAK2V617F allele burden, %*	11 ± 8†	—	25 ± 13	—	.002	—
White blood cell count, ×10 <sup>9</sup> /L*	8.8 ± 3.1	8.5 ± 2.1	9.5 ± 3.1	.8	.2	<.001
Hemoglobin, g/L*	134 ± 13	135 ± 22	142 ± 21	.7	<.001	<.001
Platelet count, ×10 <sup>9</sup> /L*	956 ± 331	935 ± 315	791 ± 211	.8	.004	<.001
LDH, U/L*	459 ± 182	336 ± 128	338 ± 116	.03	.005	.1
Serum ferritin, µg/L*	110 ± 82	82 ± 85	93 ± 96	.08	.1	.7
Splenomegaly, no (%; n = 892)‡	5 (17%)	71 (20%)	107 (21%)	.9	.9	.8
Pruritus, no (%; n = 663)‡	4 (13%)	13 (5%)	34 (10%)	.1	.5	.2
Arterial events at diagnosis, no (%)	3 (10%)	24 (6%)	66 (12%)	.4	.9	.008
Arterial events at follow-up, no (%)	4 (13%)	6 (1%)	20 (4%)	.002	.05	.04
Venous events at diagnosis, no (%)	1 (3%)	10 (2%)	29 (5%)	.5	.9	.09
Venous events at follow-up, no (%)	2 (7%)	5 (1%)	12 (2%)	.07	.1	.3
Microvessel disturbances, no (%)	18 (60%)	106 (25%)	170 (31%)	<.001	.001	.1
Major hemorrhage, no (%)§	2 (7%)	15 (4%)	20 (4%)	.1	.1	.8

Unless otherwise specified, all data were collected at diagnosis. P values in bold indicate statistically significant differences ( $P < .05$ ).

\*Mean value ( $\pm$  SD) is reported.

†Refers only to the 8 patients who harbored both JAK2V617F and MPLW515L/K mutation.

‡Numbers within parentheses indicate the number of patients for whom information was available.

§Includes patients with hemorrhage either at diagnosis, during follow-up, or both.

**Tabella 23:** caratteristiche clinico-laboratoristiche dei pazienti affetti da TE alla diagnosi stratificati in base allo stato mutazionale di MPL e JAK2.

Dai dati presentati in Tabella X si può osservare che non sono presenti differenze nella conta dei globuli bianchi, nel valore di emoglobina e di ematocrito, nei livelli di ferritina sierica e LDH, in dipendenza dallo stato mutazionale di *MPL*. Abbiamo comunque osservato che i livelli di emoglobina e la conta piastrinica erano significativamente più bassi ( $p < .001$ ) o più alti ( $p = .004$ ) rispetto ai pazienti MPKL WT JAK2 mutati, rispettivamente.

L'analisi di marcatori biologici è stata condotta su un campione informativo di 273 pazienti come riportato nella tabella 24.

	MPL W515L/K		P
	Mutated (n=13)	WT (n=260)	
<b>Biological characteristics</b>			
EEC +ve (n=119)	3 (37%)	54 (48%)	0.7
PRV-1 +ve (n=130)	4 (44%)	53 (43%)	0.9
Clonal hemopoiesis (HUMARA) (n=120)	7 (70%)	62 (56%)	0.5

**Tabella 24.** Caratteristiche biologiche alla diagnosi di pazienti con TE.

La frequenza di pazienti che presentava la formazione di colonie eritroidi spontanee e l'iperpressione del gene *PRV-1* era simile tra quelli con la mutazione *MPL515W>K/L*

(37% e 44% rispettivamente) o *MPL WT* (48% e 43% rispettivamente). la durata media della malattia dal momento della diagnosi era significativamente più lunga nei pazienti *MPL* mutati che in quelli wild-type (110 vs 57 mesi,  $P=0.001$ )

Non sono state evidenziate differenze tra i due gruppi di pazienti per quanto riguarda le complicanze venose (eventi trombotici ed emorragici), la splenomegalia, prurito e sintomi sistemici; mentre abbiamo osservato una maggior frequenza di pazienti *MPL* mutati con complicanze trombotiche arteriose alla diagnosi.

Abbiamo inoltre osservato una maggior frequenza di pazienti *MPL* mutati con coinvolgimento del microcircolo

Gli trombotici maggiori riferiti alla diagnosi documentati clinicamente o con esami strumentali erano rappresentati da trombosi cerebrovascolari, infarti del miocardio, trombosi venosa profonda, embolia polmonare, trombosi dei vasi splancnici con una diagnosi accertata di sindrome Budd-Chiari; aborti spontanei manifestatisi prevalentemente alla terza settimana di gestazione. Gli eventi emorragici maggiori includevano emorragie a livello gastrointestinale, a livello delle vie urinarie, epistassi gravi ed emorragie cerebrali.

Globalmente, le complicanze trombotiche ed emorragiche non presentano differenze statisticamente significative tra pazienti *JAK2617V>F* e *JAK2WT*, in accordo con precedenti osservazioni (Antonioli et al. Leukemia 2005), ma a differenza di altri studi (Campbell et al. Lancet 2005) durante il follow-up nessuno dei pazienti esaminati è evoluto verso una forma acuta o ha presentato evoluzione verso la mielofibrosi.

Le biopsie osteomidollari dei pazienti *MPL* mutati sono state esaminate e confrontate con quelle di circa 30 pazienti privi della mutazione (Tabella 25).

	<i>MPL</i> W515L/K mutant (n=21)	<i>MPL</i> wild-type (n= 42)	P=
<b>Visual Inspection</b>			
Total BM cellularity (%)	32.0±8.0	45.0±15.0	<b>0.03</b>
Reticulin grade (mean±SD)	0.6±0.4	0.8±0.7	0.8
Erythroid cellularity (% of patients)			
Reduced	44%	9%	
Normal	56%	64%	<b>&lt; 0.001<sup>§</sup></b>
Increased	0	27%	
<b>Quantitative Assessment</b>			
Area occupied by cells (%)	30.1±6.5	40.9±4.8	<b>0.011</b>
Area occupied by fibers (%)	12.4±5.4	10.7±3.3	0.7
No. of Mks/mm <sup>2</sup> , median (range)	4.9 (2.7-7.1)	3.3 (1.9-7.1)	<b>0.006</b>
No. of Mk clusters/mm <sup>2</sup> , median (range)	3.3 (0.4-7.3)	1.1 (0-4.6)	<b>0.0002</b>
No. of Mks comprising clusters, median (range)	4.6 (3.5-7.2)	4.8 (3.7-7.9)	0.6
No. of small Mks (% of all Mks)	28.1±14.4	18.6±12.2	<b>0.0005</b>

**Tabella 25.** Caratteristiche istomorfologiche di biopsie osteomidollari di pazienti affetti da TE in relazione alla presenza o meno della mutazione del gene *MPL*

La valutazione istopatologica, che prevedeva l'analisi delle caratteristiche istomorfologiche in sezioni colorate con Giemsa, non ha mostrato differenze di rilievo tra i due gruppi di pazienti per quanto riguardava la cellularità totale o aspetti morfologici a carico della linea eritroide e mieloide; al contrario nei pazienti che presentavano la mutazione *MPL* si documentava una più spiccata iperplasia della linea megacariocitaria. Inoltre, accanto alla presenza di megacariociti maturi con nucleo iperlobato, ipermaturo e con abbondante citoplasma, era possibile riscontrare un aumento del numero di piccoli megacariociti atipici, positivi all'immunoistochimica per il fattore di von Willebrand (vWF) e per il CD61, con elevato rapporto nucleo-citoplasmatico, comunemente definiti micromegacariociti, più tipicamente caratteristici di una forma mielofibrotica. Peraltro, a differenza di quanto si osserva tipicamente nella mielofibrosi, inclusa la forma cosiddetta pre-fibrotica o ipercellulare, i megacariociti nei pazienti con ET mutati per *MPL* si trovavano spesso dispersi nel parenchima midollare o raggruppati in piccoli cluster, e non in accumuli più ampi e quasi sinciziali come nella mielofibrosi.

La valutazione del grado di fibrosi midollare è stata eseguita su sezioni trattate secondo il metodo Gomori, ed il contenuto di fibre reticoliniche midollari è stato valutato mediante una scala semiquantitativa, in accordo con i criteri recentemente enunciati da parte del

Network Europeo della Mielofibrosi (EUMNET) (Barosi G, 2005). Tutti i pazienti presentavano un grado di fibrosi di grado 0-1 ad eccezione di un paziente con la mutazione *MPL515W>L* (25% di allele mutato) che presentava una fibrosi di grado 1-2. Abbiamo quindi attentamente riesaminato i dati clinici di questo soggetto, che hanno confermato la diagnosi di ET piuttosto che un quadro di mielofibrosi inizialmente misconosciuta.

Successivamente abbiamo condotto una analisi di confronto tra pazienti che presentavano le due diverse mutazione di MPL, rispetto anche allo stato mutazionale di JAK2 (Tabella 26).

	<i>MPL</i>		<i>JAK2</i>		<i>P value</i>				
	W515L (A)	W515K (B)	wild-type (C)	V617F (D)	(A) vs (B)	(A) vs (C)	(A) vs (D)	(B) vs (C)	(B) vs (D)
Number of patients	18	12	418	546	—	—	—	—	—
Male, no (%)	7 (38.8)	2 (16.6)	144 (34)	170 (31)	.2	.7	.8	.5	.5
Median age, y*	67 (31-84)	48 (22-66)	50 (8-87)	56 (15-97)	<b>.004</b>	<b>.01</b>	.89	.6	.1
<i>MPL</i> mutant allele burden, %†	37 ± 23	53 ± 26	—	—	.09	—	—	—	—
<i>JAK2</i> V617F mutated, no (%)	3 (17%)	5 (42%)	—	—	.2	—	—	—	—
<i>JAK2</i> V617F allele burden, %†	13 ± 14	10 ± 15	—	25 ± 13	.9	—	<b>.02</b>	—	<b>.01</b>
White blood cell count, × 10 <sup>9</sup> /L†	8.3 ± 2.9	9.5 ± 3.3	8.5 ± 2.1	9.5 ± 3.1	.5	.6	.1	.4	.9
Hemoglobin, g/L†	129 ± 13	142 ± 90	135 ± 22	142 ± 21	<b>.003</b>	<b>.01</b>	<b>&lt;.001</b>	.07	.6
Platelet count, × 10 <sup>9</sup> /L†	882 ± 358	1060 ± 270	935 ± 315	791 ± 211	<b>.01</b>	.2	.1	<b>.07</b>	<b>&lt;.001</b>
LDH, U/L†	493 ± 249	431 ± 102	336 ± 128	338 ± 116	.8	.1	<b>.01</b>	<b>.06</b>	<b>.02</b>
Serum ferritin, µg/L†	140 ± 106	80 ± 34	82 ± 85	93 ± 96	.6	.07	.23	.5	.6

All data were collected at diagnosis. *P* values in bold indicate statistically significant differences (*P* < .05).

\*Median values (range) are shown.

†Mean values (± SD) are shown.

**Tabella 26.** Caratteristiche cliniche e di laboratorio di pazienti con TE stratificati in base allo stato mutazionale di MPL (W515K e W515L) e JAK2.

Dall'analisi è emerso che i pazienti mutati per MPL W515L avevano un'età più avanzata e livelli di emoglobina più bassi rispetto ai pazienti mutati per MPL W515K o WT, in particolare se questi presentavano la mutazione JAK2V617F. Al contrario i pazienti mutati per MPL W515K presentavano una conta piastrinica significativamente più elevata rispetto ai pazienti mutati per MP; W515L o WT.

Non abbiamo invece osservato differenze tra i pazienti mutati per l'una o l'altra mutazione di MPL per quanto riguarda la splenomegalia, il prurito, complicanze trombotiche arteriose o venose, emorragie o interessamento del microcircolo (55% vs 66%)

In conclusione la ricerca delle mutazioni del gene che codifica per il recettore della trombopoietina (MPL) nei pazienti affetti da TE assume una notevole importanza sul piano diagnostico poiché esiste tuttora una quota di pazienti per i quali non è stato

individuato un marcatore molecolare che spieghi non solo l'insorgenza della malattia, ma soprattutto che ne caratterizzi il fenotipo clinico. Questi pazienti risultano infatti negativi per la mutazione *JAK2617V>F* che rappresenta un marcatore della malattia in circa il 60% dei casi, a differenza della quasi totalità (>95%) dei pazienti con policitemia vera.

Oltre alla relativa rarità della mutazione, uno dei fattori che ha limitato fino ad ora gli studi in questo settore è rappresentata dalla tecnologia utilizzata, basata sul sequenziamento diretto. Questo studio è stato reso possibile innanzitutto dallo sviluppo di una nuova metodologia quantitativa mediante real-time PCR, con sonde LNA. La tecnica messa a punto in questo studio consente infatti di determinare le mutazioni di *MPL* e contemporaneamente di stabilire la percentuale di allele mutato. Si tratta inoltre di una metodica specifica, sensibile e riproducibile che oltre a rappresentare un importante test diagnostico potrebbe determinare anche un contenimento dei costi eliminando la necessità del sequenziamento. Inoltre, in alcuni studi è stata ipotizzata l'esistenza di correlazioni tra carica allelica e variazioni fenotipiche della malattia. (Lasho et al. *BJH* 2006). In questo senso risulta evidente l'utilità di una metodica che permetta di monitorare le fluttuazioni della percentuale di allele mutato nel tempo. Queste variazioni potrebbero risultare utili come indice prognostico di progressione verso stadi avanzati della malattia e anche come indice di risposta alla terapia.

L'uso di modelli murini ha permesso di identificare un fenotipo caratteristico dovuto alla mutazione di *MPL*, e che ben differisce da quello riscontrato in animali positivi per la mutazione *JAK2V617F*.

Infatti, l'espressione indotta di *MPL515W>L* in modelli murini determina nelle cellule emopoietiche una indipendenza dalle citochine con attivazione costitutiva del recettore della trombopoietina e della via di segnale JAK-STAT, coinvolta in numerosi meccanismi biologici quali la proliferazione e la differenziazione cellulare. La presenza della mutazione *W515L* si traduceva in un quadro clinico sovrapponibile alla mielofibrosi dell'uomo caratterizzata dalla comparsa di leucocitosi, splenomegalia, aumento delle piastrine e fibrosi midollare con metaplasia mieloide extramidollare.

Uno studio successivo (Pardanani et al. *Blood* 2006) ha analizzato un numero consistente di pazienti affetti da mielofibrosi o trombocitemia essenziale portanti la mutazione di *MPL*. Lo studio non ha però mostrato differenze cliniche significative tra pazienti *MPL515W>L* positivi e negativi, anche se i pazienti con MFP mutati presentavano una

marcata iperplasia megacariocitaria midollare, leucocitosi e trombocitosi, e con un decorso clinico più aggressivo.

Precedentemente il nostro gruppo ha analizzato il significato clinico della mutazione *MPL515W>K/L* in 217 pazienti con PMF e mielofibrosi secondarie (Guglielmelli et al, BJH 2007). Il risultato di questa analisi ha indicato che il fenotipo clinico associato alla mutazione *MPL* risultava caratterizzato da anemia severa con una maggiore necessità trasfusionale rispetto ai pazienti non portatori della mutazione. Inoltre l'effetto negativo sull'eritropoiesi di *MPL515W>L/K* è risultato dominante sull'effetto ascrivibile alla mutazione *JAK2617V>F*, che in genere comporta una peculiare stimolazione della linea eritroide.

Questo fenotipo clinico non è sovrapponibile a quello che abbiamo osservato nei pazienti con trombocitemia essenziale. Innanzitutto, in questo studio abbiamo trovato che la frequenza delle mutazioni *MPLW515L/K* è pari al 3.0%, una percentuale significativamente più elevata rispetto a quella riportata nelle altre casistiche (Pardanani et al. Blood 2006). Le due alterazioni *W515L* e *W515K* si presentano in questo gruppo di pazienti con la stessa frequenza riportata in precedenti studi che segnalavano un rapporto di 3:1 per la mutazione *W515L* rispetto all'altra (Pardanani et al. Blood 2006).

Dal punto di vista clinico, la presenza della mutazione *MPL* non è però risultata essere associata ad un fenotipo clinico ben definito, ad eccezione per l'elevata conta piastrinica e la maggiore incidenza di sintomi microvascolari.

Un reperto caratteristico è stato il riscontro di micromegacariociti nelle sezioni midollari, che è considerato uno degli aspetti tipici della mielofibrosi. Peraltro, l'intero pattern istologico, la valutazione del grado di fibrosi, così come la stabilità clinica della malattia, non supportano una diagnosi alternativa di mielofibrosi in fase pre-fibrotica.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno dimostrato che la presenza della mutazione del codone 515 del gene *MPL* in pazienti con una diagnosi di trombocitemia essenziale sulla base dei criteri WHO si accompagna ad alcuni caratteri distintivi, come una più elevata conta piastrinica alla diagnosi e l'apparenza morfologica dei megacariociti, ma non identifica un sottogruppo diverso in termini clinici, e soprattutto non supporta la diagnosi alternativa di "forma pre-fibrotica" di mielofibrosi.

In considerazione dei dati sperimentali che dimostrano come le cellule emopoietiche che esprimono le mutazioni *MPL515W>K/L* presentano un vantaggio proliferativo, si può concludere che queste stesse rappresentano un elemento fondamentale nella

patogenesi molecolare di questi disordini, rappresentando un utile parametro diagnostico e prognostico, ma anche terapeutico. A conferma di questa ipotesi, alcuni risultati di recenti studi indicano come le cellule portatrici della mutazione *MPL515W* sono sensibili all'azione degli inibitori di JAK2, identificando queste nuove molecole come possibile strategia terapeutica potenziale per la cura delle sindromi mieloproliferative croniche Ph-negative e *MPL* mutate.

I risultati di questo studio sono stati pubblicati nella rivista *Blood* (Vannucchi, et al. 2008).

## SCREENING MUTAZIONALE PER I GENI IDH1 E IDH2

Al fine di valutare accuratamente la reale prevalenza delle mutazioni dei geni IDH1/IDH2 nelle NMP, abbiamo condotto uno studio in collaborazione con il gruppo americano della Mayo Clinic su un campione di 1422 pazienti con diagnosi di NMP e 51 casi di LAM secondarie a una pregressa NMP; valutando inoltre la sua rilevanza prognostica in associazione ad altre alterazioni citogenetiche e molecolari (come la ricerca delle mutazione a carico dei geni JAK2, MPL, TET2 e l'aplotipo 46/1 del gene JAK2).

Dopo aver ottenuto il consenso informato, è stato prelevato sangue periferico da pazienti affetti da PV, TE, PMF, mielofibrosi secondaria a PV ed ET e soggetti sani.

Lo studio è stato condotto analizzando 1473 pazienti di cui 421 con PV, 594 con TE, 312 con mielofibrosi primaria, 54 con mielofibrosi secondaria a policitemia vera (PPV) e 41 con mielofibrosi secondaria a trombocitemia essenziale (PET). Nello studio abbiamo inoltre incluso 51 pazienti con LAM secondaria ad una fase cronica di NMP. La tabella seguente (Tabella 27) riporta in dettaglio le caratteristiche dei pazienti.

MPN center	Diagnosis	N	Median age in years (range)	Males (%)	JAK2 mutation frequency	MPL mutation frequency	TET2 mutation frequency	JAK2 46/1 nullizygous frequency
Florence (n = 522)	PV	150	62 (16–91)	66	83% (123/149) <sup>a</sup>	NA	NA	6% (1/18)
	ET	199	56 (13–93)	37	63% (124/198)	2.2% (4/184)	NA	52% (25/48)
	PMF	107	63 (16–90)	67	65% (69/106)	4% (4/98)	NA	39% (37/96)
	Post-PV MF	32	62 (48–78)	47	100% (32/32)	0% (0/28)	NA	0% (0/16)
	Post-ET MF	26	63 (33–82)	50	39% (10/26)	13% (3/24)	NA	27% (3/11)
	Post-PV AML	1	66	0	100% (1/1)	0% (0/1)	NA	NA
	Post-ET AML	2	65–70	0	50% (1/2)	0% (0/1)	NA	NA
	Post-PMF AML	5	73 (67–83)	80	20% (1/5)	0% (0/5)	NA	20% (1/5)
Harvard (n = 322)	PV	159	59 (32–85)	48	93% (139/150) <sup>a</sup>	0% (0/159)	9.4% (15/159)	23% (29/125)
	ET	124	57 (31–84)	26	31% (35/114)	3.2% (4/124)	8% (10/124)	42% (41/98)
	PMF	39	64 (50–70)	49	42% (16/38)	5.1% (2/39)	7.7% (3/39)	22% (5/23)
Mayo (n = 629)	PV	112	66 (21–95)	48	95% (106/112) <sup>a</sup>	1.8% (1/56)	15.7% (14/89)	25% (25/99)
	ET	271	63 (15–87)	38	49% (132/271)	4.9% (7/143)	5.7% (3/53)	34% (91/266)
	PMF	166	62 (35–82)	67	57% (95/166)	10% (11/108)	18% (10/57)	35% (55/158)
	Post-PV MF	22	65 (47–75)	64	100% (22/22)	7.7% (1/13)	7.7% (1/13)	5% (1/20)
	Post-ET MF	15	63 (39–75)	80	47% (7/15)	10% (1/10)	12.5% (1/8)	31% (4/13)
	Post-PV AML	11	64 (48–87)	64	100% (11/11)	0% (0/7)	20% (1/5)	36% (4/11)
	Post-ET AML	5	64 (50–75)	60	60% (3/5)	0% (0/5)	25% (1/4)	20% (1/5)
	Post-PMF AML	27	66 (49–83)	74	48% (13/27)	9% (2/22)	0% (0/7)	35% (8/23)

Abbreviation: NA, not done or not available.

<sup>a</sup>Includes JAK2 exon 12 mutations: two cases from Mayo clinic and one case from Harvard.

**Tabella 27.**

Dall'analisi è emerso che 38 pazienti erano mutati per i geni IDH: 18 a carico del gene IDH1 (10 R132S, 7 R132C ed 1 R132G) e 20 a carico del gene IDH2 (18 R140Q, 1 R140W e 1 R172G) (come mostrato in tabella 28)

Variables	Number of patients	IDH mutated (IDH1 or IDH2), n (%)	IDH1 mutated, n	IDH2 mutated, n	P-value
All patients	1473	38	18	20	<0.01
PV	421	8 (1.9%)	2	6	
ET	594	5 (0.8%)	1	4	
PMF	312	13 (4.2%)	7	6	
Post-PV MF	54	1 (1.9%)	0	1	
Post-ET MF	41	0	0	0	
Post-PV AML	12	3 (25%)	2	1	
Post-ET AML	7	0	0	0	
Post-PMF AML	32	8 (25%)	6	2	
JAK2 mutated vs wild type (n = 629) <sup>a</sup>	389 vs 240	14 (3.6%) vs 10 (4.2%)			0.72
MPL mutated vs wild type (n = 364) <sup>a</sup>	23 vs 341	1 (4.3%) vs 18 (5.3%)			0.85
TET2 mutated vs wild type (n = 237) <sup>a</sup>	31 vs 206	1 (3.2%) vs 13 (6.3%)			0.5
JAK2 46/1 nullizygous vs not nullizygous (n = 596) <sup>a</sup>	189 vs 407	11 (5.8%) vs 12 (2.9%)			0.09

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; IDH, isocitrate dehydrogenase; PMF, primary myelofibrosis.

<sup>a</sup>Analysis limited to Mayo clinic patients only and 'n' signifies number of patients evaluated.

#### Tabella 28.

Le mutazioni dei geni IDH sono quindi risultate essere poco frequenti nella fase cronica delle NMP mentre la frequenza aumenta significativamente nella fase blastica della malattia (  $p=.01$ ): in particolare abbiamo trovato 5 mutazioni (0.8%) nei pazienti con TE, 8 (1.9%) nei pazienti con PV, 13 (14.1%) nei pazienti con PMF, un solo caso (1%) nelle forme secondarie di mielofibrosi e 11 casi (21.6%) nelle LAM secondarie a NMP.

Inoltre abbiamo osservato che la frequenza delle mutazioni dei geni IDH sono simili tra i pazienti mutati per JAK2 (3.6%), MPL (4.3%) e TET2 (3.2%) suggerendo che la frequenza mutazionale di IDH non sembra essere influenzata né dal tipo di mutazione coesistente né dalla presenza o assenza di specifiche mutazioni (  $p=.96$ ).

Al contrario considerando i soli pazienti informativi (n=629) abbiamo osservato una correlazione tra la presenza delle mutazioni di IDH con l'assenza dell'aplotipo 46/1 del gene JAK2 sia considerando insieme la fase cronica e quella blastica della malattia (  $p=.007$ ) sia separatamente (  $p=.04$ ).

Al fine di ottenere una popolazione di pazienti omogenea e sufficientemente numerosa per l'analisi delle correlazioni cliniche e della rilevanza prognostica, abbiamo deciso di limitare la nostra attenzione ai soli pazienti affetti da PMF ( n=138) di cui 111 in fase cronica ( includenti 7 pazienti mutati per IDH) e 27 in fase blastica (includenti 8 pazienti mutati per IDH). In entrambe le coorti di pazienti la presenza delle mutazione dei geni IDH non sembrano essere influenzate dall'età (  $p=.51$  e  $p=.70$ , rispettivamente) o dal sesso (  $p=.09$  e  $p=.3$ , rispettivamente).

Considerando i fattori prognostici più significativi nella fase cronica di malattia abbiamo osservato che i pazienti mutati per i geni IDH erano più frequentemente inclusi in categorie di rischio citogenetico basso od intermedio; seppur non significativa, questa

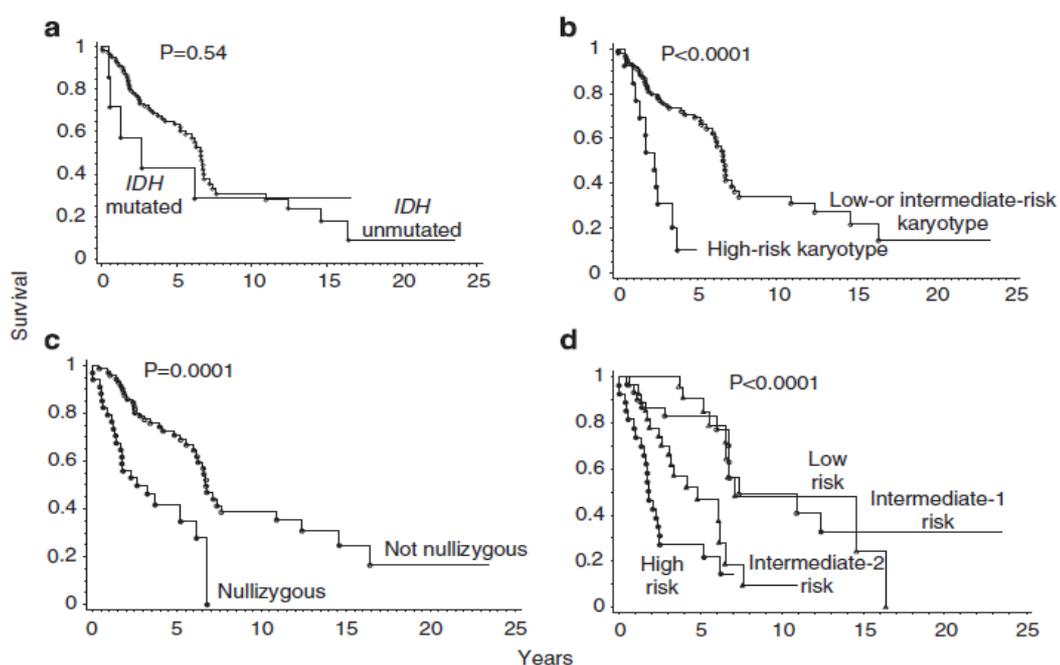
differenza si manteneva anche durante la fase blastica in cui i pazienti mutati presentavano raramente un cariotipo complesso ( Tabella 29).

Variables	N	IDH mutated (IDH1 or IDH2), n (%)	P-value
Chronic-phase PMF (JAK2V617F mutated vs wild type)	166 (95 vs 71)	7 (4.2%) (2 (2.1%) vs 5 (7%))	0.12
Blast-phase PMF (JAK2V617F mutated vs wild type)	27 (13 vs 14)	8 (30%) (4 (31%) vs 4 (29%))	0.9
Chronic-phase PMF (JAK2 46/1 nullizygous vs not nullizygous)	158 (55 vs 103)	7 (4.4%) (5 (9%) vs 2 (1.9%))	0.04
Blast-phase PMF (JAK2 46/1 nullizygous vs not nullizygous)	23 (8 vs 15)	8 (35%) (5 (63%) vs 3 (20%))	0.04
Chronic-phase PMF karyotype at diagnosis (high-risk karyotype vs not high-risk)	111 (13 vs 98)	7 (6.3%) (0 (0%) vs 7 (7.1%))	0.32
Blast-phase PMF karyotype at transformation (complex karyotype vs not complex)	22 (11 vs 11)	7 (32%) (0 vs 7 (64%))	0.001

Abbreviations: IDH, isocitrate dehydrogenase; N, number of patients evaluable; PMF, primary myelofibrosis.

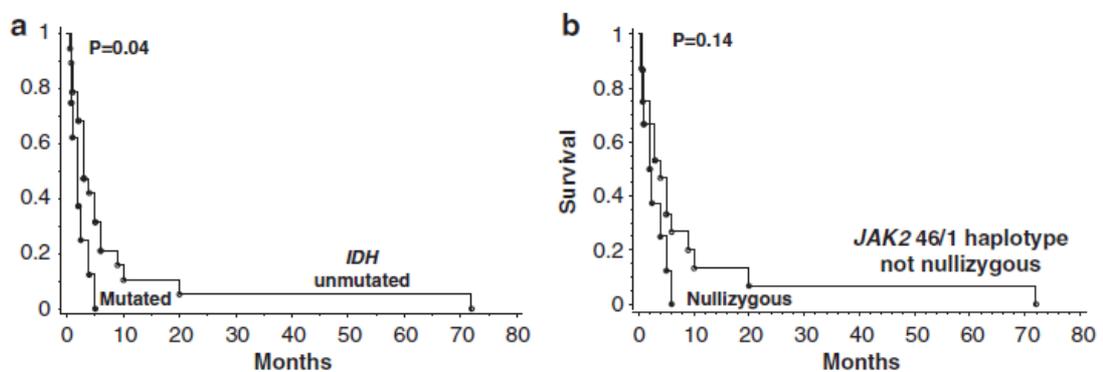
**Tabella 29.** Frequenze relative alle mutazioni dei geni IDH in pazienti con PMF sia in fase cronica che in fase blastica, in accordo allo stato mutazionale di JAK2V617F, all'aplotipo 46/1 e alla citogenetica.

Considerando la sopravvivenza globale (OS) dei soli pazienti in fase cronica, l'analisi univariata mostrava una correlazione statisticamente significativa tra l'OS e l'assenza dell'aplotipo 46/1 ( $p=.0001$ ), la citogenetica sfavorevole ( $p<.0001$ ) ed un alto IPSS secondo IWG-MRT score ( $p<.0001$ ); mentre non abbiamo trovato correlazioni con lo stato mutazione di IDH ( $p=.54$ ), come mostrato in figura 44. Le stesse variabili mantenevano la significatività statistica anche in analisi multivariata come fattori prognostici indipendenti: con un hazard ratio (HR) di 2.2 (intervallo di confidenza (CI) 95%: 1.2-4.2) per l'aplotipo 46/1, un HR di 2.8 (CI 95%: 1.3-5.9) per il cariotipo sfavorevole e un HR di 4.8 (CI 95%: 2.0-11.5) per l'alto IPSS.



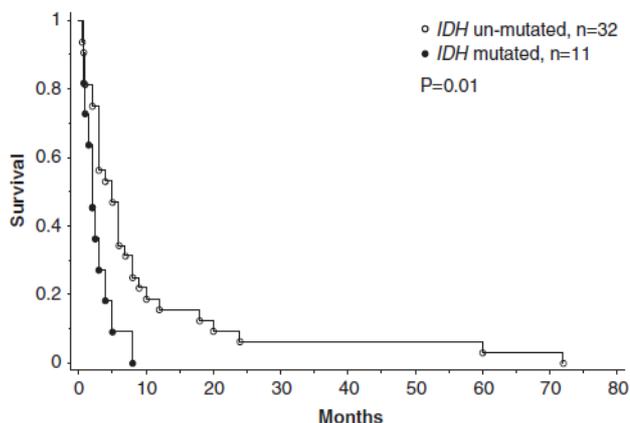
**Figura 44.** Curve di sopravvivenza di pazienti con PMF in fase cronica stratificate in base allo stato mutazionale di IDH (a), il rischio citogenetico (b), l'aplotipo 46/1 di A/Jk2 (c) o le categorie di rischio prognostico secondo l'IPSS (d).

Al contrario considerando la sottopopolazione di pazienti con PMF in fase blastica, nonostante l'associazione con un cariotipo non complesso, la presenza delle mutazioni IDH predicavano una ridotta sopravvivenza ( $p=.04$ ) come mostrato nella figura 45; come per l'assenza dell'aplotipo 46/1 che presentava un simile andamento ( $p=.14$ ). La significatività veniva comunque persa durante l'analisi multivariata, probabilmente per le ridotte dimensioni dei pazienti analizzati.



**Figura 45.** Curve di sopravvivenza di pazienti con PMF in fase blastica stratificate in base allo stato mutazionale di IDH (a) e l'aplotipo 46/1 di JAK2 (b).

Lo stato mutazionale dei geni IDH manteneva un prognostico negativo anche quando l'analisi statistica includeva tutti i pazienti in fase blastica, sia in univariata che in multivariata (figure 46)



**Figura 46.** Curve di sopravvivenza di pazienti con NMP in fase blastica stratificate in base allo stato mutazionale dei geni IDH.

In conclusione questo studio ha meglio caratterizzato alcuni degli aspetti clinici o prognostici associati alla presenza di mutazioni somatiche dei geni IDH. In prima istanza, abbiamo dimostrato che le mutazioni di IDH insorgono sia durante la fase cronica sia durante la fase blastica di una pregressa NMP; e che la frequenza mutazionale è ridotta nelle forme secondarie di NMP. Quest' ultimo aspetto, in combinazione all'aumentata incidenza delle mutazioni nelle forme blastiche, suggerisce un contributo patogenetico delle mutazioni di IDH nella trasformazione leucemica ma non nella trasformazione fibrotica della malattia.

Due osservazioni aggiuntive avvalorano questo aspetto: (i) i pazienti mutati per i geni IDH hanno meno frequentemente un cariotipo complesso, ad indicare un indipendente contributo patogenetico; (ii) l'assenza di una mutua esclusione con altre mutazioni associate alle NMP ( come JAK2V617F, le mutazioni di MPL o le mutazioni di TET2), che suggerisce un ruolo di cooperazione di tutte le alterazioni molecolari conosciute nel determinare una progressione della malattia piuttosto che rappresentarne la causa.

Un'altra osservazione di particolare interesse è l'associazione tra le mutazioni dei geni IDH e l'assenza dell'aplotipo 46/1 di JAK2, che potrebbe suggerire una maggior suscettibilità dei pazienti negativi per l'aplotipo 46/1 ad acquisire anomalie molecolari aggiuntive, che potrebbe risultare in una fase biologicamente più aggressiva della malattia.

Risulta quindi sempre più evidente come mutazioni aggiuntive a quelle già caratterizzate a carico di JAK2 e di MPL siano espresse nelle NMP sia in fase cronica che in fase acuta. Sarebbe quindi di particolare ausilio lo studio combinato di coppie di campioni ottenuti dallo stesso paziente in fase cronica e blastica di malattia al fine di chiarire il contributo individuale sia patogenetico che prognostico di queste mutazioni, oltre a definire un possibile ordine cronologico di comparsa.

I risultati finali di questo studio sono stati pubblicati in *Leukemia* nel 2010 (Tefferi, Lasho et al. 2010).

## SCREENING MUTAZIONALE PER IL GENE EZH2

La scoperta di mutazioni genomiche, in particolare la mutazione JAK2V617F presente in circa il 95% dei pazienti con PV e nel 60% di pazienti con TE e PMF, e delle mutazioni puntiformi a carico del gene MPL nel codone 515 presente in circa 8% di pazienti affetti da PMF e TE, ha consentito di migliorare significativamente l'approccio diagnostico. Tuttavia, molti aspetti della biologia e delle manifestazioni cliniche di queste patologie rimangono poco definiti, soprattutto per quanto riguarda la Mielofibrosi, la cui patogenesi si ritiene essere molto più complessa delle altre NMP. Risulta chiara quindi l'esigenza di un approfondimento sulla patogenesi di queste malattie al fine di avere nuove informazioni per un approccio diagnostico e terapeutico mirato.

Negli ultimi tre anni sono state identificate nuove mutazioni somatiche in geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi delle NMP, come TET2, ASXL1, CBL, IDH e IKKZF1, le cui caratteristiche funzionali però sono ancora da definire. Recentemente il gruppo di Nick Cross ha identificato alcune Mutazioni in corrispondenza del gene EZH2 (Ernst et al, Nat Gen 2010), in un'ampia popolazione di pazienti affetti da NMP, MDS e LAM, con conseguente inattivazione dell'attività metiltrasferasica della proteina stessa, suggerendone un ruolo come soppressore tumorale nei disordini mieloidi.

In collaborazione con NGRL (Wessex) Salisbury District Hospital (diretto dal Prof. Nick Cross, Salisbury, Wiltshire, UK) dove ho trascorso un breve periodo di tempo per acquisire le metodologie per valutare lo stato mutazionale del gene EZH2, abbiamo condotto uno studio di screening su una casistica di 517 pazienti affetti da PMF e mielofibrosi secondaria a PV o TE, al fine di definire con maggior esattezza la prevalenza delle mutazioni e la loro possibile influenza su aspetti clinici e prognostici della malattia.

A tale scopo tutti i pazienti sono stati screenati per il gene EZH2 mediante analisi HRM.

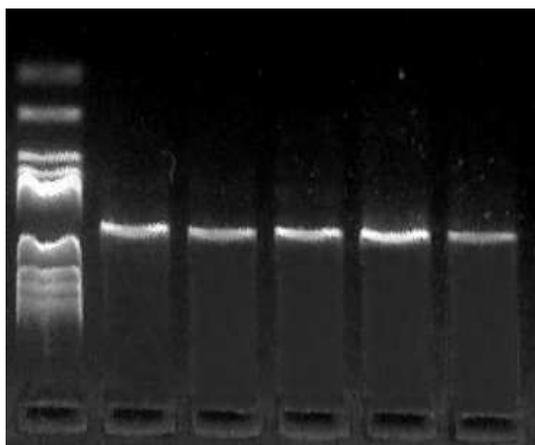
Dopo aver ottenuto il consenso informato, è stata prelevato la frazione granulocitaria da sangue periferico da pazienti affetti da mielofibrosi primaria, secondaria a PV ed ET e soggetti sani.

Lo studio è stato condotto analizzando 370 pazienti con mielofibrosi primaria, 84 con mielofibrosi secondaria a policitemia vera (PPV) e 64 con mielofibrosi secondaria a trombocitemia essenziale (PET).

Il primo approccio all'analisi delle mutazioni del gene EZH2 è stato quello di caratterizzare il gene stesso dal punto di vista strutturale e funzionale. Dopo aver

verificato la zona di mappatura del gene, 7q36, e la sua divisione in 20 esoni, sono stati disegnati primers specifici per ogni esone.

Il DNA, precedentemente estratto dai granulociti dei pazienti arruolati, è stato amplificato mediante Whole Genome Amplification che ha permesso di ottenere 10 $\mu$ g di DNA a partire da 10ng. Il prodotto di amplificazione è stato poi separato su gel di agarosio all'1.5% e analizzato mediante il programma Kodak 1 DLE 3.6 (Figura 47).



**Figura 47** : DNA amplificato mediante Whole Genome Amplification

Per eliminare i contaminanti di reazione, le piastre contenenti i campioni amplificati sono state purificate mediante il cleanup. Per le successive reazioni di HRM, le piastre di campioni sono state diluite 1:100 in modo da avere la concentrazione ideale di DNA (20 ng/ $\mu$ l). Inoltre per potere avere una curva di HRM e un profilo di melting di riferimento, in tutte le reazioni di HRM, i profili di HRM e melting dei pazienti sono stati confrontati con quelli di un controllo sano.

Di seguito tutti i pazienti sono stati analizzati per ogni esone del gene EZH2 e la reazione è stata eseguita utilizzando 100% di DNA del paziente. Successivamente, per poter identificare anche eventuali mutazioni in omozigosi, sono state eseguite altrettante reazioni di HRM utilizzando 90% di DNA del paziente e 10% DNA di controllo. Prendendo come riferimento i controlli negativi, per ogni soggetto screenato sono stati analizzati attentamente i punti di flesso del profilo di HRM e il numero e le caratteristiche dei picchi delle curve di melting: questa minuziosa analisi ci ha permesso di discriminare due ampliconi che differiscono anche di una sola base. Per validare la specificità della metodica i campioni, il cui profilo di melting risultava diverso da quello dei controlli sani, sono stati sottoposti a sequenziamento. Per una maggiore veridicità dei dati trovati, il

sequenziamento è stato eseguito utilizzando sia il primer forward sia il primer reverse di ogni esone all' interno del quale è stata riscontrata una mutazione.

I risultati del sequenziamento hanno confermato la presenza di 30 pazienti mutati: 23 PMF (6%) e 7 PPV/PET (5%). Tutte le mutazioni esoniche identificate erano di tipo missenso in eterozigosi causate dalla sostituzione di un singolo nucleotide; mentre 3 (10%) erano in forma eterozigote. Sono state inoltre identificate 4 mutazioni introni che, di cui 3 localizzate in siti putativi di splicing. In totale abbiamo identificato 23 mutazioni esoniche di cui 4 già descritte nel lavoro inglese (Ernst et al. Nat genetics 2009). Nove (34.6%) delle mutazioni esoniche sono localizzate a livello del dominio catalitico SET della proteina EZH2, 10 (38.4%) all' interno dei 2 domini SANT- DNA bd.

Nella tabella 30 sono elencate le mutazioni identificate nel gene EZH2.

ID patient	gender	Age	Diagnosis	EZH2 EX	EZH2 mutation type	JAK2	MPLW515L/K
1116	M	68	PMF	EX18	74938G>GA:679V>V/M	Negative	Negative
1101	F	53	PET	EX9	64693A>AG:322N>N/S	Negative	Negative
334	M	70	PMF	INT4-5	51571A>AG Splice site mutation	Positive	Negative
203	M	57	PMF	INT19-20	75253G>A Splice site mutation	Negative	Negative
1235	M	90	PMF	EX9	64693A>AG:322N>N/S	Positive	Negative
915	F	57	PMF	EX8	57825G>GA:288R>R/Q	Negative	Negative
600	F	56	PET	EX5	54557T>TA:149L>L/Q	Negative	Negative
1063	M	67	PMF	EX18	75013G>GC:704V>V/L	Positive	Negative
1333	F	56	PMF	EX18	74938G>A:679V>M	Negative	Negative
3405	M	61	PPV	EX5	54560T>TC:150I>I/T	Positive	Negative
384	M	65	PMF	EX17	73990G>C:677D>H	Positive	Negative
1527	F	77	PMF	EX15	:70231C>CT:573T>T/I	Negative	Negative
2615	M	57	PET	INT16-17	72749_72753het_delCTTTA Splice site mutation	Negative	Negative
87	F	45	PMF	EX18	74972G>GA:690R>R/H	Negative	Negative
91	M	63	PMF	EX4	51614C>CT:96I>I/I	Positive	Negative
275	F	52	PET	INT5-6	54608C>CT	Negative	
276	M	77	PET	EX5	54514G>A:135G>R	Positive	Negative
9	F	38	PMF	EX15	70231C>CT:573T>T/I	Positive	Negative
71	M	41	PMF	EX15	70210G>GA:566R>R/H	Negative	Negative
68	M	55	PMF	EX9	64693A>AG:322N>N/S	Positive	Negative
BCN-12	F	47	PMF	EX6	55584G>T Splice site mutation	Negative	Negative
BCN-19	M	79	PMF	EX3	37794C>T:63R>X	Positive	Negative
BCN-26	M	70	PMF	EX5	54505C>CT:132P>P/S.	Positive	Negative
BCN-30	M	72	PMF	EX3 EX19	37786G>GA:60W>W/X 75234A>AT:726E>E/V	Negative	Negative
BCN-33	M	81	PMF	EX5	54545T>TC:145F>F/S	Negative	Negative
08-6467	M	51	PMF	EX15	70195G>G/A:591R>R/H	Negative	Negative
Z19	M	53	PMF	EX14	69394C>CT:553Q>Q/X	Negative	Negative
Z2425	F	72	PMF	EX19	75244_75245het_insT	Positive	Negative
Soton 003	M	78	PMF	EX19	76620C>CA:733Y>Y/X	Negative	Negative
Soton 017	M	78	PET	EX18	74972G>GA:690R>R/H	Positive	Negative

**Tabella 30.**

Per accertarci che le mutazioni riscontrate non fossero SNPs, è stata fatta l'analisi del germline: quando è stato possibile, ai pazienti sono state prelevate cellule della mucosa buccale dalle quali è stato estratto il DNA. Il risultato del sequenziamento ha confermato l'esistenza delle mutazioni.

Le immagini riportate in Figura 48 mostrano : la curva di HRM (a), il profilo di melting (b), i risultati del sequenziamento del DNA estratto dai granulociti (c) e il risultato del sequenziamento del DNA estratto dalla mucosa buccale (d) di un paziente mutato.

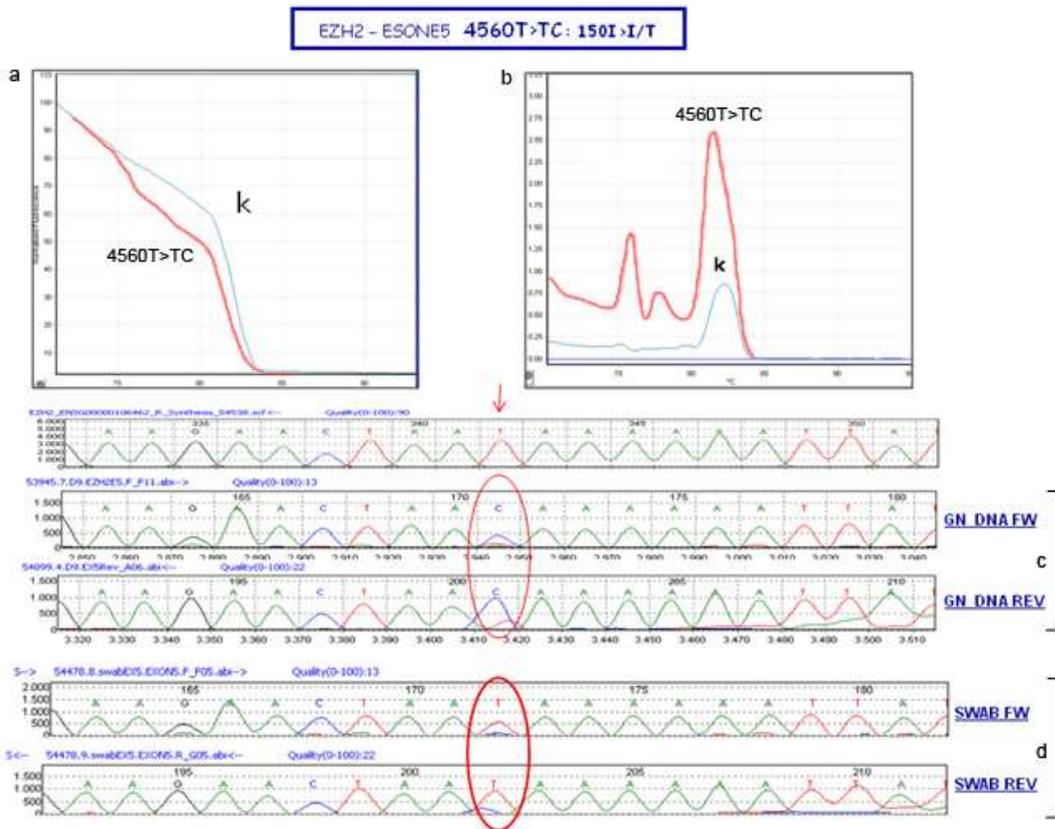


Figura 48.

Tutti i pazienti mutati per EZH2 risultano essere MPL negativi ed IDH1/IDH2 negativi, mentre per quanto riguarda la mutazione V617F di JAK2 13 (43%) pazienti risultano mutati. Non sono state ancora chiarite le conseguenze delle mutazioni da un punto di vista funzionale: il dominio catalitico SET è responsabile dell'attività metiltransferasica e le mutazioni riscontrate al suo interno potrebbero impedire la metilazione del H3K27 con conseguente alterazione della regolazione epigenetica. Seguendo il lavoro precedentemente presentato da Ernst e collaboratori, sarebbe opportuno proseguire lo studio mediante analisi in western blot o citofluorimetria per confrontare l'espressione della proteina EZH2 e la presenza/assenza di trimetilazione tra pazienti mutati e pazienti non mutati.

Nella Tabella 31 sono riassunte le principali caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti inclusi nello studio con le relative significatività.

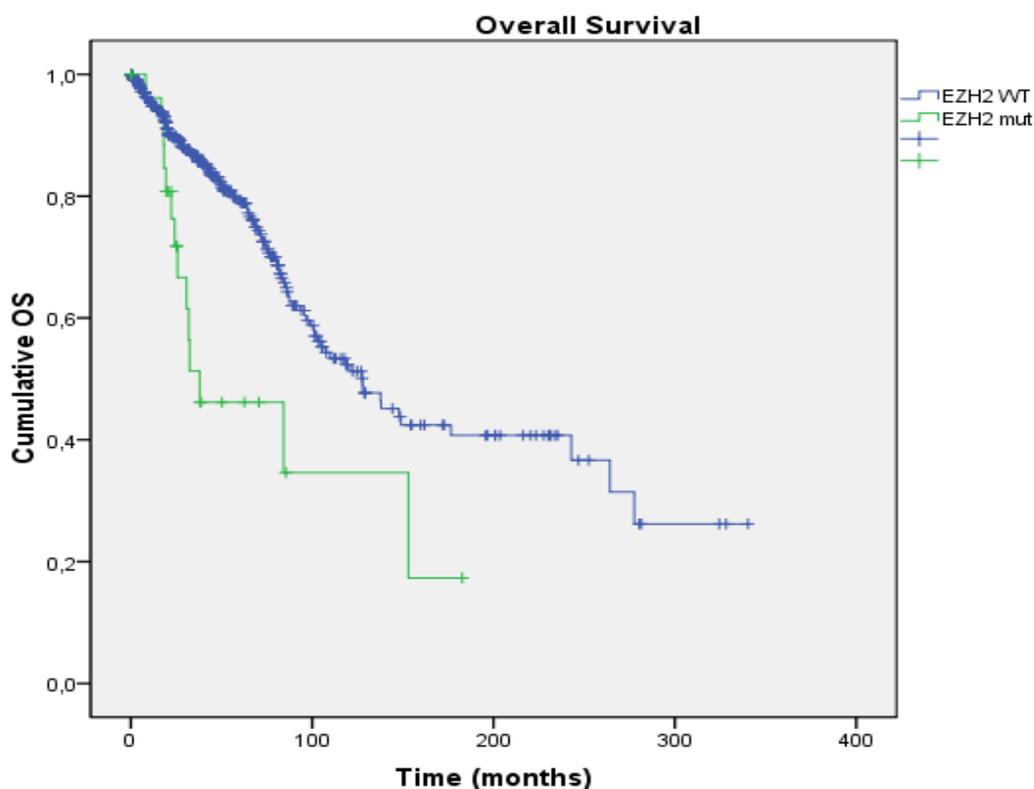
		<b>EZH2 WT</b>	<b>EZH2 mut</b>	<b>p</b>
<b>N.</b>		488	30	
<b>Age n=510 mean</b>		59.0	62.8	ns
<b>Gender (Female) n=303</b>		283	20	ns
<b>Diagnosis PMF/PPV/PET</b>		347/83/58	23/1/6	ns
<b>IWG-MRT score n=264</b>	Low	70	4	ns
	Int-1	65	8	
	Int-2	64	2	
	High	41	10	
<b>WBC x106/L n=500 mean</b>		12.93	17.11	.02
<b>Hb g/dL n=497 mean</b>		11.41	10.99	ns
<b>PLT x106/L n=501 mean</b>		419.4	352.8	ns
<b>Blast cells % n= 329 mean</b>		0.66	1.36	.0003
<b>Constitutional symptoms n=333</b>		101	10	ns
<b>Splenomegaly n=494</b>	0	108	4	ns
	1	198	11	
	2	158	15	
<b>Abnormal Karyotype n=195</b>		43	6	ns
<b>JAK2V617F n=517</b>		308	13	.034
<b>JAK2V617F allele burden % mean</b>		33.79	20.29	.02
<b>MPL W515L/K n=466</b>		18	0	ns
<b>Progression in LA n=443</b>		73	8	ns
<b>Death n=494</b>		114	14	.006
<b>FU (months)n=500</b>		54.64	39.33	.05

Tabella 31.

La maggior parte dei pazienti EZH2 mutati erano inclusi nella categoria ad alto rischio (19.6%) rispetto alla categoria a basso rischio (5.4%)( $p=.003$ ). Dall'analisi è emerso che i pazienti mutati per EZH2 presentavano un significativo aumento della conta leucocitaria ( $p=.02$ ) e della percentuale di blasti nel sangue periferico ( $p=.003$ ). Non abbiamo invece osservato differenze statisticamente significative tra il gruppo di pazienti WT o mutati per EZH2 per quanto riguarda l'età, il sesso, i sintomi costituzionali, la splenomegalia, altre caratteristiche ematologiche e soprattutto con la progressione in leucemia acuta. Infatti, 81 pazienti progrediscono in leucemia acuta, 30.29% vs 28.57% dei pazienti EZH2 WT o mutati, rispettivamente.

Dopo un media di 38 mesi, 128 (24.7%) pazienti risultano deceduti durante il periodo di osservazione.

Le curve di sopravvivenza hanno invece mostrato una riduzione significativa della sopravvivenza nei pazienti EZH2 mutati (55 vs 39 mesi;  $p=.05$ ), come illustrato nella figura 49.



**Figura 49.** Analisi di Kaplan-Meier sulla sopravvivenza di pazienti con mielofibrosi primitiva e secondaria stratificati in base allo stato mutazionale di EZH2.

Dall'analisi multivariata è emerso che gli unici fattori indipendenti associati alla sopravvivenza sono l'alta categoria di rischio secondo l'IPSS score ( $p < .0001$ ), una carica allelica inferiore al 25% ( $p = .04$ ) e presentare almeno una mutazione nel gene EZH2 ( $p = .002$ ).

In conclusione questo studio si è focalizzato sul gene EZH2, che mappando in una regione critica nelle neoplasie mieloidi, potrebbe influenzare la patogenesi della malattia. Lo studio è stato condotto su una coorte di 518 pazienti affetti da mielofibrosi primaria e mielofibrosi secondaria a PV e TE. Allo scopo di identificare eventuali mutazioni, la loro frequenza e la loro influenza sul decorso della malattia, tutti i pazienti sono stati screenati per il gene EZH2 mediante analisi HRM. Lo screening mutazione ha identificato 30 mutazioni del gene EZH2, alcuni dei quali presentano una mutazione a livello esonico e un'altra a livello intronico. È nostra intenzione proseguire lo studio caratterizzando con più precisione le mutazioni introniche e cercare di definire, mediante studi di citofluorimetria e di analisi in western blotting, il ruolo funzionale di queste mutazioni. Inoltre con questo studio abbiamo identificato per la prima volta la presenza di mutazioni a carico del gene EZH2 anche in pazienti affetti da mielofibrosi secondaria a PV e ET pari al 5% dell'intera popolazione, sarà quindi interessante analizzare i campioni di questi pazienti prima della evoluzione in mielofibrosi in modo da verificare se le mutazioni del gene EZH2 hanno un ruolo nella progressione di queste malattie. Inoltre, ci proponiamo di aumentare casistica di pazienti con forme aggressive di MPN con lo scopo di valutare possibili correlazioni tra la comparsa delle mutazioni e la progressione in leucemia acuta, valutando anche altri possibili geni probabilmente coinvolti in questa fase. Infine abbiamo dimostrato che la presenza di almeno una mutazione a carico del gene EZH2 è correlata con una ridotta sopravvivenza, rappresentando un fattore prognostico negativo indipendente.

## RUOLO DEL MICRORNA-16 NELLA PATOGENESI DELLA POLICITEMIA VERA

La formazione e lo sviluppo di una neoplasia è scandito dal susseguirsi di eventi mutazionali, riarrangiamenti cromosomici e alterazioni epigenetiche, che coinvolgono geni codificanti elementi chiave nei processi di signaling, crescita cellulare, ciclo cellulare ed apoptosi, cosiddetti proto-oncogeni e geni oncosoppressori. In questo quadro di alterazioni si inseriscono anche i microRNA, che svolgono un'importante funzione di regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale.

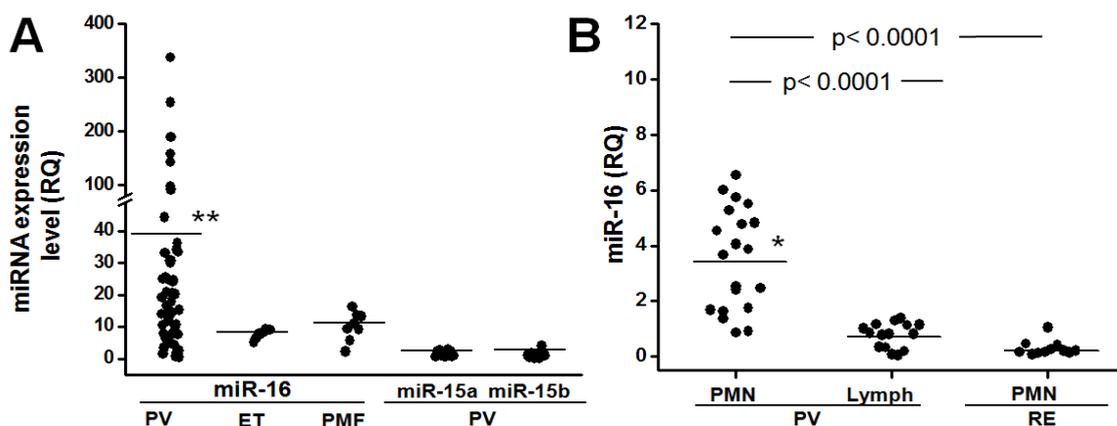
Il miR-16 è uno dei microRNA più studiati e caratterizzati e costituisce un ottimo modello per comprendere il possibile ruolo di queste molecole nella patogenesi tumorale. La famiglia dei microRNA -15 e -16 è infatti coinvolta nella regolazione della crescita cellulare e del ciclo cellulare, inibendo la traduzione di proteine come la ciclina D1 che promuove il passaggio dalla fase G1 alla fase S. Un altro target importante di questa famiglia di microRNA è *BCL2*, che codifica per una proteina con funzione antiapoptotica. I microRNA -15a e 16-1 si trovano in una regione deleta in circa metà dei pazienti con leucemia linfatica cronica; l'assenza di geni con dimostrata funzione patogenetica in questa regione sta ad attestare la possibile funzione dei due microRNA come oncosoppressori.

Alcuni dati suggeriscono che il miR-16 è coinvolto nell'eritropoiesi: infatti è stato osservato che la sua espressione tende ad aumentare nelle fasi tardive del differenziamento eritroide. Muovendo da queste osservazioni ottenute in modelli di eritropoiesi fisiologica, lo scopo di questo studio è stato di valutare il possibile ruolo di questo miRNA nell'alterata eritropoiesi nella Policitemia Vera.

Innanzitutto è stata misurata l'espressione del miR-16 sia nei granulociti che nelle cellule CD34+ (separate da sangue periferico nei pazienti affetti da mielofibrosi e da midollo osseo in tutti le altre patologie) di pazienti affetti da NMP. L'analisi è stata effettuata calcolando i livelli di espressione del miR-16 in RNA estratto da granulociti ottenuti da pazienti affetti da PV, PMF, TE confrontanti con controlli sani; sono stati inoltre considerati soggetti affetti da eritrocitosi reattiva (RE) e quando possibile la valutazione dei livelli di espressione del miR-16 è stata estesa alla frazione linfocitaria dei pazienti con PV (come controllo negativo della emopoiesi, assumendo che la componente linfocitaria non sia parte del clone mieloproliferativo). La valutazione sulle cellule CD34+ e della frazione granulocitaria è stata effettuata in 45 PV, 10 PMF, 10 TE. Dall'analisi eseguita sui granulociti è stata osservata una significativa iperespressione del microRNA nei pazienti

affetti da PV ( $p=0.016$ ) rispetto ai controlli sani (Figura 50B); nelle altre NMP l'espressione del miR-16 era sovrapponibile ai controlli. Al fine di escludere la possibilità che l'iperespressione del miR-16 fosse esclusivamente un fenomeno associato alla stimolazione dell'eritropoiesi, abbiamo valutato i livelli di espressione del microrna anche in granulociti e, quando possibile, in cellule CD34+ di soggetti con forme reattive di eritrocitosi; come atteso il livelli di espressione in questa categoria di pazienti risultava sovrapponibile a quelli dei controlli sani.

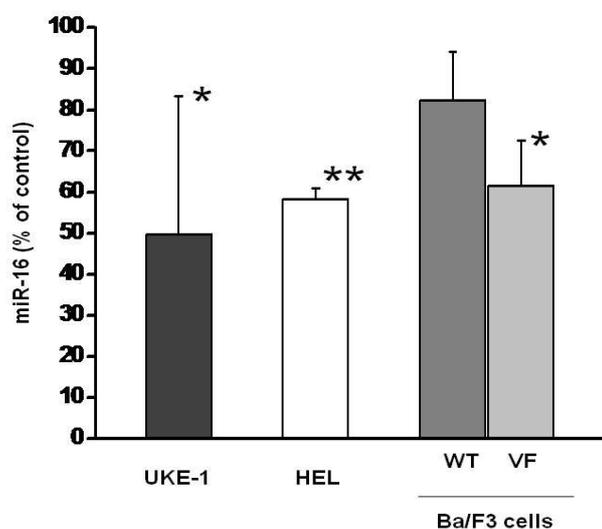
Nelle cellule CD34+ (Figura 50A) l'espressione del miR-16 era significativamente aumentata soprattutto nei pazienti con PV ( $p<.001$ ) rispetto ai controlli sani, mentre i livelli nelle altre NMP erano moderatamente aumentati, ma senza raggiungere la significatività statistica. Come mostrato nella figura l'aumentata espressione del mir-16 era limitata al clone mieloide, dato che la frazione linfocitaria dei pazienti con PV presentava livelli di espressione del miRNA sovrapponibili a quelli dei controlli.



**Figura 50:** Espressione del miR-16 in pazienti con NMP nelle cellule CD34+ (A) e nella frazione granulocitaria (B) si pazienti con Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essenziale (Te), Mielofibrosi Primaria (PMF), Eritrocitosi Reattiva (RE) e controlli sani (Ctr).

Al fine di definire una possibile associazione tra l'espressione del miR-16 nella PV e la via di segnale intracellulare JAK2/STAT, abbiamo trattato cellule JAK2V617F, come le HEL e le UKE-1 (entrambe omozigoti per la mutazione) e cellule murine Ba/F3 iperesprimanti il trascritto mutato o WT di JAK con un potente inibitore di JAK2 (AZD1480; Astrazeneca, Boston, USA). Abbiamo quindi esposto queste linee cellulari a concentrazioni del farmaco riferibili ai rispettivi  $Ic_{50}$ : per le HEL  $460\pm30$  nM, per le UKE-1  $100\pm30$  nM, per le Ba/F3 JAK2WT  $500\pm100$  nM mentre per le Ba/F3 JAK2V617F  $300\pm80$  nM.

Come riportato in Figura 51 l'inibitore di JAK2 produce una riduzione del miR-16, statisticamente significativa; suggerendo l'esistenza di una relazione funzionale tra l'attivazione della via JAK2/STAT e l'iperespressione del mir-16.



**Figura 51:** Correlazione tra i livelli di espressione del miR-16 e la carica allelica di Jak2V617F in linee cellulari trattate con AZD1480.

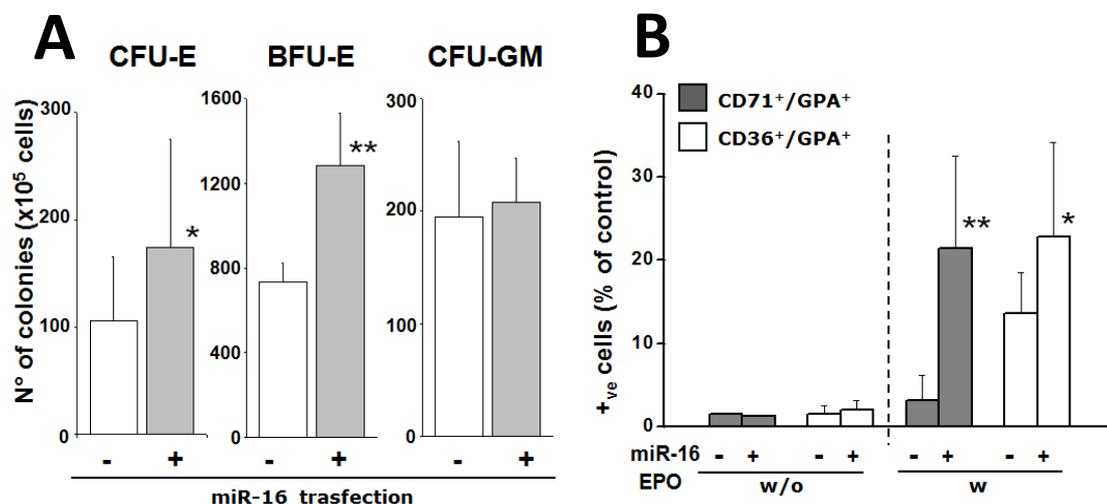
Il miRNA-16 è codificato da due geni diversi, definiti rispettivamente miR-16-1 e miR-16-2, inclusi nello stesso cluster con il microRNA -15a sul cromosoma 13 e microRNA-15b sul cromosoma 3, rispettivamente; è stata pertanto studiata l'espressione individuale di questi due miRNA nelle cellule CD34+ ottenute da pazienti con PMF e PV. L'analisi è stata effettuata negli stessi pazienti nei quali era stata valutata l'espressione del miR-16 e non ha mostrato nessuna variazione dei livelli di miR-15a e 15b rispetto ai controlli (Figura 50A).

Per verificare l'effetto biologico di un'alterata espressione cellulare del miR-16 nell'espansione di progenitori eritroidi, sono stati messi appunto studi funzionali in vitro. Mediante elettroporazione con metodo Amaxa, abbiamo indotto l'iperespressione transiente del miR-16 in colture cellulari ottenute da cellule CD34+ di controlli sani. La trasfezione del microRNA maturo è stata effettuata al sesto giorno di coltura eritroide, considerando la normale cinetica di espressione del miRNA. Come controllo, una parte delle cellule sono state trasfettate con un costrutto di controllo("scramble"). L'efficienza di trasfezione è stata verificata dopo 24 ore valutando i livelli di espressione del miR-16 mediante PCR quantitativa. Le cellule trasfettate sono state successivamente poste in coltura liquida e semisolidi con citochine pro-differenziative e ne è stato valutato il commissionamento con test clonogenici e mediante metodica citofluorimetrica. Nelle colture trasfettate con il miR-16 maturo è stato osservato un aumento significativo della

formazione di colonie eritroidi rispetto alle colture trasfettate con il costrutto di controllo ( $p < 0.001$ ). Abbiamo infatti osservato che il numero di BFU-e ( $670 \pm 35 \times 10^3$  vs  $1330 \pm 180 \times 10^3$  cellule,  $p = .004$ ) e di CFU-e ( $105 \pm 60 \times 10^3$  vs  $174 \pm 100 \times 10^3$  cellule,  $p = .02$ ) era significativamente aumentato se confrontato con la coltura "scramble". Al contrario, non abbiamo osservato differenze nel numero di colonie mieloidi (Figura 52A).

Le cellule trasfettate con il microRNA mostravano un significativo incremento dell'espressione dei markers di superficie come GPA+/CD36+ ( $12 \pm 3\%$  vs  $23 \pm 9\%$ ,  $p = .031$ ) e GPA+/CD71+ ( $5 \pm 3\%$  vs  $22 \pm 9\%$ ,  $p < .001$ ) suggerendo un commissionamento della popolazione cellulare verso il lineage eritroide, rispetto alle cellule trasfettate con il costrutto di controllo (Figura 52A); la presenza di eritropoietina era comunque necessaria per la maturazione eritroide indipendentemente dalla trasfezione o meno con il microRNA (figura 52B).

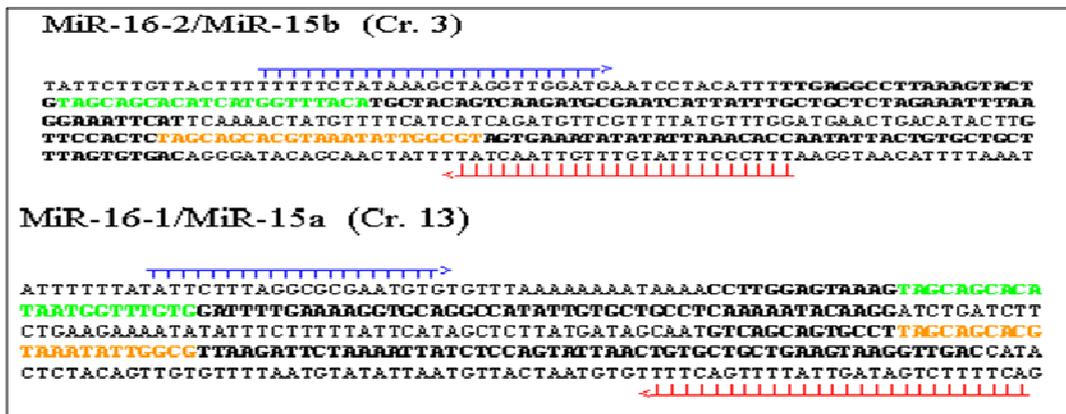
Inoltre, per valutare il ruolo di miR-16 durante il patologico differenziamento eritroide nella PV, abbiamo trasfettato cellule CD34+ purificate da PV con un siRNA specifico per la forma matura di miR-16. Le cellule sono state poste in coltura semisolda per 14 giorni e si è quindi valutato il numero di colonie eritroidi spontanee che si sono formate.



**Figura 52.** Effetto dell'aumentata espressione del mir-16 in cellule CD34+ ottenute da donatori sulla conta di progenitori eritroidi e mieloidi (A) e sull'espressione di marks legati al differenziamento eritroide (B).

Abbiamo quindi effettuato un'analisi a livello genomico al fine di evidenziare possibili mutazioni o riarrangiamenti. In prima istanza sono state escluse delezioni a livello del braccio lungo del cromosoma 13, osservate ad esempio nella leucemia linfatica cronica e talvolta nella Mielofibrosi. Per fare ciò è stata effettuata un'analisi FISH con sonde fluorescenti specifiche per la regione deleta (13q14). La presenza di entrambi i segnali all'interno dei nuclei ha dimostrato l'assenza di delezioni nella regione.

Per evidenziare mutazioni nei geni codificanti il miR-16 sono state sequenziate entrambe le regioni sui cromosomi 3 e 13. I primers sono stati disegnati in modo da comprendere una regione abbastanza ampia, contenente l'intera sequenza del pre-miR-16-1 e del pre-miR-15a sul cromosoma 13 e del pre-miR16-2 e pre-miR-15b sul cromosoma 3 (Figura 53).

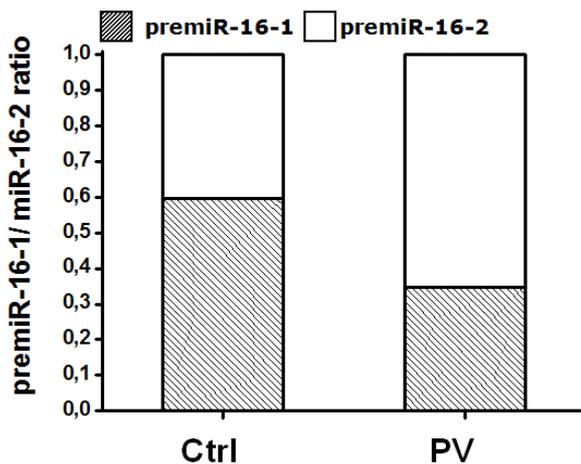


**Figura 53:** Sequenze dei locus contenenti i geni per i microRNA -15 e -16. Le sequenze dei precursori sono segnate in grassetto. La sequenza dei microRNA -15a e 15b maturi sono evidenziate in verde. La sequenza del miR-16 maturo è evidenziata in arancio. Sono riportate le sequenze e la posizione dei primers utilizzati per il sequenziamento (FW in blu, REV in rosso).

E' stato amplificato e sequenziato il DNA ottenuto da granulociti di 10 pazienti, che presentavano i più alti livelli di espressione del miR-16 maturo, confrontandolo a quello di 4 donatori e alla corrispondente sequenza ottenuta da BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Nessuna mutazione è stata trovata nei due geni. Al fine di valutare se l'iperespressione del miR-16 fosse attribuibile all'amplificazione di uno o entrambi i geni è stata condotta un'analisi del numero di copie dei geni codificanti i microRNA -16-1 e -16-2. In collaborazione con l'Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. e A. Seràgnoli" Università degli Studi Bologna è stata condotta quindi un'analisi di Copy Number Variation utilizzando una metodica SNP Array con piattaforma Affymetrix; successivamente abbiamo utilizzato una metodica di tipo quantitativo mediante Real-time PCR con chimica SYBR Green per la quale sono state disegnate due coppie di primers che amplificano la sequenza del pre-miR-16-1 e del pre-miR-16-2 sul DNA genomico. Come gene di riferimento è stato utilizzato HCK, gene presente in singola copia e non soggetto a riarrangiamenti (Kröger et al. Blood 2007). In tutti i campioni esaminati non sono state evidenziate alterazioni del numero di copie dei due geni codificanti il miR-16.

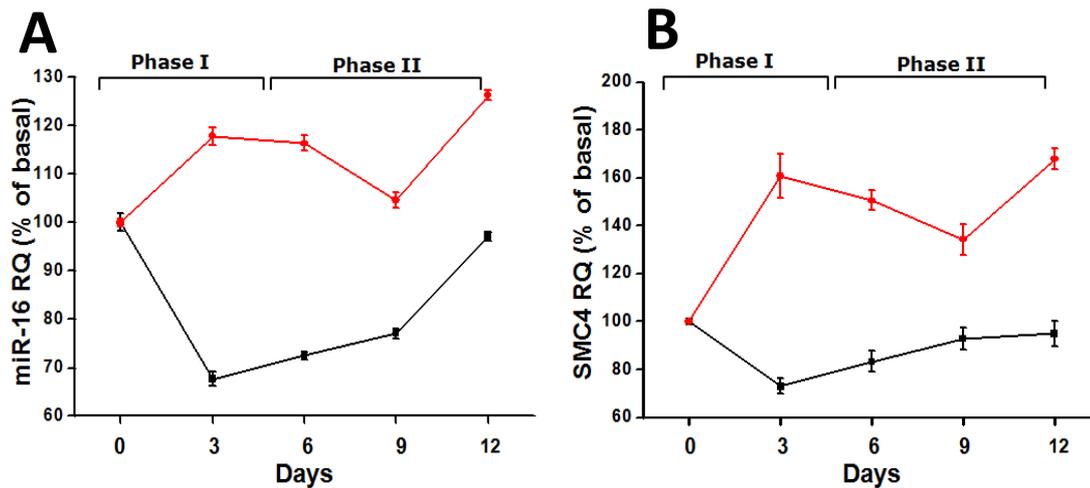
Per comprendere se i livelli aumentati di miR16 maturo fossero da scrivere ad una preferenziale attivazione di una delle due forme del microRNA, abbiamo misurato i livelli di

RNA dei due diversi precursori, il pre-miR-16-1 ed il pre-miR-16-2, mediante real-time PCR, in cellule CD34+ purificate da pazienti con PV e da soggetti sani. Dall'analisi dei livelli di espressione abbiamo osservato che il rapporto tra pre-miR-16-1/pre-miR-16-2 era pari a  $0.6 \pm 0.05$  nei controlli e a  $0.34 \pm 0.11$  nelle PV ( $p = .0013$ ) suggerendo quindi una prevalenza di mir-16 maturo derivante dal pre-mir-16-2 (Figura 54)



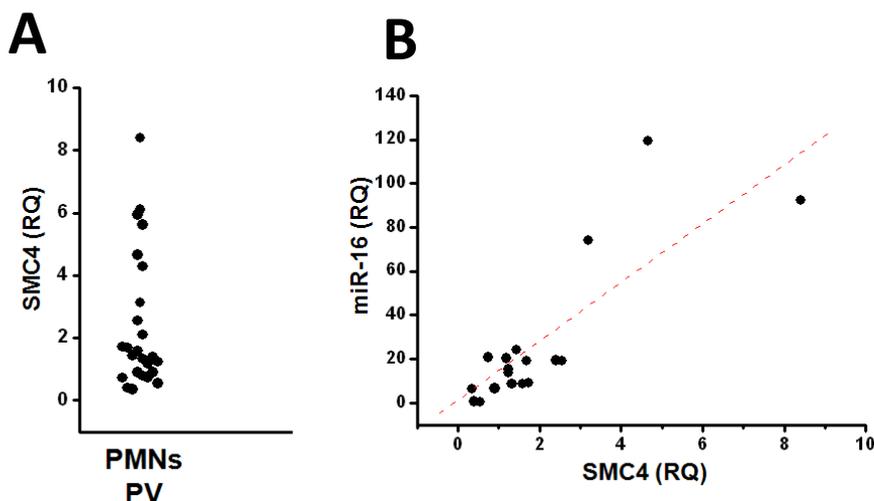
**Figura 54.** Rapporto tra i livelli di espressione del pre-miR-16-1 e del pre-miR-16-2 in cellule CD34+ di controlli sani e pazienti con PV.

Per comprendere e evidenziare il ruolo del miR-16 nell'eritropoiesi patologica, è stato valutata l'espressione del miR-16 durante il differenziamento eritroide (Figura 55A). Sono state allestite colture cellulari in due fasi: una prima fase proliferativa (Medium serum-free, IL-3, IL-6, SCF) per espandere il pool di progenitori, ed una seconda fase differenziativa, nella quale viene indotta la maturazione verso il lineage eritroide (Medium serum-free, IL-3, SCF, Epo). Le colture sono state ottenute da cellule CD34+ di controlli sani e di PV, la valutazione dell'espressione del miR-16 è stata effettuata a vari tempi seguendo il differenziamento delle cellule mediante citofluorimetria. Confrontando i dati ottenuti dalle colture cellulari di PV con quelle ottenute da controlli sani, è stata evidenziata una significativa differenza nelle due cinetiche: l'espressione del miR-16 è significativamente più alta nelle PV in tutti i punti della curva, con un significativo incremento nelle fasi tardive. L'espressione del microRNA è molto alta nelle cellule staminali indifferenziate (24 ore di coltura) e crolla dopo 3 giorni, per poi risalire gradualmente con il procedere del differenziamento. I livelli di miR-16 salgono più rapidamente al sesto giorno, dopo l'aggiunta dell'eritropoietina e toccano il massimo al dodicesimo giorno.



**Figura 55.** Espressione differenziale del miR-16 (a) e di SMC4 (b) in cellule di pazienti con PV rispetto a controlli sani, durante il differenziamento eritroide.

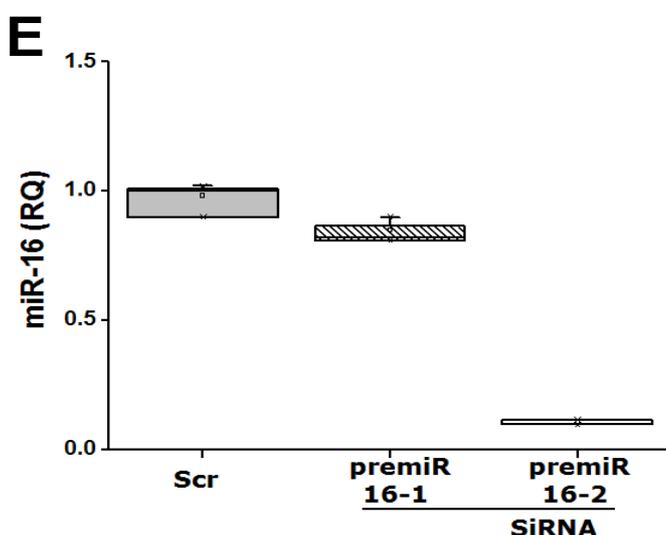
In considerazione del fatto che il gene codificante per il pre-miR-16-2 si localizza in una porzione intronica del gene SMC4 e che la maggior parte dei miRNA intronici sono normalmente co-trascritti con il rispettivo gene ospite, abbiamo valutato i livelli di espressione di SMC4 nella frazione granulocitaria di pazienti con PV ed abbiamo osservato una iperespressione del gene statisticamente significativa se confrontato con i controlli sani ( $r=.76, p=.002$ ) (Figura 56). Inoltre abbiamo valutato la cinetica di espressione di SMC4 durante il differenziamento eritroide di cellule CD34+ di soggetti sani, osservando un andamento dei livelli di espressione sovrapponibile a quelli del miR-16 (Figura 55B).



**Figura 56.** Livelli di espressione di SMC4 in granulociti di pazienti con PV confrontati con quelli dei controlli sani (A). Correlazione tra i livelli di espressione di SMC4 e di miR-16 in granulociti di pazienti con PV (B)

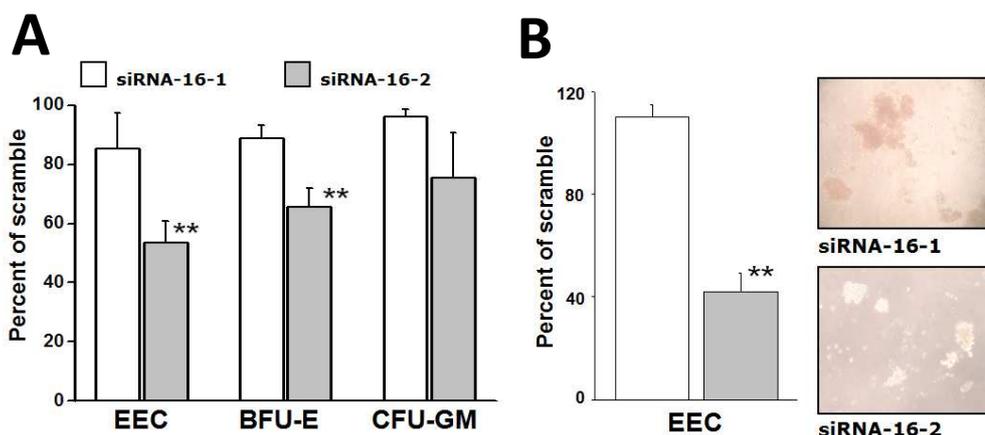
Dal momento che l'iperespressione del miR-16 in cellule di donatori induce un aumento del differenziamento eritroide, abbiamo verificato l'effetto opposto silenziando

l'espressione del microRNA con siRNA modificati con chimica LNA (Locked Nucleic Acid) specifici per i due differenti precursori. Sono stati trasfettati due diversi siRNA, in modo da inibire selettivamente l'espressione del pre-miR-16-1 e -16-2 ed un controllo negativo (scramble) GFP positive, in cellule mononucleate ottenute da pazienti con PV. La valutazione citofluorimetrica dopo 24 ore dalla trasfezione ha mostrato un discreto incremento delle cellule positive al FITC (GFP positive), mentre l'effettivo abbattimento dei livelli di miR-16 è stato valutato mediante PCR quantitativa. E' stato osservato un decremento significativo dell'espressione del miR-16 nei pazienti con PV, solo nelle cellule trasfettate con il siRNA anti pre-miR-16-2 (Figura 57).



**Figura 57.** Livelli di espressione del miR-16 in cellule CD34+ di pazienti con PV trasfettate con siRNA di controllo (scr:scamble) oppure anti-premiR-16-1 o pre-miR-16-2

I risultati ottenuti dall'analisi dei test clonogenici in colture semisolide di cellule mononucleate trasfettate con il siRNA anti pre-miR-16-2 hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa della formazione di colonie eritroidi, rispetto alle colture trasfettate con il siRNA anti pre-miR-16-1 e con il costrutto di controllo ( $p < 0.001$ ); al contrario il numero di colonie mieloidi valutato era sovrapponibile a quello del controllo (Figura 58A). Inoltre abbiamo osservato che anche il numero di colonie eritroidi spontanee (EEC) era significativamente ridotto dopo trattamento con il siRNA anti-pre-miR-16-2. Come mostrato in Figura 58B il siRNA anti-pre-miR-16-2 determina una riduzione di circa il 60% di EEC, e le poche colonie cresciute mostravano piccole dimensioni e difetti di emoglobinizzazione.



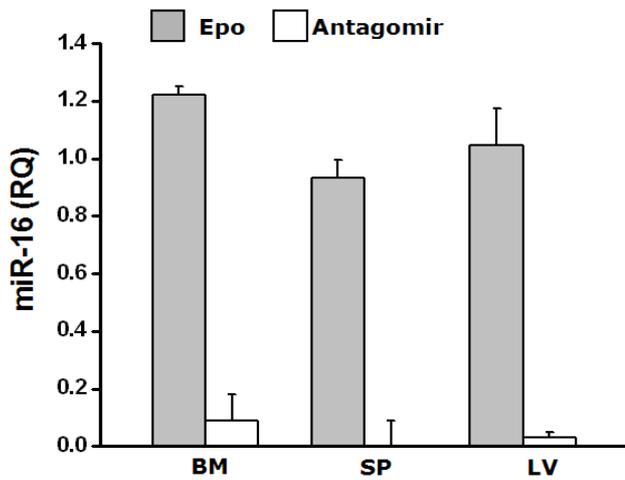
**Figura 58.** Percentuale relativa di colonie eritroidi (BFU-e e CFU-e), mieloidi (CFU-GM) e colonie eritroidi spontanee (EEC) in colture semisolide ottenute da cellule trasfettate con siRNA anti pre.miR-16-1 e pre-miR-16-2, calcolata rispetto allo “scramble”.

Questi risultati definiscono quindi un ruolo del miR-16 durante la normale eritropoiesi sia durante le fasi maturative più precoci sia durante le fasi terminali del differenziamento eritroide; inoltre abbiamo dimostrato che il maggior contributo nell’abnorme espansione eritroide nella PV e nella formazione di EEC è rappresentato dall’iperespressione del pre-miR-16-2.

Infine abbiamo studiato la rilevanza del miRNA-16 nell’eritropoiesi in vivo utilizzando un sistema di silenziamento efficace del mirna-16 mediante oligonucleotidi antisense modificati come gli Antagomir. Questa parte del progetto ha previsto la collaborazione da parte del laboratorio LiGema dell’Università di Firenze.

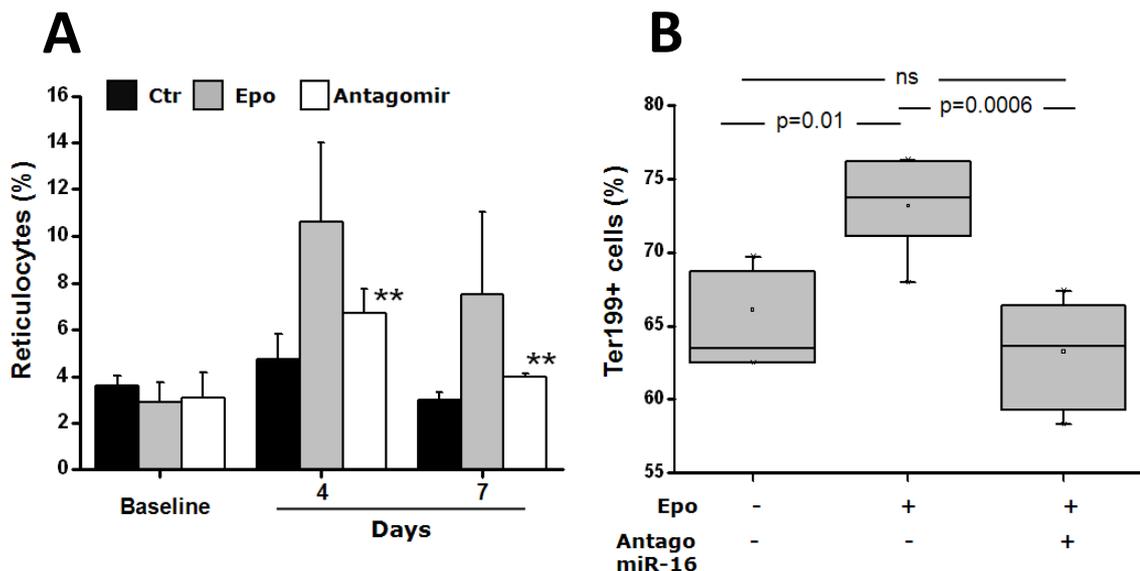
Abbiamo quindi utilizzato un modello utile allo studio dell’eritropoiesi normale trattando 10 topi C56Bl con eritropoietina. Gli animali sono stati trattati con una singola dose di eritropoietina (0.6 U/gr) al giorno 0 seguita, per 4 animali, da tre somministrazioni giornaliere dell’antagomir anti-miR-16 (55µg/gr in 300µL suddivisi in due somministrazioni giornaliere di 150µl ) ed in 6 animali di controllo con volumi equivalenti di soluzione fisiologica. Ad intervalli di due giorni sono stati prelevati campioni di sangue periferico per la valutazione dei parametri ematologici e per la conta reticolocitaria. Al giorno 4 ed al giorno 7 tre animali di controllo e 2 animali trattati con l’antagomir sono stati sacrificati al fine di valutare l’efficacia di silenziamento dell’antagomir e con test clonogenici le capacità differenziali e proliferative dei progenitori eritroidi e mieloidi midollari, le caratteristiche istomorfologiche del midollo osseo, della milza e del fegato e mediante citofluorimetria le variazioni fenotipiche sia delle cellule prelevate dal midollo osseo e dalla milza.

Nella Figura 59 sono mostrati i livelli di espressione del miR-16 in cellule mononucleate ottenute dal midollo osseo, dalla milza e dal fegato degli animali sacrificati mostrando l'efficace silenziamento del mir-16 da parte dell'antagomir.



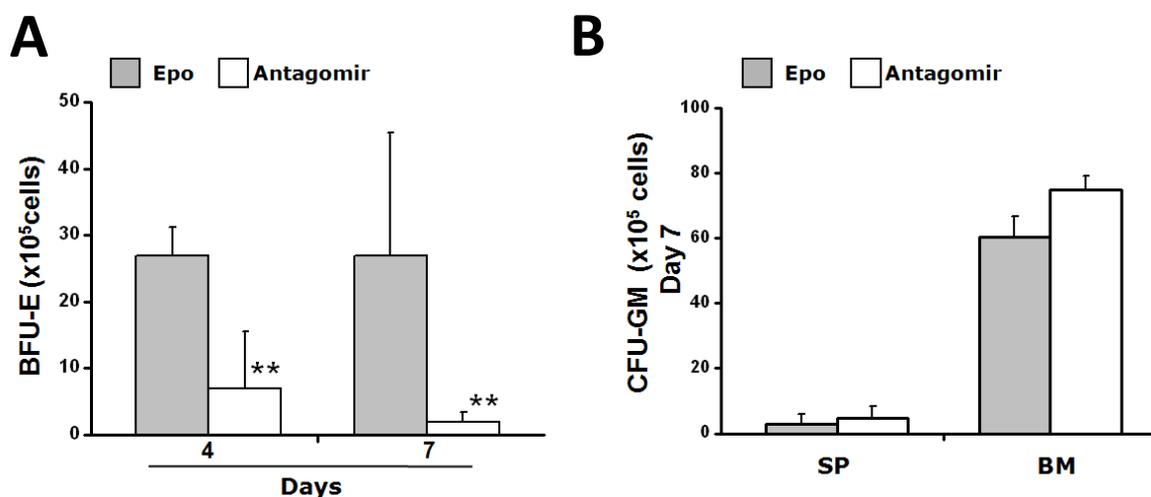
**Figura 59.** Livelli di espressione del miR-16 maturo in frazioni cellulari ottenute dal midollo osseo (BM), dalla milza (SP) e dal fegato (LV) di topi C56Bl trattati con un antagomir anti mir-16, rispetto al controllo non trattato.

La somministrazione di eritropoietina, come atteso, ha determinato un aumento significativo della conta reticolocitaria che risultava fortemente prevenuta dal trattamento con l'antagomir anti-mir-16. (Figura 60A); un effetto del tutto sovrapponibile è stato osservato sulla percentuale di cellule Ter-119+ del midollo osseo che in seguito al trattamento con l'antagomir si presentavano in percentuale simile ai controlli (Figura 60B).



**Figura 60.** Percentuale relativa alla frazione reticolocitaria calcolata nel sangue periferico alla baseline e dopo trattamento con un antagomir anti-miR-16 (A). Proporzione di cellule Ter-119+ nel midollo osseo di topi C56Bl trattato con un antagomir anti-miR-16 (B).

Infine, il numero di BFU-e ottenute dai topi trattati con Antagomir era marcatamente ridotto se confrontato con gli animali trattati con la sola eritropoietina (Figura 61A,  $p < .001$ ), al contrario non abbiamo visto differenze nel numero di colonie mieloidi tra i due gruppi in esame (Figura 61B).



**Figura 61.** Numero di colonie eritroidi (BFU-e, A) e mieloidi (CFU-GM, B) ottenute al giorno 4 e al giorno 7 da cellule di midollo osseo di animali trattati con Antagomir anti-miR-16 o con sola eritropoietina.

Questi risultati sono perfettamente in linea con le osservazioni ottenute negli studi in vitro in cui sopprimendo l'espressione del miR-16 si riduce significativamente la produzione di cellule eritroidi indotte dall'eritropoietina.

In conclusione possiamo affermare che l'espressione del miR-16 risulta essere alterato durante il processo di eritropoiesi nei soggetti affetti da Policitemia Vera e il significato funzionale di questa alterazione è dimostrato dagli esperimenti di up/down-regolazione effettuati in vitro ed in vivo; resta ancora da chiarire il meccanismo alla base dell'aumentata espressione del pre-miR-16-2 in questi pazienti. Oltre alle alterazioni descritte in precedenza, sono stati osservati altri meccanismi in grado di alterare l'espressione dei microrna, quali: modificazioni epigenetiche come la metilazione del DNA a livello delle CpG islands e l'acetilazione degli istoni ad esempio, che sono state dimostrate essere dei meccanismi di regolazione dell'espressione dei geni codificanti microrna (Saito et al. (2006) Cancer Cell). Un altro meccanismo descritto è l'editing post trascrizionale del pre-miRNA. L'editing dell'RNA messaggero è una modificazione sito specifica, che permette di ottenere un prodotto differente a quello codificato dalla sequenza di DNA, tale meccanismo solitamente consiste nella deamminazione di alcune adenosine in inosine ed è operato da una classe di enzimi definiti ADARs (Adenosine

Deaminase acting on RNA). L'editing dei pre-miRNA potrebbe influire quindi sul loro processamento oppure sulla funzione del miRNA maturo stesso (Blow et al. (2006) Genome Biol), (Kawahara et al. (2007) EMBO reports).

Anche i processi mediante i quali il miR-16 agisce sul differenziamento eritroide devono essere indagati, i target di questo microrna stimati mediante approcci computazionali sono moltissimi, servono pertanto metodiche di screening con le quali confrontare questi dati per restringere il campo di ricerca ed individuare le pathways coinvolte. L'eritropoiesi è un processo molto complesso che coinvolge anche meccanismi apoptotici; le fasi finali di differenziamento dei progenitori eritroidi presentano infatti fenomeni apoptotici, necessari per l'enucleazione delle cellule e la formazione di eritrociti maturi. (Testa et al. (2004) Leukemia), (Zermati et al. (2001) J Exp Med). *BCL2*, uno dei target più caratterizzati per la famiglia dei microrna -15 e -16, è un gene molto importante nell'inibizione dell'apoptosi; non è quindi escluso che proprio la regolazione di questo gene da parte del miR-16 possa costituire uno dei meccanismi mediante i quali questo microrna influenza l'eritropoiesi e contribuisce alla patogenesi della Policitemia Vera. Questo lavoro è attualmente in fase di revisione in Blood.

## CONCLUSIONI

Nell'ambito della oncoematologia, le neoplasie mieloproliferative croniche (NMP) sono divenute uno degli argomenti più studiati e discussi degli ultimi anni a seguito della identificazione di alcune alterazioni molecolari ricorrenti che hanno coronato oltre 50 anni di ricerche dalla iniziale descrizione di William Dameshel (1951). Infatti, a partire dal 2005, sono state identificate ad un ritmo quasi incalzante numerose mutazioni, che coinvolgo i geni Janus kinase 2 (JAK2), Myeloproliferative Leukemia Virus (MPL), TET oncogene family member 2 (TET2), Additional Sex Combs-Like 1 (ASXL1), Casitas B-lineage lymphoma protooncogene (CBL), Isocitrate dehydrogenase (IDH), IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1) e Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2). Da un punto di vista funzionale, le alterazioni sopra elencate convergono nella deregolazione della via di segnalazione JAK-STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), nella alterazione di meccanismi molecolari associati alla modulazione epigenetica della trascrizione e nel possibile accumulo di oncoproteine. Tuttavia nessuna di queste mutazioni risulta specifica per le NMP, in quanto, seppure con frequenza variabile e spesso in una minoranza solamente dei soggetti, sono state riscontrate anche in altre patologie oncoematologiche, in particolare nelle forme mielodisplastiche e mieloproliferative/mielodisplastiche. Sono ancora molti gli aspetti da chiarire: in primis, se tali alterazioni siano riconducibili ad un clone ancestrale comune e se, e con quali meccanismi, contribuiscano a determinare il fenotipo clinico, l'evoluzione clonale e/o la trasformazione leucemica.

Questa tesi di dottorato è il frutto dell'attività di ricerca condotta in questo specifico campo nell'arco di un triennio, e si caratterizza per una stretta connessione tra la ricerca di base e quella applicata all'ambito clinico.

Uno degli argomenti sul quale in particolare sono stati ottenuti risultati di un certo interesse, come documentato dalle pubblicazioni effettuate e dalle citazioni che queste stesse hanno ricevuto, è rappresentato dallo studio delle correlazioni tra lo stato mutazionale e/o la carica allelica dei geni mutati, nello specifico la mutazione *JAK2V617F*,

*MPLW515L/K, IDH1/IDH2 ed EZH2*. I principali risultati ottenuti possono essere così elencati:

- 1- Dimostrazione che il fenotipo clinico della mielofibrosi, sia primaria che secondaria a policitemia vera e trombocitemia essenziale, è condizionato dalla presenza della mutazione *JAK2V617F* (considerando infatti che il 60% solamente dei soggetti è mutato) e dalla sua carica allelica, la quale è stata definita come un importante fattore prognostico negativo
- 2- dimostrazione che la mutazione *MPLW515L/K* nella trombocitemia essenziale identifica una sottopopolazione di pazienti con caratteristiche ematologiche e cliniche univoche, pur senza avere valenza prognostica
- 3- riscontro di una correlazione tra l'aplotipo di predisposizione *JAK2 46/1* e lo sviluppo di mielofibrosi sia *JAK2* che *MPL* mutate
- 4- definizione della epidemiologia mutazionale per i geni mutati *IDH1/IDH2* in una ampia casistica di pazienti con le tre MPN classiche
- 5- identificazione del genotipo mutato *EZH2* come un potente fattore di rischio per la sopravvivenza in pazienti con mielofibrosi primaria e secondaria a policitemia vera e trombocitemia essenziale

Per quanto concerne invece gli studi più propriamente biologici, ho completato con successo una serie di esperimenti, coinvolgenti anche un modello animale, che mi hanno consentito di identificare, per la prima volta in letteratura, il coinvolgimento di un microRNA, miR-16-2, in alcuni aspetti della patogenesi molecolare della policitemia vera.

I risultati di queste ricerche sono stati presentati sotto forma di comunicazioni a diversi convegni nazionali ed internazionali e fatti oggetto di pubblicazioni in riviste scientifiche che sono elencate nella sezione che segue e conclude questo lavoro di tesi.

**Elenco delle pubblicazioni relative agli studi presentati in questo elaborato di tesi:**

1. Guglielmelli P, Fatini, C., Lenti, M., Bosi, A., Vannucchi, A.M. JAK2V617F mutation screening in patients with retinal vein thrombosis or recurrent fetal loss. *Thrombosis Research*. 2008;124:377-378.
2. Pancrazzi A, Guglielmelli P, Ponziani V, et al. A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in chronic myeloproliferative disorders with locked nucleic acid-modified probes and real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*. 2008;10:435-441.
3. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;112:844-847.
4. Guglielmelli P, Barosi G, Pieri L, Antonioli E, Bosi A, Vannucchi AM. JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Haematologica*. 2009;94:144-146.
5. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood*. 2009;114:1477-1483.
6. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010;24:1302-1309.
7. Guglielmelli P, Biamonte F, Spolverini A, et al. Frequency and clinical correlates of JAK2 46/1 (GGCC) haplotype in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2010;24:1533-1537.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas, S., S. Lugthart, et al. (2010). "Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value." Blood **116**(12): 2122-2126.
- Antonioli, E., P. Guglielmelli, et al. (2005). "Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia." Leukemia **19**(10): 1847-1849.
- Antonioli, E., P. Guglielmelli, et al. (2008). "Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia." Haematologica **93**(1): 41-48.
- Baker, E. J., D. A. Gerard, et al. (2002). "HL-60 cell growth-conditioned medium is an effective inducer of myeloperoxidase expression in K-562 human leukemia cells." Leuk Res **26**(11): 1017-1025.
- Barbui, T. (2004). "The leukemia controversy in myeloproliferative disorders: is it a natural progression of disease, a secondary sequela of therapy, or a combination of both?" Semin Hematol **41**(2 Suppl 3): 15-17.
- Barosi, G. (2003). "Myelofibrosis with myeloid metaplasia." Hematol Oncol Clin North Am **17**(5): 1211-1226.
- Barosi, G., G. Bergamaschi, et al. (2007). "JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis." Blood **110**(12): 4030-4036.
- Barosi, G., G. Viarengo, et al. (2001). "Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia." Blood **98**(12): 3249-3255.
- Baxter, E. J., L. M. Scott, et al. (2005). "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders." Lancet **365**(9464): 1054-1061.
- Beer, P. A., P. Campbell, et al. (2008). "MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort." Blood **112**(1): 141-149.
- Beer, P. A. and A. R. Green (2009). "Pathogenesis and management of essential thrombocythemia." Hematology **2009**(1): 621-628.
- Bellanne-Chantelot, C., I. Chaumarel, et al. (2006). "Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders." Blood **108**(1): 346-352.
- Berk, P. D., J. D. Goldberg, et al. (1981). "Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy." N Engl J Med **304**(8): 441-447.
- Birgegard, G. (2009). "Long-term management of thrombocytosis in essential thrombocythaemia." Ann Hematol **88**: 1-10.
- Bruchova, H., M. Merkerova, et al. (2008). "Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera." Haematologica **93**(7): 1009-1016.
- Bruchova, H., D. Yoon, et al. (2007). "Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis." Exp Hematol **35**(11): 1657-1667.
- Buss, D. H., A. W. Cashell, et al. (1994). "Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: a study of 280 cases." Am J Med **96**(3): 247-253.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15524-15529.

- Calin, G. A., M. Ferracin, et al. (2005). "A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med **353**(17): 1793-1801.
- Campbell, P. J. and A. R. Green (2006). "The myeloproliferative disorders." N Engl J Med **355**(23): 2452-2466.
- Campbell, P. J., M. Griesshammer, et al. (2006). "V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis." Blood **107**(5): 2098-2100.
- Cardoso, C., C. Mignon, et al. (2000). "The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders." Eur J Hum Genet **8**(3): 174-180.
- Cardoso, C., S. Timsit, et al. (1998). "Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein." Hum Mol Genet **7**(4): 679-684.
- Castro-Malaspina, H., R. E. Gay, et al. (1982). "Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders." Blood **59**(5): 1046-1054.
- Castro-Malaspina, H. and S. C. Jhanwar (1984). "Properties of myelofibrosis-derived fibroblasts." Prog Clin Biol Res **154**: 307-322.
- Cazzola, M. (2010). "IDH1 and IDH2 mutations in myeloid neoplasms - Novel paradigms and clinical implications." Haematologica **95**(10): 1623-1627.
- Cazzola, M. and R. Skoda (2005). "Gain of function, loss of control - a molecular basis for chronic myeloproliferative disorders." Haematologica **90**(7): 871-874.
- Cazzola, M. and R. C. Skoda (2000). "Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease." Blood **95**(11): 3280-3288.
- Ceesay, M. M., N. C. Lea, et al. (2006). "The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T." Leukemia **20**(11): 2060-2061.
- Centurione, L., A. Di Baldassarre, et al. (2004). "Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1(low) mice." Blood **104**(12): 3573-3580.
- Cervantes, F., B. Dupriez, et al. (2009). "New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment." Blood **113**(13): 2895-2901.
- Cervantes, F., F. Passamonti, et al. (2008). "Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders." Leukemia **22**(5): 905-914.
- Chagraoui, H., E. Komura, et al. (2002). "Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice." Blood **100**(10): 3495-3503.
- Chagraoui, H., M. Tulliez, et al. (2003). "Stimulation of osteoprotegerin production is responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO." Blood **101**(8): 2983-2989.
- Chagraoui, H., F. Wendling, et al. (2006). "Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia: Insight from mouse models." Best Pract Res Clin Haematol **19**(3): 399-412.
- Chen, C. Z., L. Li, et al. (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." Science **303**(5654): 83-86.
- Chen, G. L. and J. T. Prchal (2007). "X-linked clonality testing: interpretation and limitations." Blood **110**(5): 1411-1419.
- Chou, W. C., H. A. Hou, et al. "Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation." Blood **115**(14): 2749-2754.

- Cimmino, A., G. A. Calin, et al. (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13944-13949.
- Cortelazzo, S., G. Finazzi, et al. (1995). "Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis." N Engl J Med **332**(17): 1132-1136.
- Cortelazzo, S., P. Viero, et al. (1981). "Spectrum of platelet aggregation abnormalities in myeloproliferative diseases." Ric Clin Lab **11**(1): 35-42.
- Cortelazzo, S., P. Viero, et al. (1990). "Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia." J Clin Oncol **8**(3): 556-562.
- Cross, N. C., G. Q. Daley, et al. (2008). "BCR-ABL1-positive CML and BCR-ABL1-negative chronic myeloproliferative disorders: some common and contrasting features." Leukemia **22**(11): 1975-1989.
- Cross, N. C. and A. Reiter (2002). "Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases." Leukemia **16**(7): 1207-1212.
- Dameshek, W. (1951). "Some speculations on the myeloproliferative syndromes." Blood **6**(4): 372-375.
- Dang, L., S. Jin, et al. (2010). "IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia." Trends Mol Med **16**(9): 387-397.
- Dang, L., D. W. White, et al. (2009). "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate." Nature **462**(7274): 739-744.
- Dang, L., D. W. White, et al. (2010). "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate." Nature **465**(7300): 966.
- Delhommeau, F., D. F. Pisani, et al. (2006). "Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders." Cell Mol Life Sci **63**(24): 2939-2953.
- Dewald, G. W. and P. I. Wright (1995). "Chromosome abnormalities in the myeloproliferative disorders." Semin Oncol **22**(4): 341-354.
- Ding, J., H. Komatsu, et al. (2009). "The Asn505 mutation of c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity." Blood.
- Dore, L. C., J. D. Amigo, et al. (2008). "A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3333-3338.
- Dupriez, B., P. Morel, et al. (1996). "Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system." Blood **88**(3): 1013-1018.
- Eridani, S., E. Batten, et al. (1984). "Erythroid colony formation in primary thrombocythaemia: evidence of hypersensitivity to erythropoietin." Br J Haematol **56**(1): 157-161.
- Eridani, S., T. C. Pearson, et al. (1983). "Erythroid colony formation in primary proliferative polycythaemia, idiopathic erythrocytosis and secondary polycythaemia: sensitivity to erythropoietic stimulating factors." Clin Lab Haematol **5**(2): 121-129.
- Ernst, T., A. J. Chase, et al. (2010). "Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders." Nat Genet **42**(8): 722-726.
- Fazi, F., A. Rosa, et al. (2005). "A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis." Cell **123**(5): 819-831.
- Felli, N., L. Fontana, et al. (2005). "MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18081-18086.

- Fernandez-Luna, J. L. (1999). "Apoptosis and polycythemia vera." Curr Opin Hematol **6**(2): 94-99.
- Fialkow, P. J. (1990). "Stem cell origin of human myeloid blood cell neoplasms." Verh Dtsch Ges Pathol **74**: 43-47.
- Fialkow, P. J., G. B. Faguet, et al. (1981). "Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell." Blood **58**(5): 916-919.
- Finazzi, G., V. Caruso, et al. (2005). "Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study." Blood **105**(7): 2664-2670.
- Fontana, L., E. Pelosi, et al. (2007). "MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation." Nat Cell Biol **9**(7): 775-787.
- Fruchtman, S. M., R. M. Petitt, et al. (2005). "Anagrelide: analysis of long-term efficacy, safety and leukemogenic potential in myeloproliferative disorders." Leuk Res **29**(5): 481-491.
- Garzon, R., M. Garofalo, et al. (2008). "Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3945-3950.
- Garzon, R., F. Pichiorri, et al. (2006). "MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 5078-5083.
- Garzon, R., F. Pichiorri, et al. (2007). "MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia." Oncogene.
- Gastinne, T., F. Vigant, et al. (2007). "Adenoviral-mediated TGF-beta1 inhibition in a mouse model of myelofibrosis inhibit bone marrow fibrosis development." Exp Hematol **35**(1): 64-74.
- Gilbert, H. S., V. Praloran, et al. (1989). "Increased circulating CSF-1 (M-CSF) in myeloproliferative disease: association with myeloid metaplasia and peripheral bone marrow extension." Blood **74**(4): 1231-1234.
- Green, A. and P. Beer (2010). "Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms." N Engl J Med **362**(4): 369-370.
- Greenberg, B. R., L. Woo, et al. (1987). "Cytogenetics of bone marrow fibroblastic cells in idiopathic chronic myelofibrosis." Br J Haematol **66**(4): 487-490.
- Gross, S., R. A. Cairns, et al. (2010). "Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations." J Exp Med **207**(2): 339-344.
- Grossi, A., A. M. Vannucchi, et al. (1986). "Beta-thromboglobulin content in megakaryocytes of patients with myeloproliferative diseases." Thromb Res **43**(3): 367-374.
- Grossi, A., A. M. Vannucchi, et al. (1987). "Megakaryocyte progenitors in the bone marrow and peripheral blood of patients with myeloproliferative diseases." Am J Hematol **25**(4): 371-376.
- Guglielmelli, P., G. Barosi, et al. (2009). "JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis." Haematologica **94**(1): 144-146.
- Guglielmelli, P., G. Barosi, et al. (2009). "Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele." Blood **114**(8): 1477-1483.

- Guglielmelli, P., F. Biamonte, et al. (2010). "Frequency and clinical correlates of JAK2 46/1 (GGCC) haplotype in primary myelofibrosis." *Leukemia* **24**(8): 1533-1537.
- Guglielmelli, P., Fatini, C., Lenti, M., Bosi, A., Vannucchi, A.M. (2008). "JAK2V617F mutation screening in patients with retinal vein thrombosis or recurrent fetal loss." *Thrombosis Research* **124**: 377-378.
- Guglielmelli, P., A. Pancrazzi, et al. (2007). "Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation." *Br J Haematol* **137**(3): 244-247.
- Guglielmelli, P., L. Tozzi, et al. (2007). "MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients." *Exp Hematol* **35**(11): 1708-1718.
- Harrison, C. N., P. J. Campbell, et al. (2005). "Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia." *N Engl J Med* **353**(1): 33-45.
- Hussein, K., J. Huang, et al. (2009). "Karyotype complements the International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis." *Eur J Haematol* **82**(4): 255-259.
- Ihle, J. N. and D. G. Gilliland (2007). "Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders." *Curr Opin Genet Dev* **17**(1): 8-14.
- Ihle, J. N. and I. M. Kerr (1995). "Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily." *Trends Genet* **11**(2): 69-74.
- James, C., V. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." *Nature* **434**(7037): 1144-1148.
- Jelinek, J., Y. Oki, et al. (2005). "JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia." *Blood* **106**(10): 3370-3373.
- Jones, A. V., P. J. Campbell, et al. (2010). "The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms." *Blood* **115**(22): 4517-4523.
- Jones, A. V., A. Chase, et al. (2009). "JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms." *Nat Genet* **41**(4): 446-449.
- Jones, A. V., S. Kreil, et al. (2005). "Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders." *Blood* **106**(6): 2162-2168.
- Kamminga, L. M., L. V. Bystrykh, et al. (2006). "The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion." *Blood* **107**(5): 2170-2179.
- Kaushansky, K. (2005). "The molecular mechanisms that control thrombopoiesis." *J Clin Invest* **115**(12): 3339-3347.
- Kaushansky, K. (2008). "Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis." *Blood* **111**(3): 981-986.
- Kiladjian, J. J., F. Cervantes, et al. (2008). "The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases." *Blood* **111**(10): 4922-4929.
- Kilpivaara, O., S. Mukherjee, et al. (2009). "A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms." *Nat Genet* **41**(4): 455-459.
- Komura, E., C. Tonetti, et al. (2005). "Role for the nuclear factor kappaB pathway in transforming growth factor-beta1 production in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FK506 binding protein 51 overexpression." *Cancer Res* **65**(8): 3281-3289.
- Kralovics, R., Y. Guan, et al. (2002). "Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera." *Exp Hematol* **30**(3): 229-236.
- Kralovics, R., F. Passamonti, et al. (2005). "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders." *N Engl J Med* **352**(17): 1779-1790.

- Kralovics, R. and J. T. Prchal (2000). "Congenital and inherited polycythemia." Curr Opin Pediatr **12**(1): 29-34.
- Lacout, C., D. F. Pisani, et al. (2006). "JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis." Blood **108**(5): 1652-1660.
- Landolfi, R., G. Ciabattini, et al. (1992). "Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo." Blood **80**(8): 1965-1971.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C., S. Chevillard, et al. (1996). "Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia." Blood **88**(12): 4534-4546.
- Levine, R. L. and D. G. Gilliland (2007). "JAK-2 mutations and their relevance to myeloproliferative disease." Curr Opin Hematol **14**(1): 43-47.
- Levine, R. L., M. Wadleigh, et al. (2005). "Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis." Cancer Cell **7**(4): 387-397.
- Li, J., Y. Xia, et al. (2000). "The platelet thrombopoietin receptor number and function are markedly decreased in patients with essential thrombocythaemia." Br J Haematol **111**(3): 943-953.
- Linsley, P. S., J. Schelter, et al. (2007). "Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression." Mol Cell Biol **27**(6): 2240-2252.
- Liu, K., M. Martini, et al. (2009). "Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in 8 Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia." Haematologica.
- Liu, Q., H. Fu, et al. (2008). "miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes." Nucleic Acids Res **36**(16): 5391-5404.
- Malcovati, L., M. G. Della Porta, et al. (2009). "Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis." Blood.
- Manoharan, A. (1998). "Idiopathic myelofibrosis: a clinical review." Int J Hematol **68**(4): 355-362.
- Marchioli, R., G. Finazzi, et al. (2005). "Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera." J Clin Oncol **23**(10): 2224-2232.
- Marcucci, G., K. Maharry, et al. (2010). "IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study." J Clin Oncol **28**(14): 2348-2355.
- Mardis, E. R., L. Ding, et al. (2009). "Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome." N Engl J Med **361**(11): 1058-1066.
- Martyre, M. C., M. C. Le Bousse-Kerdiles, et al. (1997). "Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis." Br J Haematol **97**(2): 441-448.
- Martyre, M. C., N. Romquin, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis." Br J Haematol **88**(1): 9-16.
- McMullin, M. F. (2008). "The classification and diagnosis of erythrocytosis." Int J Lab Hematol **30**(6): 447-459.
- Mercier, E., G. Lissalde-Lavigne, et al. (2007). "JAK2 V617F mutation in unexplained loss of first pregnancy." N Engl J Med **357**(19): 1984-1985.

- Mesa, R. A., C. A. Hanson, et al. (2009). "Trisomy 13: prevalence and clinicopathologic correlates of another potentially lenalidomide-sensitive cytogenetic abnormality." Blood **113**(5): 1200-1201.
- Mesa, R. A., C. A. Hanson, et al. (2000). "Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia." Blood **96**(10): 3374-3380.
- Mesa, R. A., S. Verstovsek, et al. (2007). "Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT)." Leuk Res **31**(6): 737-740.
- Mi, S., J. Lu, et al. (2007). "MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 19971-19976.
- Moliterno, A. R., W. D. Hankins, et al. (1998). "Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera." N Engl J Med **338**(9): 572-580.
- Moliterno, A. R., K. E. Siebel, et al. (1998). "A novel thrombopoietin signaling defect in polycythemia vera platelets." Stem Cells **16 Suppl 2**: 185-192.
- Moliterno, A. R., D. M. Williams, et al. (2004). "Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11444-11447.
- Murphy, P. T., M. Sivakumaran, et al. (1995). "Acute lymphoblastic transformation of essential thrombocythaemia." Br J Haematol **89**(4): 921-922.
- Murphy, S. (1997). "Therapeutic dilemmas: balancing the risks of bleeding, thrombosis, and leukemic transformation in myeloproliferative disorders (MPD)." Thromb Haemost **78**(1): 622-626.
- Neilson, J. R., G. X. Zheng, et al. (2007). "Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development." Genes Dev **21**(5): 578-589.
- Nikoloski, G., S. M. Langemeijer, et al. (2010). "Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes." Nat Genet.
- Nussenzweig, R. H., S. I. Swierczek, et al. (2007). "Polycythemia vera is not initiated by JAK2V617F mutation." Exp Hematol **35**(1): 32-38.
- Olcaydu, D., A. Harutyunyan, et al. (2009). "A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms." Nat Genet **41**(4): 450-454.
- Orazi, A. and U. Germing (2008). "The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features." Leukemia **22**(7): 1308-1319.
- Pardanani, A., T. L. Lasho, et al. (2010). "IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms." Leukemia **24**(6): 1146-1151.
- Pardanani, A., T. L. Lasho, et al. (2008). "JAK2V617F mutation screening as part of the hypercoagulable work-up in the absence of splanchnic venous thrombosis or overt myeloproliferative neoplasm: assessment of value in a series of 664 consecutive patients." Mayo Clin Proc **83**(4): 457-459.
- Pardanani, A., T. L. Lasho, et al. (2007). "JAK2V617F is infrequently associated with arterial stroke in the absence of overt myeloproliferative disorder." J Thromb Haemost **5**: 1784-1785.
- Pardanani, A. D., R. L. Levine, et al. (2006). "MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients." Blood **108**(10): 3472-3476.

- Paschka, P., R. F. Schlenk, et al. (2010). "IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication." J Clin Oncol **28**(22): 3636-3643.
- Pasini, D., A. P. Bracken, et al. (2007). "The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation." Mol Cell Biol **27**(10): 3769-3779.
- Pasini, D., A. P. Bracken, et al. (2004). "Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity." Embo J **23**(20): 4061-4071.
- Passamonti, F., E. Rumi, et al. (2006). "Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders." Blood **107**(9): 3676-3682.
- Passamonti, F., E. Rumi, et al. (2004). "Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia." Am J Med **117**(10): 755-761.
- Pikman, Y., B. H. Lee, et al. (2006). "MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia." PLoS Med **3**(7): e270.
- Prchal, J. F. and A. A. Axelrad (1974). "Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera." N Engl J Med **290**(24): 1382.
- Quentmeier, H., R. A. MacLeod, et al. (2006). "JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders." Leukemia **20**(3): 471-476.
- Raaphorst, F. M., F. J. van Kemenade, et al. (2000). "Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease." Am J Pathol **157**(3): 709-715.
- Reilly, J. T. (2002). "Cytogenetic and molecular genetic aspects of idiopathic myelofibrosis." Acta Haematol **108**(3): 113-119.
- Remacha, A. F., C. Estivill, et al. (2007). "The V617F mutation of JAK2 is very uncommon in patients with thrombosis." Haematologica **92**(2): 285-286.
- Rollison, D. E., N. Howlader, et al. (2008). "Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myeloproliferative Disorders in the United States, 2001-2004: Utilizing Data from the NAACCR and SEER Programs." Blood **112**(1): 45-52.
- Schaub, F. X., R. Jager, et al. (2009). "Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the predisposing mutations for JAK2-V617F." Blood **113**(9): 2022-2027.
- Schmitt-Graeff, A. H., S. S. Teo, et al. (2008). "JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis." Haematologica **93**(1): 34-40.
- Sene, D., I. Elalamy, et al. (2008). "JAK2V617F mutation is not associated with unexplained recurrent arterial and venous thrombosis." Thromb Res **122**(3): 427-428.
- Sevignani, C., G. A. Calin, et al. (2006). "Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression." Mamm Genome **17**(3): 189-202.
- Skoda, R. and J. T. Prchal (2005). "Lessons from familial myeloproliferative disorders." Semin Hematol **42**(4): 266-273.
- Skoda, R. C. (2009). "Thrombocytosis." Hematology **2009**(1): 159-167.
- Spivak, J. L. (2002). "Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management." Blood **100**(13): 4272-4290.
- Spivak, J. L. (2003). "Diagnosis of the myeloproliferative disorders: resolving phenotypic mimicry." Semin Hematol **40**(1 Suppl 1): 1-5.
- Spivak, J. L., G. Barosi, et al. (2003). "Chronic myeloproliferative disorders." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 200-224.

- Spivak, J. L. and R. T. Silver (2008). "The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythosis and primary myelofibrosis: an alternative proposal." Blood **112**(2): 231-239.
- Staerk, J., A. Kallin, et al. (2005). "JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor." J Biol Chem **280**(51): 41893-41899.
- Staerk, J., C. Lacout, et al. (2006). "An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor." Blood **107**(5): 1864-1871.
- Steensma, D. P., G. W. Dewald, et al. (2005). "The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes." Blood **106**(4): 1207-1209.
- Swerdlow, S. H., Campo, E, Harris, NL, Jaffe, ES, Pileri, SA, Stein, H, Thiele, J, Vardiman, JW., Ed. (2008). WHO classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Tam, C. S., L. V. Abruzzo, et al. (2009). "The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: Applicability at the time of diagnosis and later during disease course." Blood **113**(18): 4171-4178.
- Taskin, A. L., K. Cohen-Solal, et al. (1998). "Myelofibrosis: experimental models and human studies." Stem Cells **16 Suppl 2**: 155-164.
- Tefferi, A. (2003). "The forgotten myeloproliferative disorder: myeloid metaplasia." Oncologist **8**(3): 225-231.
- Tefferi, A. (2006). "The diagnosis of polycythemia vera: new tests and old dictums." Best Pract Res Clin Haematol **19**(3): 455-469.
- Tefferi, A. (2006). "New insights into the pathogenesis and drug treatment of myelofibrosis." Curr Opin Hematol **13**(2): 87-92.
- Tefferi, A. (2008). "The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek." Leukemia **22**(1): 3-13.
- Tefferi, A. (2010). "Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1." Leukemia **24**(6): 1128-1138.
- Tefferi, A., T. L. Lasho, et al. (2010). "IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis." Leukemia **24**(7): 1302-1309.
- Tefferi, A., T. L. Lasho, et al. (2010). "JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygoty for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival." Leukemia **24**: 105-109.
- Tefferi, A., T. L. Lasho, et al. (2005). "The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates." Br J Haematol **131**(3): 320-328.
- Tefferi, A., R. Skoda, et al. (2009). "Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics." Nat Rev Clin Oncol **6**(11): 627-637.
- Tefferi, A., J. J. Strand, et al. (2007). "Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera." Leukemia **21**: 2074-2075.
- Tefferi, A., J. Thiele, et al. (2007). "Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel." Blood **110**(4): 1092-1097.

- Thai, T. H., D. P. Calado, et al. (2007). "Regulation of the germinal center response by microRNA-155." Science **316**(5824): 604-608.
- Theocharides, A., M. Boissinot, et al. (2007). "Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation." Blood **110**(1): 375-379.
- Thiele, J. and H. M. Kvasnicka (2003). "Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients." Ann Hematol **82**(3): 148-152.
- Thiele, J., H. M. Kvasnicka, et al. (2005). "Bone marrow CD34+ progenitor cells in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders--a clinicopathological study on 575 patients." Leuk Lymphoma **46**(5): 709-715.
- Thiele, J., H. M. Kvasnicka, et al. (2006). "Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders: a forgotten pearl." Best Pract Res Clin Haematol **19**(3): 413-437.
- Tonini, T., L. Bagella, et al. (2004). "Ezh2 reduces the ability of HDAC1-dependent pRb2/p130 transcriptional repression of cyclin A." Oncogene **23**(28): 4930-4937.
- Tonini, T., G. D'Andrilli, et al. (2008). "Importance of Ezh2 polycomb protein in tumorigenesis process interfering with the pathway of growth suppressive key elements." J Cell Physiol **214**(2): 295-300.
- Vainchenker, W., A. Dusa, et al. (2008). "JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies." Semin Cell Dev Biol **19**(4): 385-393.
- van Kemenade, F. J., F. M. Raaphorst, et al. (2001). "Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma." Blood **97**(12): 3896-3901.
- van Leenders, G. J., D. Dukers, et al. (2007). "Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features." Eur Urol **52**(2): 455-463.
- Vannucchi, A. M. (2008). "JAK2: how many faces in MPD?" Blood **111**(5): 2499.
- Vannucchi, A. M. (2010). "Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia." Internal and Emergency Medicine **5**: 177-184.
- Vannucchi, A. M., E. Antonioli, et al. (2007). "Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden." Leukemia **21**(9): 1952-1959.
- Vannucchi, A. M., E. Antonioli, et al. (2008). "Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia." Blood **112**: 844-847.
- Vannucchi, A. M., E. Antonioli, et al. (2008). "Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal." Leukemia **22**(7): 1299-1307.
- Vannucchi, A. M., E. Antonioli, et al. (2007). "Clinical profile of homozygous JAK2V617F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia." Blood **110**(3): 840-846.
- Vannucchi, A. M. and T. Barbui (2007). "Thrombocytosis and thrombosis." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2007**: 363-370.
- Vannucchi, A. M., L. Bianchi, et al. (2002). "Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice)." Blood **100**(4): 1123-1132.

- Vannucchi, A. M., L. Bianchi, et al. (2004). "Impaired GATA-1 expression and myelofibrosis in an animal model." Pathol Biol (Paris) **52**(5): 275-279.
- Vannucchi, A. M., L. Bianchi, et al. (2005). "A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis." Blood **105**(9): 3493-3501.
- Vannucchi, A. M., P. Guglielmelli, et al. (2009). "Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms." CA Cancer J Clin **59**(3): 171-191.
- Vannucchi, A. M., A. R. Migliaccio, et al. (2005). "Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia: lessons from mouse models of the disease." Semin Oncol **32**(4): 365-372.
- Vardiman, J. W., N. L. Harris, et al. (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood **100**(7): 2292-2302.
- Vekony, H., F. M. Raaphorst, et al. (2008). "High expression of Polycomb group protein EZH2 predicts poor survival in salivary gland adenoid cystic carcinoma." J Clin Pathol **61**(6): 744-749.
- Villeval, J. L., K. Cohen-Solal, et al. (1997). "High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice." Blood **90**(11): 4369-4383.
- Wang, J. C., H. D. Lang, et al. (1992). "Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia." Br J Haematol **80**(2): 184-188.
- Ward, P. S., J. Patel, et al. (2010). "The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate." Cancer Cell **17**(3): 225-234.
- Wardrop, D. and D. P. Steensma (2009). "Is refractory anaemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T) a necessary or useful diagnostic category?" Br J Haematol **144**(6): 809-817.
- Xiao, C. and K. Rajewsky (2009). "MicroRNA control in the immune system: basic principles." Cell **136**(1): 26-36.