

*Università degli Studi di Firenze*



Scuola di dottorato in Fisiopatologia Clinica e  
dell'Invecchiamento  
Ciclo XXIV

**Approccio genomico e funzionale allo  
studio delle alterazioni dei microRNA  
nelle MPN.**

Dottorando:  
Lorenzo Tozzi

Tutor:  
Prof. Alessandro M. Vannucchi

Coordinatore del Dottorato:  
Prof.ssa Rosanna Abbate

# Indice

---

Introduzione.....	4
Le neoplasie mieloproliferative croniche Philadelphia negative .....	4
La mutazione <i>JAK2V617F</i> : .....	10
Altre mutazioni: .....	11
Disomia Uniparentale: .....	14
Imprinting: .....	21
Cluster DLK1/MEG3: .....	25
MicroRNA:.....	30
Biogenesi:.....	35
miRtrons, IsomiRs, moRNA: .....	41
Meccanismi di silenziamento genico: .....	43
miRNA ed ematopoiesi fisiologica: .....	46
Differenziamento eritrocitario e megacariocitario:.....	49
Differenziamento granulocitario:.....	53
Differenziamento linfocitario:.....	55
Ruolo dei miRNA nelle patologie ematologiche: .....	57
Leucemie: .....	58
Linfomi: .....	61
Sindromi mieloproliferative croniche: .....	62
miR-16:.....	65
Scopo dello studio.....	68
Materiali e Metodi .....	71
Arruolamento dei pazienti: .....	71
Preparazione delle sottopopolazioni cellulari: .....	71
Purificazione cellule CD34+:.....	71
Estrazione acidi Nucleici: .....	72
PCR Real-Time (TaqMan) (RT-PCR): .....	73
Analisi dell'espressione dei geni miRNA: .....	76
Sequenziamento dei geni codificanti il miR-16:.....	77
PCR quantitativa per l'analisi del numero di copie geniche: .....	78
FISH: .....	78
Colture cellulari:.....	79
Trasfezione:.....	80

Esperimenti in-vivo: .....	81
SNPs arrays: .....	82
Next Generation Exome Sequencing: .....	83
Validazione dei dati NGS: .....	83
Analisi dello stato di Metilazione: .....	85
Analisi bioinformatica dei promotori.....	87
Luciferase Reporter Assay:.....	87
Risultati: .....	89
Ruolo del miR16-2 nella patogenesi della PV .....	89
Espressione del miR-16 durante il differenziamento eritroide: .....	89
Espressione del miR-16 in granulociti e cellule CD34+: .....	90
L'espressione del miR-16 non correla con lo stato mutazionale di JAK2: .....	91
Espressione dei microRNA 15a, 15b e 195 nelle cellule CD34+ di pazienti con PV: .....	91
Iperattivazione del pre-miR-16-2:.....	92
Trasfezione del pre-miR-16 in cellule CD34+ normali:.....	94
Silenziamento dell'espressione del miR-16 In cellule di pazienti con PV: .....	95
Studi in vivo:.....	96
Ricerca alterazioni dei geni codificanti il miR-16: .....	99
Studio Metilazione: .....	101
Myb transattiva il promoter di SMC4: .....	102
Caratterizzazione della disomia uniparentale del cromosoma 14q .....	104
SNPs array 14q UPD: .....	104
Analisi mutazionale 14q UPD:.....	106
Analisi del profilo di metilazione:.....	109
Discussione.....	112
Bibliografia: .....	122

# Introduzione

---

## **Le neoplasie mieloproliferative croniche Philadelphia negative**

Le sindromi mieloproliferative croniche (MPN) rappresentano un gruppo di disordini ematologici che originano dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale pluripotente, e sono caratterizzate dalla proliferazione clonale di uno o più progenitori emopoietici nel midollo osseo e in sedi extramidollari.

Nel 1951 W. Demeshek ha raggruppato sotto il termine di malattie mieloproliferative croniche quattro disordini tra loro correlati fisiopatologicamente e clinicamente: la Policitemia Vera (PV), la Mielofibrosi primaria (PMF), la Trombocitemia essenziale (ET) e la Leucemia mieloide cronica (CML).

L'identificazione del cromosoma Philadelphia e la presenza di caratteristiche cliniche peculiari hanno indotto a considerare la leucemia mieloide cronica come un'entità nosologica a parte. Quest'ultima è infatti una neoplasia che è caratterizzata da un'alterazione citogenetica e molecolare specifica, la traslocazione reciproca t(9;22)(q34; q11), che porta alla formazione di un cromosoma, denominato Philadelphia, e, a livello molecolare, di un oncogene di fusione chimerico BCR-ABL che codifica per una fosfoproteina anomala di 210 kD (p210) ad attività tirosinchinasica.

Successivamente, nel 2001 la WHO (World Health Organization) 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).

Le MPN sono malattie relativamente comuni, 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. Peraltro, 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.

Da un punto di vista clinico le principali manifestazioni di queste patologie sono le complicanze trombotiche ed emorragiche che ancora oggi rimangono la principale

causa di morbidità e di mortalità in questi pazienti; più rare l'evoluzione in forme di mielofibrosi post-PV e post-ET e la trasformazione in leucemia acuta.

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 idiopatica, 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 2003).

La patogenesi molecolare di questi disordini è stata ulteriormente definita nel 2005 con la scoperta della prima alterazione genetica ricorrente, la mutazione puntiforme a carico del gene *JAK2* ricorrente in questi tipo di patologie (Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005). In seguito sono state scoperte la mutazione del gene *MPL* (codificante per il recettore della trombopoietina) (Pikman, Lee et al. 2006) rappresentata dalla sostituzione nucleotidica W>L/K/A al codone 515 e le mutazioni, inserzioni o delezioni nell'esone 12 del gene *JAK2*. Oltre il 95% dei pazienti con PV risulta positivo per la mutazione V617F del gene *JAK2* o recante anomalie nell'esone 12 (circa il 2%) (Scott, Tong et al. 2007) mentre mutazioni di *MPL* non sono ancora state riscontrate in questo tipo di disordine; soltanto il 60% dei pazienti con ET e PMF risulta avere la mutazione *JAK2*V617F e in circa l'8% si riscontra la mutazione *MPL* W515K/L/A o altre infrequenti mutazioni. ET e PMF sembrano non coinvolte da anomalie nell'esone 12. Queste anomalie molecolari sottolineano una proliferazione clonale e si pongono come il maggior criterio di diagnosi dal 2008 nella nuova classificazione WHO, che identifica queste forme con la terminologia di "neoplasie mieloproliferative croniche" (MPN).

Tuttavia, molti aspetti della biologia e delle manifestazioni cliniche di queste patologie rimangono poco definiti.

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 2 casi/100.000 l'anno; ne è stata osservata una lieve predominanza nel sesso maschile (Modan 1965). 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 (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. 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.

Le principali manifestazioni cliniche della PV sono una diretta conseguenza dell'eccessiva proliferazione degli elementi cellulari delle varie linee emopoietiche. L'eritrocitosi, creando un aumento della viscosità ematica, si manifesta con segni e sintomi legati all'interessamento del microcircolo periferico e cerebrale. Caratteristico è il prurito generalizzato, riferito nella metà dei casi, frequentemente acquagenico. Le principali complicanze sono gli eventi trombotici che possono interessare qualunque distretto, anche sedi infrequenti come i grossi vasi addominali.

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 due 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. Leucocitosi e trombocitosi sono presenti in più del 50% dei casi.

Durante l'evoluzione, la malattia si modifica, passando dalla fase puramente policitemica a quella "spenta", caratterizzata da parametri ematologici stabili; in seguito i pazienti possono presentare evoluzione in mielofibrosi e più raramente in leucemia mieloide acuta.

La causa più frequente di mortalità nei pazienti con PV è l'evento cardiovascolare (41% delle morti).

La mielofibrosi 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). 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" rispettivamente post-PV (PPV-MF) e post-ET (PET-MF). 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).

A livello patogenetico ciò che caratterizza la PMF è la fibrosi midollare, la metaplasia mieloide, la presenza di progenitori emopoietici in circolo e la presenza di emopoiesi clonale. La fibrosi midollare è considerata un evento secondario, risultato del rilascio di fattori stimolanti da parte delle cellule derivanti dal clone neoplastico. In accordo con questa ipotesi è il fatto che la fibrosi midollare è un evento potenzialmente reversibile, come dimostrato dalla sua regressione dopo trapianto allogenico di midollo osseo o dopo prolungata somministrazione di chemioterapici o interferone (Manoharan and Pitney 1984; McCarthy 1985). Le citochine implicate 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) prodotte principalmente da 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).

La Metaplasia Mieloide è una condizione caratteristica della Mielofibrosi e coinvolge frequentemente la milza, ma può estendersi anche ad altri organi e apparati quali il polmone, il sistema nervoso centrale, l'apparato gastrointestinale e quello genitourinario.

La mielofibrosi costituisce il quadro patologico più grave tra tutte le Neoplasie Mieloproliferative Croniche e rimane tutt'oggi una malattia incurabile per quei pazienti non eleggibili al trapianto allogenico di cellule staminali (SCT allogenico) (Vannucchi 2011).

La Trombocitemia Essenziale (TE) è un disordine mieloproliferativo cronico caratterizzato 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, Stuart et al. 1985).

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).

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- $\beta$ .

Da un punto di vista clinico le principali manifestazioni di queste patologie sono le complicanze trombotiche ed emorragiche che ancora oggi rimangono la principale causa di morbidità e di mortalità in questi pazienti; 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. L'evoluzione in forme di mielofibrosi post-ET e la trasformazione in leucemia acuta costituiscono un evento più infrequente.

La mutazione del gene JAK2 è riscontrabile in circa il 95% dei pazienti con PV e in circa il 50% dei pazienti con ET e PMF, mentre la mutazione del gene MPL in circa il 3-5% delle ET e il 5-10% delle PMF ed è assente nelle PV. Nonostante ciò, la sovrapposizione fenotipica di questi disordini e la carenza di marcatori molecolari univoci, rendono talora molto difficile la diagnosi differenziale delle tre malattie (Spivak 2003).

#### **La mutazione JAK2V617F:**

JAK2 è un membro della famiglia delle Janus Chinasi, proteine ad attività tirosin-chinasica che svolgono un ruolo chiave nella trasduzione del segnale intracellulare.

Le proteine JAK funzionano come intermediari tra i recettori citochinici di membrana e molecole di 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 a quelli che appartengono alla famiglia di STAT. Le molecole STAT una volta attivate entrano nel nucleo e agiscono come fattori di trascrizione. JAK2 sembra essere attivato particolarmente quando i recettori legano fattori di crescita emopoietici come l'EPO, IL-3, IL-5, G-CSF, GM-CSF e TPO

Recenti studi hanno identificato nel gene *JAK2*, localizzato sul braccio corto del cromosoma 9 (p 24), una mutazione puntiforme specifica delle forme mieloproliferative Ph negative. La mutazione è dovuta allo shift di una G → T nel codone 617, all'esone 14; questo porta alla sostituzione di una valina con una fenilalanina. Questa mutazione è localizzata nel dominio pseudo-chinasico JH2 di JAK2, che svolge una funzione inibitoria nei confronti dell'attività tirosin-chinasica (JH1), e

porta a un'attivazione costitutiva del recettore. Studi in vitro hanno evidenziato che, in seguito all'attivazione costitutiva del recettore dovuta alla mutazione, i progenitori eritroidi acquistano la capacità di crescita e di maturazione indipendente dall'eritropoietina (Epo) e da fattori di crescita come IL-3 (Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kaushansky 2005; Zhao, Xing et al. 2005).

La frequenza di *JAK2V617F* è molto alta nei pazienti affetti da PV (Antonioli, Guglielmelli et al. 2005; Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005; Zhao, Xing et al. 2005); infatti, secondo gli ultimi dati riportati da Campbell et al sembra che, applicando metodiche di laboratorio più sensibili, si possa riscontrare la mutazione nella quasi totalità dei pazienti con diagnosi di PV.

La mutazione *V617F* non è comunque specifica per PV poiché si trova nel 50-70% dei pazienti con TE o con PMF (Campbell, Scott et al. 2006).

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, che insorge secondariamente ad un meccanismo di ricombinazione mitotica a livello del cromosoma 9p con duplicazione dell'allele mutato, e non ad una delezione allelica. E' stato osservato inoltre che la quota di *JAK2* mutato valutata mediante PCR quantitativa, correla con le caratteristiche cliniche nei pazienti affetti da Policitemia Vera (Vannucchi, Antonioli et al. 2007; Vannucchi, Antonioli et al. 2007).

A distanza 2 anni dalla scoperta della mutazione *V617F*, altre mutazioni attivanti *JAK2* sono state trovate all'interno dell'esone 12 del gene. Queste mutazioni cadono all'interfaccia tra i domini SH2 e JH2 e si pensa possano modificare la struttura del dominio pseudochinasico, allo stesso modo della mutazione *V617F*. Queste mutazioni sono ristrette a pazienti con PV (Scott, Tong et al. 2007).

### **Altre mutazioni:**

Dopo la scoperta della mutazione del gene *JAK2*, numerosi sforzi per caratterizzare a livello genomico le MPN, di pari passo con una crescente disponibilità tecnologica,

hanno permesso di identificare un numero tuttora in crescita di mutazioni genetiche responsabili della patogenesi delle MPN. Queste mutazioni possono essere suddivise nelle seguenti categorie funzionali: mutazioni in geni coinvolti nella pathway di JAK/STAT, mutazioni di “regolatori epigenetici”, mutazioni di geni coinvolti nello splicing e mutazioni associate a trasformazione leucemica.

Al primo gruppo appartengono le mutazioni del gene MPL, che costituiscono il secondo gruppo di mutazioni “fondatrici” scoperte nelle MPN e sono presenti in circa il 15% delle ET e PMF JAK2V617F negative (Pikman, Lee et al. 2006). Le mutazioni del gene MPL cadono tutte all’interno dell’esone 10 del gene, che codifica per alcuni residui del dominio intracellulare iuxtramembrana e portano ad attivazione costitutiva del recettore.

Allo stesso gruppo appartengono le mutazioni del gene SH2B3 (LNK) e di CBL. SH2B3 è una proteina adattatrice con funzione inibitoria nei confronti di JAK2, attraverso il suo dominio SH2. Le mutazioni di questo gene sono piuttosto rare, cadono quasi tutte in una regione tra i residui 208 e 234 ed hanno effetto dannoso sulla proteina (Oh, Simonds et al. 2010). Queste mutazioni possono indurre un fenotipo patologico diverso, probabilmente in associazione con altri fattori. Le mutazioni dell’esone 2 del gene sono state osservate anche nelle eritrocitosi primarie (Lasho, Pardanani et al. 2010). CBL è una proteina coinvolta nella degradazione di numerosi recettori ad attività tirosin chinasi (TKI) mediante ubiquitinazione. Oltre ai TKI, CBL è in grado di legare altri target tra i quali JAK2 e MPL inducendone la degradazione; mutazioni di CBL sono state osservate in una piccola percentuale di pazienti con PMF e sono spesso associate a UPD del cromosoma 11q o molto raramente a delezione dell’allele Wild Type (Sanada, Suzuki et al. 2009; Ogawa, Sanada et al. 2010).

Un altro gruppo di molecole coinvolte nel signaling di JAK/STAT sono le proteine della famiglia SOCS, che inibiscono l’attivazione di JAK2 mediante un circuito di feedback. Le mutazioni delle proteine SOCS sono molto rare, ma più frequentemente è stata osservata l’ipermetilazione del promotore di questi geni, con conseguente riduzione della loro espressione, anche se il loro ruolo nella patogenesi delle MPN resta tuttora da definire (Teofili, Martini et al. 2008).

La mutazione del gene JAK2 e delle altre molecole coinvolte nel signaling non sono sufficienti da sole a spiegare la patogenesi delle MPN, come suggeriscono diverse evidenze. La scoperta delle mutazioni del gene TET2 prima e successivamente EZH2, ha fornito informazioni molto importanti sulla patogenesi delle MPN e sul ruolo dei regolatori epigenetici in questo processo.

Il gene TET2 codifica per un'idrossilasi dipendente da ferro e  $\alpha$ -chetoglutarato, in grado di aggiungere gruppi idrossilici alle citosine metilate, funzione condivisa anche dagli altri due membri della famiglia, TET1 e TET3. L'idrossilazione delle citosine è un processo scoperto recentemente la cui funzione non è ancora ben definita, è stato però ipotizzato che possa costituire uno step di passaggio nella demetilazione del DNA. Le mutazioni descritte fino ad ora sono prevalentemente inserzioni e delezioni che risultano in frameshift e formazione di una proteina tronca, sono però state osservate anche mutazioni missenso con effetto deleterio sulla struttura della proteina e sono dislocate su tutto il gene. Le mutazioni di TET2 sono presenti in circa 11% delle ET e 19% delle PMF e in una frazione dei pazienti è stata osservata presenza di mutazione su entrambi gli alleli (Delhommeau, Dupont et al. 2009; Jankowska, Szpurka et al. 2009).

Il gene EZH2 costituisce una delle due possibili subunità catalitiche del Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) con attività metiltransferasica. Il PRC2 media la di- e trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3, marcatore associato alla cromatina inattiva. L'iperespressione di EZH2 è stata osservata in numerosi tumori e mutazioni attivanti la proteina sono state trovate nei linfomi a cellule B (Martinez-Garcia and Licht 2010; Morin, Johnson et al. 2010). Nelle neoplasie mieloidi al contrario le mutazioni del gene EZH2 sono tutte inattivanti, mediante formazione di una proteina tronca o modificazioni di aminoacidi fondamentali. Le mutazioni di EZH2 sono presenti in circa il 6% delle MF e sono associate a cattiva prognosi (Guglielmelli, Biamonte et al. 2011). Successivamente sono state identificate rare mutazioni in altri membri del PRC2 come SUZ12, JARID2 e AEBP2 (Puda, Milosevic et al. 2012; Score, Hidalgo-Curtis et al. 2012).

ASXL1 è stato recentemente identificato come membro di un altro Polycomb Complex (PR-DUB), implicato nella deubiquitinazione dell'istone H2A (Scheuermann, de Ayala

Alonso et al. 2010). Mutazioni non senso e frameshift con perdita del dominio PHD carbossi-terminale sono state descritte in diverse neoplasie mieloidi e sono frequenti nella mielofibrosi (Carbuccia, Murati et al. 2009; Stein, Williams et al. 2011).

Le mutazioni osservate nelle proteine dello "spliceosoma" costituiscono il gruppo più recente di mutazioni scoperto in un ampio spettro di patologie mieloidi e in particolar modo nelle mielodisplasie (Papaemmanuil, Cazzola et al. 2011; Yoshida, Sanada et al. 2011). Nelle MPN il gene più frequentemente affetto è SF3B1, mutato in circa il 6% dei pazienti (Lasho, Finke et al. 2011). Le mutazioni dei componenti dello spliceosoma sono state descritte alterare il profilo di splicing di geni come TET2 e RUNX1 (Makishima, Visconte et al. 2012).

La progressione in leucemia acuta si osserva in circa il 15% di pazienti con MF e in meno del 10% dei casi di PV ed ET. Le mutazioni associate a trasformazione leucemica comprendono un'ampia gamma di alterazioni a carico di fattori trascrizionali e noti oncogeni/geni oncosoppressori, tra i quali IKZF1 (Jager, Gisslinger et al. 2010), NRAS/KRAS (Beer, Delhommeau et al. 2010), NF1 (Kawamata, Ogawa et al. 2008), TP53 (Harutyunyan, Klampfl et al. 2011) e RUNX1 (Ding, Harada et al. 2009).

Tra le lesioni associate a trasformazione leucemica, vale la pena ricordare le mutazioni dei geni IDH1 e 2 presenti in bassa percentuale delle MPN in fase cronica (0.8% ET, 1.9% PV, 4.2% MF) ed in circa il 22% dei pazienti in fase blastica (Pardanani, Lasho et al. 2010). I geni IDH codificano per le isocitrato deidrogenasi coinvolte nel ciclo di Krebs, che convertono l'isocitrato in  $\alpha$ -chetoglutarato; le proteine mutate acquisiscono una funzione neomorfica, convertendo l'isocitrato in 2-idrossiglutarato. E' stato proposto che l'iperproduzione di 2-idrossiglutarato possa influire sulla funzione di enzimi  $\alpha$ -chetoglutarato dipendenti, come ad esempio TET2, ma la funzione di queste mutazioni nella cellula staminale ematopoietica restano tuttora sconosciute (Figueroa, Abdel-Wahab et al. 2010).

### **Disomia Uniparentale:**

Il genoma di una cellula tumorale è caratterizzato da un numero altamente variabile di alterazioni molecolari acquisite durante il processo di trasformazione neoplastica e

successivamente selezionate in base alla loro idoneità genetica. Alcuni tipi di tumore mostrano alterazioni genetiche molto specifiche e con elevata ricorrenza, come ad esempio la traslocazione t(9;22) nella leucemia mieloide cronica, mentre altre alterazioni molecolari presentano una minore specificità e sono presenti in un ampio spettro di patologie. Queste mutazioni costituiscono pertanto un importante marcatore di clonalità e la loro individuazione è spesso fondamentale per la diagnosi di malattia, monitoraggio dell'efficacia di una terapia ed eventuali ricadute.

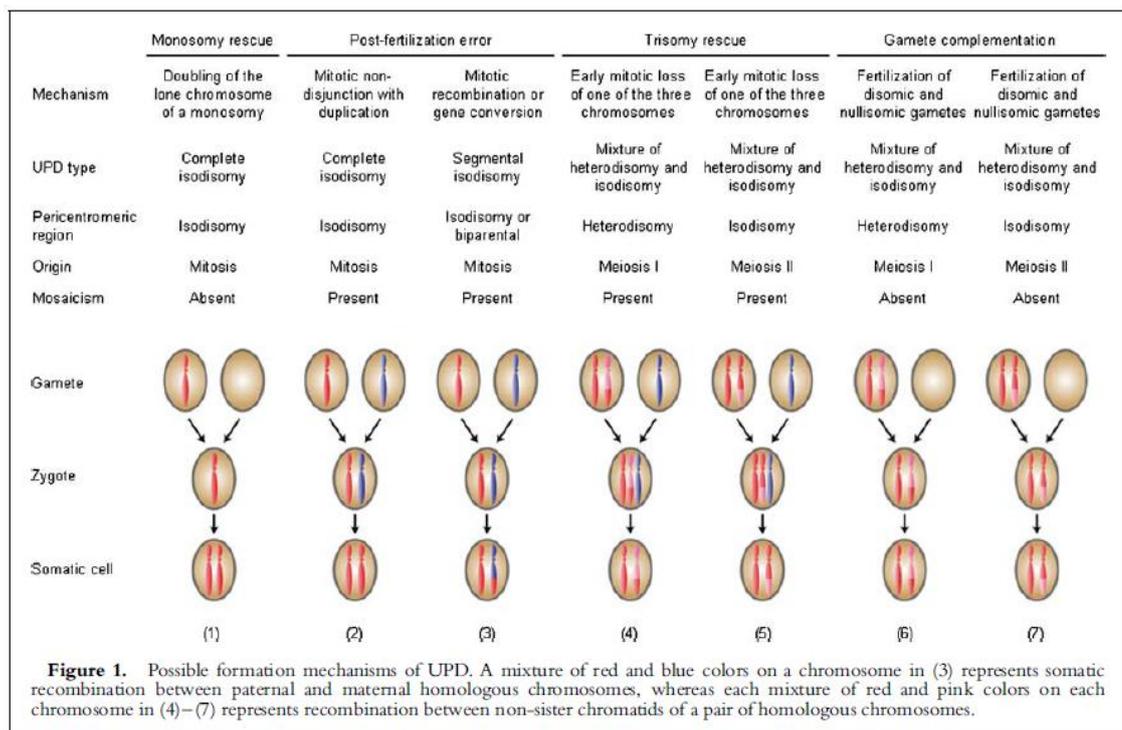
La perdita di eterozigosi (LOH) è uno degli eventi che si osserva più frequentemente nel genoma tumorale ed è un elemento importante nel processo di trasformazione neoplastica, in grado di spiegare concetti fondamentali come la teoria dei "two hits" formulata da Knudson nel 1971.

La LOH può essere dovuta a perdita di materiale genetico, ad esempio una mutazione somatica presente su un solo allele di un gene può passare da uno stato di eterozigosi ad uno stato di emizigosi in seguito a delezione dell'altro allele e manifestare quindi il fenotipo patologico altrimenti mascherato dalla variante Wild Type. Lo stesso esempio può essere fatto per quanto riguarda mutazioni ereditarie oppure varianti polimorfiche predisponenti la malattia.

Vi sono casi invece in cui la perdita di eterozigosi può avvenire senza alterare il numero di copie di un gene, in questo caso si parla di Disomia Uniparentale (UPD). In un individuo ogni cromosoma (ad eccezione dei cromosomi sessuali nell'uomo) è presente in due copie ereditate dai due genitori, queste differiscono fra di loro a livello di sequenza per un certo numero di varianti polimorfiche (SNPs). Nella Disomia Uniparentale, la perdita di un cromosoma o parte di esso viene rimpiazzata mediante duplicazione della restante copia, con conseguente bilanciamento di materiale genetico e perdita delle differenze polimorfiche.

Questo meccanismo è stato inizialmente scoperto studiando patologie congenite, nelle quali la perdita di eterozigosi può avvenire a livello germinale con conseguente trasmissione di due copie identiche di un cromosoma o parte di esso in tutto l'organismo (isodisomia) (Engel 1980). Le cause molecolari di questa alterazione sono state studiate approfonditamente soltanto per quanto riguarda la forma costitutiva,

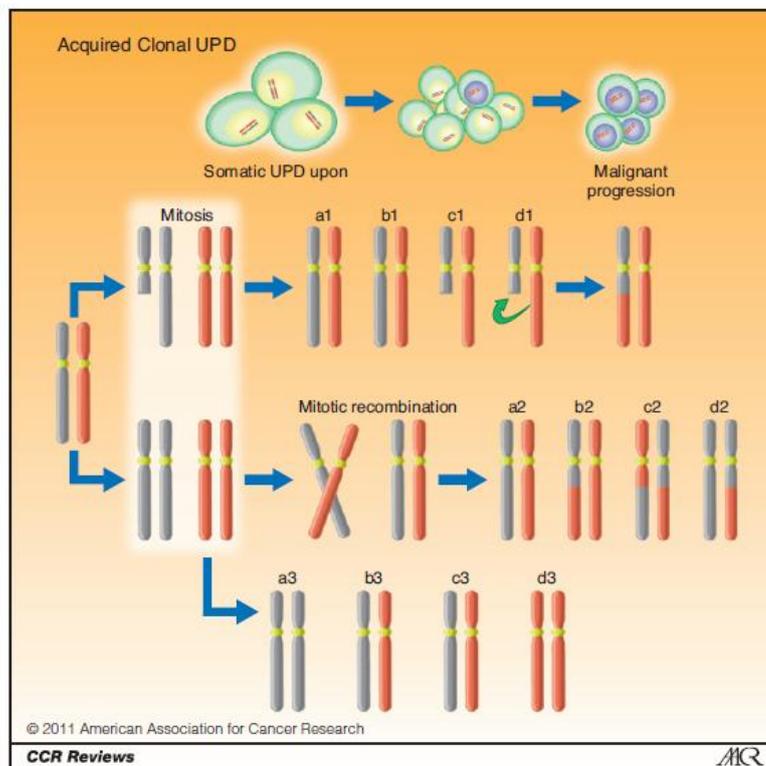
mentre i meccanismi che portano a UPD nella cellula somatica sono ancora in parte sconosciuti. La disomia uniparentale deve essere distinta da alcune condizioni di omozigosi che si possono riscontrare frequentemente come conseguenza di incroci consanguinei nella popolazione normale (autozigosi), queste condizioni possono non avere dirette conseguenze patologiche, ma possono fattori predisponenti lo sviluppo di tumori (Bacolod, Schemmann et al. 2009) . La disomia uniparentale invece deriva da errori nella ricombinazione genetica a livello meiotico durante la gametogenesi o mitotico successivamente alla fase di fertilizzazione. Diversi scenari possono portare a UPD costitutiva, con conseguenze genetiche differenti a seconda del meccanismo mediante il quale si originano e il momento in cui avvengono (figura 1).



**Figura 1: Possibili meccanismi di sviluppo di UPD (Yamazawa, Ogata et al. 2010).**

La disomia uniparentale somaticamente acquisita invece può derivare da eventi di ricombinazione omologa a livello mitotico, oppure come meccanismo di ripristino in seguito a perdita non bilanciata di materiale cromosomico, mediante duplicazione della copia intatta di un cromosoma. Questa condizione può coinvolgere un

cromosoma intero, quando ad esempio si ha non disgiunzione o perdita di un cromosoma durante l'anafase e riduplicazione del cromosoma rimanente. Si può avere invece UPD segmentale, nel caso in cui due cromosomi omologhi si scambiano fra di loro materiale genetico durante la mitosi a livello di regioni ripetute altamente conservate, in questo caso si avrà perdita di eterozigosi dal punto di rottura fino a telomero. Nel caso di cellule somatiche, l'UPD segmentale interstiziale è un evento estremamente raro, poiché richiede due eventi di ricombinazione sequenziali o simultanei (figura 2).



**Figura 2: Possibili meccanismi di acquisizione di UPD nelle cellule tumorali (Makishima and Maciejewski 2011).**

La prova fondamentale dell'importanza della UPD nelle patologie ematologiche è stata fornita nel 2002 in uno studio effettuato su pazienti con Policitemia Vera (Kralovics, Guan et al. 2002) in cui, mediante analisi di microsatelliti, fu riportata la presenza di LOH a livello del braccio corto del cromosoma 9 in circa il 33% dei pazienti con PV

dovuta a riarrangiamento cromosomico a livello mitotico. Questa alterazione, che tuttora costituisce l'alterazione citogenetica più frequente nei pazienti con MPN, è stata poi associata nel 2005 alla mutazione V617F del gene JAK2 presente nella quasi totalità dei pazienti con PV e in circa il 50-60% dei pazienti con ET e PMF e costituisce uno step importante nella progressione della patologia (Kralovics, Passamonti et al. 2005; Barosi, Bergamaschi et al. 2007).

Negli ultimi 6 anni, l'utilizzo di metodiche molto più rapide e sensibili come gli SNPs Arrays (SNP-A), ha portato all'individuazione di numerose altre regioni di UPD e altrettanti geni soggetti mutazioni ad esse associati, nelle patologie ematologiche e in altri tipi di tumore; tra queste è importante ricordare la UPD del cromosoma 1p, 7q, 4q e 11q associate rispettivamente ai geni MPL, EZH2, TET2 e CBL (Jankowska, Szpurka et al. 2009; Szpurka, Gondek et al. 2009; Ernst, Chase et al. 2010; Muramatsu, Makishima et al. 2010).

La frequenza e le regioni colpite da questo tipo di alterazione cromosomica varia a seconda del tipo di tumore, alcuni carcinomi del colon ad esempio mostrano una frequenza piuttosto elevata di UPD a livello di regioni multiple, probabilmente dovute a predisposizione genetica o instabilità cromosomica. Altre UPD sono invece altamente specifiche per determinate neoplasie e con elevata probabilità coinvolgono geni con un ruolo patogenetico fondamentale per quella patologia, un esempio è appunto la Disomia Uniparentale del cromosoma 9p. In altri casi ancora, si osserva una presenza preferenziale di alterazioni del numero di copie a discapito della UPD.

Alcuni studi hanno dimostrato che i riarrangiamenti cromosomici che portano a UPD avvengono spesso regioni coinvolti in altri tipi di alterazioni, come ad esempio siti fragili e regione caratterizzate da elevata instabilità. Alcuni fattori inoltre possono aumentare la predisposizione ad acquisire UPD, nel carcinoma ovarico ad esempio la presenza di mutazione germinale dei geni BRCA1/2 è stata associata ad una maggiore frequenza di UPD rispetto alle forme sporadiche (Walsh, Ogawa et al. 2008).

L'acquisizione di regioni di UPD può portare differenti conseguenze molecolari con significato patogenetico a seconda dell'area coinvolta, in grado di conferire alla cellula tumorale un vantaggio proliferativo. Lo scenario più comune e meglio descritto è

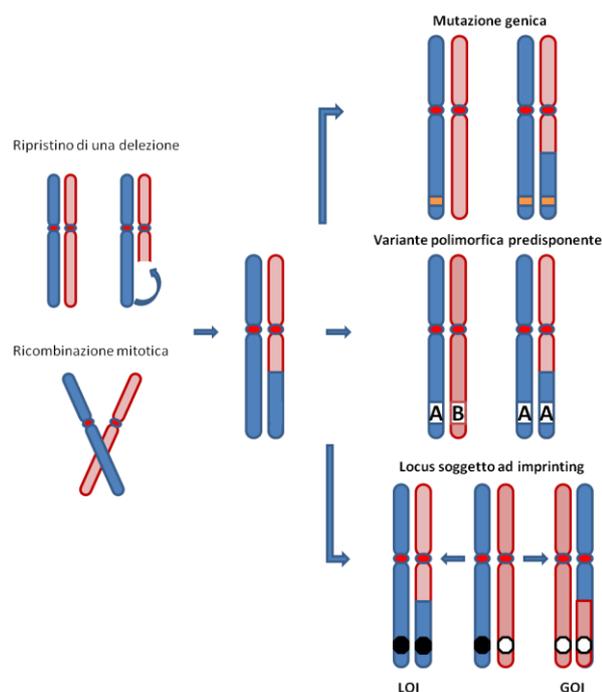
quello in cui la disomia uniparentale è associata a mutazione somatica o germinale di un gene, con conseguente perdita dell'allele wild type; questo può accadere sia nel caso di mutazioni attivanti proto-oncogeni o nel caso di inattivazione di geni oncosoppressori. Nel caso di mutazioni a carico di proto-oncogeni, lo sviluppo di UPD porta alla perdita della copia normale di un gene e acquisizione di una doppia dose dell'allele mutato e conferisce quindi alla cellula un maggiore vantaggio proliferativo; questo meccanismo è stato ben descritto per geni come JAK2, MPL, FLT3 e WT1 (Grundy, Wilson et al. 1994; Griffiths, Mason et al. 2005). Mutazioni somatiche o germinali inattivanti geni oncosoppressori presenti in eterozigosi possono allo stesso modo diventare omozigoti, con conseguente perdita dell'allele intatto e sviluppare un fenotipo patologico, secondo la teoria dei due "hit" di Knudson; questo accade ad esempio per i geni TP53, CBL ed EZH2. È importante sottolineare che ci sono differenze importanti tra la perdita di eterozigosi dovuta a delezione genica e a disomia uniparentale e in alcuni casi quest'ultimo meccanismo sembra essere favorito rispetto al primo. Nel caso del gene CBL ad esempio, la maggior parte delle mutazioni risulta essere associata a UPD del cromosoma 11q, mentre sono molto più rari i casi di emi- o eterozigosi; questo fatto è supportato dall'osservazione che in modelli murini la mutazione del dominio RING-finger della proteina, produce un effetto leucemogenico molto più marcato rispetto al doppio knock-out per il gene CBL (Rathinam, Thien et al. 2010).

La disomia uniparentale somatica può anche portare a duplicazione di rare varianti polimorfiche associate a sviluppo di malattia; nelle MPN, è stato identificato da vari gruppi un aplotipo (46/1) associato ad una aumentata predisposizione a sviluppare MPN con mutazione JAK2V617F (Olcaydu, Harutyunyan et al. 2009), in un recente studio è stato dimostrato che in alcuni casi la ricombinazione omologa a livello del braccio corto del cromosoma 9 con duplicazione dell'aplotipo GGCC del gene JAK2, può precedere l'acquisizione della mutazione JAK2V617F e costituire un percorso alternativo nello sviluppo di MPN (Vilaine, Olcaydu et al. 2011).

Quando la ricombinazione fra cromosomi omologhi avviene a livello di locus soggetti ad imprinting genomico, si parla di "loss of imprinting" (LOI) o "gain of imprinting" (GOI). I locus soggetti a imprinting contengono geni espressi o silenziati in base al

genitore da cui è ereditato l'allele, mediante modificazioni epigenetiche; l'acquisizione di UPD a livello di queste regioni porta pertanto allo sbilanciamento di questi meccanismi e a un'aberrante espressione di questi geni. Le alterazioni dell'imprinting genomico possono coinvolgere in maniera casuale entrambi gli alleli parentali, se però soltanto uno dei due possibili assetti genetici acquisiti è in grado di conferire alla cellula tumorale un vantaggio proliferativo, questo sarà selezionato e trasmesso nelle cellule figlie. Pertanto è possibile che i meccanismi di LOI e GOI siano acquisiti preferenzialmente su uno dei due alleli parentali a seconda del locus coinvolto portando alla riattivazione o repressione di specifici proto-oncogeni o geni oncosoppressori.

Le regioni di UPD spesso coinvolgono segmenti molto estesi di un cromosoma e talvolta l'intero cromosoma, includendo moltissimi geni, varianti polimorfiche e loci soggetti a regolazione epigenetica. Sebbene si tenda frequentemente ad associare una regione di UPD ad una singola lesione genetica, come nel caso della mutazione del gene JAK2, è altrettanto possibile che in una singola regione di UPD più di un meccanismo concorra alla definizione di un fenotipo patologico.



**Figura 3: Possibili cause e conseguenze di UPD acquisita a livello somatico.**

**Imprinting:**

L'imprinting genomico è un meccanismo importante nella crescita e nello sviluppo embrionale nei mammiferi ed è determinato dall'interazione di meccanismi epigenetici, rimodellamento cromatinico e RNA non codificanti. L'imprinting genomico causa una diversa espressione di determinati geni in base al genitore dal quale sono ereditati, a seconda dei diversi loci regolati mediante questo processo, alcuni geni saranno espressi soltanto dall'allele materno e altri soltanto dall'allele paterno. I primi indizi di un effetto parentale sull'espressione genica risalgono a più di 40 anni fa, ma soltanto più recentemente si è iniziato a comprendere più a fondo il ruolo di questi meccanismi nella fisiologia e nella patologia umana.

Il termine imprinting è stato coniato nel 1960 per descrivere il processo di eliminazione selettiva di uno dei due cromosomi paterni negli sciaridi (Crouse 1960), successivamente la compensazione del dosaggio genico dei cromosomi sessuali mediante meccanismi epigenetici è stata descritta anche nei mammiferi. A differenza dell'essere umano, in cui l'inattivazione di una copia del cromosoma X nella donna avviene in maniera casuale, i marsupiali presentano una inattivazione selettiva del cromosoma X paterno nelle cellule somatiche (Cooper, VandeBerg et al. 1971). Queste evidenze insieme ad osservazioni sperimentali effettuate in modelli vegetali, hanno fornito i primi indizi della presenza di un ulteriore livello di regolazione del dosaggio genico, che sarà poi definito "epigenetica". Negli stessi anni, alcuni studi su modelli murini hanno permesso di identificare un simile meccanismo a livello di regioni autosomi che e di mappare un certo numero di queste regioni (Johnson 1974; Cattanaach and Kirk 1985). Un'ulteriore prova dell'importanza dei meccanismi di compensazione del dosaggio genico nei mammiferi e della non equivalenza dei genomi parentali, è stata sottolineata dagli esperimenti effettuati su embrioni murini partenogenici e androgenetici. Tali embrioni presentano un genoma diploide composto da due copie identiche del genoma materno o paterno rispettivamente e sono incapaci di svilupparsi in un individuo; in particolar modo è stato osservato che un embrione partenogenico è in grado di sviluppare prevalentemente tessuti embrionali, ma non tessuti extra-embriionali (placenta, amnios, corion, allantoide, sacco vitellino), viceversa, embrioni androgenetici sono in grado di sviluppare tessuti

extra-embrionali, ma non i tessuti embrionali. Questa non equivalenza funzionale dei genomi parentali, presuppone quindi la presenza di un marcatore non genetico in grado di distinguere i due differenti contributi (McGrath and Solter 1984). I primi tre geni soggetti ad imprinting sono stati identificati nel topo agli inizi degli anni '90, il gene *Igf2r* successivamente associato ad un cluster genico regolato da imprinting sul cromosoma 17 nel topo e i geni *Igf2* e *H19* appartenenti allo stesso cluster sul cromosoma 7 (Barlow, Stoger et al. 1991; Bartolomei, Zemel et al. 1991; DeChiara, Robertson et al. 1991). Questi ultimi due geni inoltre presentavano un pattern di espressione reciproco, essendo *Igf2* espresso soltanto dall'allele paterno, mentre *H19* soltanto dall'allele materno; queste prime osservazioni hanno gettato le basi per decifrare i meccanismi di imprinting genomico.

Ad oggi sono stati identificati circa 100 geni soggetti ad imprinting nel topo, la maggior parte dei quali è conservata anche nell'uomo. Molti di questi sono inoltre organizzati in clusters (figura 4). Recentemente inoltre è stato osservato che l'imprinting è un meccanismo dinamico, l'espressione di alcuni geni soggetti ad imprinting può essere infatti specifica per alcuni tessuti, mentre in altre condizioni questi meccanismi possono essere disattivati (Ferron, Charalambous et al. 2011).

La metilazione del DNA rappresenta il marcatore mediante il quale l'imprinting è stabilito e trasmesso alla generazione successiva poiché costituisce un meccanismo dinamico e in grado di essere trasmesso durante la divisione cellulare nelle cellule figlie. I due alleli parentali acquisiscono due pattern di metilazione differenti a livello di regioni definite "Differentially methylated regions" (DMR), che determinano l'output trascrizionale del locus specifico. Queste regioni possono essere classificate come DMR germinali, se acquisiscono il pattern di metilazione differenziale nella linea germinale, oppure somatiche o secondarie, se la metilazione è stabilita dopo la fertilizzazione. Queste ultime costituiscono l'elemento chiave che determina l'espressione monoallelica dei geni, all'interno dei cluster soggetti ad imprinting. La metilazione del DNA avviene nei mammiferi prevalentemente sulle citosine a livello dei dinucleotidi CG ad opera di enzimi definiti DNA metiltransferasi; l'enzima DNMT3A e il suo regolatore DNMT3L in particolar modo sono responsabili e indispensabili per determinare il pattern di metilazione nella linea germinale (Kaneda, Okano et al. 2004). Le DMR che

acquisiscono la metilazione durante l'oogenesi sono frequentemente situate a livello del promotore di geni codificanti proteine o RNA non codificanti, mentre quelle acquisite durante la spermatogenesi si trovano in regioni intergeniche.

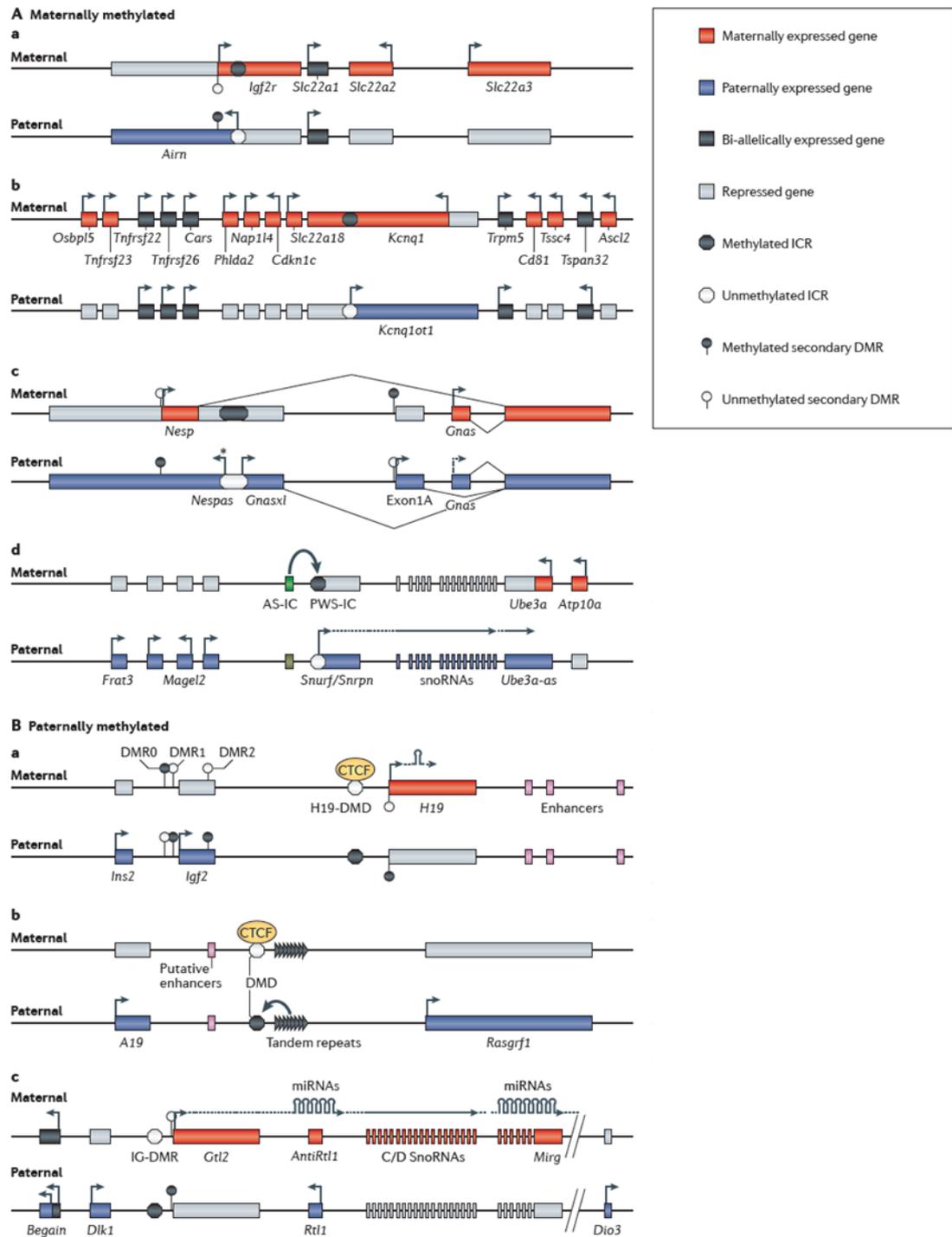


Figura 4: Esempi di alcuni cluster geni soggetti a imprinting (Ferguson-Smith 2011).

Nel locus che contiene il gene *Igf2r*, ad esempio, la DMR viene metilata nella linea materna. L'assenza di metilazione sull'allele paterno causa l'espressione di un RNA non codificante trascritto in modo antisenso a *Igf2r*, definito *Airn*, che agisce inibendo l'espressione dello stesso *Igf2r* sullo stesso cromosoma, agendo in-cis. Sull'allele materno invece il promotore di *Airn* è metilato e pertanto *Igf2r* risulta espresso. Un esempio di DMR metilata nella linea paterna è la H19-DMR, all'interno del locus *Igf2-H19*; in questo caso il meccanismo che provoca l'espressione differenziale dei geni del cluster è differente e coinvolge alcuni fattori definiti CCCTC-binding factors (CTCF). I CTCF sono proteine contenenti domini zinc-finger che legano il DNA in maniera dipendente dal pattern di metilazione, nel caso della H19-DMR, l'allele materno non metilato viene legato da questi fattori che isolano il promotore di *Igf2* dal legame di enhancer specifici, inibendone la trascrizione. In aggiunta questo legame favorisce l'interazione del promotore di H19 con gli stessi enhancers promuovendone la trascrizione. Al contrario, la metilazione dell'allele paterno blocca il legame dei CTCF favorendo l'espressione di *Igf2* e la repressione di H19. Anche le modificazioni delle proteine istoniche giocano un ruolo in questi processi, rafforzando il controllo esercitato dalle DMR sulla repressione/attivazione genica e contribuendo probabilmente alla definizione del pattern di metilazione nella linea germinale interferendo con le proteine DNMT3A/DNMT3L (Ooi, Qiu et al. 2007; Henckel, Nakabayashi et al. 2009). Questi esempi di clusters soggetti ad imprinting dimostrano la complessità di questi sistemi di regolazione, che coinvolgono metilazione del DNA, rimodellamento della cromatina ed espressione di RNA non codificanti.

Il ruolo dell'imprinting nelle patologie umane è noto da tempo, questi meccanismi hanno infatti contribuito a caratterizzare alcune malattie geniche ereditarie con fenotipo dipendente dalla provenienza parentale dell'allele mutato; viceversa lo studio di queste patologie ha fornito importanti indizi sulla localizzazione e organizzazione dei loci soggetti ad imprinting. Tra queste patologie è importante ricordare ad esempio la sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS) e le sindromi di Prader-Willi e Angelman. Questi ultimi due disordini sono frequentemente causati da delezioni o UPD a livello della stessa regione del cromosoma 15, ma presentano caratteristiche cliniche differenti a seconda che la mutazione sia ereditata dal padre (Angelman) o dalla madre

(Prader-Willi). Lo studio di queste patologie ha permesso di mappare le regioni di controllo dell'imprinting e comprendere i meccanismi mediante i quali agiscono.

### **Cluster DLK1/MEG3:**

Uno dei primi approcci che hanno permesso di identificare e mappare i cluster genici soggetti ad imprinting è stato l'utilizzo di modelli murini recanti traslocazioni cromosomiche bilanciate. Mediante accoppiamenti incrociati di questi modelli nel 1993 Cattanach e Rasberry dimostrarono l'indispensabilità di entrambi i corredi parentali del cromosoma 12 per lo sviluppo di un individuo vitale, evidenziando l'importanza dei meccanismi di imprinting in questa regione. Studi successivi hanno portato all'identificazione di un cluster genico soggetto ad imprinting genomico sulla parte distale del cromosoma 12 murino, il locus DLK1-MEG3, che nell'uomo è localizzato sul cromosoma 14q32.

Il locus contiene tre geni codificanti proteine, con espressione paterna, DLK1, RTL1 e Dio3 e una serie di RNA non codificanti di varie classi, lncRNA (MEG3), snoRNA e miRNA ad esclusiva espressione materna. Il dosaggio dei geni del cluster è controllato mediante metilazione di quattro regioni (DMR) che agiscono secondo un ordine gerarchico. Due DMR sono localizzate in corrispondenza dei geni DLK1 e MEG3, la prima (DLK1-DMR) comprende l'introne 4 e l'esone 5 del gene DLK1, la seconda (MEG3-DMR) copre la regione del promotore e il primo esone del gene MEG3, entrambe le DMR sono acquisite post-fertilizzazione. Un'altra DMR secondaria si trova circa 7.5 kb a monte del gene DLK1 (DMR-0). L'elemento di controllo principale, che controlla l'imprinting della regione (ICR) è situato tra DLK1 e MEG3 ed è definito IG-DMR (intergenic DMR); questa regione è una DMR germinale responsabile dell'espressione monoallelica dei geni del cluster, che acquisisce il pattern di metilazione durante la spermatogenesi ed è pertanto ipermetilata nella linea paterna. Studi di delezione di questa regione hanno permesso di comprendere quali elementi sono indispensabili per il mantenimento dell'imprinting a livello di questa regione; una delezione della IG-DMR trasmessa dalla linea materna provoca un cambiamento del pattern epigenetico in senso paterno, che risulta nella repressione di MEG3 e del

cluster di RNA non codificanti e nell'espressione dei geni codificanti da parte di entrambi gli alleli. D'altra parte, la delezione della IG-DMR sull'allele paterno non provoca conseguenze altrettanto evidenti, indicando che la copia materna non metilata è essenziale per reprimere l'espressione dei geni codificanti e attivare l'espressione degli RNA non codificanti.

Questi dati implicano un differente meccanismo di regolazione del dosaggio genico, rispetto al cluster genico Igf2-H19, con il quale il locus DL1-MEG3 condivide molte caratteristiche. Il cluster Igf2-H19 presenta due geni codificanti proteine ad espressione paterna (Igf2, Ins) ed un lncRNA espresso dall'allele materno (H19) e come nel locus DLK1-MEG3 la DMR che agisce come centro di controllo dell'imprinting (H19-DMR) acquisisce metilazione nella linea paterna. L'interazione tra proteine "insulator" CTCF e DMR determina la repressione/attivazione dei geni del cluster in maniera metilazione dipendente, in questo caso la delezione paterna della H19-DMR determina up-regolazione di H19 e down-regolazione di Igf2. L'assenza di siti di legame per proteine CTCF e il differente effetto della delezione paterna della IG-DMR fanno pensare che i meccanismi di controllo dell'imprinting nel locus DLK1-MEG3 siano differenti rispetto al cluster Igf2-H19 e restano tuttora da definire. Un'altra caratteristica peculiare di questo locus è un secondo livello di regolazione dell'espressione genica, che agisce in trans. L'allele materno esprime un trascritto non codificante antisenso a RTL1 (asRTL1) che contiene 5 microRNA (miR-431, -432, -433, -127, -136), poiché questi miRNA sono perfettamente complementari a RTL1, la loro espressione induce il silenziamento del gene codificato sull'allele paterno (Seitz, Youngson et al. 2003) (figura 5).

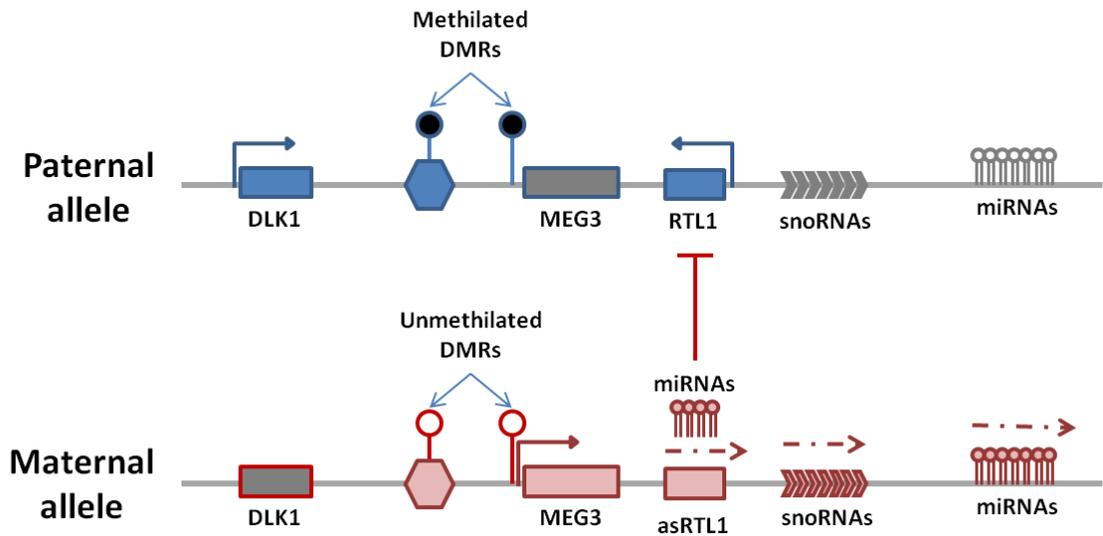


Figura 5: Organizzazione funzionale dei geni del cluster DLK1-MEG3.

DLK1 è una proteina transmembrana della famiglia Delta/Notch/Serrate, proteine caratterizzate da domini EGF-like ripetuti. A differenza degli altri ligandi classici di Notch, DLK1 non possiede il dominio DSL coinvolto nell'interazione e nell'attivazione di quest'ultimo e presenta un dominio intracellulare molto ridotto, nonostante queste caratteristiche è stato riportato che DLK1 può legare e inibire Notch. (Baladron, Ruiz-Hidalgo et al. 2005) (figura 6).

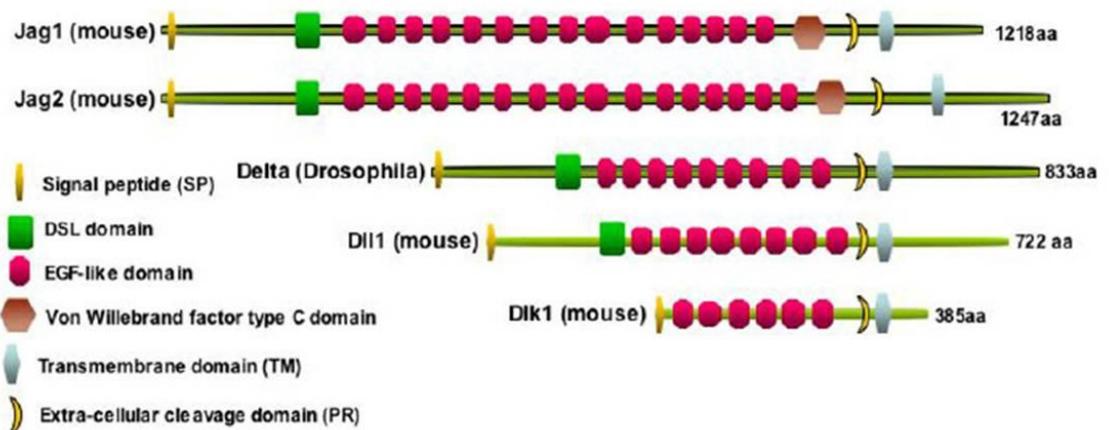


Figura 6: Differenza strutturale dei diversi membri della famiglia Delta/Notch/Serrate nel topo.

La proteina DLK1 è espressa sotto forma di diverse isoforme derivanti da splicing alternativo che differiscono nella lunghezza del dominio iuxtamembrana e del sesto dominio EGF-like. Le due varianti più lunghe (DLK1A, B) contengono un sito di taglio nel dominio iuxtamembrana che viene riconosciuto da proteasi extracellulari; dopo l'espressione sulla membrana DLK1 viene clivato e un lungo frammento della proteina, corrispondente a quasi tutta la porzione extracellulare, viene rilasciato nella matrice; le isoforme più corte di DLK1 (DLK1C, D) mancano di questa sequenza di riconoscimento e restano pertanto legate alla membrana cellulare.

DLK1 (denominato anche Pref-1, Preadipocyte Factor 1) riveste un ruolo importante nel corso dello sviluppo embrionale, mentre la sua espressione è mantenuta in pochi tessuti nell'individuo adulto. DLK1 è stato inizialmente descritto coinvolto nell'adipogenesi, i livelli di questa proteina risultano infatti essere elevati nei preadipociti e progressivamente downregolati nel corso del differenziamento. L'espressione costitutiva di DLK1 porta a una diminuzione del differenziamento adipocitario, evidenziando un effetto inibitorio esercitato da questa proteina (Wang, Kim et al. 2006).

Un ruolo di DLK1 è stato descritto anche nell'ematopoiesi, la sua espressione infatti aumenta nel corso del differenziamento megacariocitario. Modelli murini DLK1<sup>-/-</sup> presentano un alterato pattern di differenziamento linfocitario B a livello del midollo osseo e della milza e alterazioni del differenziamento megacariocitario e granulocitario (Sakajiri, O'Kelly et al. 2005; Raghunandan, Ruiz-Hidalgo et al. 2008). L'iperespressione di DLK1 nella linea cellulare promielocitica HL60 provoca invece una riduzione della proliferazione cellulare e del differenziamento (Li, Forman et al. 2005).

Ferròn et al. riportano l'espressione di DLK1 a livello della regione sub ventricolare (SVZ) del cervello, sede principale della neurogenesi a livello post-natale e nell'individuo adulto ad opera di progenitori neuronali (NSC) ipotizzando pertanto un suo possibile ruolo nel controllo della neurogenesi. Topi knockout per questa proteina mostrano infatti un'aumentata proliferazione delle NSC nei primi stadi di sviluppo post-natale, con conseguente diminuzione del numero di NSC quiescenti nel cervello adulto e della formazione di nuovi neuroni. Un'osservazione molto interessante che

emerge da questo studio è che in queste strutture vi è una perdita dell'imprinting di DLK1 dovuta a ipermetilazione della DMR germinale sull'allele materno, con conseguente espressione biallelica del gene, dato che sottolinea come l'imprinting possa essere dinamicamente regolato in determinate circostanze (Ferron, Charalambous et al. 2011). Stadtfeld et al. dimostrano invece che l'aberrante pattern metilazione ed espressione dei geni del cluster DLK1-MEG3, osservata in diversi cloni di cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) correla con una ridotto potenziale differenziativo (Stadtfeld, Apostolou et al. 2010).

Alterazioni del pattern di metilazione e dell'espressione dei geni del cluster DLK1-MEG3 sono state descritte in numerose patologie, DLK1 in particolar modo risulta essere iperespresso nei neuroblastomi e nei tumori al polmone. Nelle patologie ematologiche alterazioni dell'espressioni di DLK1 sono state riportate nelle CD34+ di pazienti con MDS e nelle AML (Sakajiri, O'Kelly et al. 2005). L'espressione di DLK1 nelle AML risulta essere biallelica, il che indica che in queste patologie i meccanismi di imprinting possono essere disattivati con conseguente riattivazione dell'espressione genica sull'allele materno (Khoury, Suarez-Saiz et al. 2010).

In uno studio del 2007, mediante analisi del profilo di espressione genica in cellule CD34+ di pazienti con mielofibrosi idiopatica (IM) è stato identificato nel nostro laboratorio un set di geni espressi in maniera differenziale nei soggetti patologici rispetto ai controlli, in grado di distinguere la patologia nei confronti di soggetti sani e delle altre MPN. La presenza di DLK1 tra i geni maggiormente up-regolati nelle CD34+ e nei granulociti di pazienti con mielofibrosi suggerisce un ruolo specifico di questa proteina nella patogenesi di questa condizione (Guglielmelli, Zini et al. 2007).

L'altro gene ad espressione paterna, RTL1 (Retrotrasposon-Like 1), possiede molte analogie con altri elementi trasponibili del genoma, ma ha perso la capacità di spostarsi autonomamente ed integrarsi. E' espresso prevalentemente nel corso dello sviluppo embrionale in alcuni tessuti e nella placenta, ma non è stata descritta alcuna funzione specifica nell'organismo adulto.

Il principale gene ad espressione materna è MEG3 (nel topo Gtl2), che codifica per un RNA non codificante di circa 1.6 kb espresso in numerosi tessuti e soprattutto a livello

cerebrale e nella ghiandola ipofisaria. In altri loci genici regolati da imprinting i ncRNA hanno la funzione di inibire i geni reciprocamente espressi mediante meccanismo che agisce in cis. E' pertanto possibile che anche in questo locus il trascritto codificato da MEG3 inibisca l'espressione di DLK1 e RTL1 sull'allele materno. E' stato però descritta una possibile funzione di MEG3 come oncosoppressore nei tumori ipofisari; MEG3 sarebbe infatti in grado di attivare p53 inibendo l'espressione del suo repressore MDM2. La ridotta espressione di MEG3 osservata nei tumori ipofisari potrebbe quindi portare ad inattivazione di p53 e sviluppo tumorale (Zhou, Zhong et al. 2007).

Oltre a MEG3 l'allele materno esprime un grande cluster di snoRNA e circa 50 miRNA, che probabilmente sono espressi in certi tessuti sotto forma di un grande trascritto unico processato successivamente; l'assenza apparente di promotori intermedi ed il fatto che tutti questi elementi presentano lo stesso orientamento, sono dati a favore di questa ipotesi. Il cluster di snoRNA è composto da una serie di RNA della famiglia C/D box ripetuti in tandem, solitamente questi elementi mediano la 2'-O-metilazione di altre specie di RNA come ad esempio gli rRNA e snRNA all'interno del nucleolo. Escludendo i 5 microRNA contenuti all'interno del trascritto RTL antisenso, la maggior parte dei miRNA del locus sono organizzati in un grande cluster. All'interno del cluster la maggior parte dei miRNA sono organizzati in serie ad elevata omologia di sequenza, disposti in tandem. L'espressione di queste molecole è riscontrabile nei tessuti embrionali e nella placenta ed è conservata nel cervello adulto. Sebbene la funzione di questi miRNA non sia ancora ben caratterizzata, alterazioni nella loro espressione sono state osservate in numerose patologie.

### **MicroRNA:**

I microRNA sono una classe di RNA non codificanti che svolgono un importante ruolo di regolazione dell'espressione genica non solo nell'uomo, ma anche nelle piante e in tutti gli esseri eucarioti pluricellulari.

Alcune caratteristiche peculiari permettono di classificare una molecola di RNA come miRNA (Berezikov, Cuppen et al. 2006):

- Si tratta di una molecola di RNA a singolo filamento lunga circa 22 nucleotidi.
- Viene prodotto a partire da un precursore con una struttura secondaria caratterizzata da motivi a forcina che non contengono lunghi loop interni. Il miRNA maturo occupa il gambo della struttura a forcina.
- Viene processato dall'RNasi di tipo III Dicer; esistono altre classi di piccoli RNA, ma la loro maturazione non richiede l'intervento di questo enzima.
- Infine la sequenza di questi microRNA e la loro struttura sono conservate in specie differenti.

I miRNA sono molecole di RNA antisenso che, grazie alle loro caratteristiche, funzionano da elementi guida nel silenziamento genico post trascrizionale.

Infatti appaiandosi a RNA messaggeri bersaglio ne promuovono la degradazione oppure come avviene più di frequente, ne bloccano la traduzione.

Approcci bioinformatici, hanno dimostrato che la regolazione dell'espressione genica da parte dei miRNA si realizza secondo meccanismi piuttosto complessi: un singolo miRNA può appaiarsi a diversi messaggeri regolando quindi l'espressione di più geni e talvolta singoli RNA messaggeri presentano siti di riconoscimento per miRNA diversi, dimostrando quanto siano raffinati e precisi questi meccanismi di regolazione in cui varie vie di segnalazione confluiscono nell'espletare una singola funzione.

Vista questa plasticità funzionale, non stupisce che alcuni miRNA svolgano un ruolo chiave in vie di regolazione diverse: controllo degli stadi di sviluppo, proliferazione, differenziazione e morte cellulare, emopoiesi, sviluppo del sistema nervoso.

**Tabella 1: Funzione di alcuni miRNA caratterizzati in varie specie.**

miRNA	Function	Known target	Species
lin-4	Developmental timing	lin-14, lin-28	Caenorhabditis elegans
let-7	Developmental timing	lin-41, hbl-1	Caenorhabditis elegans
lsey-6	Neuronal patterning	cog-1	Caenorhabditis elegans
mir-273	Neuronal patterning	die-1	Caenorhabditis elegans
bantam	Cell death, proliferation	hid	Drosophila Melanogaster
mir-14	Cell death, fat storage	Caspase?	Drosophila Melanogaster
mir-181	Hematopoiesis	?	Mus Musculus
mir-196	Development?	HoxB8,HoxC8 HoxD8,HoxA7	Mus Musculus
mir-143	Adipocyte differentiation	?	Homo Sapiens

Appare quindi di estrema rilevanza il ruolo di queste molecole nel modellare i trascrittomi di numerosi organismi, dai più semplici come C.Elegans ai più complessi come l'uomo. La notevole conservazione di sequenza dei miRNA tra varie specie è un'ulteriore prova di quanto siano antichi e siano stati selezionati nell'evoluzione i meccanismi di regolazione basati su corte molecole di RNA antisense.

Nel 1993 uno studio dimostrò che il gene lin-4 implicato nel controllo dello sviluppo di C.Elegans codificava due RNA, uno di circa 60 nucleotidi e uno di circa 22. L'RNA più corto costituiva il trascritto maturo derivato dalla processazione del primo. Successivamente, fu dimostrato che questa breve molecola di RNA poteva appaiarsi come antisense a varie sequenze nella regione non tradotta all'estremità 3' del gene lin-14, inibendo la sua espressione. La proteina prodotta dal gene lin-14 risulta infatti essere presente nei primi stadi di sviluppo di C.Elegans per ridursi in relazione all'espressione di lin-4 nelle diverse fasi evolutive. Anche lin-28 è un bersaglio di lin-4 poiché anch'esso presenta una sequenza complementare al 3'. Fino al 2000 questa piccola molecola di RNA fu considerata un caso isolato in quanto non fu trovata traccia di molecole simile né in C.Elegans né in altri organismi; la prospettiva cambiò radicalmente dopo la scoperta del secondo miRNA. Let-7 codifica anch'esso per un RNA di circa 22 nucleotidi, che promuove lo sviluppo larvale nelle fasi più tardive di C.Elegans andando ad inibire l'espressione del gene lin-41. Anche in questo caso la regolazione è dovuta all'appaiamento di let-7 con regioni non tradotte al 3' dell'RNA messaggero codificato da lin-41. Inizialmente per la loro funzione come regolatori dello sviluppo larvale di C.Elegans, lin-4 e let-7 assunsero la denominazione di small

temporal RNA (stRNA), ma questa posizione dovette essere rivista poco dopo. Fu infatti dimostrata la conservazione di let-7 in numerose altre specie compreso l'uomo e successivamente furono trovati circa un centinaio di geni esprimenti brevi sequenze di RNA non codificante in insetti, nematodi e nell'uomo. Queste nuove molecole rispecchiavano alcune caratteristiche di lin-4 e let-7, ovvero erano composte da circa 22 nucleotidi ed erano potenzialmente prodotte a partire da un precursore di dimensioni maggiori; nella maggior parte dei casi non avevano funzioni specifiche nel controllo dello sviluppo, ma piuttosto venivano espresse solo in determinati tipi cellulari, venendo quindi a mancare la presupposta funzione di regolatori temporali. La definizione di stRNA fu quindi modificata in microRNA (miRNA). (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001; Bartel 2004)

Una delle domande che molti ricercatori si sono posti è: cosa è cambiato dalla scoperta di lin-4, perchè nessun altro miRNA è stato isolato in sette anni prima di let-7? Sicuramente una delle risposte è data dalle stesse caratteristiche dei miRNA: le loro piccole dimensioni, il fatto che spesso sono espressi solo in determinati tessuti e in precise condizioni, e la mancanza di un marcatore specifico che permetta di distinguere un microRNA da qualsiasi altra breve sequenza di RNA. Non bisogna però trascurare l'enorme sviluppo fatto dalla bioinformatica in questo periodo e le sempre maggiori conoscenze sul genoma. Approcci computazionali affiancati da metodiche sperimentali sono stati messi a punto per individuare geni codificanti miRNA all'interno dei vari genomi. In un primo momento sono stati utilizzati approcci volti a individuare ortologhi e paraloghi di geni miRNA conosciuti, oppure basati sulla prossimità di geni miRNA conosciuti a sequenze in grado di formare strutture stem-loop, per valutare la possibile presenza di clusters. In seguito sono state messe a punto metodiche più raffinate che utilizzano informazioni sulla struttura secondaria, caratteristica fondamentale dei miRNA; i parametri valutati sono quindi la conservazione di particolari strutture emerse dal confronto di miRNA noti e la stabilità termodinamica di queste strutture rispetto a molecole simili. Un approccio non basato sulla struttura secondaria sfrutta invece la conservazione di particolari sequenze bersaglio spesso presenti a livello del 3' non tradotto di molti geni, che in molti casi sono state

dimostrate essere complementari a motivi chiave di molti miRNA (Berezikov, Cuppen et al. 2006).

Questi studi affiancati da verifiche sperimentali hanno permesso l'individuazione di moltissimi geni miRNA mettendo in evidenza alcune caratteristiche (Bartel 2004):

- La maggior parte dei miRNA è trascritta a partire da singoli geni, unità trascrizionali indipendenti ognuna con il proprio promotore e con precisi meccanismi di regolazione. Questi geni sono localizzati in regioni del genoma non codificanti proteine.
- Una discreta minoranza di geni che codificano per i miRNA si trovano in regioni introniche all'interno di altri geni, con lo stesso orientamento dell'mRNA codificato da questi. In questo caso il microRNA non sarà trascritto a partire dal suo promotore, ma sarà processato dall'introne dopo lo splicing, e pertanto si osserverà la contemporanea espressione del miRNA e del prodotto proteico di quel gene.
- Altri miRNA formano dei clusters all'interno del genoma. L'espressione di questi miRNA comporta la trascrizione di un lungo precursore contenente tutti i geni del cluster, che poi sarà processato e darà origine a diversi micro-RNA maturi. È stato inoltre osservato che spesso i geni dello stesso cluster sono correlati tra loro.

L'utilizzo di tecnologie per lo studio dell'espressione genica, come i micro arrays, ha permesso di osservare come i miRNA siano espressi nei diversi tessuti. Vi sono microRNA espressi solo in determinati tessuti: ad esempio mir-1 è stato trovato solo nel miocardio dei mammiferi, mir-122 solo nel fegato, mir-223 solo nei granulociti e nei macrofagi. Altri miRNA sono espressi solo in precisi stadi di sviluppo, ma non nell'individuo adulto; ad esempio i geni del cluster mir-290-mir-295 sono espressi solo nelle cellule staminali embrionali di topo, ma non si ritrovano nelle cellule differenziate. Un'altra differenza è costituita dal livello di espressione dei diversi miRNA: alcuni sono presenti in numero elevatissimo all'interno delle cellule, altri solo

in poche copie, forse a causa di una forte attività di trascrizione, forse a causa di una diversa stabilità della molecola.

### Biogenesi:

Per comprendere i meccanismi che regolano l'espressione dei miRNA, è opportuno ricordare tutti i vari steps di maturazione di queste molecole, che coinvolgono numerosi enzimi e complessi molecolari.

Questo processo si può riassumere in 5 momenti importanti:

1. Sintesi del pri-miRNA.
2. Produzione del pre-miRNA da parte dell'enzima Drosha.
3. Esportazione del pre-miRNA dal nucleo al citoplasma.
4. Produzione del miRNA maturo da parte dell'enzima Dicer.
5. Assemblaggio del complesso enzimatico RISC.

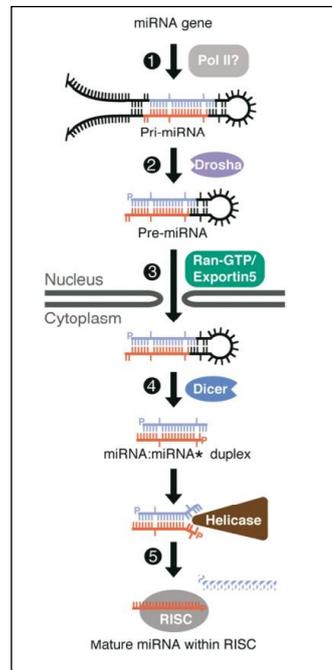
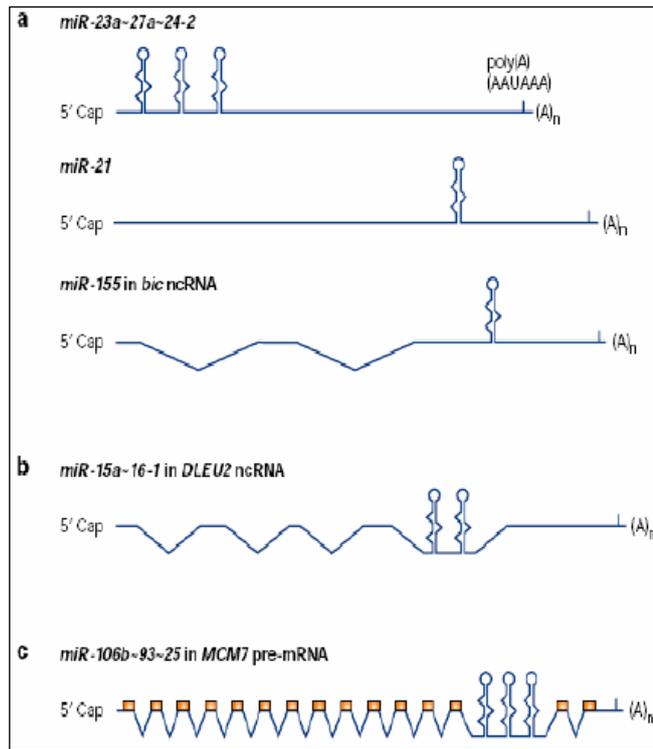


Figura 7: Pathway maturativo dei miRNA.

Sono due gli enzimi che potrebbero plausibilmente essere implicati nella trascrizione del pri-miRNA: le RNA polimerasi II e III. Sicuramente i miRNA intronici, che non possiedono un promotore proprio, ma sono contenuti all'interno di geni ospiti, vengono trascritti dalla RNA polimerasi II, enzima responsabile della sintesi di tutti gli mRNA e alcuni RNA non codificanti. Non è altrettanto facile individuare l'enzima implicato nella trascrizione dei miRNA codificati da singoli geni indipendenti e contenuti in clusters. La RNA polimerasi III è implicata nella trascrizione di alcuni dei più corti RNA non codificanti, come i tRNA, l'rRNA 5s e uno degli snRNA che costituiscono lo spliceosoma, e in un primo momento era stato quindi ipotizzato che potesse essere questo l'enzima responsabile della sintesi dei pri-miRNA.

Vi sono però alcune evidenze che indicherebbero come candidato principale l'RNA polimerasi II: in primo luogo il fatto che spesso i pri-miRNA sono lunghi anche diverse migliaia di basi e che spesso nella loro sequenza sono presenti sequenze poli-u, fattori che entrambi promuoverebbero il distacco della pol III dalla doppia elica di DNA e quindi la prematura interruzione della trascrizione. In secondo luogo il fatto che molti miRNA sono espressi diversamente in determinate situazioni, fattore caratteristico dei prodotti della polimerasi II, ma non della III. Alcuni esperimenti inoltre dimostrerebbero che questi trascritti primari in molti casi risultano essere provvisti del cap al 5' e della coda di poli-a al 3', anche questa caratteristica dei prodotti della pol II. (Lee, Jeon et al. 2002)

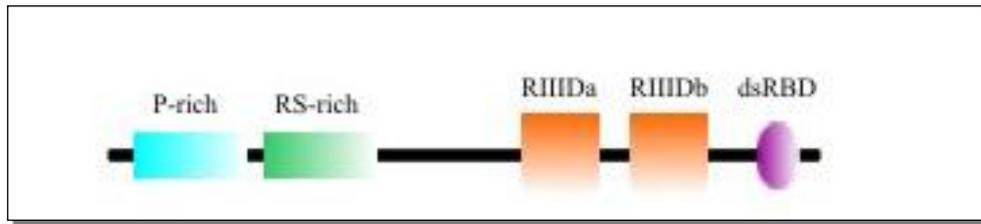
Nonostante queste evidenze, è probabile che la maggior parte dei miRNA siano trascritti dalla pol II, ma non tutti: è infatti plausibile che anche le altre polimerasi siano parzialmente coinvolte nella sintesi di queste molecole, così come ad esempio avviene per gli altri small nuclear RNA (snRNA).



**Figura 8: Struttura dei pri-miRNA . (a) miRNA in trascritti esonici non codificanti. (bc) miRNA intronici in trascritti codificanti proteine(c) e non codificanti (b).**

I pri-miRNA sono caratterizzati da una o più regioni (nel caso di trascritti policistronici), con struttura ad ansa e stelo, fiancheggiate da sequenze più o meno lunghe di RNA lineare a singola elica. Questi due elementi sembrano essere importanti per il riconoscimento di questo precursore da parte dell'enzima Drosha. In particolar modo per essere efficientemente processata da Drosha la struttura a forcina deve essere composta da un'ansa di circa 10 nucleotidi e uno stelo leggermente più lungo di quello del pre-miRNA. Anche le regioni a singolo filamento fiancheggianti sembrano essere importanti per il processamento, caratteristica che distingue Drosha da altre RNasi di tipo III.

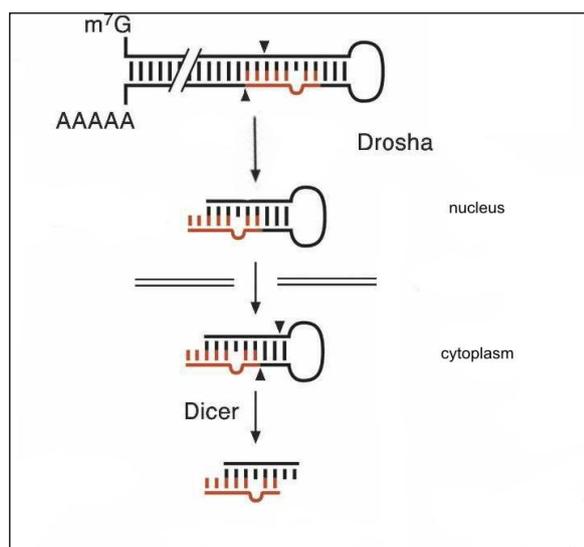
Le ribonucleasi di tipo III sono enzimi presenti sia nei procarioti, che negli eucarioti e svolgono un ruolo importante nel processamento di rRNA, tRNA e altri RNA non codificanti. Drosha è una proteina di circa 160 kDa che presenta due domini RNasi III in tandem e un solo dominio di legame per l'RNA a doppio filamento.



**Figura 9: Domini di Drosha.**

Questa particolare struttura con due domini di taglio indipendenti produce il taglio caratteristico con estremità sfalsate: il pre-miRNA che deriva da questo taglio è quindi formato dalla regione ad ansa del precursore e da parte dello stelo, con circa due nucleotidi in più al 3' a livello del sito di taglio.

Le estremità sfalsate costituiscono un elemento importante per il successivo riconoscimento da parte di Dicer. Drosha inoltre agisce in un complesso molecolare con un'altra proteina, DGCR8 (Pasha negli invertebrati), che sembra essere coinvolta nel legame del pri-miRNA (Lee, Ahn et al. 2003; Zeng and Cullen 2005; Zeng, Yi et al. 2005).



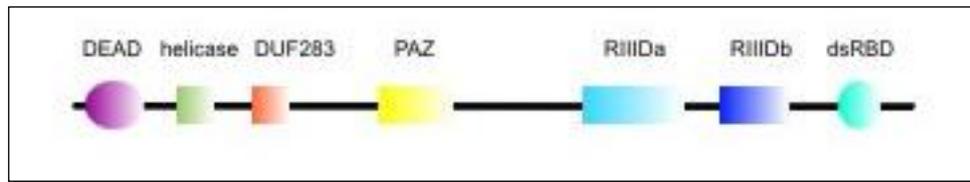
**Figura 10: Struttura del pre-miRNA dopo il clivaggio da parte di Drosha.**

Queste prime fasi del processamento dei microRNA avvengono all'interno del nucleo, le successive, dal legame con Dicer al riconoscimento del bersaglio, si svolgono invece nel citoplasma; il passaggio nucleo-citoplasma è mediato da una proteina di trasporto, l'esportina-5.

Lo scambio di molecole tra nucleo e citoplasma avviene attraverso i pori, strutture presenti sull'involucro nucleare e la selettività di questo trasporto è affidata ad un gruppo di recettori che facilitano il passaggio di determinate molecole attraverso i pori: le importine e le esportine. Queste proteine agiscono come vettori che interagendo con le nucleoporine, che costituiscono i pori, trasportano all'interno o all'esterno del nucleo le molecole ad esse legate, conferendo specificità e direzionalità al passaggio di molecole. Sia le importine che le esportine, per svolgere la loro funzione si legano al complesso Ran-GTP che si trova in concentrazione maggiore all'interno del nucleo: il legame di un'importina con Ran-GTP promuove pertanto il rilascio della molecola legata, viceversa un'esportina complessata a Ran-GTP lega con affinità maggiore il bersaglio. Nel citoplasma viene stimolata l'attività GTPasica di Ran, che converte il GTP in GDP destabilizzando il legame tra esportina e la molecola cargo. Inibendo mediante RNA interfering l'espressione dell'esportina-5, è stato dimostrato che questo trasportatore è implicato direttamente nel passaggio di pre-miRNA e short hairpins RNA nel citoplasma (Yi, Qin et al. 2003).

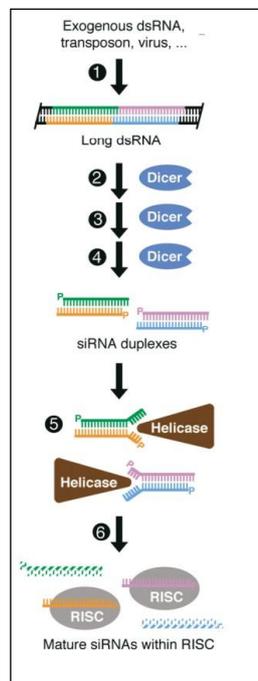
Il passo successivo nella maturazione dei miRNA è il taglio del loop del pre-miRNA, con la formazione di una breve sequenza di RNA a doppia elica, formata quindi da un filamento che costituisce il miRNA maturo e il filamento complementare (indicato come miRNA\*).

Questo step coinvolge Dicer, una ribonucleasi di tipo III citoplasmatica, che è responsabile anche della formazione degli small interfering RNA nell'RNA interfering. Dicer è una proteina di 220 kDa che contiene due domini RNase III, un dominio di legame per l'RNA a doppio filamento, un probabile dominio con attività elicastica e un dominio PAZ.



**Figura 11: Domini di Dicer.**

Dicer riconosce la porzione a doppia elica del pre-miRNA, in particolare sembra che abbia un'elevata affinità verso il 5' fosfato e l'estremità 3' sfalsata della molecola ed effettua il taglio a circa due giri di elica dalla base dello stelo. Poiché anche questo enzima possiede due domini RNasi III indipendenti, anche il taglio effettuato da Drosha produce un'estremità sporgente al 3' del filamento complementare. A livello di Dicer i pathways della biosintesi dei miRNA e del silenziamento genico mediante RNAi confluiscono; questo enzima è infatti responsabile della produzione dei siRNA, ottenuti mediante successivi clivaggi di una lunga molecola di RNA a doppio filamento.



**Figura 12: RNAi, produzione dei siRNA da parte di Dicer e assemblaggio di RISC.**

Soltanto uno dei due filamenti della molecola ottenuta dopo il taglio di Dicer costituisce il miRNA maturo e viene incorporato nel complesso RISC, ma non è ancora chiaro se l'altro filamento svolga una distinta funzione nella cellula, oppure se sia semplicemente destinato alla degradazione.

Circa il meccanismo con il quale viene selezionato uno dei due filamenti in favore dell'altro, si ritiene che in base alla relativa stabilità al 5' dei due filamenti, uno venga degradato, mentre l'altro incorporato nel complesso RISC: una supposta elicasi despiralizza la doppia elica partendo dall'estremità più instabile e favorisce l'ingresso all'interno del complesso del filamento che presenta legami più labili al 5'. Non è ancora del tutto chiaro se questa despiralizzazione sia svolta da una specifica proteina, oppure dallo stesso Dicer, che presenta un dominio DEAD-box con attività elicastica. (Maniataki and Mourelatos 2005).

#### **miRtrons, IsomiRs, moRNA:**

La maggior parte dei miRNA animali è trascritta a partire da unità trascrizionali indipendenti o può derivare da esoni o introni di altri geni, circa la metà dei miRNA umani è localizzata infatti all'interno di esoni di geni codificanti. Questi microRNA intronici possono presentare un promotore indipendente, oppure essere cotrascritti insieme al gene ospite. La processazione dei miRNA intronici segue la stessa via dei microRNA intergenici, con due successivi clivaggi enzimatici da parte di Drosha e Dicer. Recentemente è stato scoperto un gruppo di microRNA intronici, che viene processato in maniera indipendente da Drosha, queste molecole sono state definite "Mirtrons" (Ruby, Jan et al. 2007). I miRtrons originano a partire da introni di ridotte dimensioni, in grado di formare strutture stem-loop e sfruttano i macchinari di splicing nella prima parte di processazione, aggirando il taglio di Drosha. Queste strutture stem loop mancano infatti della porzione terminale dello "stelo" e delle sequenze fiancheggianti a singolo filamento, entrambe strutture fondamentali per il riconoscimento da parte di Drosha; questi precursori confluiscono poi nella stessa via di processamento dei miRNA convenzionali. I Mirtrons sono stati individuati inizialmente in Drosophila e nei

nematodi, ma successivamente caratterizzati anche nei mammiferi, con alcune differenze dal punto di vista strutturale (Berezikov, Chung et al. 2007).

L'applicazione di metodiche di sequenziamento massivo allo studio dei microRNA ha permesso di incrementare notevolmente la possibilità di identificare nuovi microRNA e di ampliare le conoscenze su quello che si può definire "miRnoma". Queste metodiche hanno portato infatti alla scoperta di nuove varianti di microRNA noti, definite da Morin et al. al "isomiRs" (Morin, O'Connor et al. 2008). Gli IsomiR sono microRNA che presentano variazioni rispetto alla sequenza convenzionale annotata su miRBase, su questo database ogni pre-miRNA è associato ad uno o due microRNA maturi (es, miR-1 e miR-1\*). Pertanto, la scoperta degli isomiR presuppone che ad un singolo precursore possano essere associate più sequenze mature. Si possono distinguere diversi tipi di isomiRs che differiscono nella struttura e/o nella modalità con la quale sono originati. Le specie più abbondanti di IsomiR possono differire dalla sequenza annotata su miRBase per la lunghezza delle estremità al 3' o al 5', per la presenza di una base aggiuntiva al 3', oppure presentar uno o più mismatch all'interno della sequenza. Il primo tipo di IsomiRs deriva dalla presenza di siti di taglio alternativi per gli enzimi Drosha e Dicer; il microRNA maturo derivante dal taglio può pertanto presentare alcuni nucleotidi in più o meno alle due estremità. Gli altri due tipi di IsomiRs derivano invece da modificazioni successive della molecola di RNA: l'estensione di una base al 3' del miRNA costituisce la variante più frequente per quasi tutti i miRNA ed avviene per aggiunta di un nucleotide da parte di alcuni enzimi. La molecola risultante sarà pertanto complementare (Kawahara, Zinshteyn et al. 2007) alla sequenza genomica in tutte le posizioni tranne l'ultima (Wyman, Knouf et al. 2011). L'ultimo sottotipo di isomiRs deriva da editing post-trascrizionale della molecola ad opera di deaminasi che agiscono su RNA (ADAR), questi enzimi catalizzano la deaminazione dell'adenina in inosina (che si traduce con una transizione A-G) o della citosina in uracile (transizione C-U) e tali varianti costituiscono il gruppo meno frequente (Luciano, Mirsky et al. 2004; Kawahara, Zinshteyn et al. 2007). E' importante sottolineare che a questo gruppo di isomiRs possono appartenere anche varianti originate da polimorfismi genetici di popolazione o mutazioni acquisite, ed è pertanto fondamentale in questi casi indagare l'origine della variazione per poterne delineare il possibile significato patologico.

L'ultima e meno caratterizzata famiglia di molecole che possono originare da pre-microRNA sono i cosiddetti microRNA-offset RNA (moRNA), descritti per la prima volta in *Ciona intestinalis* (Shi, Hendrix et al. 2009). Inizialmente identificati come prodotti collaterali della processazione dei miRNA, i moRNA sono molecole di circa 20 paia di basi derivanti da entrambe le estremità del pre-microRNA (ma prevalentemente dall'estremità 5'), osservate in diversi tessuti normali e tumorali (Meiri, Levy et al. 2010; Bortoluzzi, Bisognin et al. 2012). La sequenza del moRNA in alcuni casi può sovrapporsi per poche basi al microRNA contenuto nello stesso precursore. Il fatto che i moRNA siano processati prevalentemente dall'estremità 5' del precursore indipendentemente dalla posizione del miRNA stesso e che la loro sequenza sia spesso conservata nel corso dell'evoluzione, suggerisce che queste molecole costituiscano una nuova classe funzionale di RNA.

#### **Meccanismi di silenziamento genico:**

RISC (RNA-induced silencing complex), che costituisce l'effettore finale di tutta questa via di regolazione dell'espressione genica, è un grande complesso ribonucleoproteico che utilizza il miRNA maturo come stampo e si lega all'RNA messaggero bersaglio bloccandone la traduzione.

Non è ancora stato accertato quali siano tutti i componenti del complesso, ma sembra ormai evidente che un ruolo chiave è svolto da proteine della famiglia Ago, presenti nell'uomo e in numerosi altri organismi.

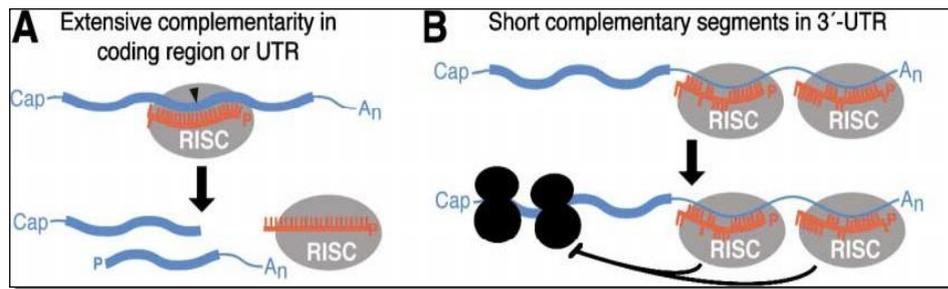
Queste proteine di circa 100 kDa presentano domini PAZ e PIWI, e questi ultimi specialmente sembrano essere direttamente coinvolti nel clivaggio del messaggero bersaglio. In particolar modo nell'uomo, la proteina Ago2, sembra essere l'unica della famiglia a possedere questa attività, nonostante i domini PIWI siano conservati anche negli altri membri. Si pensa che proprio Ago 2 nell'uomo abbia un importante ruolo nel complesso di silenziamento genico.

Il dominio PAZ invece è un motivo di legame per l'RNA che riconosce specificamente le estremità sfalsate prodotte dal taglio di Dicer (Maniataki and Mourelatos 2005).

Purificando da lisati cellulari i miRNPs (miRNA ribonucleoprotein complexes), è stato osservato che i microRNA risiedono in un complesso di grandi dimensioni che contiene Ago2 e le elicasi Gemin3 e Gemin4, ma non è noto se questo costituisca un complesso funzionale già di per sé, oppure rappresenti un intermedio incompleto. Un'ipotesi plausibile resta comunque il fatto che possano esistere vari complessi RISC, formati da costituenti diversi che riconoscono bersagli diversi e svolgono funzioni diverse. A supporto di ciò è da tenere in considerazione il grande numero di proteine che appartengono alla famiglia Ago riscontrate nelle varie specie (Bartel 2004).

RISC riconosce i bersagli in base alla complementarietà più o meno perfetta tra il miRNA e l'mRNA, l'endonucleasi del complesso poi taglia il messaggero tra i nucleotidi 10 e 11 appaiati al miRNA. Dopo il clivaggio, il microRNA resta intatto e può legarsi ad un altro bersaglio. Particolarmente importante per il riconoscimento del target sembra essere un core nucleotidico (seed sequence, nucleus) al 5' del miRNA, che è una breve sequenza di circa 7 nucleotidi in molti casi perfettamente complementare al 3' non tradotto di vari messaggeri: questa regione è stata dimostrata essere coinvolta nei meccanismi di repressione post-trascrizionale.

In realtà il taglio dell'mRNA bersaglio è solo uno dei modi in cui il miRNA impedisce la trascrizione e la via alternativa, che negli animali sembra addirittura essere prevalente è la repressione della trascrizione; in questo caso il messaggero resta intatto, ma ne viene impedita la traduzione a livello ribosomale. I meccanismi e le ragioni per cui un messaggero viene degradato o meno non sono ancora ben noti; in accordo però con il modello che al momento raccoglie maggiori consensi, sarebbe la complementarietà tra microRNA e mRNA che determina quale delle due modalità viene attivata. Si pensa, infatti, che se l'mRNA si appaia perfettamente o quasi con il miRNA, allora verrà tagliato dal complesso RISC; se però le due molecole non sono sufficientemente complementari ed il messaggero contiene vari siti di riconoscimento per il miRNA, allora ne verrà preferenzialmente bloccata la traduzione. Un'altra ipotesi potrebbe però essere che non tanto il miRNA, quanto la composizione del complesso di silenziamento genico ad esso associato determini il meccanismo mediante il quale viene bloccata la sintesi di una proteina.



**Figura 13: Meccanismi di silenziamento genico da parte di RISC**

Già dai primi studi su lin-4 fu osservato che il microRNA induceva una riduzione dell'espressione della proteina codificata da lin-14 senza però influire sulla concentrazione del messaggero. Studi successivi evidenziarono anche il fatto che il profilo dei poliribosomi di lin-14 non variava nei vari stadi di sviluppo del nematode. Questi due fattori riassumono il concetto per cui il microRNA lin-4 non agisce degradando il messaggero di lin-14, ma bloccandone la traduzione. Non solo, ma il fatto che la densità dei ribosomi sul messaggero non varia sta ad indicare il fatto che la traduzione viene bloccata ad uno step più tardivo, probabilmente in fase di allungamento o terminazione. È possibile che proprio la presenza di più siti di riconoscimento per un miRNA sul messaggero e quindi il simultaneo assemblaggio di vari complessi RISC su di esso favorisca l'arresto di tutto il macchinario di traduzione.

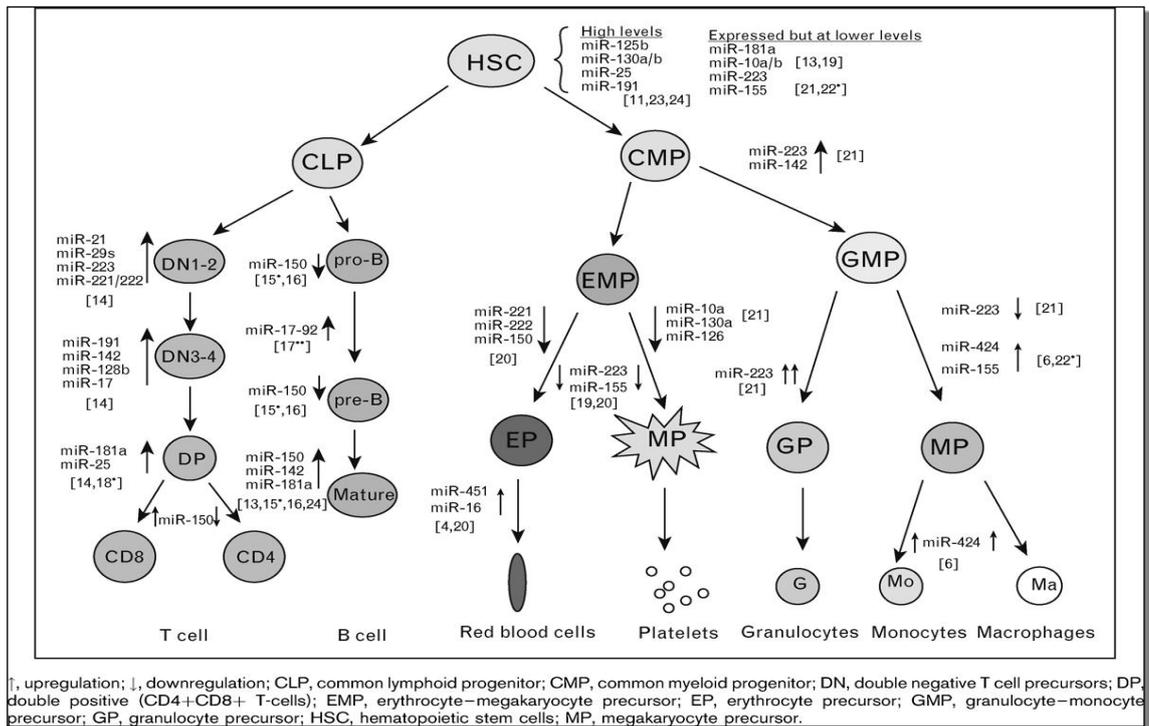
Anche lo studio dei bersagli dei miRNA ha fatto grandi passi avanti con l'utilizzo crescente della bioinformatica, che costituisce un utile strumento di screening ad ampio raggio. Ad oggi sono stati sviluppati numerosi algoritmi per predire i possibili bersagli dei miRNA; questi programmi si basano sul grado di complementarietà tra il microRNA e il 3' non tradotto del messaggero. Nel riconoscimento del bersaglio gioca un ruolo fondamentale la così detta "seed sequence", una breve sequenza di nucleotidi al 5' del miRNA che si appaiano perfettamente al bersaglio; questo elemento, insieme alla conservazione tra le varie specie di questa regione di legame, costituiscono le basi per effettuare previsioni dei bersagli dei miRNA.

Numerosi approcci sperimentali sono stati studiati per confermare queste previsioni, ed i più usati si basano su costrutti artificiali formati da un gene reporter (solitamente la luciferasi), contenente la regione non tradotta al 3' del bersaglio, insieme con il possibile sito di legame per il miRNA. Questi costrutti vengono trasfettati all'interno di cellule esprimenti il microRNA (come controllo vengono utilizzati costrutti mutati all'interno del sito di legame) e la regolazione da parte del miRNA viene quindi evidenziata da una ridotta attività del reporter wild type rispetto al mutato.

Un altro approccio su scala più larga invece si basa sullo studio dell'espressione genica mediante micro array dopo aver aumentato all'interno della cellula la concentrazione del miRNA mediante l'utilizzo di siRNA oppure tramite l'infezione con adenovirus ricombinanti (Krutzfeldt, Poy et al. 2006).

### **miRNA ed ematopoiesi fisiologica:**

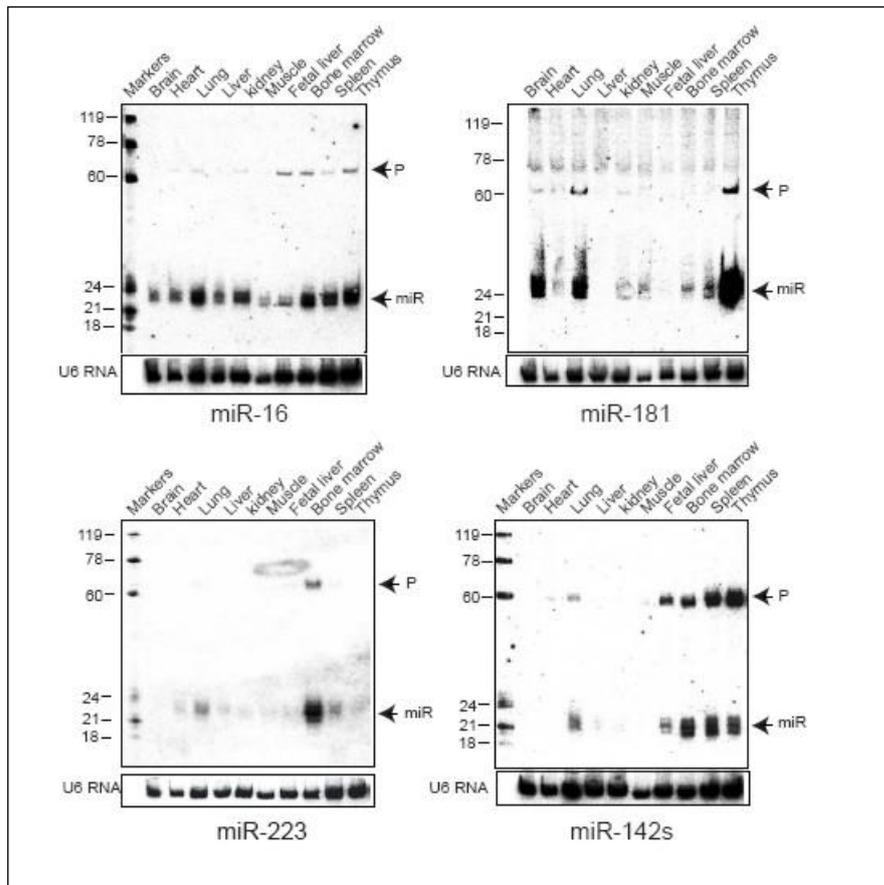
L'ematopoiesi comprende tutta quella serie di processi che garantiscono l'omeostasi della componente cellulare del sangue sia in condizioni fisiologiche sia in risposta a condizioni particolari, come la perdita o la distruzione di tali cellule oppure un aumento della richiesta da parte dell'organismo. 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.



**Figura 14: MicroRNA coinvolti nell'ematopoiesi**

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, rappresentando 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 particolar 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 15: 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).**

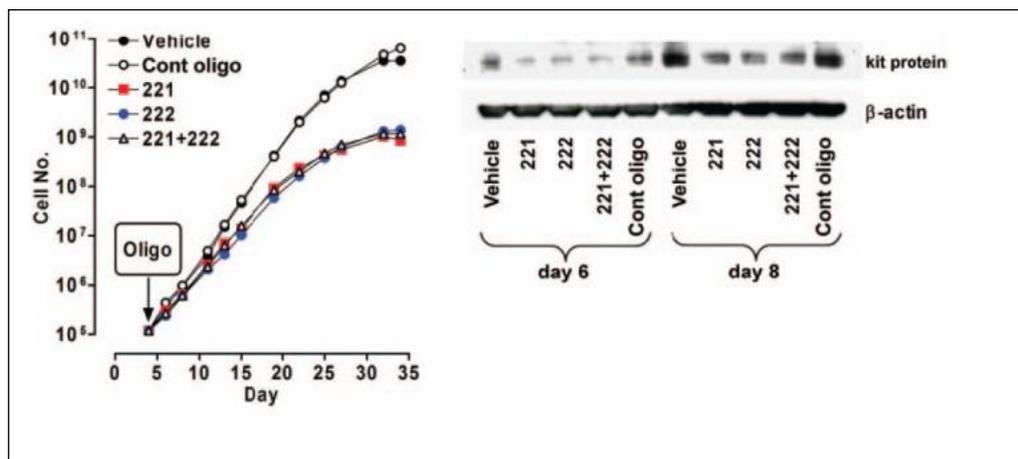
L'espressione di questi tre miRNA è significativamente alta nel timo per quanto riguarda il miR-181, nel midollo per il miR-223, nella milza, nel midollo e nel timo per il miR-142s; nei mammiferi adulti questi tre tessuti svolgono importanti ruoli nell'ematopoiesi, e si può quindi pensare che i vari 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 microRNA 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 microRNA 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.



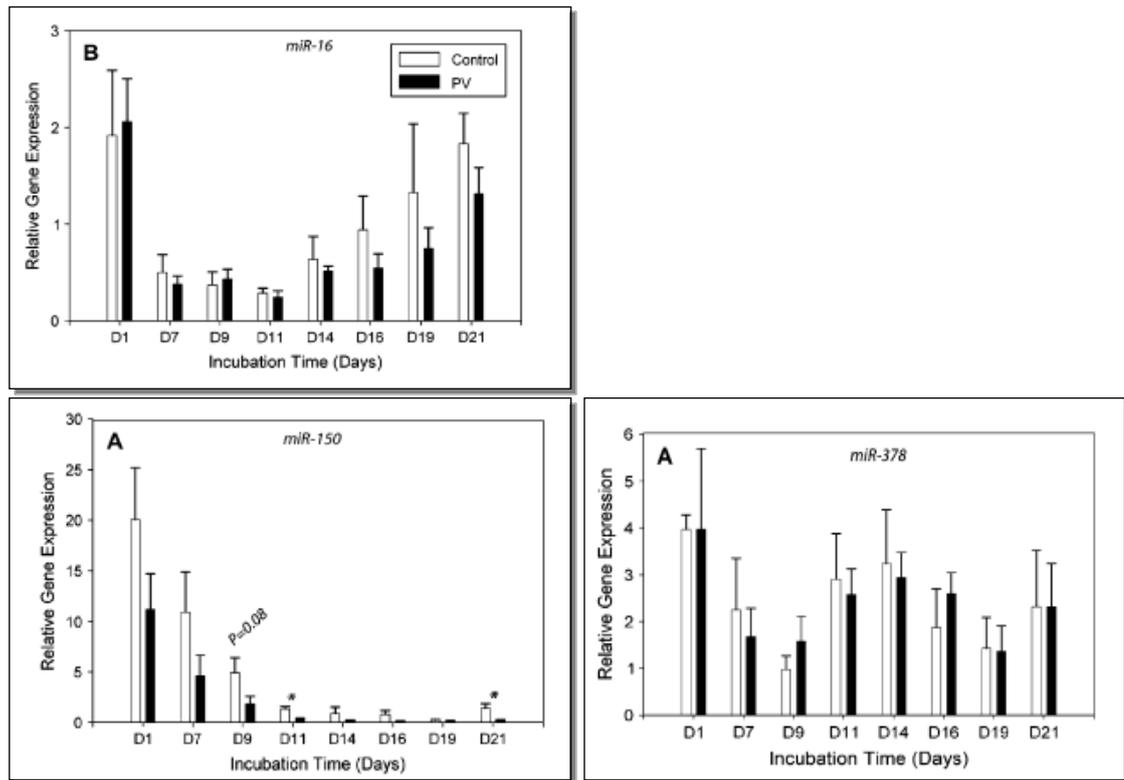
**Figura 16: Effetti della produzione ectopica dei miR-221 e 222 sulla proliferazione cellulare (a sinistra). Inibizione della sintesi di c-KIT in cellule trasfettate con i due miRNA (a destra).**

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 microRNA attivati da questo fattore di trascrizione. In particolar modo i microRNA 144 e 451, che presentano la maggior variazione in risposta all'induzione di GATA 1c (Dore, Amigo et al. 2008).

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, hanno 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.

L'aumento di espressione del miR-451 durante il differenziamento eritroide era già stato osservato in un altro studio sul profilo di espressione di microRNA durante il differenziamento eritroide normale e patologico di pazienti con PV (Bruchova, Yoon et al. 2007). In questo studio viene testata l'espressione su larga scala di microRNA, in colture ottenute da cellule mononucleate separate da sangue periferico ed indotte verso il differenziamento eritroide. I microRNA che presentano variazioni nelle varie fasi di differenziamento, sono stati suddivisi in 4 classi: microRNA up-regolati durante il differenziamento (miR-451, -16), down regolati (miR-150, -221, -222, -155), con espressione bifasica (miR-339, -378) e micro-RNA con moderata variazione di espressione (miR-21, -26b, -27a). In questo studio soltanto il miR-150 mostrava una differente espressione statisticamente significativa nei pazienti con PV rispetto ai controlli.



**Figura 17: Esempi di cinetiche di espressione dei microRNA durante il differenziamento eritroide.**

Per definire il profilo di espressione dei microRNA durante le varie fasi di sviluppo megacariocitario è stata utilizzata anche la tecnologia dei microarrays (Garzon, Pichiorri et al. 2006). 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 microRNA implicati nel differenziamento dei megacariociti nelle cellule leucemiche rispetto a quelle normali.

**Tabella 2: (A) miRNA down-regolati durante il differenziamento megacariocitario. (B) miRNA up-regolati nei megacarioblasti.**

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, CFBF, 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, CFBF, RAF1, 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>CBFB, MAFB, HOXA1, SBF1, NCOR2, 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, RAP1B, 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, PTMA1, RAP1B</i>
	<i>hsa-mir-099b</i>	19q13	4.19	<i>HOXA1, MYCBP2</i>
	<i>hsa-mir-149</i>	2q37	3.53	<i>RAP1A, 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>

### 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, Harris et al. 2008). 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, Fukuda 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, Calado et al. 2007). 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 miRNA nelle patologie ematologiche:

Studi piuttosto recenti hanno dimostrato che anche i microRNA (molecole di RNA antisenso) 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 microRNA 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.

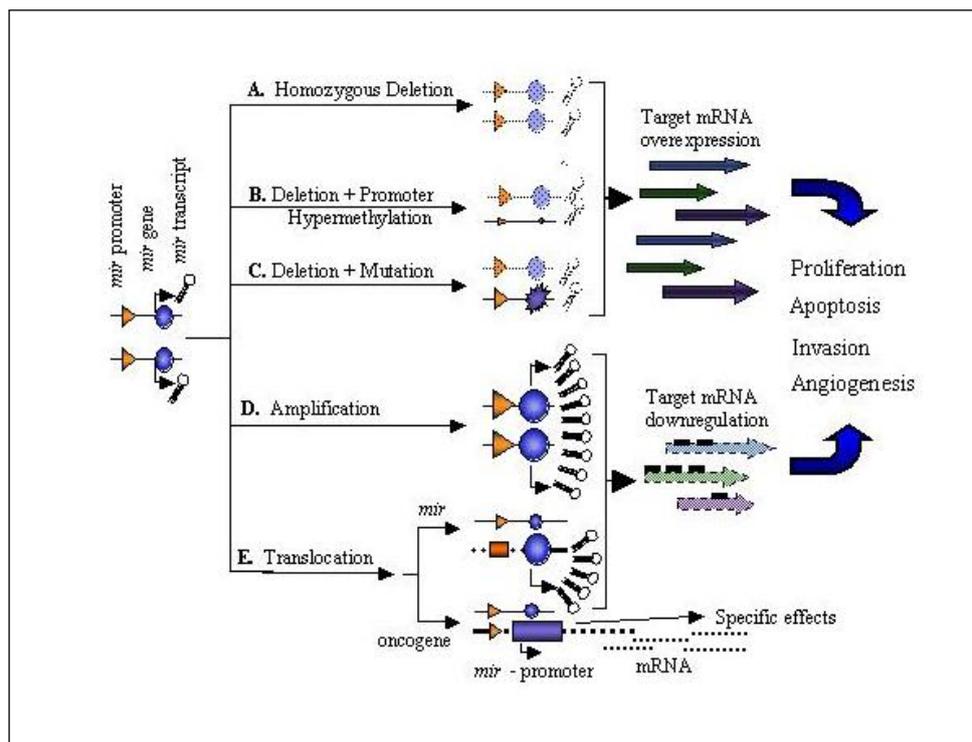
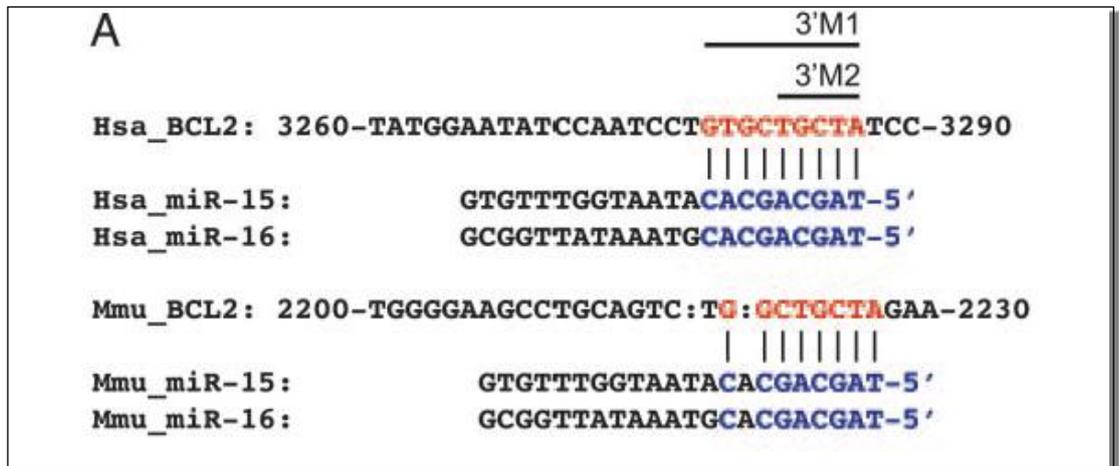


Figura 18: Possibili meccanismi di patogenesi tumorale guidata da miRNA

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 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 microRNA 15a e 16-1, che risultano infatti down-regolati negli stessi pazienti (Calin, Dumitru et al. 2002). In un lavoro successivo viene individuato BCL2 come possibile target dei due microRNA, in base al grado di complementarietà tra i microRNA e l'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 19: Complementarietà dei microRNA -15 e -16 con una regione nel 3' UTR di BCL2**

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, Ferracin et al. 2005)

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 microRNA 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 (Golub, Slonim et al. 1999). 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 menzionati 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.

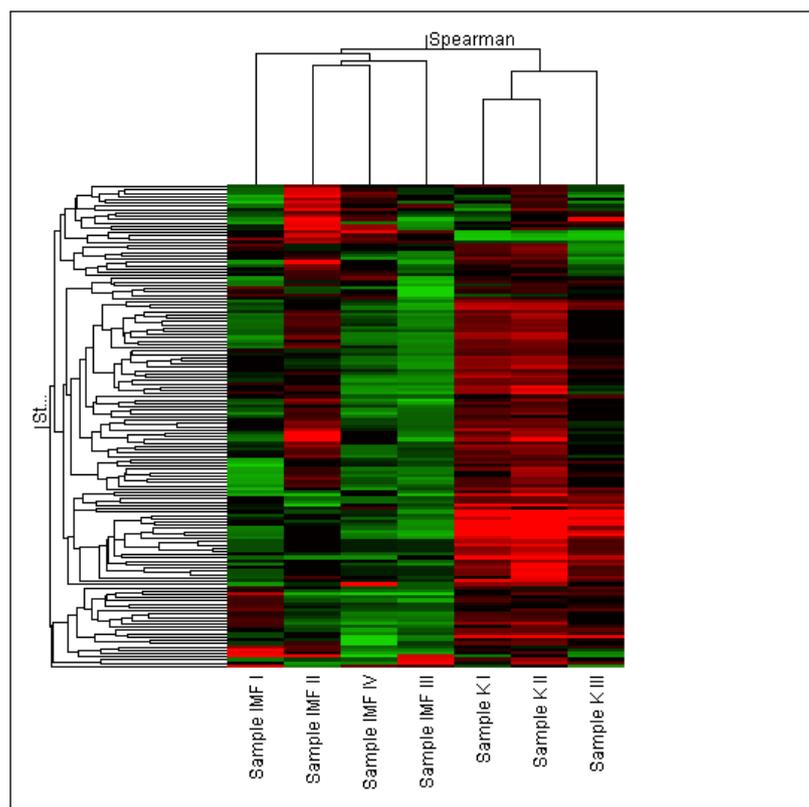
### **Linfomi:**

L'amplificazione del cromosoma 13q31 è una frequente alterazione cromosomica in molti tipi di linfoma, in questa regione mappano due geni, c13orf25 e GPC5. Il primo dei due geni, che risulta up-regolato nelle cellule neoplastiche presentanti il riarrangiamento cromosomico, codifica per un lungo trascritto primario contenente 7 diversi microRNA (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b-1 and miR-92-1). L'espressione del pri-miR-17-92 è stata studiata in tessuti tumorali derivanti da linfomi e altre neoplasie ed è stata osservata l'up-regolazione dei microRNA del cluster nel 65% dei campioni. La funzione del cluster 17-92 è stata studiata in modelli

murini, che hanno evidenziato l'interazione di questi microRNA con l'oncogene MYC nel determinare uno sviluppo più rapido del tumore (He, Thomson et al. 2005)

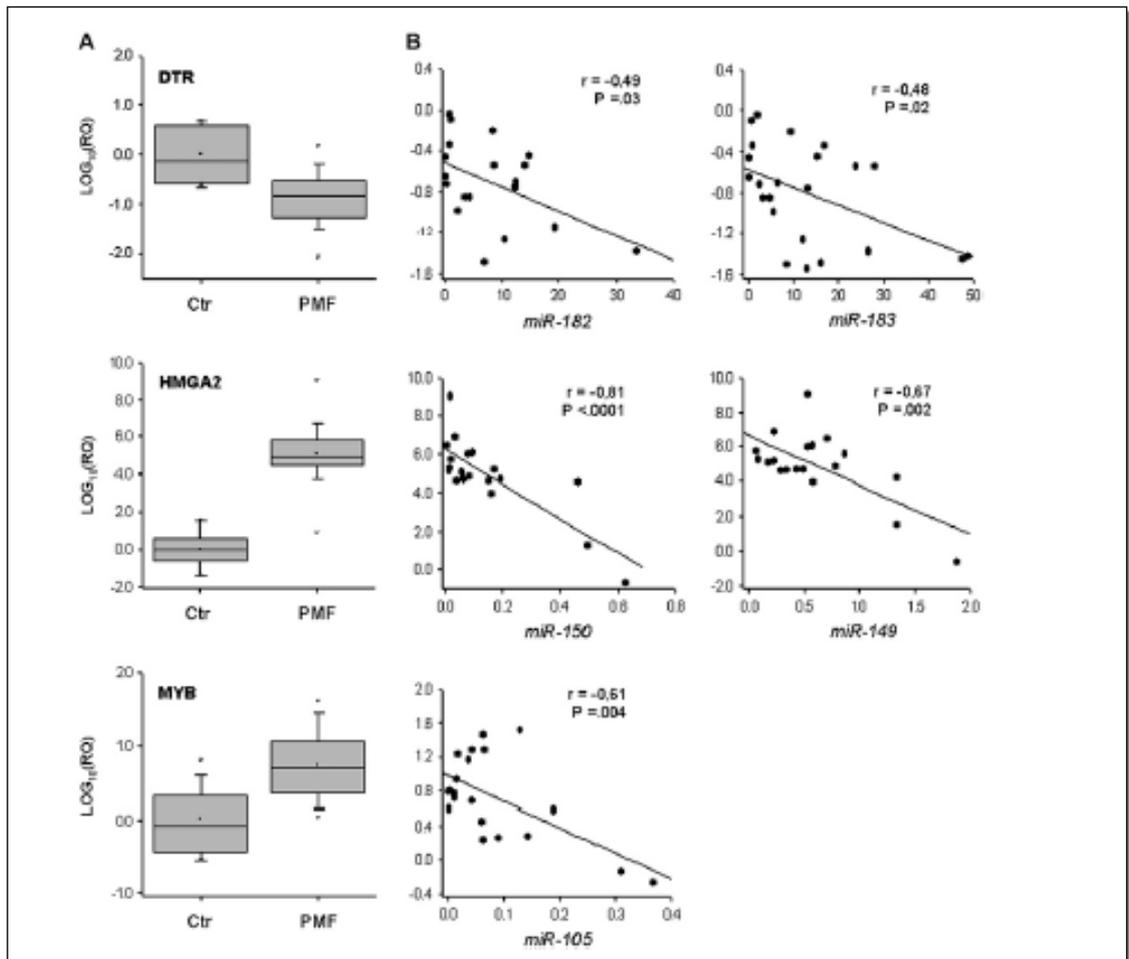
### **Sindromi mieloproliferative croniche:**

Nonostante che 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 questa patologia (Guglielmelli, Tozzi et al. 2007).



**Figura 20: Clustering dei microRNA espressi in granulociti di pazienti affetti da Mielofibrosi Idiopatica confrontati a controlli sani.**

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/miR-182, -183 e HMGA2/ miR-150, -149, MYB/miR-150, -149, -105.



**Figura 21: Correlazione tra i livelli di espressione di alcuni microRNA e i rispettivi geni target.**

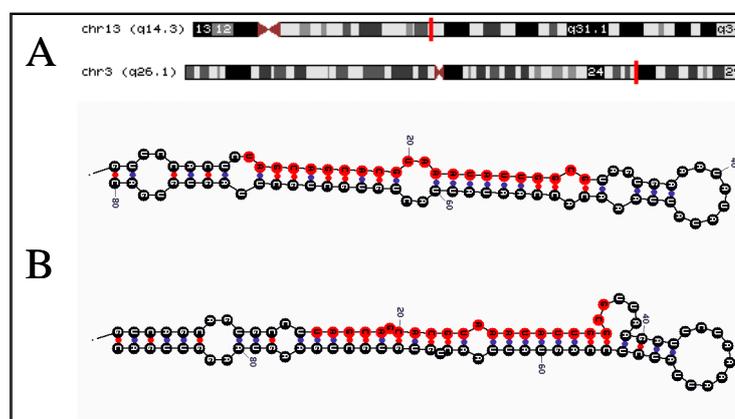
Sono stati pubblicati due studi sulla alterata regolazione dei microRNA nelle policitemia vera; in un primo lavoro è stata studiata la differente espressione dei miRNA in colture eritroidi ottenute da cellule mononucleate di PV, a tempi diversi, confrontandole a controlli sani. Soltanto un microRNA presenta 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).

### miR-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 diversi pre-miRNA, che in seguito 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.



**Figura 22: A. Localizzazione cromosomica dei microRNA 16-1 e 16-2. B. Sequenza e struttura secondaria dei pre-miRNA.**

Questi 9 nucleotidi costituiscono la “seed sequence”, 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: trasferendo 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 nuovi 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.

## Scopo dello studio

---

Le MPN sono un gruppo di patologie ematologiche rare che derivano dalla trasformazione neoplastica della cellula staminale ematopoietica e sono caratterizzate da una iperproduzione di cellule mieloidi mature. Nel 2005 lo studio di una regione di perdita di eterozigosi sul braccio corto del cromosoma 9 presente in un numero cospicuo di pazienti con MPN, individuata mediante analisi di micro satelliti ha portato alla scoperta della mutazione V617F del gene JAK2, che costituisce tuttora la principale alterazione molecolare in questo gruppo di patologie. Nonostante questa mutazione puntiforme sia in grado di spiegare molti aspetti della patogenesi delle MPN essendo presente in circa il 95% delle PV e in circa il 50-60% delle ET/MF, restano ancora molti interrogativi senza risposta. Dalla scoperta della mutazione del gene JAK2, la maggiore attenzione della comunità scientifica verso questo gruppo di malattie di pari passo con il rapido avanzamento della tecnologia in ambito biologico, ha fatto emergere un numero sempre crescente di alterazioni molecolari a carico di geni coinvolti in diversi processi, incrementando notevolmente le conoscenze nel campo delle MPN.

L'importanza dei microRNA nella regolazione dell'espressione genica è stata dimostrata da numerosi studi, sia nei processi fisiologici, come ad esempio nell'ematopoiesi, sia nella patogenesi di molte malattie tra le quali il cancro. È stato infatti osservato come modificazioni nell'espressione di queste piccole molecole possano causare significative variazioni della funzione cellulare modulando la trascrizione di numerosi geni, fino ad assumere il significato di veri e propri oncogeni o geni oncosoppressori.

Proprio da questo punto di vista la ricerca sui miRNA ha aperto una nuova strada nel campo della diagnostica, come hanno dimostrato i risultati ottenuti dagli studi sulla leucemia linfatica cronica; infatti queste molecole costituiscono markers molecolari molto specifici che consentono di discriminare cellule patologiche da cellule normali, ma anche di classificare sottotipi diversi della stessa patologia. Molti studi inoltre hanno descritto il ruolo patogenetico diretto di queste molecole, che agendo sinergicamente su molti target, possono modificare il fenotipo cellulare.

In questo studio proponiamo due differenti approcci, entrambi finalizzati all'identificazione e caratterizzazione di microRNA espressi differenzialmente in cellule di pazienti con MPN rispetto a cellule normali, con possibile rilevanza dal punto di vista diagnostico e terapeutico.

Il primo approccio è di tipo funzionale: dal confronto tra eritropoiesi fisiologica e patologica abbiamo isolato un microRNA, miR-16, che presenta livelli di espressione aumentati nelle cellule di pazienti con PV. Il miR-16 è un microRNA ben caratterizzato, è codificato da due diversi geni posti sui cromosomi 3 e 13; la sua espressione è ubiquitaria e studi recenti hanno dimostrato il suo coinvolgimento nell'eritropoiesi. Lo scopo di questo studio è stato di analizzare il possibile ruolo di questo microRNA nella patogenesi di questa malattia. Per fare ciò saranno utilizzati modelli in-vitro ed in-vivo al fine di caratterizzare la funzione di questo miRNA nell'eritropoiesi fisiologica e patologica e valutare il possibile impiego di questa molecola come target terapeutico nel trattamento della PV. Lo studio dei meccanismi responsabili dell'alterata espressione del miR-16 e l'analisi integrata dei possibili target del microRNA potrebbero condurre anche all'identificazione di nuovi geni e pathway coinvolte nella patogenesi della PV.

Il secondo approccio è invece di tipo genomico ed è basato sull'utilizzo delle più recenti tecnologie di analisi citogenetica e di sequenziamento ad ampio spettro, per identificare alterazioni cromosomiche potenzialmente coinvolte nella patogenesi e progressione delle MPN. Sono molti gli esempi in letteratura di microRNA coinvolti in riarrangiamenti cromosomici, il cui ruolo nella patogenesi e/o nella definizione del fenotipo patologico è stato ampiamente descritto; alcuni esempi sono i microRNA-15a/16-1 nella LLC, il cluster dei miRNA 17-92 nei linfomi e i miR-145 e -146 nelle MDS (Calin, Dumitru et al. 2002; He, Thomson et al. 2005; Starczynowski, Kuchenbauer et al. 2010). Pertanto, mi sono interessato alla caratterizzazione di alterazioni cromosomiche frequentemente osservate nelle MPN in corrispondenza delle quali fossero localizzati microRNA; in particolar modo mi sono occupato della caratterizzazione di una regione di UPD osservata in un numero significativo di pazienti con MPN a livello del braccio lungo del cromosoma 14. Questa regione comprende un locus di geni soggetto a imprinting genomico, il cui coinvolgimento è stato

documentato anche in altri tipi di neoplasie. Il locus contiene geni quali DLK1, MEG3 e numerosi microRNA, la cui espressione è regolata da meccanismi epigenetici definiti durante la gametogenesi.

Globalmente questo studio potrebbe generare nuove informazioni utili a comprendere la biologia delle MPN con implicazioni importanti dal punto di vista diagnostico e prognostico, e nello sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

# Materiali e Metodi

---

## **Arruolamento dei pazienti:**

Sono stati inclusi nello studio pazienti con Mielofibrosi Primaria, Policitemia vera, Trombocitemia Essenziale, Eritrocitosi idiopatica e volontari sani come controlli. Tutti i pazienti sono stati classificati secondo i criteri WHO (Vardiman, Harris et al. 2002) e l'Italian Consensus Conference (Barosi, Ambrosetti et al. 1999). Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato allo studio, in accordo alle direttive del Comitato Etico Locale.

## **Preparazione delle sottopopolazioni cellulari:**

I campioni di sangue periferico sono stati ottenuti da 5 ml di sangue periferico in presenza dell'anticoagulante acido etilen-diamino-tetracetico (EDTA).

I granulociti (GN) sono stati isolati a partire dal campione di sangue periferico mediante centrifugazione su gradiente di densità (Lymphoprep, Ficoll Hypaque) a 1600 rpm per 35 min a temperatura ambiente; le cellule nucleate sedimentate nel fondo della provetta erano costituite per più del 98% da granulociti neutrofili come confermato da osservazione della morfologia in vetrino colorato con Wright-Giemsa realizzato con cytospin. I granulociti così ottenuti sono stati quindi raccolti, sottoposti ad una lisi con cloruro di ammonio per eliminare i globuli rossi, e lavati due volte in PBS mediante centrifugazione a 1500rpm per 10 min. Una parte delle cellule è stata conservata in Trizol (GibcoBrl, Italia) (lisi in soluzione di guanidina isotiocianato) per l'estrazione di RNA, mentre una seconda aliquota è stata congelata a secco per l'estrazione di DNA.

## **Purificazione cellule CD34+:**

La pellet delle cellule mononucleate è stata 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 stato incubato per 30 minuti a 4° e periodicamente agitato. Terminata l'incubazione abbiamo aggiunto buffer 2 fino ad un volume di 10ml e centrifugata a 1000rpm per 10 minuti a 8°; rimosso molto accuratamente il sopranatante e 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 e la si è lasciata defluire per gravità recuperando la frazione CD34-negativa; seguito poi da 3 lavaggi della colonnina ciascuno con 500µl di buffer 2. La frazione CD34-positiva è stata successivamente ottenuta tramite pressione con un pistone all'interno della colonnina. In alcuni casi è stato necessario eseguire ulteriori passaggi di purificazione della frazione CD34-positiva fino ad un massimo di tre purificazioni.

### **Estrazione acidi Nucleici:**

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 è stata incubata a temperatura ambiente per 2-3 minuti, dopo l'aggiunta di 0.2 ml di cloroformio e centrifugata a 12000 rpm 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 al fine di precipitare l'RNA. 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 risospende in 20 µl di acqua sterile (Eurobio). L'RNA così ottenuto è stato quantificato mediante dosaggio spettrofotometrico a 260 nm (tecnologia Nanodrop NB-1000, Celbio).

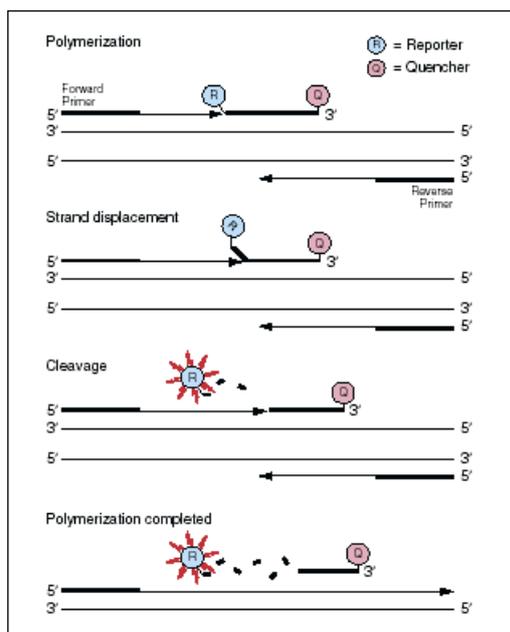
Estrazione del DNA :

Il DNA genomico è stato estratto dai granulociti mediante l'utilizzo del QIAmp DNA Blood kit (Quiagen, Germany). La pellet granulocitaria è stata risospesa in 200 µl di PBS al quale sono stati aggiunti 200 µl di Proteinase K e 200 µl di Buffer AL. Dopo incubazione a 56° per 10 minuti sono stati aggiunti 200 µl di etanolo e la mix è stata trasferita su colonnina Qiagen e centrifugata. Dopo aver trasferito la colonnina su un nuovo tubo sono stati eseguiti tre lavaggi consecutivi rispettivamente con BUFFER AW1, BUFFER AW2 e BUFFER AE come da protocollo e infine dopo centrifugazione a 12.000 per 1 minuto l'eluato ottenuto è stato trasferito in eppendorf sterile. Il DNA raccolto è stato misurato mediante assorbimento spettrofotometrico a 260 nm (NanoDrop NB-1000, Celbio).

### **PCR Real-Time (TaqMan) (RT-PCR):**

Caratteristiche della metodica PCR RT:

La reazione di PCR RT 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' (es. FAM dye) e un marcatore, il quencer, all'estremità 3' (es. TAMRA dye) legati covalentemente. Durante la reazione, il taglio della sonda separa il marcatore fluorescente reporter dal quencer, 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 23 mostra il processo descritto:



**Figura 23: schema di reazione di una RT-PCR con sistema di rilevamento Taqman.**

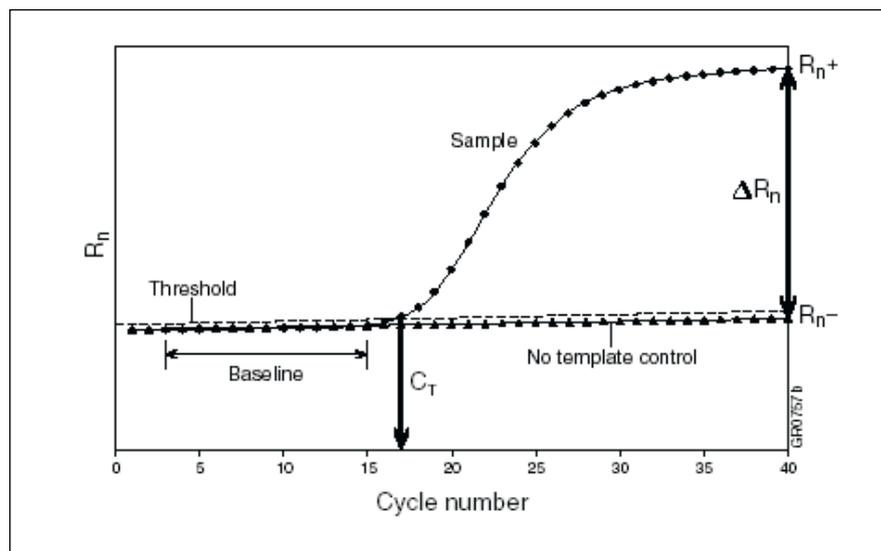
Quando la sonda è intatta, la vicinanza del reporter fluorescente e del quencher determina la soppressione della fluorescenza del reporter in seguito al fenomeno di trasferimento di energia Förster-type (Förster 1948). Durante la PCR, se il target di interesse è presente, la sonda si lega in maniera 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 quencher solo se la sonda ibridizza con il target. I frammenti della sonda sono poi staccati dal target mentre la polimerizzazione dell'elica continua. L'estremità 3' del probe è invece 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 marcatore agisce da standard interno di riferimento permettendo la normalizzazione del segnale del reporter durante l'analisi dei dati. La normalizzazione è necessaria per correggere le fluttuazioni di fluorescenza dovuta ai cambiamenti nelle concentrazioni o ai 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.

La misurazione del cDNA amplificato viene valutata mediante valutazione del ciclo soglia ( $C_t$ ).

Il  $C_t$  è il primo ciclo di PCR in cui viene individuato un aumento statisticamente significativo nel  $R_n$ . 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 Detection System) inizia a rilevare l'aumento nel segnale associato con una crescita esponenziale del prodotto di PCR (Fig. 24)



**Figura 24: cinetica di reazione della RT-PCR.**

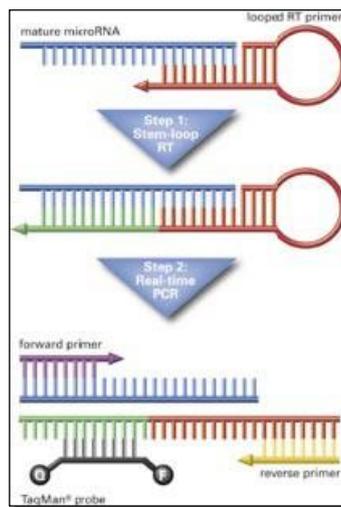
I risultati della PCR quantitativa sono espressi come differenze nei livelli di espressione tra il gene di interesse e il gene di riferimento (HOUSEKEEPING) per ciascun campione, quindi dalla differenza del ciclo soglia  $C_t$  del gene di riferimento con quello del gene di interesse, ottenendo il cosiddetto  $\Delta C_t$ . 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) viene espresso come  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **Analisi dell'espressione dei geni miRNA:**

La metodica prevede 2 steps:

1. Step di retrotrascrizione in cui l'RNA viene retrotrascritto a cDNA utilizzando un looped-primer specifico per i microRNA.
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 Tm senza aumentare la lunghezza del probe.



**Figura 25: struttura e funzione del looped-primer.**

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

Step 2: Il volume di reazione raccomandato è 20  $\mu$ L per pozzetto ed è composto da 10  $\mu$ L di Taqman 2x Universal Pcr Master Mix (no AmpErase UNG), 7.67  $\mu$ L di acqua da

PCR, 1  $\mu$ L di TaqMan MicroRNA Assay Mix (10x), 1.33  $\mu$ 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 microRNA è rappresentato dall'assay RNA 18S.

### Sequenziamento dei geni codificanti il miR-16:

Per il sequenziamento del gene localizzato sul cromosoma 13 sono stati utilizzati i seguenti primers:

**Tabella 3: Primers utilizzati per il sequenziamento.**

PRIMER	FW (5'-3')	REV (5'-3')
PRE-MIR-16-1/15A	ATTCTTTAGGCGGAATGTG	TGAAAAGACTATCAATAAACTGAAAA
PRE-MIR-16-2/15B	TTTTTCTATAAAGCTAGGTTGGATG	AAAGGGAAATACAAACAATTGATAA

Entrambe le coppie di primers sono state disegnate utilizzando il software Primer Express (Applied Biosystems).

Sono stati amplificati 100 ng di DNA genomico estratto da granulociti in 50  $\mu$ L della seguente mix: 25mM MgCl<sub>2</sub> solution (Applied Biosystems), (5  $\mu$ L), GeneAmp 10X Buffer (Applied Biosystems) (5  $\mu$ L), dNTPs 2.5 $\mu$ M (Roche, Europe) (1  $\mu$ L), AmpliTaq Gold 5U/  $\mu$ L (Applied Biosystems) (0.2  $\mu$ L), DEPC Treated Water, primers 10  $\mu$ M (1 $\mu$ L Fw + 1  $\mu$ L Rev), DEPC- Treated Water (Ambion) 36.8  $\mu$ L.

### PCR quantitativa per l'analisi del numero di copie geniche:

L'analisi del numero di copie geniche è stata effettuata mediante PCR quantitativa con intercalante fluorescente SYBR<sup>®</sup> Green. Sono stati amplificati 20ng di DNA genomico in 25 µL di mix con la seguente composizione: SYBR<sup>®</sup> GreenER<sup>™</sup> qPCR SuperMix for ABI PRISM<sup>®</sup> 2X (Invitrogen) (12.5 µL), DEPC- Treated Water (Ambion), 150 nM dei seguenti primers:

**Tabella 4: Primers utilizzati per lo studio del numero di copie geniche.**

PRIMER	FW (5'-3')	REV (5'-3')
PRE-MIR-16-1/15A	GCAGCACGTAATATTGGCGT	CAGCAGCACAGTTAATACTGGAGA
PRE-MIR-16-2/15B	GCACGTAATATTGGCGTAGT	AAGCAGCACAGTAATATTGGTG
HCK	TATTAGCACCATCCATAGGAGGCT	GTTAGGGAAAGTGGAGCGGAA

E' stata utilizzata la seguente cinetica di reazione: 2 minuti a 50°, 10 minuti a 95°, 15 secondi a 95°, un minuto a 60° per 40 cicli totali.

I dati sono stati analizzati utilizzando come riferimento il gene HCK ed espressi come RQ (Kroger, Badbaran et al. 2007).

### FISH:

E' stata utilizzata la sonda locus specifica per il gene D13S25 sul cromosoma 13 (D13S25 Spectrum Orange Vysis). Da ogni paziente è stato analizzato un ml di sangue periferico. Ogni vetrino viene osservato al microscopio a contrasto di fase per individuare una regione di ibridazione idonea per il numero di cellule da esaminare. Per ogni campione sono state analizzate 200 cellule in interfase integre, non sovrapposte. I campioni sono stati considerati analizzabili se presente più del 90% di ibridazione, quindi se meno del 10% delle cellule non presentava segnale. Il nucleo

della cellula esaminata appare sempre controcolorato in blu con il colorante nucleare Dapi e le sonde dei geni ricercati appariranno con doppio segnale fluorescente rosso all'interno del nucleo del campione di controllo normale. Il cut-off di positività per ogni campione è del 5% (valore calcolato per confronto con campione normale di controllo).

Nel caso della del13q14 il campione normale di controllo presenterà due segnali rossi corrispondenti alla coppia dei geni omologhi corrispondenti. Quando è presente la delezione, si osserverà un singolo segnale (Fig.2 a,b; Fig.3). Il campione normale di controllo presenta fino a un 5% di falsi positivi.

### **Colture cellulari:**

Colture liquide per differenziamento eritroide e megacariocitario:

Per il differenziamento eritroide e megacariocitario sono state utilizzate colture in due fasi: una prima fase proliferativa per espandere il pool di progenitori e una seconda fase differenziativa.

Sono state utilizzate cellule CD34 positive separate da sangue midollare di PV e di donatori sani e da sangue periferico di donatori sani stimolati con fattori di crescita, quali il G-CSF.

Coltura eritroide:

Fase proliferativa: 1°-6° giorno	Fase differenziativa: 7°-12° giorno
Terreno: SYN-H ( AbCys S.A)	Terreno: STEM $\alpha$ .A (STEM $\alpha$ )
Penicellina/streptomicina 1%	Penicellina/streptomicina 1%
L-glutamina 1%	L-glutamina 1%
Il-3 2ng/mL, Il-6 1ng/mL, SCF 10ng/mL	Il-3 2ng/mL, Il-6 1ng/mL, SCF 10ng/mL, Epo 3U/mL

Coltura megacariocitaria:

Fase proliferativa: 1°-6° giorno	Fase differenziativa: 7°-12° giorno
Terreno: SYN-H ( AbCys S.A)	Terreno: STEM $\alpha$ .A (STEM $\alpha$ )
Penicellina/streptomicina 1%	Penicellina/streptomicina 1%
L-glutammina 1%	L-glutammina 1%
Il-3 2ng/mL, Il-6 1ng/mL, Il-11 40ng/mL, Tpo 50ng/mL	Il-3 2ng/mL, Il-6 1ng/mL, Il-11 40ng/mL, Tpo 50ng/mL

Colture semisolidi per valutazione delle colonie eritroidi spontanee:

Sono state piastrate  $1-5 \cdot 10^3$  cellule CD34 positive oppure circa  $2.5 \cdot 10^5$  mononucleate isolate da sangue periferico per mL di metilcellulosa (MethoCult<sup>®</sup> H4531, Stemcell), sia in assenza di citochine, che con aggiunta di 2U/mL di Epo. La presenza di colonie spontanee ed indotte è stata valutata dopo 7 e 14 giorni di coltura.



**Figura 26: BFU-e**

### **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-

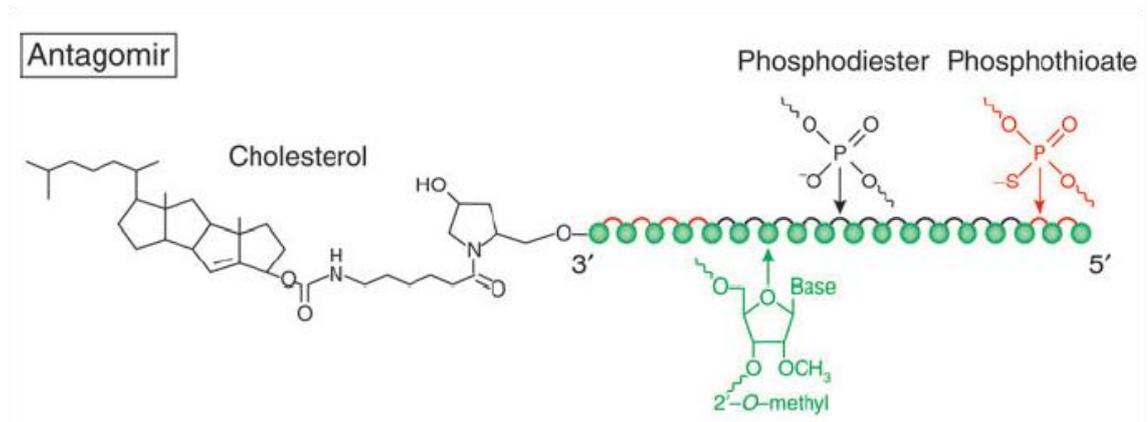
miR™ miRNA Precursor Negative Controls, Ambion). Come controllo negativo inoltre sono state trasfettate cellule in assenza di costrutto ectopico (mock). Le cellule sono state risospese nel buffer di trasfezione (Human CD34 Nucleofector Kit, Amaxa) e trasfettate utilizzando il settaggio specifico consigliato 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  $5 \cdot 10^5$  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.

#### Esperimenti in-vivo:

Per gli studi in vivo sono stati utilizzati topi del ceppo C57BL/6J di 6-8 settimane di età. Gli animali sono stati trattati con una dose intraperitoneale di 600U/Kg di Epo e tre dosi giornaliere di 55 mg/Kg di AntagomiR o un volume equivalente del solo veicolo per via endovenosa. Il sangue è stato raccolto mediante prelievo dal plesso retro orbitale e gli organi prelevati dopo sacrificio effettuato mediante dislocazione cervicale. Il midollo osseo è stato prelevato dal femore mediante "flushing". L'AntagomiR 16 è stato sintetizzato dalla VBC Biotech GmbH e risospeso in soluzione fisiologica (sequenza: 5'-C<sub>s</sub>AG<sub>s</sub>CCAAU<sub>s</sub>UUUACGUGCU<sub>s</sub>C<sub>s</sub>U<sub>s</sub>A<sub>s</sub>-3'-Chol, dove s indica un legame fosforilato, figura 27).



**Figura 27: Struttura di una molecola di Antagomir (Kruzfeldt, Poy et al. 2006).**

### **SNPs arrays:**

I campioni sono stati analizzati mediante SNPs arrays 6.0 (Affymetrix), in breve 250 ng di DNA genomico sono stati digeriti con l'enzima di restrizione NspI e 250 ng con l'enzima StyI, ligato con oligonucleotidi adattatori e amplificato mediante PCR. I prodotti di PCR sono stati poi raccolti insieme, purificati e frammentati; i prodotti ottenuti sono stati poi marcati, denaturati e ibridizzati sul chip. Gli array sono stati quindi lavati e scannerizzati mediante Gene Chip Scanner 3000. Ciascun chip contiene circa 1.8 milioni di sonde per marcatori polimorfici (SNPs) e Copy Number Variants (CNV), che permettono di ottenere informazioni molto dettagliate sul cariotipo e sulla presenza di regioni di LOH. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante Genotyping Console 3.0.2 software (Affimetrix).

I campioni che mostravano bassa qualità o alto rumore di fondo sono stati eliminati dalla successiva analisi, in totale sono stati selezionati 408 campioni rappresentativi di 398 pazienti.

Tutte le alterazioni riscontrate in regioni soggette a variazioni del numero di copie già annotate (Database of Genomic Variants version 5, human reference genome assembly hg18) sono state scartate. Per quanto riguarda l'analisi delle regioni di LOH, sono state selezionate soltanto le alterazioni di dimensioni maggiori a 1 Mb e situate in posizione terminale sul cromosoma.

**Next Generation Exome Sequencing:**

I campioni di DNA sono stati processati e arricchiti per le regioni introniche mediante Agilent SureSelect Human All Exome Kit (Agilent), TruSeq DNA Sample Preparation e TruSeq Exome Enrichment Kit (Illumina), secondo protocollo. Le library di DNA sono state sequenziate mediante NGS sequenze HiSeq 2000 (Illumina), con letture di 51 bp paired ends. L'analisi dell'immagine e l'assegnazione delle basi è stata effettuata mediante RealTime Analysis 1.12 software (Illumina) e convertiti in formato FASTQ con il software CASAVA 1.7 (Illumina). L'allineamento delle letture e assegnazione delle varianti è stata effettuata su software CLC Workbench4.7 (CLC bio), utilizzando come parametri di tolleranza un massimo di 2 mismatch o inserzioni/delezioni di due paia di basi per ciascuna lettura. Le varianti con coverage inferiore a 10 e frequenza inferiore a 15 sono state scartate. I dati ottenuti sono stati quindi convertiti e caricati su SeattleSeq (<http://gvs.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation/>) per ottenere le annotazioni e filtrati per eliminare le varianti polimorfiche note, le mutazioni silenziose o non codificanti.

**Validazione dei dati NGS:**

I risultati ottenuti dal Next Generation Exome Sequencing sono stati validati mediante sequenziamento convenzionale con metodica Sanger. Sono state disegnate coppie di primers specifiche per ogni possibile mutazione (Tabella 5) e il DNA genomico amplificato mediante Touch Down PCR. I prodotti di PCR sono stati purificati e sequenziati utilizzando BigDye v3.1 terminators, su 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). L'analisi degli elettroferogrammi è stata effettuata mediante Sequencher Software 4.9 (Gencodes).

**Tabella 5: Primers utilizzati per la validazione dei dati di NGS.**

HOMEZ	ACCCACCTGAAGAACACAA	GGTGCTGGATTGGTTTGACT	305
OR10G3	TGGGCTCTGAGCATTCTTT	TAGACATTGGGGTGGTGGTT	317
HOMEZ	TGGGGAAAGGTACTCTGTGG	CCAACCAGTCACATGGCATA	347
LRRC16B	CTGACCCTGCCTCTATCTGG	CTCCTCAGTGTCACCCACT	295
LRRC16B	GCATCTGGCATTGTTGCTA	TCCAGCAGGGAGAGGAGTTA	286
IRF9	TTGAGAGGGGCATCCTAGTG	GAGGTAGCAGGACCAACAA	254
KLHL28	CAAATGCCGGAAGTTCATTC	CAGTGAATGCTGAATCCT	392
ABHD12B	AGAGCCTCCTTGATGTG	ATGGCATCCGTAGTCAGTC	307
PYGL	ATAATTTCCCTCCCATTC	AGGCCTGGAACAATGGTA	290
NID2	ACACAGTCCGTCATCTCC	TCTCCGGTGTGCACAAAA	258
PTGDR	GCTCTACTCCAGCCTCATGG	AACTCAGCAGCAAACCTTCC	382
C14orf135	TGAGAGGGTAGGAGTCGTGAA	TCCCTAGGTGTTTTCACAGG	359
ACTN1	TTAGAGGTCACTCTCGCCGTA	TACAGGAGGGAGGCAAAATG	287
EXD2	GAACCCAGTAGCCTGTCTG	CAGCCTTTGAAGCATCTCC	424
SRSF5	GAGGCTCTGTTGGCAATCTC	TATCCACCCGGACTCAAGA	365
MAP3K9	GCCTTCGCCTTACACTGAAT	GAGGTGCTGTCCAAGGACTC	182
C14orf43	CTCTCCCATCAGGCAGTAG	CAACCCAGATATGAACCCAGA	306
FAM164C	TAGCAGCCGAGAGTGAACCT	CCTGGGAATCACTTTCTGGA	385
TLL5	TTCTGATTGCCAGCTGATTG	TATGGCAATCCAAGCACAA	411
FOXN3	ATGCATGGCTGCATGTTTAT	CTGTAACCTGCAGGGGGAAA	321
C14orf159	ACCATGCCACATGGACTGTA	CATTATCCCCAACGTACCA	346
RIN3	GAGAAGTTCGCGGTGGAG	CTTGACGAGCGTCATGTTA	396
CHGA	AGAGGAGGAGGAGGAGATGG	TTTCTTCTCTCGGGGTAGC	349
BTBD7	CTGTTGCTGTTGAGGTGGTG	CCAGCTACCCAATCCATAA	250
DDX24	GTTAGCAAAGAGGGGAAGG	TCCAGAGGCCTGAACTCTA	313
VRK1	AAGGTTCTTGGTCTTTGTTT	CTGGCCACCCTAACATCT	313
KLC1	CAAGTAATCAGGGGCTGGA	TCGGCCTGGATCTGTTATTC	297
TDRD9	TGCCCTTCTGTCTGTAGG	GCACACACCTGGACTCGTA	288
KIAA0284	AGAGAGCAGCAGGAGGAGTG	ATAACACAGCGTCCCATTC	281
C14orf21	AGGACTGGCAGTGAGATGCT	CCCCTAGGTCCACTTTCTCTC	421
HEATR5A	AGCTTTCCCAAAGGGACAAT	CCTAAAGCCACCCAACTCA	221
C14orf106	GAGCTACACAAGGGCAAGGA	CAAGCAAGAACAGCCATCAA	295
TMX1	GCAGTTTTGGGCATATGAG	TATCTGTGGCCAATGATGGA	266
SLC38A6	GAAAGGCCAGGATTTGGTAA	GGGGCCATATGCAAGTATGA	409
SYNE2	TTTCAGGTCTGAGTCTCTCT	AAGACAAGCAGCTCGGTAGC	229
NEK9	CCTGGCTGGGTCTATAGCAT	TCCATAGTGGCATCGTCTCA	457
IFI27L1	CTGGTCTTTACACGTTGA	CTCACCACTGACTGCAGAA	331
C14orf49	CTGGTCTCAAGTCTCAGC	CATTTTGGGCATCTTGTCTCT	260
RTL1	ATCTGCACTGTGGATGTGGA	CAACGTTACCGTCAGTGTGG	189
C14orf73	AGATGCCATCACACAGACA	CTCGGGTTTCAGTTCCTCAG	392
C14orf73	TCAATCTGACCTCCCTGACC	ACTGGGCACCTTGATCTCTCT	299
KIF26A	CTGTACTCGTGGTGGGAAG	TCTCTGAGACTCCCGTCTCTG	452
DACT1	AGGACTCGAGGGCTTCTAGC	GCAGCAAGATGTTCTCTCTCC	482

**Analisi dello stato di Metilazione:**

200ng-1ug di DNA genomico sono stati trattati con sodio bisulfito (Epitect Bisulfite Conversion Kit, Qiagen) per convertire le citosine non metilate in uracile, le citosine metilate risultano essere protette e non vengono modificate, secondo il protocollo riportato nel kit. Per il Bisulfite Sequencing sono state disegnate tre coppie di primers specifiche per la sequenza modificata e il DNA amplificato e sequenziato secondo il protocollo descritto in precedenza. Dopo aver selezionato una regione ottimale è stata scelta la Methylation Specific PCR come metodica di screening. Sono stati disegnati tre primers, un primers revers comune situato in una regione priva di CpG islands e due primers forward marcati con FAM specifici per le sequenze metilate e non metilate, contenenti al loro interno una o più CpG islands (vedi schema in figura 28). I prodotti di PCR ottenuti, di diversa lunghezza, sono stati separati e quantificati mediante elettroforesi capillare su 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). In tabella 6 sono riportate le sequenze dei primers utilizzati. Il software online Methprimer è stato utilizzato per individuare le aree ricche di CpG islands e per disegnare i primer specifici per il Bisulfite Sequencing (BS) e la Methylation sensitive PCR (MSP), utilizzando come input 5000 bp a monte e a valle dei microRNA 16-1 e 16-2 (Tabella 7).

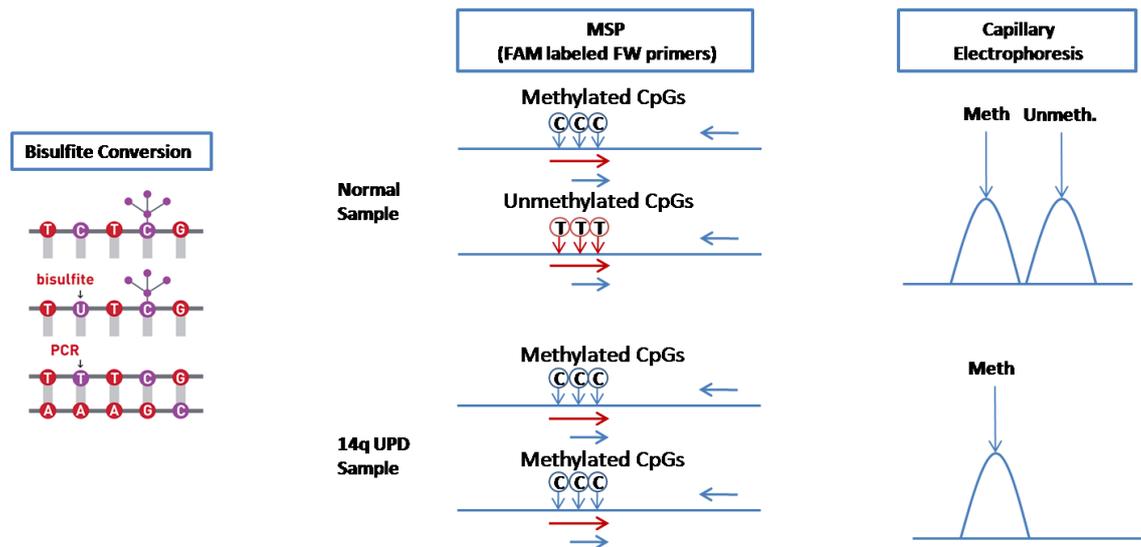


Figura 28: Schema della PCR methylation specific. Il DNA viene convertito mediante bisulfitazione e amplificato con primers specifici per le sequenze metilate e non. I prodotti di PCR sono poi separati e quantificati mediante elettroforesi capillare.

Tabella 6: Primers utilizzati per l'analisi di metilazione del locus DLK1-MEG3.

	Primer	FW	REV
BS	IG-DMR_1	TGGGTTTTGTTAGTTGTTTGTG	TCTAAAAATCACCAAAACCCATAA
BS	IG-DMR_2	ATTGTGGTGAATTATAGTGAATTG	TTACCAATTACCTATAATTCACCA
BS	IG-DMR_3	AGTGAATTGTATTGTTGAGAATTG	TCACCAATTACCTATAAECTACC
MSP	FW (met)	(6-FAM)TTGTTCGTGGTTTATTAGTTGTTT	CAACTTTCCTCCAAATAAACAAACA
	FW (unmet)	(6-FAM)attTTGTTTGTGGTTTATTAGTTGTTT	CAACTTTCCTCCAAATAAACAAACA

Tabella 7: Primers utilizzati per l'analisi di metilazione dei geni codificanti il miR-16.

PRIMERS	FW	REV	SIZE	CPG
MSP 1	AAAGGTATTTAGTTTTTTATTGTT	CAAATAACTTTCCTAAACCTCTACC	279	34
MSP 4	TTTAGTTTTGGTTTGAGTGGATTG	ATAACAACAAAAAATCTCCCAAC	173	9
MSP 5	AGGTTTAGAGGTGAAGGGATTATT	CCTAACAAATTTTAAAAAATTTTT	282	19
BS MET	GTTGTTAGTTACGGGATTTTGATTC	ATTATTTTTAAAACCTCCACCCGT	191	16
BS UNMET	TTGTTAGTTATGGGATTTTGATTG	ATTATTTTTAAAACCTCCACCCATC		

### **Analisi bioinformatica dei promotori**

I putativi siti di legame dei fattori trascrizionali MYB, GATA-1, KLF1 e LMO2 al promotore del gene SMC4 sono stati individuati confrontando le rispettive sequenze consenso con la sequenza genomica a monte del sito di inizio della trascrizione del gene SMC4 utilizzando il database TRANSFAC (<http://motif.genome.jp>).

### **Luciferase Reporter Assay:**

La regione di -1130/+33 paia di basi dal sito di inizio della trascrizione del gene SMC4 è stata clonata all'interno del vettore pXP1 a monte del gene codificante la luciferasi privo del proprio promotore. In questo modo l'espressione del gene reporter dipende dalla presenza di elementi regolatori presenti sul frammento di promotore inserito e dal legame di determinati fattori trascrizionali con queste sequenze. L'espressione del gene reporter viene misurata sfruttando la seguente reazione enzimatica:



La liberazione di energia sotto forma di fotoni viene rilevata mediante luminometro (LumiGlo, Promega).

I cDNA codificanti i fattori di trascrizione MYB, GATA-1, KLF1 e LMO2 sono stati inseriti nei vettori di espressione pCMV6XL5 (MYB), pOPINE(GATA-1), LXIDN (KLF1 e LMO2), il vettore pPNT è stato utilizzato per normalizzare la quantità di vettore trasfettato in ciascun pozzetto.

Per normalizzare i valori di espressione della luciferasi ed eliminare eventuali differenze dovute ad una diversa efficienza di trasfezione, è stato utilizzato un vettore esprime la luciferasi di renilla in modo costitutivo, cotrasfettato nella stessa quantità in tutti i pozzetti. La luciferasi di Renilla è una proteina monomeric di 36 kDa e deriva dal celenterato *Renilla reniformis* (Matthews, Aslanian et al. 1997). La luciferasi di Renilla catalizza la reazione:



La mix contenente il vettore reporter, il vettore riempitivo, il vettore codificante la luciferasi di renilla e dosi crescenti del vettore esprimente ciascun fattore di trascrizione è stata trasfettata in cellule HEK239T utilizzando Lipofectamine (Invitrogen).

Dopo 48h dalla trasfezione le cellule sono state lisate per valutare l'espressione del gene reporter mediante il sistema Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). In breve, il substrato della luciferasi è stato aggiunto al lisato proteico e il segnale rilevato dal luminometro; dopo l'aggiunta di un quencer, il substrato della luciferasi di renilla è stato aggiunto e il segnale letto nuovamente. Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti, in ciascuno dei quali ogni campione è stato processato in duplicato.

Per ogni singolo campione la normalizzazione si ottiene dal rapporto tra il segnale generato dalla Luciferasi e l'attività del reporter di controllo, Renilla. I valori calcolati vengono ulteriormente normalizzati rispetto al valore così ottenuto relativo al campione di controllo trasfettato i soli vettori vuoti, il cui segnale viene settato convenzionalmente a 1.

## Risultati:

---

### Ruolo del miR16-2 nella patogenesi della PV

---

#### Espressione del miR-16 durante il differenziamento eritroide:

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 (figura 29).

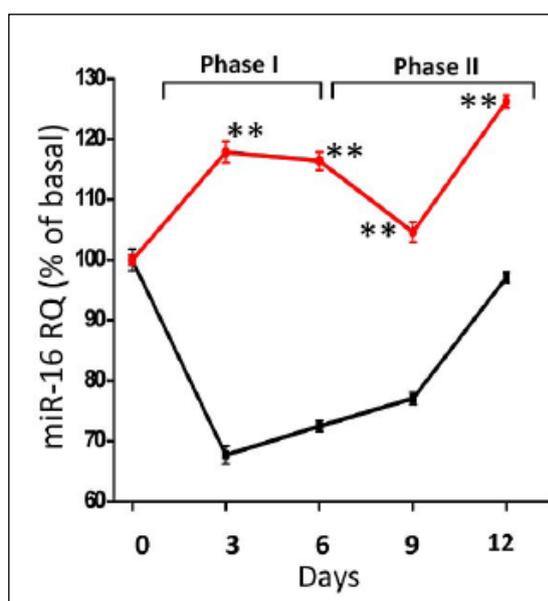
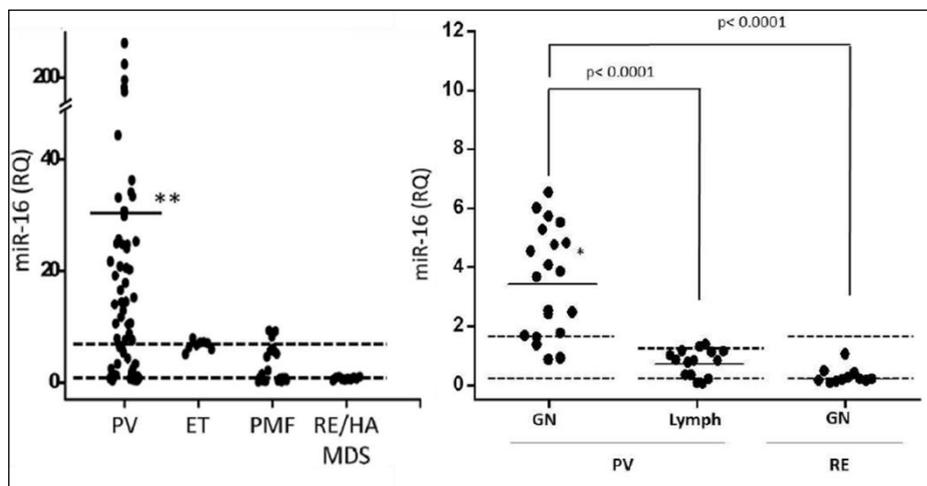


Figura 29: Espressione differenziale del miR-16 in cellule di pazienti con PV rispetto a controlli sani, nel corso del differenziamento eritroide.

### Espressione del miR-16 in granulociti e cellule CD34+:

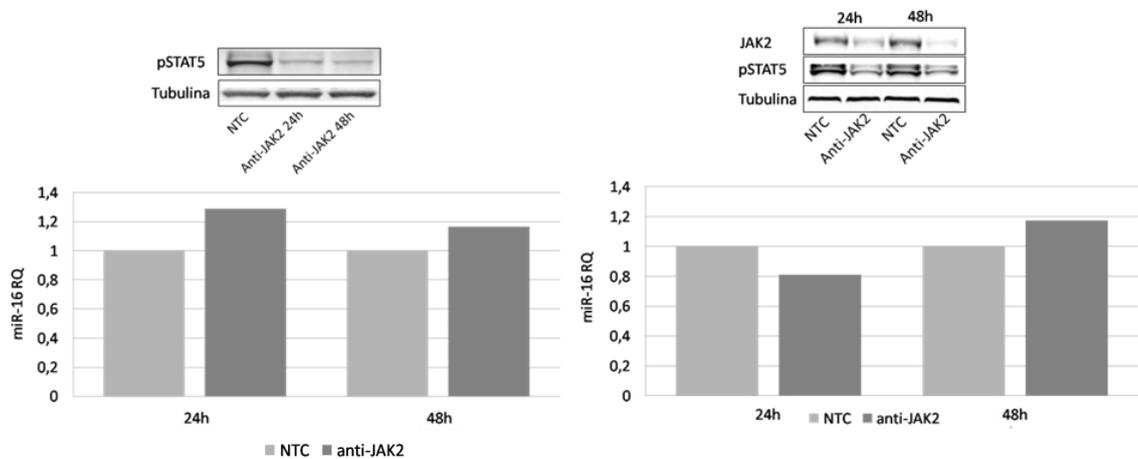
L'espressione del miR-16 è stata valutata sia nei granulociti, che nelle cellule CD34+ (separate da sangue periferico nei pazienti affetti da mielofibrosi, da midollo osseo in tutti le altre patologie) di pazienti affetti da Mielofibrosi Primaria (PMF), Trombocitemia Essenziale (TE), Policitemia Vera (PV) e alcune forme secondarie e mielodisplastiche. L'analisi è stata effettuata su RNA estratto da sulle cellule CD34+ separate da 75 PV, 25 PMF, 10 TE e 10 pazienti con forme secondarie/mielodisplastiche confrontandole a CD34+ separate da midollo osseo di donatori. L'espressione del miR-16 presenta una mediana di espressione 35 volte più alta nelle cellule separate da pazienti con PV rispetto ai controlli (range 1-357) e alle altre patologie. Questo dato indica che l'iperespressione del miR-16 è selettiva per la PV e non riflette soltanto una condizione di eritropoiesi iperstimolata. Questa alterazione è inoltre ristretta al lineage mieloide, poiché i linfociti T di pazienti con PV non presentano aumento dei livelli di miR-16 (Figura 30).



**Figura 30: Espressione del miR-16 nei granulociti di pazienti con Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essenziale (Te), Mielofibrosi Primaria (PMF), Eritrocitosi Idiopatica (EI) confrontati con controlli sani (Ctr).**

### L'espressione del miR-16 non correla con lo stato mutazionale di JAK2:

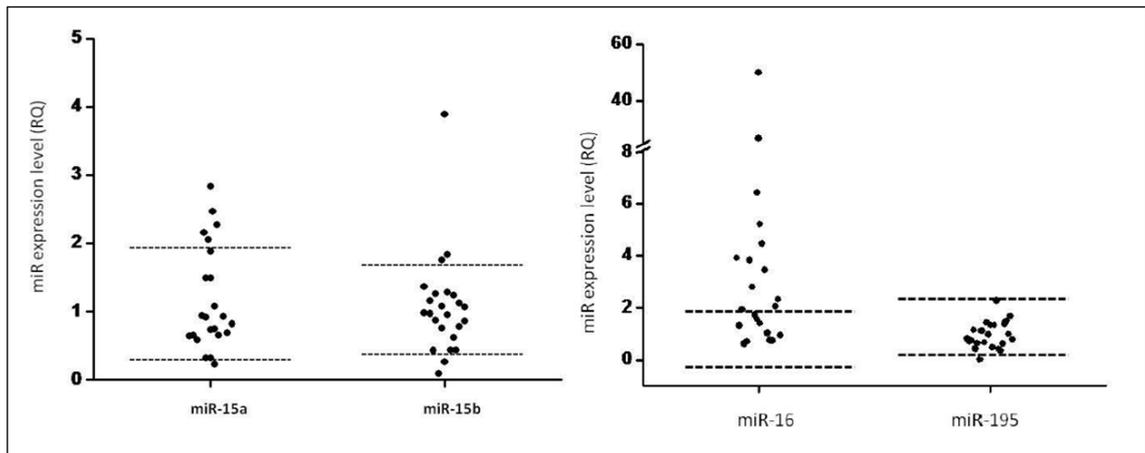
Per verificare la possibile relazione tra l'espressione del miR-16 e l'iperattivazione della pathway di JAK/STAT osservata nelle MPN, abbiamo trasfettato due linee cellulari JAK2 mutate (HEL e UKE-1) con un siRNA anti-JAK2 e valutato l'espressione del microRNA mediante PCR Real Time. L'effettivo silenziamento di JAK2 e l'effetto sulla fosforilazione di STAT5 è stato valutato mediante WB. Non è stata però osservata alcuna significativa variazione dei livelli di miR-16 in risposta alla diminuzione dei livelli di JAK2 (Figura 31).



**Figura 31: Effetto del silenziamento di JAK2 sui livelli di miR-16 nelle linee cellulari JAK2 mutate HEL (sinistra) e UKE-1 (destra).**

### Espressione dei microRNA 15a, 15b e 195 nelle cellule CD34+ di pazienti con PV:

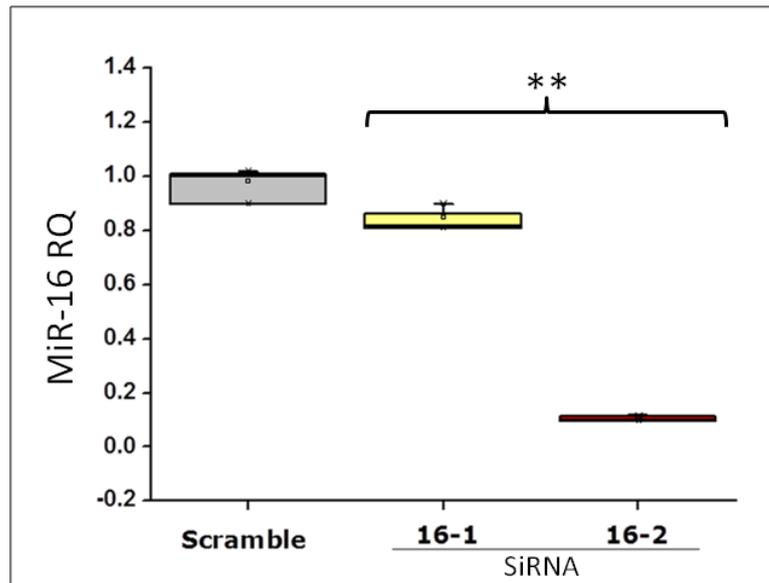
I microRNA 16-1 e 16-2 sono inclusi nello stesso cluster con altri due geni, i miR-15a e -15b appartenenti alla stessa famiglia insieme al miR-195; è stata pertanto studiata l'espressione di questi tre miRNA nelle cellule CD34+ ottenute da pazienti con PV. L'analisi è stata effettuata negli stessi pazienti nei quali è stata valutata l'espressione del miR-16 e non ha mostrato nessuna variazione dei miR-15a, 15b e 195 rispetto ai controlli (figura 32).



**Figura 32: Differenza dei valori di espressione dei miR-15a, -15b e 195 in cellule CD34+ di PV.**

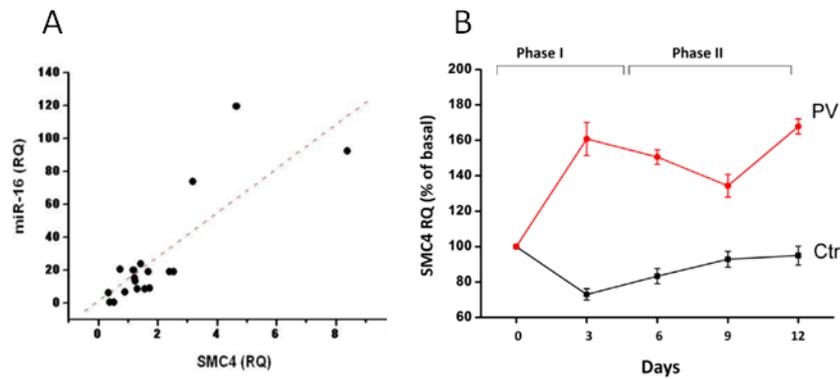
**Iperattivazione del pre-miR-16-2:**

Il microRNA-16 è codificato da due geni sotto forma di due diversi precursori, processati infine nella stessa molecola matura: il pre-miR-16-1 sul cromosoma 13q14 all'interno del gene DLEU2 e il pre-miR-16-2 sul cromosoma 3q26, all'interno di un introne del gene SMC4. Due differenti approcci sperimentali ci hanno permesso di ricondurre l'aumentata espressione del miR-16 all'iperattivazione del gene localizzato sul cromosoma 3: misurando il rapporto tra i livelli di espressione tra pre-miR-16-1 e pre-miR-16-2 mediante Real Time PCR in cellule CD34+ separate da pazienti con PV abbiamo osservato un valore di  $0.34 \pm 0.11$ , rispetto a  $0.6 \pm 0.05$  ottenuto in controlli sani, evidenziando una maggiore prevalenza del precursore codificato dal gene sul cromosoma tre nelle cellule patologiche. In secondo luogo abbiamo trasfettato cellule CD34+ ottenute da pazienti con PV con due siRNA specifici per i due differenti precursori, ottenendo una riduzione significativa dei livelli di miR-16 soltanto con il siRNA diretto contro il pre-miR-16-2 (figura 33), mentre in cellule separate da controlli sani i due siRNA hanno mostrato simile efficacia.



**Figura 33: Effetto differenziale dell'utilizzo di siRNA anti miR-16-1 e miR16-2 su cellule di pazienti con PV.**

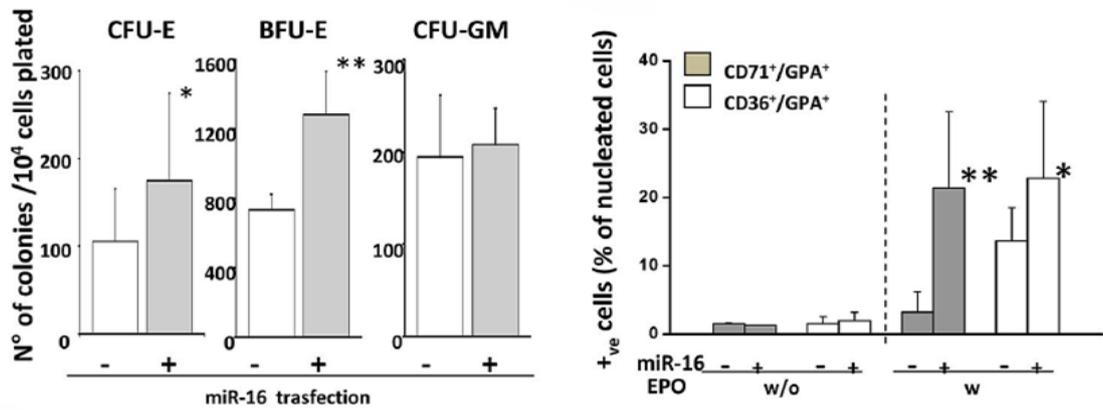
Poiché i microRNA intronici sono frequentemente co-regolati con il loro gene ospite, abbiamo misurato l'espressione del gene SMC4 mediante RT-PCR in cellule di pazienti con PV. SMC4 è risultato essere up-regolato in pazienti con PV e la sua espressione correla con i livelli di miR-16 ( $r=0.76$ , figura 34A). Inoltre i livelli di SMC4 nel corso del differenziamento eritroide rispecchiano molto fedelmente quelli del miR-16 (figura 34B). Pertanto tutti questi ci permettono di affermare che l'iperespressione del miR-16 osservata in pazienti con PV possa essere dovuta principalmente all'iperattivazione del gene localizzato sul cromosoma 3.



**Figura 34: Correlazione tra i livelli di SMC4 e di miR-16 in cellule di pazienti con PV (A). Espressione del gene SMC4 durante il differenziamento eritroide (B).**

#### **Trasfezione del pre-miR-16 in cellule CD34+ normali:**

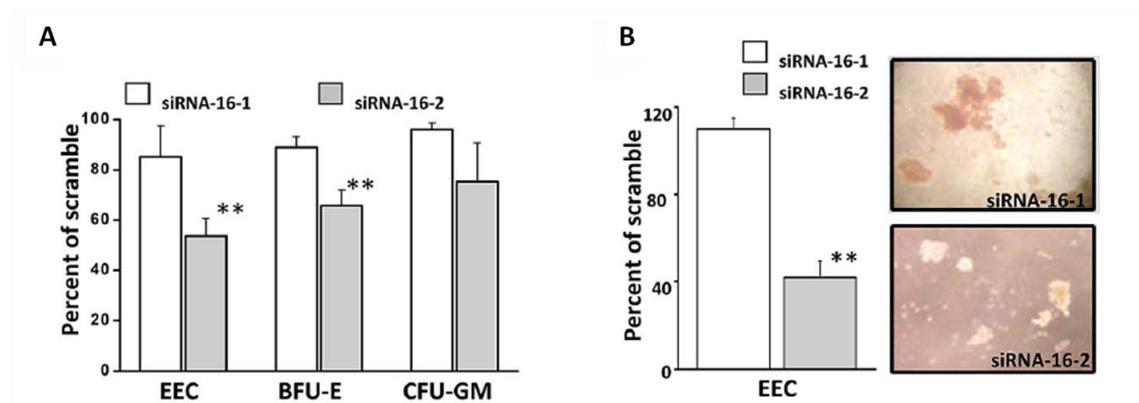
Per verificare l'effetto di un'alterazione dell'espressione del miR-16 nelle cellule, sono stati messi effettuati studi funzionali in vitro. Mediante elettroporazione abbiamo indotto l'iperpressione transiente del miR-16 in colture cellulari ottenute da cellule CD34+ di controlli sani. Per le colture liquide la trasfezione del pre-microRNA è stata effettuata al sesto giorno di coltura eritroide, considerando la normale cinetica di espressione del miRNA e l'efficienza di trasfezione verificata dopo 24 ore mediante PCR quantitativa. Le cellule trasfettate sono state poste in coltura con le citochine pro-differenziate per sei giorni e ne è stato poi valutato il commissionamento mediante citofluorimetria. Nella coltura trasfettata con il microRNA, l'espressione dei markers di superficie CD36, CD71, CD235a ha mostrato un significativo incremento della popolazione commissionata verso il lineage eritroide, rispetto alle cellule trasfettate con il costrutto di controllo. Per i saggi clonogenici le cellule sono state trasfettate subito dopo la separazione e coltivate per 12 giorni in metilcellulosa arricchita con fattori di crescita. Le cellule trasfettate con il pre-miR-16 hanno mostrato una maggiore capacità di formare colonie eritroidi rispetto alle cellule trasfettate con il costrutto di controllo, mentre nessuna differenza nel numero di CFU-GM è stata osservata (figura 35).



**Figura 35: Effetto dell'iperespressione del miR-16 sul differenziamento eritroide in colture semisolide (sinistra) e liquide (destra).**

**Silenziamento dell'espressione del miR-16 In cellule di pazienti con PV:**

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 e coniugati a una molecola di FITC (Locked Nucleic Acid). 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) in cellule mononucleate ottenute da pazienti con PV. La valutazione mediante citofluorimetro dopo 24 ore dalla trasfezione ha mostrato un discreto incremento delle cellule positive al FITC, mentre l'effettivo abbattimento dei livelli di miR-16 è stato valutato mediante PCR quantitativa. Per valutare il ruolo di miR-16 durante il differenziamento eritroide, abbiamo trasfettato cellule CD34+ purificate da PV e verificato gli effetti sulla crescita clonogenica mediante coltura semisolida. Dopo 14 giorni di coltura è stato valutato il numero di colonie eritroidi spontanee e indotte da fattori di crescita. Nelle colture trasfettate con il siRNA anti pre-miR-16-2 è stato osservato un decremento significativo 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), anche in questo caso nessuna differenza significativa nel numero di colonie mieloidi è stata osservata (figura 36).



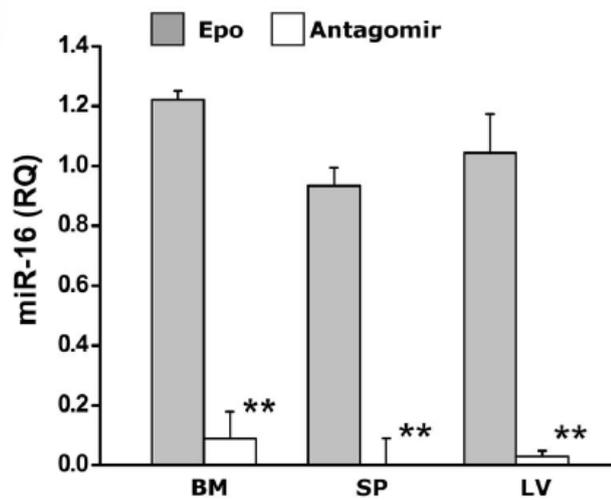
**Figura 36: Effetto del silenziamento dei premiR-16-1 e -16-2 sulla formazione di colonie eritroidi spontanee e indotte da Epo in cellule totali (A) e sortate (B).**

### Studi in vivo:

Per valutare l'effettivo impatto del miR-16 nel corso del differenziamento eritroide in vivo, abbiamo utilizzato un modello murino trattato con dosi elevate di eritropoietina in modo da ricreare artificialmente una condizione di accelerata eritropoiesi (Vannucchi, Bianchi et al. 2001) e trattato con AntagomiR per silenziare l'espressione del microRNA a livello sistemico. Gli AntagomiR sono una nuova classe di oligonucleotidi chimicamente ingegnerizzati con l'aggiunta di gruppi fosforati per incrementarne la stabilità e una molecola di colesterolo al 3' in modo da permetterne il passaggio attraverso le membrane cellulari (Kruzfeldt, Rajewsky et al. 2005). Queste molecole costituiscono un utile strumento per lo studio della regolazione dell'espressione genica da parte di microRNA in-vivo. I topi, del ceppo C57BL6, sono stati trattati con una dose di 600U/Kg di eritropoietina per via intraperitoneale e divisi in due gruppi. Al gruppo sperimentale è stata iniettata per via endovenosa una dose giornaliera di 55 mg/Kg di antagomiR per tre giorni consecutivi, mentre al gruppo di controllo l'equivalente volume di veicolo. Gli animali sono stati quindi sacrificati dopo 4 e 7 giorni dalla somministrazione di Epo, e sangue, milza, fegato e femore prelevati per ulteriori analisi.

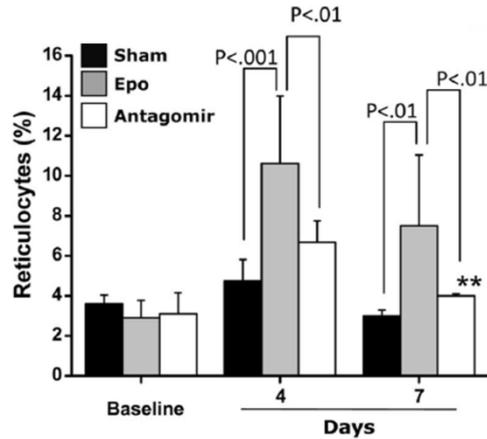
L'effetto del trattamento con AntagomiR è stato valutato su RNA di cellule ottenute da midollo osseo, milza e fegato al settimo giorno dal trattamento con Epo mediante Real time PCR. I livelli del miR-16 maturo nei topi trattati con AntagomiR sono risultati

essere notevolmente ridotti rispetto ai topi del gruppo di controllo come mostrato in figura 37.



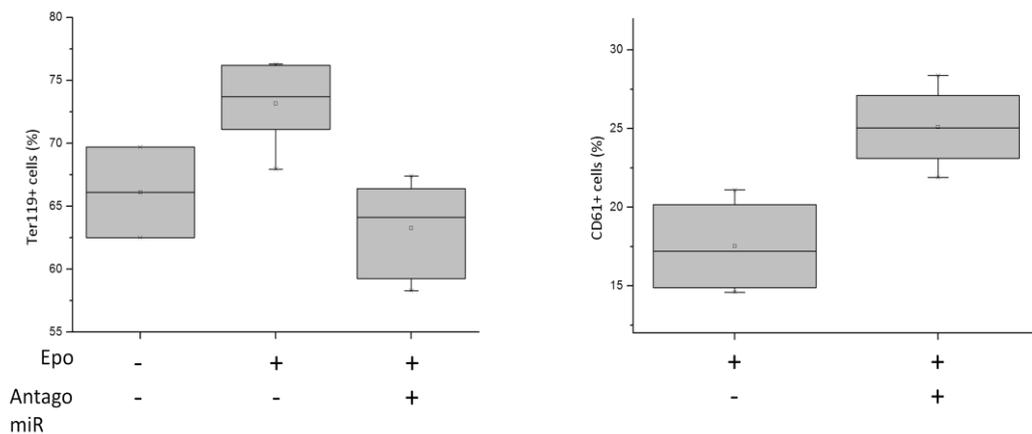
**Figura 37: Effetto della somministrazione di AntagomiR sui livelli di miR-16 nel midollo osseo, milza e fegato degli animali trattati.**

La risposta alla somministrazione di Epo negli animali è stata studiata valutando il numero di reticolociti su strisci di sangue periferico prelevato dal plesso retro orbitale al 4 e al 7 giorno dopo il trattamento, mediante colorazione con blu brillante di cresile. La stimolazione con Epo ha prodotto un significativo aumento del numero di reticolociti al quarto e settimo giorno dopo il trattamento nei topi del gruppo di controllo, rispetto al prelievo effettuato prima del trattamento. Questa risposta risulta essere notevolmente inibita nei topi trattati con l'AntagomiR, come mostrato in figura 38.



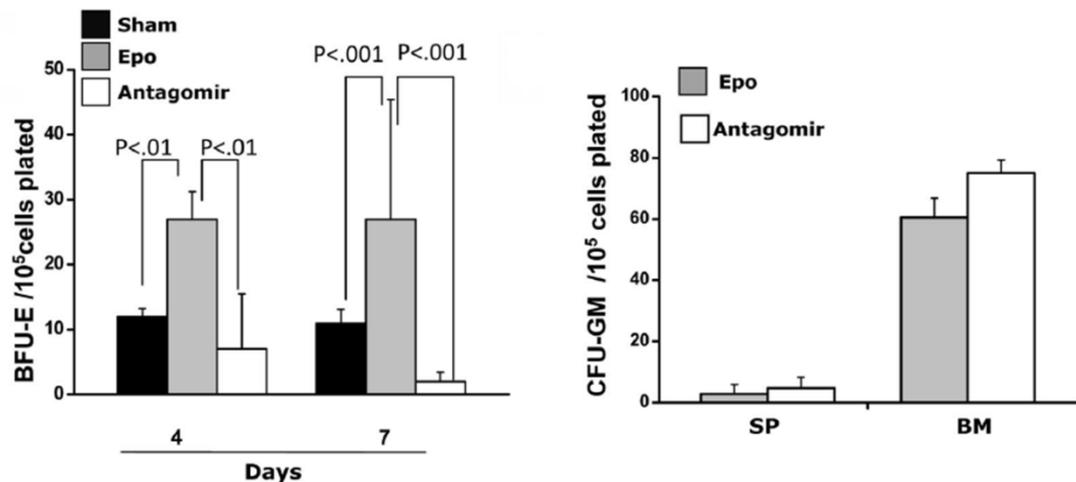
**Figura 38: Percentuale di reticolociti circolanti in sangue periferico di topi trattati con AntagomiR rispetto a topi di controllo.**

Allo stesso modo, abbiamo osservato un numero inferiore di eritroblasti nel midollo osseo separato da topi trattati con AntagomiR rispetto ai topi che hanno ricevuto il solo vettore ( $74.2 \pm 5.3\%$  vs  $62 \pm 2.9\%$ ), valutati mediante citometria a flusso in base al marcatore Ter119. A questa diminuzione della popolazione riconducibile al lineage eritroide corrisponde un aumento speculare dei progenitori megacariocitari CD61+ (Figura 39).



**Figura 39: Percentuale di progenitori eritroidi (destra) e megacariocitari (sinistra), in cellule separate da midollo osseo di topi trattati con AntagomiR, confrontati a topi trattati con il solo vettore.**

Infine il numero di colonie eritroidi ottenute da cellule di midollo osseo in coltura semisolida, è risultato essere significativamente inferiore negli animali trattati con l'AntagomiR ad entrambi gli end-point, mentre non è stata registrata alcuna variazione significativa nel numero di colonie granulocitario-macrofagiche (figura 40).



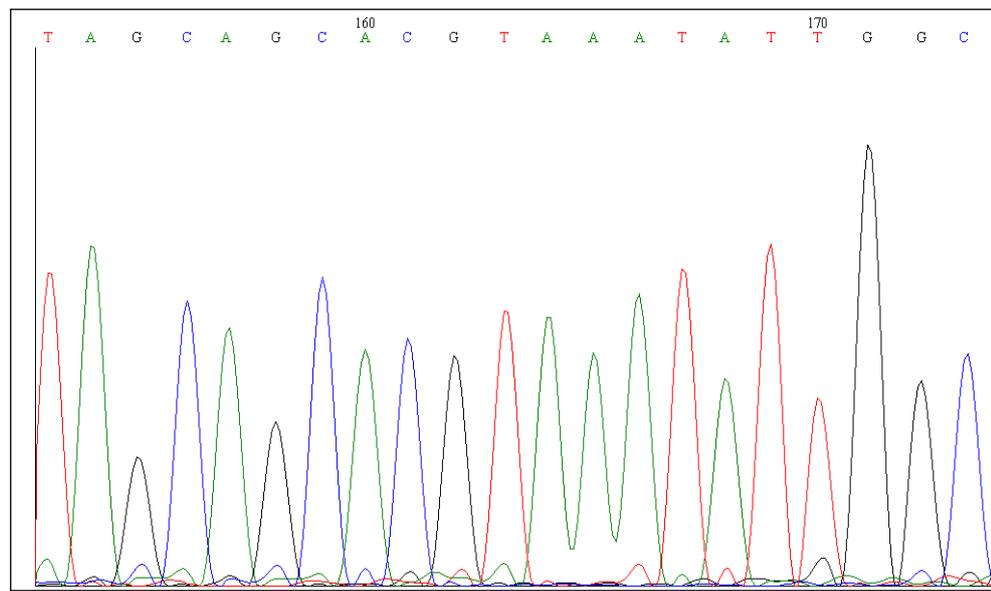
**Figura 40: Effetto del trattamento con AntagomiR-16 sulla formazione di colonie eritroidi (a sinistra) e mieloidi (a destra) in colture clonogeniche ottenute da cellule di midollo osseo.**

Nel complesso questi dati dimostrano che il trattamento con l'AntagomiR e la conseguente riduzione dei livelli di miR-16 a livello del compartimento ematopoietico causa un'evidente riduzione della risposta allo stimolo con eritropoietina e dimostrano il ruolo attivo di questo microRNA nell'eritropoiesi fisiologica.

#### **Ricerca alterazioni dei geni codificanti il miR-16:**

Alterazioni molecolari a livello dei geni codificanti microRNA sono state trovate in numerose neoplasie, pertanto abbiamo effettuato un'analisi a livello genomico al fine di evidenziare possibili mutazioni o riarrangiamenti. 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,

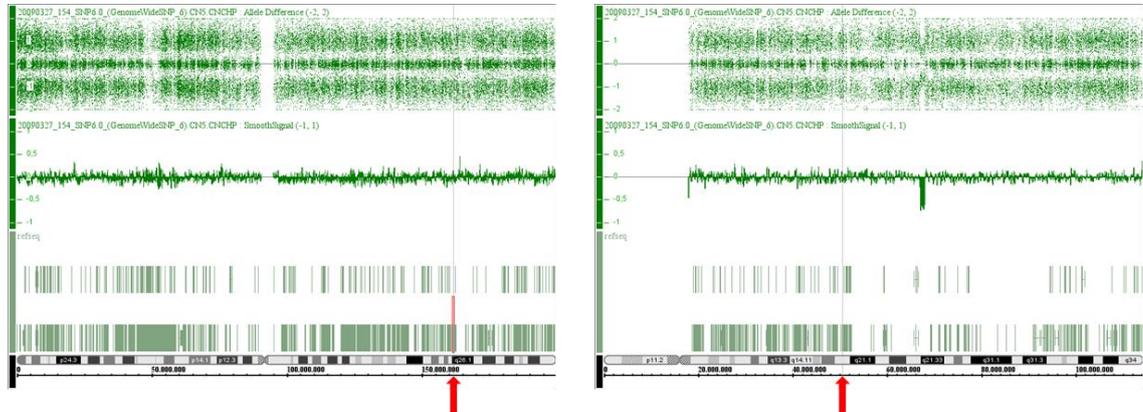
contenente l'intera sequenza del pre-miR-16-1 e del pre-miR-15a sul cromosoma 13 e del pre-miR16-2 e pre-miR-15b sul cromosoma 3. E' stato amplificato e sequenziato il DNA ottenuto da granulociti di 10 pazienti, che presentavano i più alti livelli di espressione del miR-16 maturo, confrontandolo a quello 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 (figura 41).



**Figura 41: Elettroferogramma che mostra la sequenza del miR-16 maturo. Non sono evidenziate mutazioni.**

Per escludere amplificazioni/delezioni delle regioni contenenti i cluster dei microRNA 16-1 e 16-2 è stata condotta un'analisi del numero di copie dei geni mediante PCR quantitativa con Sybr Green. 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 (Kroger, Badbaran et al. 2007). In tutti i campioni esaminati non sono state evidenziate alterazioni del numero di copie dei due geni codificanti il miR-16. Come ulteriore conferma, alcuni campioni sono stati analizzati mediante SNP array 6.0 (Affymetrix), che non hanno evidenziato alcuna anomalia nel numero di copie

a livello delle regioni d'interesse e ha permesso di escludere anche ulteriori anomalie a livello dei cromosomi 3 e 13 (figura 42).



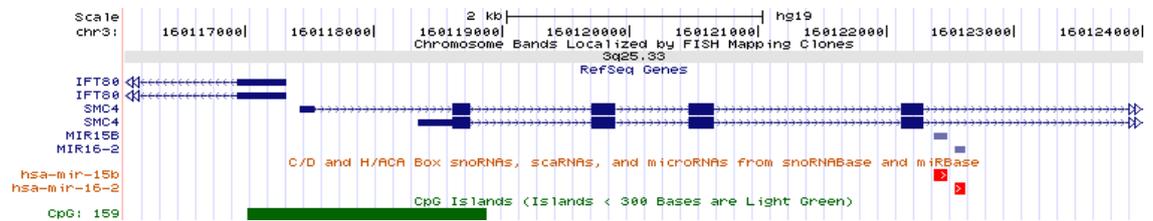
**Figura 42: Esempio di analisi mediante SNP arrays relativa ai cromosomi 3 (a sinistra) e 13 (a destra). Le frecce rosse indicano rispettivamente la posizione dei cluster dei microRNA 15b/16-2 e 15a/16-1.**

### **Studio Metilazione:**

L'ipermetilazione/ipometilazione del promotore è uno delle cause che portano ad alterazioni dell'espressione genica, nelle neoplasie ematologiche e solide si osserva frequentemente un'aberrante metilazione dei promotori di proto-oncogeni e geni oncosoppressori. Nelle Neoplasie Mieloproliferative Croniche Philadelphia-Negative ad esempio, l'ipermetilazione del promotore e la conseguente repressione trascrizionale dei geni SOCS è un dei meccanismi che porta all'iperattivazione della pathway di JAK/STAT (Teofili, Martini et al. 2008).

Abbiamo analizzato la regione di circa 5000 bp a monte dei due cluster di microRNA per verificare la presenza di CpG islands a livello del promotore del gene ospite mediante software disponibili online (Methprimer), soltanto SMC4 sul cromosoma 3 presenta una regione ricca di dinucleotidi CG che copre il sito d'inizio della trascrizione (Figura 43). Mediante Methylation Specific PCR e Bisulfite Sequencing abbiamo verificato eventuali differenze nel profilo di metilazione del promoter di SMC4 nei pazienti con PV rispetto a controlli sani, che possano giustificare l'iperespressione del

miR-16. Nei campioni analizzati non è stata evidenziata alcuna differenza nel pattern di metilazione a livello delle regioni analizzate, escludendo questo meccanismo come causa dell'iperpressione del miR-16.



**Figura 43: CpG islands a livello del promotore di SMC4 (immagine tratta da UCSC Genome Browser).**

### **Myb transattiva il promoter di SMC4:**

In molti studi è stato osservato come l'alterata espressione di fattori di trascrizione possa contribuire allo sviluppo neoplastico mediante repressione o attivazione di microRNA in veri e propri circuiti di feedback. Ad esempio, la traslocazione t(8;14) che costituisce l'evento genetico alla base dei linfomi di Burkitt porta ad un'aumentata espressione del gene MYC per effetto di prossimità del promotore del gene IGH. In alcuni studi è stato dimostrato che un cluster di microRNA (miR-17-92) localizzato sul cromosoma 13 gioca un ruolo importante nella proliferazione dei linfociti B e l'aumentata espressione dei miRNA che lo compongono porta ad un fenotipo linfoproliferativo in modelli murini (Xiao, Srinivasan et al. 2008). In uno studio del 2005 O'Donnell et al ha dimostrato che MYC lega e transattiva il promoter del gene C13orf25 che contiene il cluster dei miR-17-92, a loro volta questi miRNA mediante repressione di target come fattori di trascrizione della famiglia E2F e proteine coinvolte nell'apoptosi come BIM, PTEN e p21 (O'Donnell, Wentzel et al. 2005). In un altro studio è stato dimostrato che p53 è in grado di attivare direttamente la trascrizione dei microRNA della famiglia del miR-34 e che parte degli effetti mediati da p53 sul ciclo cellulare e apoptosi possono essere dovuti proprio a queste molecole (Raver-Shapira, Marciano et al. 2007). Molti fattori di trascrizione sono coinvolti nel differenziamento della cellula staminale multipotente in senso eritroide, tra questi GATA-1, SCL/Tal1,

LMO2, LDB1, Klf1 e Gfi-1b; questi regolatori trascrizionali agiscono in numerose combinazioni attivando o reprimendo l'espressione di geni importanti per lo sviluppo dell'eritrocita maturo. Il pre-miR-16-2 è localizzato sul cromosoma 3 all'interno del gene SMC4 e risulta essere co-regolato con questo (Corcoran, Pandit et al. 2009). SMC4 è codificato sotto forma di due trascritti che differiscono nel sito d'inizio della trascrizione, mediante analisi bioinformatica abbiamo identificato alcuni siti di legame putativi per i fattori di trascrizione MYB, GATA-1, KLF1 e LMO2 nella regione genomica a monte dei due ATG iniziali (figura 44).



**Figura 44: Siti putativi di legame per i fattori di trascrizione MYB (in rosa e rosso) e GATA-1 (in viola) sul promotore di SMC4.**

Per verificare l'ipotesi che l'espressione di SMC4 e del miR-16 possa essere regolata da uno di questi fattori abbiamo inserito una regione di 1130 paia di basi a contenente il promotore del trascritto corto di SMC4 (NM\_005496) in un vettore di espressione, a monte del gene per la luciferasi e cotrasfettato cellule HEK293 con dosi crescenti di vettori esprimenti MYB, GATA-1, KLF1 e LMO2. L'espressione del gene reporter, indotta dal legame del fattore di trascrizione con il proprio enhancer sul frammento di promotore clonato, è stata valutata sfruttando la reazione chemiluminescente generata dalla conversione della luciferina in ossi-luciferina catalizzata dalla luciferasi stessa. Soltanto la cotrasfezione del vettore reporter con dosi crescenti del vettore di espressione per MYB ha mostrato una transattivazione dose dipendente del gene per la luciferasi, fornendo la prova che questo fattore lega sequenze specifiche del promotore di SMC4 ed è quindi in grado di attivarne la trascrizione (figura 45).

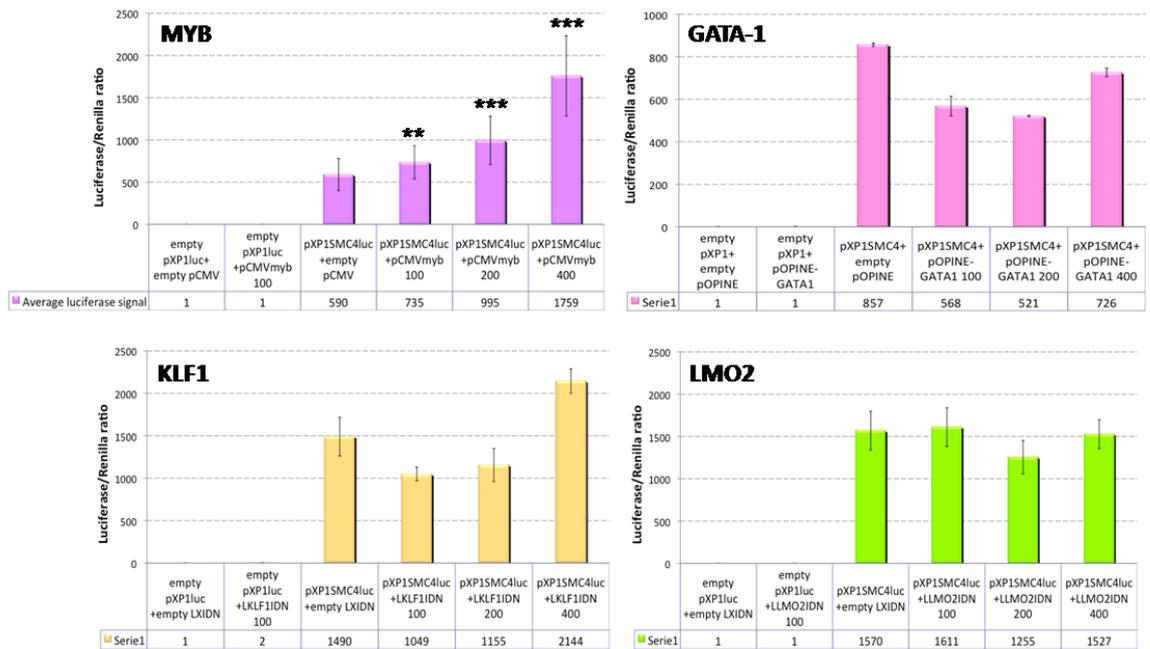
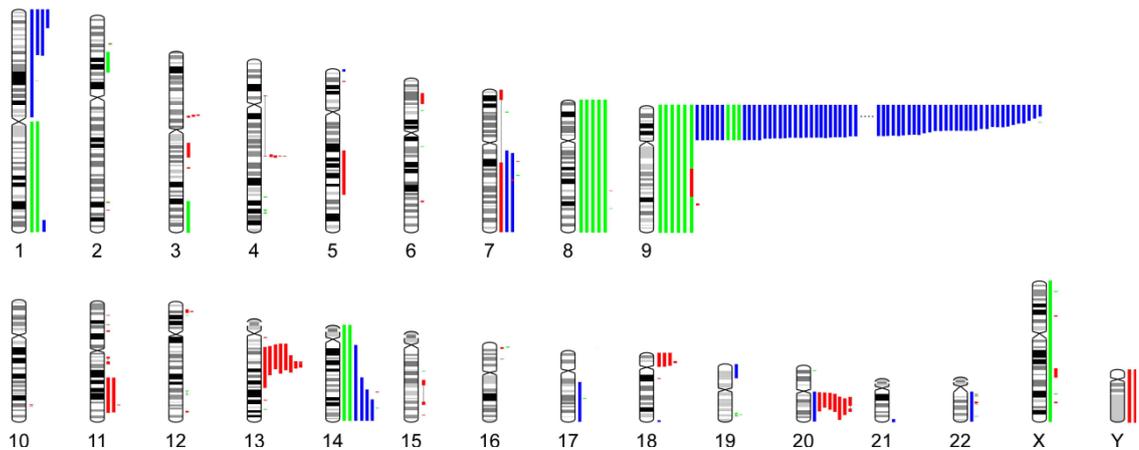


Figura 45: Effetto dell'interazione dei fattori trascrizionali MYB, GATA-1, KLF1 e LMO2 con le rispettive sequenze di consenso sul promotore di SMC4.

## Caratterizzazione della disomia uniparentale del cromosoma 14q

### SNPs array 14q UPD:

L'analisi mediante SNPs Arrays è stata effettuata su un totale di 408 campioni corrispondenti a 398 pazienti, alcuni campioni rappresentano infatti fasi distinte di evoluzione della malattia nello stesso paziente. Tra questi sono stati analizzati 162 campioni di PV, 80 ET, 79 PMF, 29 LAM secondarie a MPN e 58 pazienti con Mielofibrosi secondaria a PV o ET, oppure in fase accelerata di malattia. Circa i tre quarti dei campioni sono risultati positivi alla mutazione V617F del gene JAK2.

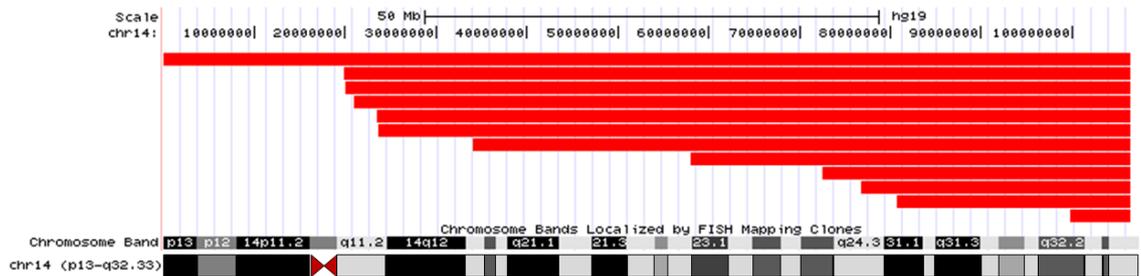


**Figura 46: Riarrangiamenti cromosomici più frequenti in pazienti con MPN (Klampfl, Harutyunyan et al. 2011).**

L'analisi ha rivelato la presenza di una o più alterazioni cromosomiche in circa il 63% dei campioni (figura 46), mentre nei rimanenti casi è stato osservato un cariotipo normale. Il numero di alterazioni cariotipiche è risultato essere correlato all'età del paziente e allo stadio di malattia; la presenza di cariotipi complessi è stata osservata con frequenza maggiore pazienti in età più avanzata, inoltre il numero di alterazioni molecolari aumenta significativamente nel passaggio dalla fase cronica (PV, ET, PMF) alla fase accelerata (pPV/ET-MF, AP) e in modo ancora più evidente nella trasformazione in leucemia acuta.

Un certo numero di alterazioni cromosomiche sono state associate a progressione da fase cronica a fase accelerata di malattia, tra queste la disomia uniparentale del cromosoma 9p associata alla mutazione V617F del gene JAK2, e gain del cromosoma 1q. La prima alterazione è stata già descritta come indice prognostico di progressione di malattia (Barosi, Bergamaschi et al. 2007), la seconda coinvolge il gene MDM4 che è un inibitore di p53 ed anche questa risulta essere associata a trasformazione in leucemia acuta (Harutyunyan, Klampfl et al. 2011). Oltre all'amplificazione del cromosoma 1q anche il gain del 3q, delezioni dei cromosomi 7q, 5q, 6p, 7p e UPD dei cromosomi 19q e 22q risultano essere associate a trasformazione in LAM (Klampfl, Harutyunyan et al. 2011).

Tra le alterazioni più frequenti sono state osservate delezioni a livello dei cromosomi 4 (associate a perdita di EZH2), 13q, 11q (associate a perdita di CBL), 18p e 20q, gain dei cromosomi 1q (associate ad amplificazione di MDM4), 8, 9 e 14. Oltre ai cromosomi 9p e 1p un'altra regione frequentemente soggetta a UPD è stata osservata a livello del cromosoma 14q (fig. 46 e 47) in un numero significativo di pazienti.



**Figura 47: Differenti estensioni di UPD a livello del cromosoma 14q in pazienti con MPN osservata mediante SNP array.**

#### **Analisi mutazionale 14q UPD:**

Mediante Next Generation Exome Sequencing, sono stati sequenziati 10 pazienti con disomia uniparentale del cromosoma 14 (4 MPN in fase cronica, 4 mielofibrosi secondarie/fase accelerata, 2 MDS) ed un paziente con trisomia 14. I risultati sono stati filtrati al fine di eliminare tutti i polimorfismi precedentemente annotati, le varianti localizzate in regioni non codificanti (5' UTR, 3' UTR) e le possibili mutazioni silenziose. Per ogni paziente infine sono state selezionate soltanto le varianti comprese nella regione di LOH individuata mediante SNP arrays. Sono state trovate 52 possibili varianti in 10 pazienti (mediana 2.5, range 0-15), di cui 14 inserzioni/delezioni e 38 sostituzioni nucleotidiche. Per ogni variante è stata disegnata una coppia di primers e sequenziato il DNA estratto da granulociti mediante metodica Sanger per eliminare eventuali falsi positivi. Di 29 varianti su 52 (56%) validate, 17 sono state verificate su DNA germinale (ottenuto da swab buccale quando disponibile o da cellule CD3+ in quanto non derivati dal clone patologico nella maggior parte dei casi), in tutti i casi la presenza della mutazione è stata individuata anche nella DNA di controllo, escludendo quindi la possibilità di un evento somatico. Delle 29 alterazioni validate 8 sono

inserzioni/delezioni (fino a 4 nucleotidi), le restanti sono varianti missenso, per ciascuna di queste l'effetto sulla proteina è stato stimato mediante analisi con PolyPhen 2, i risultati sono riportati in tabella 8.

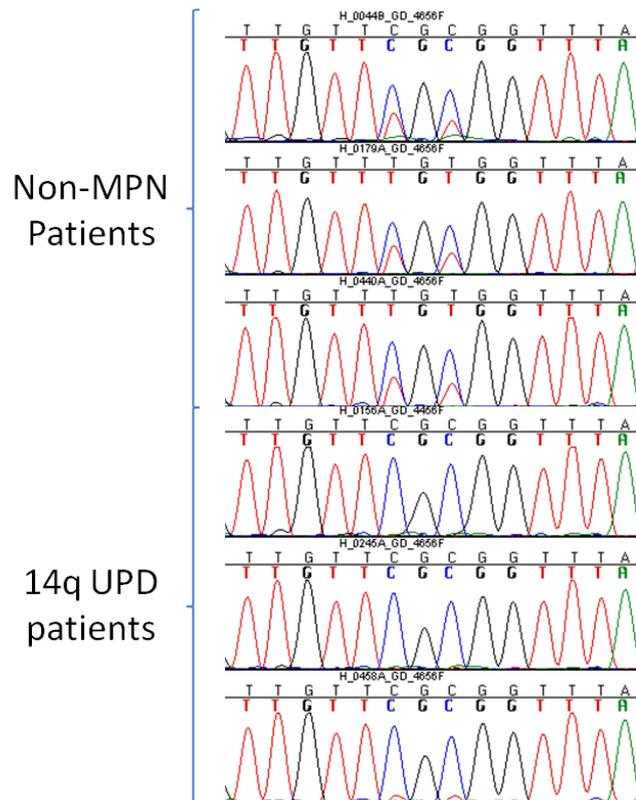
Alcune alterazioni identificate a livello della stessa posizione genomica all'interno del gene C19orf49 sono presenti in tre pazienti, il fatto che siano presenti anche a livello del DNA germinale fa ipotizzare che si possa trattare di SNPs non ancora annotati. Sono state infine identificate possibili mutazioni in due diversi codoni del gene LRRC16B in due diversi pazienti, in uno è stato possibile risalire all'origine germinale, mentre nell'altro non è stato possibile effettuare un raffronto; queste varianti sono le uniche che presentano ricorrenza in più pazienti.

**Tabella 8: Elenco delle varianti osservate mediante whole exome sequencing.**

GENE	Posizione	SNV/InDel	Origine	HumDiv score	HumVar score	Effetto
IRF9	chr14:23703971	SNV	ND	1	0,995	PROBABLY DAMAGING
C14orf159	chr14:90712051	SNV	Germline	0,993	0,973	PROBABLY DAMAGING
ABHD12B	chr14:50422106	SNV	Germline	0,863	0,783	PROBABLY DAMAGING
ZFYVE26	chr14:67334888	SNV	Germline	0,992	0,95	PROBABLY DAMAGING
OR10G3	chr14:21108012	SNV	ND	0,761	0,425	POSSIBLY DAMAGING
C14orf135	chr14:59657687	SNV	ND	0,839	0,832	POSSIBLY DAMAGING
EXD2	chr14:68774158	SNV	ND	0,711	0,372	POSSIBLY DAMAGING
DDX24	chr14:93589121	SNV	Germline	0,819	0,525	POSSIBLY DAMAGING
ACTN1	chr14:68411411	SNV	Germline	0,235	0,396	POSSIBLY DAMAGING
BTBD7	chr14:92782090	SNV	Germline	0,887	0,45	POSSIBLY DAMAGING
TLL5	chr14:75311593	SNV	Germline	0,268	0,065	POSSIBLY DAMAGING/BENIGN
KLC1	chr14:103190913	SNV	ND	0,136	0,275	BENIGN/POSSIBLY DAMAGING
PTGDR	chr14:51805040	SNV	ND	0	0,004	BENIGN
C14orf43	chr14:73275405	SNV	ND	0	0	BENIGN
NID2	chr14:51566149	SNV	ND	0	0,004	BENIGN
VRK1	chr14:96392645	SNV	Germline	0,008	0,121	BENIGN
FAM164C	chr14:74607102	SNV	Germline	0,008	0,021	BENIGN
PYGL	chr14:50441909	SNV	Germline	0	0,001	BENIGN
FOXN3	chr14:88726525	SNV	Germline	0,005	0,011	BENIGN
LRR16B	chr14:23604110	SNV	ND			UNKNOWN
LRR16B	chr14:23592778	SNV	Germline			UNKNOWN
C14orf106	chr14:44785769	InDel	ND			
TMX1	chr14:50790885	InDel	ND			
SLC38A6	chr14:60587047	InDel	ND			
C14orf49	chr14:94973061	InDel	Germline			
C14orf49	chr14:94973061	InDel	Germline			
C14orf49	chr14:94973061	InDel	Germline			
C14orf73	chr14:102636519	InDel	Germline			
HEATR5A	chr14:30926147	InDel	Germline			

**Analisi del profilo di metilazione:**

Il locus che comprende i geni DLK1 e MEG03 è compreso nella regione minima di LOH comune a tutti i pazienti ed è regolato da meccanismo di imprinting. L'espressione o la repressione dei geni del locus è regolata mediante meccanismi epigenetici a livello di due regioni (DMR) che presentano un determinato pattern di metilazione a seconda del genitore da cui è ereditato l'allele, la prima regione è localizzata tra i geni DLK1 e MEG03 (IG-DMR), la seconda regione è localizzata in prossimità del promotore di MEG03 (MEG-DMR). Più specificamente, l'allele paterno è metilato a livello delle due DMR ed esprime i geni codificanti proteine DLK1 e RTL1, l'allele materno è de metilato ed esprime il gene non codificante MEG03, il cluster di snoRNA e i microRNA. Il pattern di metilazione a livello delle due DMR è stato studiato mediante Bisulfite Sequencing e Methylation Specific PCR: inizialmente sono state disegnate tre coppie di primer per amplificare e sequenziare il DNA dopo trattamento con sodio bisulfito al fine di individuare le regioni più adatte a discriminare i due alleli. Il sequenziamento effettuato su alcuni pazienti con 14q UPD ha evidenziato la presenza esclusiva di citosine metilate a livello delle CpG islands nella regione presa in esame, laddove nei controlli sono presenti entrambi i segnali nelle stesse posizioni (figura 48).



**Figura 48: Esempio di CpG islands con differente pattern parentale di metilazione, i tre elettroferogrammi in basso mostrano la perdita del segnale relativo alle citosine non metilate.**

Come conferma di questo dato è stata messa a punto una metodica di screening mediante Methylation Specific PCR. La metodica permette di distinguere i due differenti pattern di metilazione mediante l'utilizzo di primers specifici e di ottenere una stima dell'abbondanza relativa dei due alleli. Sono stati valutati 7 campioni con UPD del cromosoma 14q e tre donatori sani. In tutti i campioni con 14qUPD analizzati abbiamo osservato la perdita dell'allele materno evidenziata dalla presenza esclusiva del segnale relativo alla sequenza metilata, mentre nei campioni negativi per questa alterazione è stata evidenziata la presenza di entrambi i segnali con stessa intensità (figura 49). Questo dato indica che l'acquisizione di UPD in questa regione non avviene in maniera casuale e che probabilmente la duplicazione dell'allele paterno (o la perdita dell'allele materno) conferisce un vantaggio selettivo alla cellula tumorale.

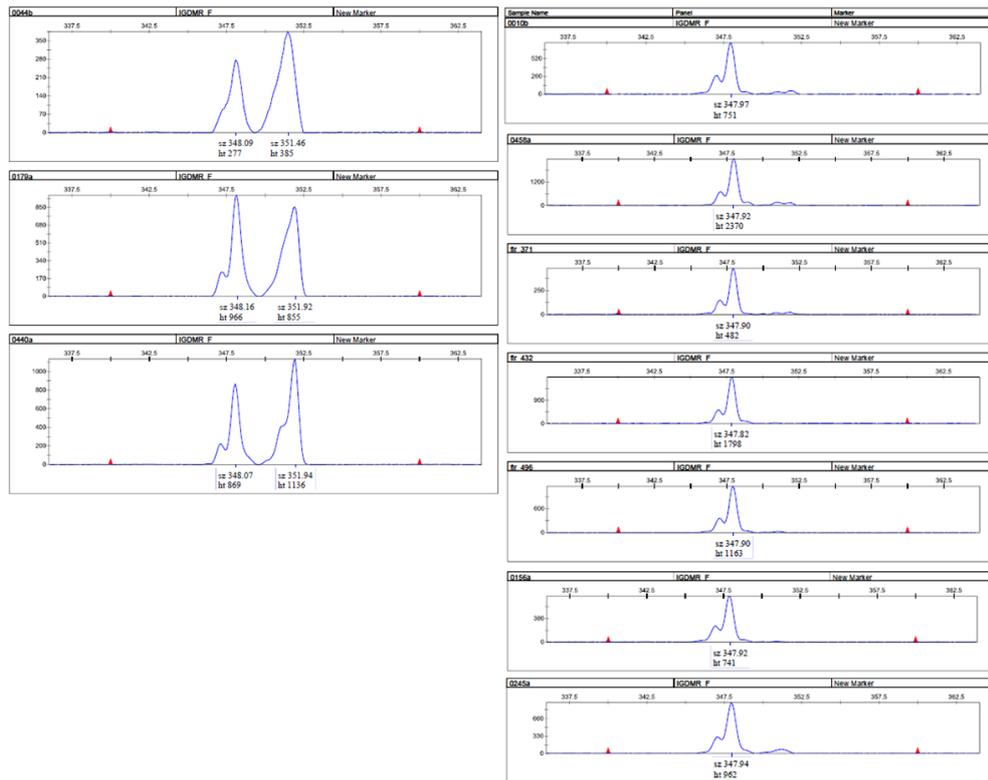


Figura 49: Elettroferogrammi derivanti dall'analisi mediante MSP di campioni con UPD del cromosoma 14 (a destra), confrontati con controlli sani (sinistra). L'amplificazione del DNA ottenuto da donatori mostra la presenza dei picchi relativi agli alleli paterno (metilato) e materno (non metilato). Tutti i campioni con UPD del cromosoma 14 mostrano perdita del segnale relativo all'allele materno.

## Discussione

---

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.

In questo studio ho utilizzato due differenti approcci sperimentali per l'identificazione e la caratterizzazione di microRNA potenzialmente coinvolti nella patogenesi delle MPN. Questi due approcci partono da due prospettive diverse, ma con lo stesso endpoint finale, ovvero la definizione di un ristretto gruppo di microRNA che possano essere utilizzati in diagnostica per distinguere le cellule di pazienti con MPN rispetto alle cellule normali e/o per la diagnosi differenziale dei vari sottotipi di MPN e/o per definire le diverse fasi di progressione di malattia e in terapia come possibili bersagli molecolari.

Il primo approccio si basa sui dati derivanti dall'analisi comparativa dei livelli di espressione dei miRNA nel corso del differenziamento eritroide in cellule normali e patologiche. Lo studio effettuato in colture cellulari ha evidenziato una netta differenza nella cinetica di espressione del miR-16 durante tutte le varie fasi di differenziamento eritroide nelle cellule ottenute da pazienti con PV rispetto ai controlli sani. E' stata pertanto valutata l'espressione del miR-16 in cellule CD34+ ottenute da pazienti affetti da diverse neoplasie mieloidi, rispetto a cellule di donatori sani; l'analisi ha dimostrato una significativa iperespressione del miR-16 nelle cellule separate da pazienti con PV, ma non nelle altre patologie, indicando un meccanismo molto specifico. Ulteriori analisi hanno inoltre evidenziato normali livelli di miR-16 nei linfociti T di pazienti con PV e in granulociti di pazienti con eritrocitosi secondarie e MDS, indicando che l'iperespressione del miRNA è caratteristica del lineage mieloide e non si osserva in altre condizioni di eritropoiesi iperstimolata. Il miR-16 è codificato da due geni distinti: il pre-miR-16-1 localizzato sul cromosoma 13, in cluster con il miR-15a e il

pre-miR-16-2, localizzato in un introne del gene SMC4 sul cromosoma 3, in cluster con il miR-15b. Non è stata osservata alcuna differenza nei livelli di miR15a, miR-15b e miR-195 (che appartiene alla stessa famiglia) nelle cellule di pazienti con PV rispetto ai controlli; ciò può essere dovuto ad un differente turnover dei microRNA nella cellula e all'interazione con target specifici (Rissland, Hong et al. 2011). Nelle cellule patologiche inoltre abbiamo dimostrato una maggiore espressione del precursore codificato dal gene sul cromosoma 3. A conferma di questo dato, abbiamo osservato una forte correlazione tra i livelli di miR16 e l'espressione del gene SMC4, in accordo con quanto riportato in letteratura.

Al fine di confermare questi dati sono stati effettuati studi funzionali in vitro, nei quali abbiamo testato l'effetto di variazioni dell'espressione del microRNA sul fenotipo cellulare. Mediante elettroporazione abbiamo trasfettato un costrutto contenente il pre-miRNA-16 in cellule CD34+ di donatori al sesto giorno di coltura eritroide, per simulare la cinetica del microRNA nelle cellule patologiche. Le cellule trasfettate con il pre-miRNA, valutate dopo sei giorni di coltura, hanno mostrato un aumentato differenziamento eritroide rispetto a quelle trasfettate con il costrutto di controllo.

Al contrario, silenziando l'espressione del miR-16 con siRNA in cellule di pazienti con PV, è stata osservata una riduzione della capacità di formare colonie eritroidi spontanee e indotte da Epo in coltura semisolidi rispetto alle cellule trasfettate con un siRNA di controllo. E' importante sottolineare che la capacità di formare colonie eritroidi in assenza di fattori di crescita è una caratteristica fondamentale dei progenitori ematopoietici nella policitemia vera, i dati ottenuti da questi studi funzionali assumono pertanto un significato molto importante sia per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della patologia, sia per lo sviluppo di nuove terapie.

Abbiamo quindi provato a riprodurre questi risultati in-vivo, ricreando una condizione di eritropoiesi artificialmente stimolata mediante somministrazione massiva di Epo in un modello murino e utilizzando gli AntagomiR, una nuova classe di oligonucleotidi sintetizzati chimicamente per silenziare l'espressione del miR-16 a livello sistemico. Gli animali trattati con AntagomiR hanno mostrato una ridotta risposta allo stimolo con

Epo rispetto agli animali trattati con il solo veicolo, sia a livello periferico sia nel midollo osseo, confermando i dati ottenuti in-vitro e sottolineando nuovamente l'importanza dei microRNA nella regolazione di complessi processi cellulari.

Sono stati descritti numerosi meccanismi che possono alterare l'espressione di un microRNA: amplificazione/delezione genica (Calin, Dumitru et al. 2002; He, Thomson et al. 2005; Starczynowski, Kuchenbauer et al. 2010), mutazioni puntiformi (Raveche, Salerno et al. 2007), modificazioni epigenetiche (Saito, Liang et al. 2006) e trans attivazione da parte di fattori trascrizionali (Ota, Tagawa et al. 2004). Al fine di definire i meccanismi alla base dell'iperespressione del miR-16, abbiamo pertanto valutato l'eventuale presenza di alterazioni a livello genomico. Abbiamo inizialmente escluso la presenza di delezioni a carico del cromosoma 13 mediante FISH, e valutata l'eventuale presenza di mutazioni nelle regioni contenenti i cluster miR-15a/16-1 e 15b/16-2; il sequenziamento di queste regioni non ha però evidenziato alcuna alterazione genomica. Inoltre tutti i campioni analizzati hanno presentato un normale numero di copie geniche del miR-16, valutato mediante PCR quantitativa e confermato mediante SNPs Array Affymetrix. Anche alterazioni epigenetiche sono state escluse mediante bisulphite sequencing e methylation sensitive PCR. Abbiamo pertanto preso in considerazione il ruolo di fattori di trascrizione coinvolti nell'eritropoiesi, concentrandoci in primo luogo sulla pathway di JAK/STAT. L'espressione del miR-16 nei pazienti presenta un leggero, ma non significativo trend in risposta all'aumento del burden allelico di JAK2V617F; esperimenti di silenziamento di JAK2 in cellule recanti la mutazione hanno però escluso un coinvolgimento diretto della proteina. Per verificare il coinvolgimento di altri fattori di trascrizione implicati nel differenziamento eritroide, abbiamo testato l'effetto di dosi crescenti di MYB, GATA-1, KLF1, LMO2 sull'espressione di un gene reporter posto sotto il controllo del promotore di SMC4. Soltanto MYB ha dimostrato di poter legare e trans attivare regioni specifiche sul promotore di SMC4 con un effetto dose dipendente e pertanto poter attivare la trascrizione del pre-miR-16-2. MYB è un fattore di trascrizione espresso ad alti livelli nella cellula staminale e nei progenitori ematopoietici e gradualmente down-regolato durante il differenziamento, recentemente è stato dimostrato che questa proteina gioca un ruolo importante nel differenziamento eritroide a livello embrionale, infatti il

knockout costitutivo del gene provoca fallimento dell'eritropoiesi epatica e morte embrionale (Mucenski, McLain et al. 1991). Anche nell'organismo adulto MYB agisce come regolatore del differenziamento eritroide, transattivando altri fattori trascrizionali come KLF1 e LMO2. Il silenziamento di MYB in cellule CD34+ provoca uno switch verso il lineage megacariocitario-macrofagico a discapito di quello eritroide, che può essere parzialmente revertito mediante espressione ectopica di KLF1 e LMO2 (Bianchi, Zini et al. 2010). Un'osservazione importante deriva da una recente pubblicazione in cui è stato descritto che MYB è in grado di attivare la trascrizione di un altro membro della famiglia del miR-16, il miR-15a che si trova sul cromosoma 13q14 in cluster con il pre-miR-16-1. Il miR-15a a sua volta regola l'espressione di MYB, creando un circuito di feedback con implicazioni funzionali nel differenziamento della cellula staminale ematopoietica.

Molti target sono stati sperimentalmente validati in diversi modelli cellulari e patologie e altrettanti i processi in cui il miR-16 è stato descritto essere coinvolto, tra i quali apoptosi, ciclo cellulare e differenziamento. Uno dei primi target validati per il miR-16 è BCL2, gene con attività anti-apoptotica che risulta essere coinvolto nella traslocazione t(14;18) nei linfomi a grandi cellule B. La delezione del cluster del miR-16-1 e miR15a nella LLC porta ad un diminuito controllo di questi microRNA sul trascritto di BCL2 e quindi ad un aumento della proteina, meccanismo che può indurre una aumentata sopravvivenza cellulare ed sviluppo tumorale (Cimmino, Calin et al. 2005). 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 (Zermati, Garrido et al. 2001; Testa 2004), 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.

Il miR-16 interviene anche nella regolazione del ciclo cellulare silenziando molti target coinvolti in questo processo (Linsley, Schelter et al. 2007; Bonci, Coppola et al. 2008) e nel differenziamento cellulare; lo stesso MYB infatti è stato dimostrato essere un target dei microRNA della famiglia del miR-16.

Il secondo approccio si basa sull'utilizzo di metodiche citogenetiche ad ampio spettro per identificare microRNA coinvolti in regioni frequentemente soggette a riarrangiamenti cromosomici nelle MPN. La metodica dei Single Nucleotide Polymorphism Arrays (SNP arrays) è stata applicata con successo in molti studi per ottenere informazioni cariotipiche molto dettagliate ed individuare nuove alterazioni associate a regioni di perdita di eterozigosi. Mediante SNP Arrays sono stati analizzati 408 pazienti con MPN e AML secondaria a MPN al fine di individuare le lesioni genetiche più frequentemente associate con queste patologie. Questo studio ha permesso di identificare numerosi geni coinvolti in riarrangiamenti cromosomici in parte non ancora caratterizzati in queste patologie e di associare queste alterazioni ai vari stadi di progressione della malattia (Klampfl T. et al, Blood, 2011). La disomia uniparentale del cromosoma 14q osservata in circa il 2% dei pazienti analizzati costituisce una delle alterazioni cromosomiche più frequenti ed è associata (anche se non in maniera significativa) alla fase accelerata di malattia. La Disomia Uniparentale (UPD) costituisce uno dei più comuni meccanismi di perdita di eterozigosi e amplificazione mutazionale nei tumori, che avviene per errori nel processo di ricombinazione mitotica e può conferire alla cellula un vantaggio proliferativo.

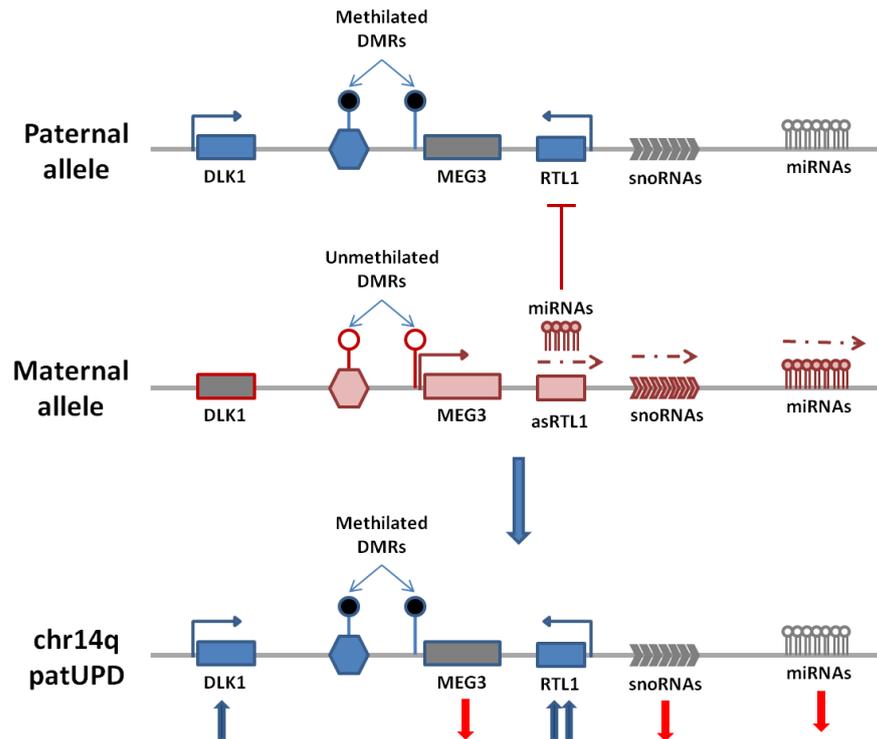
Non sono riportate in letteratura mutazioni in geni compresi in questa regione, in grado di conferire alla cellula tumorale un vantaggio proliferativo. Abbiamo pertanto sequenziato le regioni codificanti di 10 pazienti con UPD del 14q mediante Next Generation Exome Sequencing, per identificare altri geni candidati. L'analisi non ha però identificato alcuna mutazione acquisita a livello somatico nei pazienti in cui è stato possibile ottenere del DNA germinale come confronto. Per i pazienti in cui non è stato possibile ottenere un campione di DNA costitutivo, resta da valutare l'origine della mutazione. È importante notare che la Disomia Uniparentale può portare alla duplicazione di varianti germline con effetto dannoso sulla proteina, che in condizioni normali sono mascherate dall'allele normale, la perdita del quale può manifestare il fenotipo alterato. È quindi importante stimare l'effetto di queste possibili mutazioni sulla proteina e per fare ciò è stata effettuata un'analisi in-silico. Nessuna ricorrenza significativa è stata osservata in questo gruppo di pazienti, il che fa ipotizzare che nessuna di queste alterazioni sia alla base della selezione clonale delle cellule recanti l'

UPD del cromosoma 14, ma che costituiscano piuttosto mutazioni passeggero o più probabilmente polimorfismi non annotati.

La regione minima di LOH comune a tutti i pazienti comprende un locus di geni la cui espressione è regolata da meccanismi di imprinting, che comprende DLK1 e MEG3. L'imprinting è il fenomeno per cui uno dei due alleli di un gene è attivato o inattivato mediante meccanismi epigenetici in dipendenza dal genitore da cui esso è ereditato; nel caso del locus sul cromosoma 14 i geni DLK1 e RTL1 sono espressi esclusivamente dall'allele paterno, mentre l'allele materno esprime tutta una serie di RNA non codificanti tra i quali MEG3, circa 50 miRNA e numerosi snoRNA. Il pattern di metilazione delle citosine a livello di due regioni di controllo (DMR) poste tra i geni DLK1 e MEG3 regola l'espressione dei geni all'interno dei cluster sui due differenti alleli, l'allele paterno risulta essere metilato, l'allele materno non metilato. Alterazioni cromosomiche a livello di regioni soggette ad imprinting sono state descritte ad esempio in alcune patologie ereditarie come la sindrome di Prader-Willi e Angelman, causate entrambe da delezione o UPD della stessa regione sul cromosoma 15, ma il fenotipo clinico della malattia è straordinariamente differente a seconda che sia coinvolto l'allele paterno o materno. Anche delezioni e UPD che coinvolgono il locus DLK1-MEG3 sono state descritte come causa di due differenti sindromi ereditarie con fenotipo che differisce a seconda dell'allele coinvolto. La disomia uniparentale somaticamente acquisita osservata in questa regione può pertanto alterare l'espressione dei geni del cluster eliminando il controllo esercitato dalle due differenti DMR e portare in questo modo un vantaggio clonale alla cellula tumorale. Questo meccanismo acquisisce un significato ancora maggiore se si considera l'importanza della regolazione epigenetica che è emersa negli ultimi anni non solo nel campo ematologico, ma in ambito tumorale in generale. Mutazioni della DNA Metil Transferasi 3 alfa (DNMT3A) sono state osservate nel 20% circa delle AML (Stegelman F. et al, *Leukemia*, 2011), questo enzima è implicato nei processi di metilazione de novo ed è necessario per stabilire i pattern di imprinting a livello germinale (Kaneda M. et al, *Nature*, 2004). La recente scoperta dell'idrossilazione delle citosine come sistema dinamico di modulazione epigenetica da parte delle proteine della famiglia TET mutate in differenti neoplasie (Delhommeau F. et al, *New England Journal of*

Medicine, 2009; Ko M. et al, Nature,2010), costituisce un altro meccanismo coinvolto nei processi di imprinting genomico. Molti studi pubblicati recentemente inoltre riportano varie alterazioni a carico delle proteine del Polycomb Repressive Complex 2 in una frazione di pazienti con MPN e altre patologie (Ernst T et al. Nature Genetics, 2010; Score J. Et al, Blood, 2011). Le modificazioni delle proteine istoniche con funzione attivatoria/inibitoria contribuiscono a definire il complesso pattern di marcatori epigenetici a livello dei loci soggetti ad imprinting, mutazioni delle proteine che intervengono in questo processo possono pertanto interferire con il rimodellamento della cromatina in queste regioni.

Per verificare l'ipotesi di un coinvolgimento selettivo di uno dei due alleli nella regione di LOH, abbiamo utilizzato il pattern di metilazione a livello delle due DMR come marcatore. Sorprendentemente, tutti i pazienti con UPD del cromosoma 14 analizzati, hanno mostrato la perdita selettiva di parte del cromosoma materno e duplicazione del corrispondente frammento paterno, come dimostrato dalla presenza di citosine metilate a livello delle regioni di controllo, su entrambi gli alleli. Il dato molto importante che si evince da questi risultati è che soltanto una delle due possibili configurazioni è in grado di dare un vantaggio alla cellula patologica che va incontro a selezione clonale. I possibili effetti a livello molecolare causati dalla perdita della regione di controllo materna sono deducibili dagli studi effettuati su tessuti embrionali e su modelli animali (da Rocha et al. Trends in Genetics, 2008). La disomia uniparentale paterna del cromosoma 14 porta ad un'alterata espressione dei geni del cluster, in particolar modo i geni codificanti DLK1 e RTL1 risultano essere iperespressi, mentre MEG3 e i cluster di snoRNA e microRNA down regolati (figura 50). Restano da chiarire i meccanismi in grado di conferire alla cellula un vantaggio proliferativo e quali geni sono principalmente implicati.



**Figura 50: Effetto della disomia uniparentale paterna del cromosoma 14q sull'espressione dei geni del cluster DLK1-MEG3.**

Il gene DLK1 codifica per una proteina trans membrana della famiglia Delta-Notch-Serrate che gioca un'importante funzione nel differenziamento embrionale, nel topo l'aumentata espressione di questa proteina nei tessuti embrionali causa gravi difetti nello sviluppo fino alla morte pre-natale in modo dosaggio dipendente (da Rocha S.T. et al, PLoS genetics, 2009). Pochi tessuti mantengono l'espressione di questa proteina nell'organismo adulto e alcuni studi dimostrano una sua funzione nel corso dell'adipogenesi e dell'ematopoiesi (Li L. et al Oncogene, 2005; Lee K. Et al JCI, 2003). In un recente studio inoltre è stato descritto che DLK1 è in grado di regolare la neurogenesi nel cervello adulto agendo sulla cellula staminale neuronale come fattore di nicchia (Ferròn S.R. et al Nature, 2011). Infine, l'iperespressione di DLK1 è stata osservata nelle sindromi mielodisplastiche, nella Mielofibrosi primaria e nelle leucemie acute (Sakajiri S. Leukemia, 2005, Guglielmelli P. et al, Stem Cells, 2007; Khoury H. et al, Blood, 2010). Non sono ancora ben caratterizzati i meccanismi mediante i quali DLK1 agisce, è stata però descritta una sua possibile funzione come ligando non canonico di Notch, con funzione inibitoria; presenta infatti molte analogie con le

proteine di questa famiglia, ma manca del dominio DSL in grado di mediare l'attivazione di Notch (Baladron, Ruiz-Hidalgo et al. 2005). Alterazioni del signaling mediato da Notch dovute a mutazione genica con funzione sia attivatoria che inibitoria sono state descritte in numerosi tumori, pertanto l'interazione con questa pathway potrebbe spiegare il contributo di DLK1 alla trasformazione della cellula tumorale.

E' tuttavia da considerare il fatto che la perdita dell'allele materno possa avere un peso altrettanto importante a livello molecolare in questa lesione. MEG3 è un RNA non codificante della famiglia dei long non-coding RNAs (lncRNA), la cui funzione non è ancora ben definita, la trascrizione di questo RNA sembra sopprimere i geni con espressione paterna presenti sullo stesso cromosoma (da Rocha, Edwards et al. 2008). E' stato però descritto un suo possibile ruolo come oncosoppressore mediato dall'interazione con p53 (Zhou, Zhong et al. 2007).

Il locus DLK1-MEG3 contiene inoltre circa 50 microRNA con espressione materna, il ruolo di queste molecole nella regolazione dell'espressione genica ed il loro coinvolgimento nella patogenesi tumorale è stato ampiamente descritto. E' altamente probabile che tutti i miRNA presenti in questa regione siano trascritti sotto forma di un unico precursore processato successivamente, è quindi ipotizzabile che queste molecole agiscano in concerto regolando molteplici funzioni cellulari. Alterazioni dell'espressione dei microRNA che compongono questo cluster sono state individuate in diversi tumori, la loro iperespressione è stata descritta nelle MDS e in alcune AML con traslocazione t(15;17) (Dixon-Mclver, East et al. 2008; Dostalova Merkerova, Krejcik et al. 2011). Nelle leucemie linfoblastiche acute al contrario è stata riportata una ridotta espressione dei microRNA del cluster dovuta a microdelezioni del cromosoma 14q32 e conseguente up-regolazione del loro gene target BCL11A (Agueli, Cammarata et al. 2010).

La disomia uniparentale del cromosoma con conseguente alterata regolazione dei meccanismi di imprinting che controllano l'attivazione o la repressione dei geni compresi in questa regione costituisce pertanto un'originale esempio di alterazione con significato patogenetico. L'UPD è soltanto uno delle possibili che portano ad alterazione dei geni del cluster DLK1-MEG3, amplificazioni di segmenti cromosomici,

epimutazioni con conseguente riattivazione biallelica ed alterazioni dei geni coinvolti nel rimodellamento della cromatina sono altri meccanismi che possono generare gli stessi effetti. La caratterizzazione dei geni e delle pathways implicate in questa lesione e di quali processi vengono coinvolti può apportare importanti informazioni a livello biologico e terapeutico.

In conclusione questo studio descrive due approcci complementari per la caratterizzazione di microRNA con possibile ruolo patogenetico, in grado di fornire importanti informazioni dal punto di vista biologico e utili strumenti utilizzabili nella pratica clinica. Nell'era della targeted therapy una delle prospettive più interessanti è proprio l'utilizzo dei microRNA come molecole terapeutiche per il trattamento dei tumori. Due aspetti in particolare rendono appetibile l'utilizzo di queste molecole, innanzitutto la loro capacità di agire simultaneamente su target multipli, effetto che costituisce il razionale delle cosiddette "combination therapies" e che potrebbe permettere di aggirare i meccanismi di resistenza e adattamento di una cellula tumorale alla terapia. In secondo luogo molti tumori presentano pattern di espressione di microRNA molto specifici, consentendo di progettare approcci terapeutici altamente mirati. Molti studi effettuati su modelli murini dimostrano come il silenziamento di miRNA oncogenici, così come il ripristino di miRNA oncosoppressori possa avere importanti implicazioni nel trattamento dei tumori.

## Bibliografia:

---

- Agueli, C., G. Cammarata, et al. (2010). "14q32/miRNA clusters loss of heterozygosity in acute lymphoblastic leukemia is associated with up-regulation of BCL11a." Am J Hematol **85**(8): 575-578.
- Antonioni, E., P. Guglielmelli, et al. (2005). "Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia." Leukemia **19**(10): 1847-1849.
- Bacolod, M. D., G. S. Schemmann, et al. (2009). "Emerging paradigms in cancer genetics: some important findings from high-density single nucleotide polymorphism array studies." Cancer Res **69**(3): 723-727.
- Baladron, V., M. J. Ruiz-Hidalgo, et al. (2005). "dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats." Exp Cell Res **303**(2): 343-359.
- Barlow, D. P., R. Stoger, et al. (1991). "The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus." Nature **349**(6304): 84-87.
- Barosi, G. (2003). "Myelofibrosis with myeloid metaplasia." Hematol Oncol Clin North Am **17**(5): 1211-1226.
- Barosi, G., A. Ambrosetti, et al. (1999). "The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia." Br J Haematol **104**(4): 730-737.
- 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.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Bartolomei, M. S., S. Zemel, et al. (1991). "Parental imprinting of the mouse H19 gene." Nature **351**(6322): 153-155.
- 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., F. Delhommeau, et al. (2010). "Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm." Blood **115**(14): 2891-2900.
- Berezikov, E., W. J. Chung, et al. (2007). "Mammalian mirtron genes." Mol Cell **28**(2): 328-336.
- Berezikov, E., E. Cuppen, et al. (2006). "Approaches to microRNA discovery." Nat Genet **38** **Suppl**: S2-7.
- Berlin, N. I. (1975). "Diagnosis and classification of the polycythemia." Semin Hematol **12**(4): 339-351.
- Bianchi, E., R. Zini, et al. (2010). "c-myb supports erythropoiesis through the transactivation of KLF1 and LMO2 expression." Blood **116**(22): e99-110.
- Bonci, D., V. Coppola, et al. (2008). "The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities." Nat Med **14**(11): 1271-1277.
- Bortoluzzi, S., A. Bisognin, et al. (2012). "Characterisation and discovery of novel miRNAs and mRNAs in JAK2V617F mutated SET2 cells." Blood.
- 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., J. J. Stuart, et al. (1985). "The incidence of thrombotic and hemorrhagic disorders in association with extreme thrombocytosis: an analysis of 129 cases." Am J Hematol **20**(4): 365-372.

- 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., L. M. Scott, et al. (2006). "Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders." Methods Mol Med **125**: 253-264.
- Carbuccia, N., A. Murati, et al. (2009). "Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms." Leukemia **23**(11): 2183-2186.
- Cattanach, B. M. and M. Kirk (1985). "Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice." Nature **315**(6019): 496-498.
- 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.
- 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.
- 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.
- Cooper, D. W., J. L. VandeBerg, et al. (1971). "Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation." Nat New Biol **230**(13): 155-157.
- Corcoran, D. L., K. V. Pandit, et al. (2009). "Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data." PLoS One **4**(4): e5279.
- 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.
- Crouse, H. V. (1960). "The Controlling Element in Sex Chromosome Behavior in *Sciara*." Genetics **45**(10): 1429-1443.
- da Rocha, S. T., C. A. Edwards, et al. (2008). "Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain." Trends Genet **24**(6): 306-316.
- DeChiara, T. M., E. J. Robertson, et al. (1991). "Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene." Cell **64**(4): 849-859.
- Delhommeau, F., S. Dupont, et al. (2009). "Mutation in TET2 in myeloid cancers." N Engl J Med **360**(22): 2289-2301.
- Ding, Y., Y. Harada, et al. (2009). "AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms." Blood **114**(25): 5201-5205.
- Dixon-McIver, A., P. East, et al. (2008). "Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia." PLoS One **3**(5): e2141.
- 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.
- Dostalova Merkerova, M., Z. Krejci, et al. (2011). "Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome." Eur J Hum Genet **19**(3): 313-319.
- Engel, E. (1980). "A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy." Am J Med Genet **6**(2): 137-143.
- 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.
- Ferguson-Smith, A. C. (2011). "Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm." Nat Rev Genet **12**(8): 565-575.
- Ferron, S. R., M. Charalambous, et al. (2011). "Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis." Nature **475**(7356): 381-385.
- 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.
- Figueroa, M. E., O. Abdel-Wahab, et al. (2010). "Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation." Cancer Cell **18**(6): 553-567.
- Fontana, L., E. Pelosi, et al. (2007). "MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation." Nat Cell Biol **9**(7): 775-787.
- Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Annalen der Physik **437**(1-2): 55-75.
- Fukao, T., Y. Fukuda, et al. (2007). "An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling." Cell **129**(3): 617-631.
- 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.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, et al. (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." Science **286**(5439): 531-537.
- Griffiths, M., J. Mason, et al. (2005). "Acquired isodisomy for chromosome 13 is common in AML, and associated with FLT3-ITD mutations." Leukemia **19**(12): 2355-2358.
- 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.
- Grundy, P., B. Wilson, et al. (1994). "Uniparental disomy occurs infrequently in Wilms tumor patients." Am J Hum Genet **54**(2): 282-289.
- Guglielmelli, P., F. Biamonte, et al. (2011). "EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis." Blood **118**(19): 5227-5234.
- Guglielmelli, P., L. Tozzi, et al. (2007). "MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients." Exp Hematol **35**(11): 1708-1718.
- Guglielmelli, P., R. Zini, et al. (2007). "Molecular profiling of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis identifies a set of disease-associated genes and reveals the clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1)." Stem Cells **25**(1): 165-173.
- Harutyunyan, A., T. Klampfl, et al. (2011). "p53 lesions in leukemic transformation." N Engl J Med **364**(5): 488-490.
- He, L., J. M. Thomson, et al. (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." Nature **435**(7043): 828-833.
- Henckel, A., K. Nakabayashi, et al. (2009). "Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals." Hum Mol Genet **18**(18): 3375-3383.
- Jager, R., H. Gisslinger, et al. (2010). "Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms." Leukemia **24**(7): 1290-1298.
- James, C., V. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." Nature **434**(7037): 1144-1148.

- Jankowska, A. M., H. Szpurka, et al. (2009). "Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms." *Blood* **113**(25): 6403-6410.
- Johnnidis, J. B., M. H. Harris, et al. (2008). "Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223." *Nature* **451**(7182): 1125-1129.
- Johnson, D. R. (1974). "Hairpin-tail: a case of post-reductional gene action in the mouse egg." *Genetics* **76**(4): 795-805.
- Kaneda, M., M. Okano, et al. (2004). "Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting." *Nature* **429**(6994): 900-903.
- Kaushansky, K. (2005). "On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense." *Blood* **105**(11): 4187-4190.
- Kawahara, Y., B. Zinshteyn, et al. (2007). "Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs." *Science* **315**(5815): 1137-1140.
- Kawamata, N., S. Ogawa, et al. (2008). "Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray." *Exp Hematol* **36**(11): 1471-1479.
- Khoury, H., F. Suarez-Saiz, et al. (2010). "An upstream insulator regulates DLK1 imprinting in AML." *Blood* **115**(11): 2260-2263.
- Klampfl, T., A. Harutyunyan, et al. (2011). "Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression." *Blood* **118**(1): 167-176.
- 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.
- Kroger, N., A. Badbaran, et al. (2007). "Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis." *Blood* **109**(3): 1316-1321.
- Krutzfeldt, J., M. N. Poy, et al. (2006). "Strategies to determine the biological function of microRNAs." *Nat Genet* **38** *Suppl*: S14-19.
- Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, et al. (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." *Nature* **438**(7068): 685-689.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science* **294**(5543): 853-858.
- Lasho, T. L., C. M. Finke, et al. (2011). "SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients." *Leukemia*.
- Lasho, T. L., A. Pardanani, et al. (2010). "LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis." *N Engl J Med* **363**(12): 1189-1190.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., K. Jeon, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *EMBO J* **21**(17): 4663-4670.
- 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, L., S. J. Forman, et al. (2005). "Expression of DLK1 in hematopoietic cells results in inhibition of differentiation and proliferation." *Oncogene* **24**(27): 4472-4476.
- 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, 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.
- Luciano, D. J., H. Mirsky, et al. (2004). "RNA editing of a miRNA precursor." *RNA* **10**(8): 1174-1177.

- Makishima, H. and J. P. Maciejewski (2011). "Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer." *Clin Cancer Res* **17**(12): 3913-3923.
- Makishima, H., V. Visconte, et al. (2012). "Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis." *Blood*.
- Maniataki, E. and Z. Mourelatos (2005). "A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA." *Genes Dev* **19**(24): 2979-2990.
- Manoharan, A. and W. R. Pitney (1984). "Chemotherapy resolves symptoms and reverses marrow fibrosis in myelofibrosis." *Scand J Haematol* **33**(5): 453-459.
- Martinez-Garcia, E. and J. D. Licht (2010). "Deregulation of H3K27 methylation in cancer." *Nat Genet* **42**(2): 100-101.
- Matthews, J. C., A. M. Aslanian, et al. (1997). "An expression system for mammalian amino acid transporters using a stably maintained episomal vector." *Anal Biochem* **254**(2): 208-214.
- McCarthy, D. M. (1985). "Annotation. Fibrosis of the bone marrow: content and causes." *Br J Haematol* **59**(1): 1-7.
- McGrath, J. and D. Solter (1984). "Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes." *Cell* **37**(1): 179-183.
- Meiri, E., A. Levy, et al. (2010). "Discovery of microRNAs and other small RNAs in solid tumors." *Nucleic Acids Res* **38**(18): 6234-6246.
- 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.
- Modan, B. (1965). "An epidemiological study of polycythemia vera." *Blood* **26**(5): 657-667.
- Morin, R. D., N. A. Johnson, et al. (2010). "Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin." *Nat Genet* **42**(2): 181-185.
- Morin, R. D., M. D. O'Connor, et al. (2008). "Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells." *Genome Res* **18**(4): 610-621.
- Mucenski, M. L., K. McLain, et al. (1991). "A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis." *Cell* **65**(4): 677-689.
- Muramatsu, H., H. Makishima, et al. (2010). "Mutations of an E3 ubiquitin ligase c-Cbl but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia." *Blood* **115**(10): 1969-1975.
- 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.
- O'Donnell, K. A., E. A. Wentzel, et al. (2005). "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression." *Nature* **435**(7043): 839-843.
- Ogawa, S., M. Sanada, et al. (2010). "Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms." *Cell Cycle* **9**(6): 1051-1056.
- Oh, S. T., E. F. Simonds, et al. (2010). "Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms." *Blood* **116**(6): 988-992.
- Olcaydu, D., A. Harutyunyan, et al. (2009). "A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms." *Nat Genet* **41**(4): 450-454.
- Ooi, S. K., C. Qiu, et al. (2007). "DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA." *Nature* **448**(7154): 714-717.

- Ota, A., H. Tagawa, et al. (2004). "Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma." *Cancer Res* **64**(9): 3087-3095.
- Papaemmanuil, E., M. Cazzola, et al. (2011). "Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts." *N Engl J Med* **365**(15): 1384-1395.
- 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.
- 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.
- Puda, A., J. D. Milosevic, et al. (2012). "Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies." *Am J Hematol* **87**(3): 245-250.
- Raghunandan, R., M. Ruiz-Hidalgo, et al. (2008). "Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes." *Stem Cells Dev* **17**(3): 495-507.
- Rathinam, C., C. B. Thien, et al. (2010). "Myeloid leukemia development in c-Cbl RING finger mutant mice is dependent on FLT3 signaling." *Cancer Cell* **18**(4): 341-352.
- Raveche, E. S., E. Salerno, et al. (2007). "Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice." *Blood* **109**(12): 5079-5086.
- Raver-Shapira, N., E. Marciano, et al. (2007). "Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis." *Mol Cell* **26**(5): 731-743.
- Rissland, O. S., S. J. Hong, et al. (2011). "MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes." *Mol Cell* **43**(6): 993-1004.
- Ruby, J. G., C. H. Jan, et al. (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." *Nature* **448**(7149): 83-86.
- Saito, Y., G. Liang, et al. (2006). "Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells." *Cancer Cell* **9**(6): 435-443.
- Sakajiri, S., J. O'Kelly, et al. (2005). "Dlk1 in normal and abnormal hematopoiesis." *Leukemia* **19**(8): 1404-1410.
- Sanada, M., T. Suzuki, et al. (2009). "Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms." *Nature* **460**(7257): 904-908.
- Scheuermann, J. C., A. G. de Ayala Alonso, et al. (2010). "Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB." *Nature* **465**(7295): 243-247.
- Score, J., C. Hidalgo-Curtis, et al. (2012). "Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms." *Blood* **119**(5): 1208-1213.
- Scott, L. M., W. Tong, et al. (2007). "JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis." *N Engl J Med* **356**(5): 459-468.
- Seitz, H., N. Youngson, et al. (2003). "Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene." *Nat Genet* **34**(3): 261-262.
- Sevignani, C., G. A. Calin, et al. (2006). "Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression." *Mamm Genome* **17**(3): 189-202.
- Shi, W., D. Hendrix, et al. (2009). "A distinct class of small RNAs arises from pre-miRNA-proximal regions in a simple chordate." *Nat Struct Mol Biol* **16**(2): 183-189.
- Spivak, J. L. (2003). "Diagnosis of the myeloproliferative disorders: resolving phenotypic mimicry." *Semin Hematol* **40**(1 Suppl 1): 1-5.
- Stadtfeld, M., E. Apostolou, et al. (2010). "Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells." *Nature* **465**(7295): 175-181.
- Starczynowski, D. T., F. Kuchenbauer, et al. (2010). "Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype." *Nat Med* **16**(1): 49-58.

- Stein, B. L., D. M. Williams, et al. (2011). "Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocythosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocythosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes." *Haematologica* **96**(10): 1462-1469.
- Szpurka, H., L. P. Gondek, et al. (2009). "UPD1p indicates the presence of MPL W515L mutation in RARS-T, a mechanism analogous to UPD9p and JAK2 V617F mutation." *Leukemia* **23**(3): 610-614.
- 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). "New insights into the pathogenesis and drug treatment of myelofibrosis." *Curr Opin Hematol* **13**(2): 87-92.
- Teofili, L., M. Martini, et al. (2008). "Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases." *Int J Cancer* **123**(7): 1586-1592.
- Testa, U. (2004). "Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis." *Leukemia* **18**(7): 1176-1199.
- Thai, T. H., D. P. Calado, et al. (2007). "Regulation of the germinal center response by microRNA-155." *Science* **316**(5824): 604-608.
- Vannucchi, A. M. (2011). "Management of myelofibrosis." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**: 222-230.
- 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. (2007). "Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia." *Blood* **110**(3): 840-846.
- Vannucchi, A. M., L. Bianchi, et al. (2001). "Accentuated response to phenylhydrazine and erythropoietin in mice genetically impaired for their GATA-1 expression (GATA-1(low) mice)." *Blood* **97**(10): 3040-3050.
- 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.
- Vilaine, M., D. Olcaydu, et al. (2011). "Homologous recombination of wild-type JAK2, a novel early step in the development of myeloproliferative neoplasm." *Blood* **118**(24): 6468-6470.
- 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.
- Walsh, C. S., S. Ogawa, et al. (2008). "Genome-wide loss of heterozygosity and uniparental disomy in BRCA1/2-associated ovarian carcinomas." *Clin Cancer Res* **14**(23): 7645-7651.
- Wang, Y., K. A. Kim, et al. (2006). "Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis." *J Nutr* **136**(12): 2953-2956.
- Wyman, S. K., E. C. Knouf, et al. (2011). "Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity." *Genome Res* **21**(9): 1450-1461.
- Xiao, C., D. P. Calado, et al. (2007). "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb." *Cell* **131**(1): 146-159.
- Xiao, C., L. Srinivasan, et al. (2008). "Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes." *Nat Immunol* **9**(4): 405-414.

- Yamazawa, K., T. Ogata, et al. (2010). "Uniparental disomy and human disease: an overview." Am J Med Genet C Semin Med Genet **154C**(3): 329-334.
- Yi, R., Y. Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.
- Yoshida, K., M. Sanada, et al. (2011). "Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia." Nature **478**(7367): 64-69.
- Zeng, Y. and B. R. Cullen (2005). "Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences." J Biol Chem **280**(30): 27595-27603.
- Zeng, Y., R. Yi, et al. (2005). "Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha." EMBO J **24**(1): 138-148.
- Zermati, Y., C. Garrido, et al. (2001). "Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation." J Exp Med **193**(2): 247-254.
- Zhao, R., S. Xing, et al. (2005). "Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera." J Biol Chem **280**(24): 22788-22792.
- Zhou, Y., Y. Zhong, et al. (2007). "Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA." J Biol Chem **282**(34): 24731-24742.