

INDICE

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI.....	2
RIASSUNTO.....	3
INTRODUZIONE.....	5
• EMOPOIESI NORMALE E MIELODISPLASTICA.....	8
• ALTERAZIONI CROMOSOMICHE.....	14
• ALTERAZIONI EPIGENETICHE.....	19
• ALTERAZIONI DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE.....	22
• ALTERAZIONI DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE E DI CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE.....	28
• MUTAZIONI DI REGOLATORI EPIGENETICI.....	30
MATERIALI E METODI.....	32
SCOPO DELLA RICERCA.....	42
RISULTATI.....	43
DISCUSSIONE.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	64
TABELLE SUPPLEMENTARI.....	76

ELENCO ABBREVIAZIONI

AML: Leucemia Mieloide Acuta

AZA: Azacitidina

BMMC: Cellule mononucleate di Midollo Osseo

CMML: Leucemia Mielomonocitica Cronica

DAC: Decitabina

DNMT: DNA Metil-Transferasi

EPO: Eritropoietina

FAB: Classificazione French American British

G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor

HAT: Istone Acetil Transferasi

HDAC: Istone Deacetilasi

MDS: Sindromi Mielodisplastiche

MFI: Median Fluorescence Intensity

PI-PLC β 1: Fosfolipasi C β 1

RA: Anemia Refrattaria

RAEB-1: Anemia Refrattaria con Eccesso di Blasti-1

RAEB-2: Anemia Refrattaria con Eccesso di Blasti-2

RARS: Anemia Refrattaria con Sideroblasti ad Anello

RCMD: Citopenia Refrattaria con Displasia Multilineare

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

VPA: Acido Valproico

WHO: World Health Organization

RIASSUNTO

Le Sindromi Mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo eterogeneo di disordini ematologici di origine clonale caratterizzati da emopoiesi inefficace e da rischio di trasformazione in leucemia mieloide acuta. Le alterazioni a livello della trasduzione dei segnali che si verificano in corso di mielodisplasia rimangono ancora per la maggior parte da chiarire. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'attivazione proteolitica della caspasi-3 e la fosforilazione di ERK1/2, p38 e di STAT5 sia a livello basale (60 casi MDS e 6 casi di controllo) che dopo stimolazione con G-CSF o Eritropoietina (36 casi MDS e 6 casi di controllo) nelle sottopopolazioni cellulari CD34+, CD45+ e CD71+CD45- mediante tecnica citofluorimetrica. Ci siamo inoltre proposti di elaborare i risultati ottenuti per evincerne eventuali pattern di attivazioni basali caratteristici di una sottopopolazione cellulare o di un sottogruppo WHO come anche eventuali pattern di risposta alle citochine.

Le cellule CD34+ hanno presentato attivazione basale più marcata rispetto alle CD45+ e CD71+CD45-; tuttavia la grande eterogeneità osservata non ha permesso la caratterizzazione di un pattern di attivazione identificativo delle sottopopolazioni cellulari studiate.

La risposta in vitro al G-CSF non ha mostrato differenze significative fra le cellule MDS e quelle di controllo; invece la risposta in vitro ad EPO è risultata essere difettiva nelle cellule MDS rispetto alle normali ed ha correlato in maniera statisticamente significativa con la risposta in vivo ad EPO del paziente.

Questi dati ci sono sembrati molto interessanti poiché tale metodica potrebbe rappresentare un semplice test utile sia per studiare alterazioni in specifiche sottopopolazioni cellulari sia un attendibile test da applicare in studi predittivi.

INTRODUZIONE

Le Sindromi Mielodisplastiche (MDS) sono comunemente definite come patologie ematologiche di origine clonale caratterizzate da ematopoiesi inefficace con displasia cellulare e forte rischio di trasformazione in leucemia mieloide acuta. I pazienti mielodisplastici possono presentare una o più citopenie periferiche in associazione ad un midollo iper o normocellulato, sebbene in alcuni di essi invece sia ipocellulato [1]. L'incidenza delle MDS è di circa 4-5 individui/100000 ogni anno ma aumenta molto con l'età; infatti le MDS sono una delle neoplasie ematologiche più frequenti in persone con età superiore agli 80 anni. Studi epidemiologici hanno rilevato che alcuni fattori di rischio potrebbero essere costituiti da fumo, esposizione a solventi organici, radiazioni ionizzanti, sesso maschile; inoltre, l'esposizione ad agenti citotossici quali agenti alchilanti, inibitori delle topo isomerasi II e trattamento con chemio-radioterapia sembrano associati con l'incremento del rischio di insorgenza di MDS [2].

L'ipotesi più accreditata della patogenesi delle sindromi mielodisplastiche è quella di un processo a tappe, in cui un iniziale danno genetico o epigenetico, spontaneo o indotto da cause iatrogene o ambientali, dà inizio all'emopoiesi mielodisplastica.

Dal punto di vista clinico il decorso delle MDS è molto variabile: accanto a forme ad andamento indolente e con lungo decorso si osservano forme a rapida evoluzione in leucemia acuta mieloide (AML). L'analisi morfologica del midollo e del sangue periferico sono necessarie per

classificare le mielodisplasie. La classificazione attualmente in uso è quella dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). Viene comunque ancora molto utilizzata, soprattutto in Europa, la precedente classificazione French American British (FAB), ideata nel 1982 e basata sulla valutazione morfologica cellulare sia a livello del sangue periferico che midollare. Essa ha avuto il merito di essere stata la prima a dare un inquadramento a queste complesse patologie e di aver elaborato una struttura su cui si è sviluppata l'attuale WHO. Secondo la classificazione FAB le mielodisplasie si suddividono in 5 classi: anemia refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS), anemia refrattaria (RA), anemia refrattaria con eccesso di blasti (RAEB), anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione (RAEB-t), leucemia mielomonocitica cronica (CMML). La classificazione FAB ha però attualmente solo un valore storico, considerate le sue numerose limitazioni (non teneva conto delle anomalie citogenetiche, dell'entità e numero delle citopenie). Con la classificazione WHO, invece, utilizzando le basi della classificazione FAB, sono state introdotte importanti modifiche fra cui l'aggiunta di una nuova categoria (citopenia refrattaria con displasia multilineare,) e la sua rispettiva forma con sideroblasti ad anello (citopenia refrattaria con displasia multilineare con sideroblasti ad anello), la suddivisione della classe RAEB in 2 sottoclassi RAEB-1 e RAEB-2 in base alla percentuale di blasti midollari presenti, la riduzione della percentuale di blasti che stabilisce se si tratti di MDS oppure di AML, l'introduzione di una nuova classe basata sulla presenza di una specifica anomalia citogenetica, la delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (del5q) qualora il midollo presenti una percentuale di blasti inferiore al 5% (sindrome 5q-) e l'eliminazione della

CMML che viene inserita in una categoria intermedia tra le sindromi mielodisplastiche e le sindromi mieloproliferative. Tuttavia, vista la vasta eterogeneità di tali patologie, per poter definire in maniera più specifica la prognosi dei pazienti affetti da MDS, è stato elaborato un sistema, l'International Prognostic Scoring System (IPSS), che prevede l'attribuzione di un punteggio di rischio in base al numero di blasti midollari, al numero di citopenie periferiche e alla presenza di alterazioni citogenetiche. A seconda del punteggio ottenuto i pazienti vengono suddivisi in 4 categorie di rischio: basso, intermedio1 (Int-1), intermedio2 (Int-2) e alto; esse correlano sia con la sopravvivenza libera da malattia sia con la sopravvivenza globale [2]. Inoltre, poiché la trasfusione-dipendenza è stata recentemente identificata come fattore prognostico negativo nelle MDS [3], l'integrazione retrospettiva delle informazioni derivanti dalla classificazione WHO con la valutazione del cariotipo secondo IPSS e del fabbisogno trasfusionale ha recentemente prodotto un nuovo modello prognostico World Health Organization-based Prognostic Scoring System, WPSS. Tale modello ha identificato 5 gruppi di pazienti a rischio molto basso, basso, intermedio, alto e molto alto. Un aspetto importante di questo modello è rappresentato dalla sua applicabilità dinamica nel corso delle diverse fasi di malattia e non soltanto nella valutazione prognostica all'esordio.

EMOPOIESI NORMALE E MIELODISPLASTICA

Emopoiesi normale

L'emopoiesi, che ha sede nel midollo osseo, è un processo dinamico che riflette risposte funzionali integrate a fattori cellulari e umorali di tipo stimolante, facilitante o inibente; richiede costantemente sia la produzione di cellule differenziate sia il mantenimento di cellule primitive ed è assicurato da una piccola popolazione di cellule staminali. Le cellule staminali emopoietiche (CSE) ed i progenitori emopoietici (PE), dal terzo mese della vita intrauterina, sono riconoscibili nel midollo osseo in aree di microambiente stromale delimitate dalle trabecole della spongiosa e costituite dai sinusoidi delimitati da cellule endoteliali privi di membrana basale, dai fibroblasti, dagli adipociti e dai macrofagi [4]. La matrice di supporto per tutte queste cellule è costituita da collagene, proteine di adesione e proteoglicani capaci di legare e concentrare i fattori di crescita. Le integrine sembrano le principali molecole di adesione: VLA-4 e VLA-5 sono responsabili del contatto delle CSE con la fibronectina; inoltre vi sono numerosi dati sperimentali che dimostrano che l'antigene CD34, come anche c-kit e SKI-1 siano fondamentali per la citoadesione [5].

Le cellule staminali emopoietiche sono funzionalmente caratterizzate dalla capacità di auto mantenimento, dalla capacità di ricostruzione linfemopoietica a lungo termine in un ricevente letalmente irradiato, dallo stato di quiescenza per il 90% circa della vita, dalla resistenza a farmaci e dalla capacità di formare colonie in vitro e in vivo di differenziare verso tutte le filiere emopoietiche [6]. Le cellule staminali

sono difficili da caratterizzare morfologicamente; la valutazione in vitro viene effettuata mediante l'impiego di saggi per le colonie di blasti (CFU-BL, HPP-CFU) e con il sistema delle colture a lungo termine (5-8 settimane) identificanti le Long-Term Culture Initiating Cells (LTC-IC) [7].

Le CSE (Cellule Staminali Ematopoietiche) esprimono un marcatore di membrana che ne consente l'identificazione e la separazione in vitro: la glicoproteina transmembrana CD34 espressa dall'1-3% di cellule del midollo osseo normale, dallo 0,01% del sangue periferico e dallo 0,1-0,4% del sangue di cordone ombelicale [8]. L'espressione dell'antigene CD34 si associa sia a quella di altri marcatori immunologici non associati a specifiche filiere differenziative (Thy1, CD38, HLA-DR, CD45RA, CD71, CD133, CD271) sia a marcatori associati alle filiere differenziative T-linfocitaria (TdT, CD10, CD7, CD5, CD2), B-linfocitaria (TdT, CD10, CD19), mieloide (CD33, CD13) e megacariocitaria (CD61, CD41, CD42b). Le cellule CD34+ esprimono anche recettori per i fattori di crescita come l'interleuchina 3 (IL-3), il Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), il Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) e recettori tirosin-chinasici, il recettore per lo Stem Cell Factor (SCF) (CD117) e i recettori STK come l'STK-1, omologo umano del Flt-3 [9].

I fattori di crescita emopoietici (GF), o Colony-Stimulating Factors (CSF), sono una famiglia di glicoproteine essenziali per la regolazione dell'attivazione, proliferazione, differenziazione e sopravvivenza delle cellule emopoietiche; interagiscono sulla base di attività complesse mostrando attività stimolatorie o inibitorie e possono sinergizzare o antagonizzare le azioni di altri fattori, anche sulla base del microambiente e della situazione fisiopatologia [10]. La classificazione dei GF è basata sul

differente stadio ontogenetico delle loro cellule bersaglio e prevede la distinzione dei GF ad azione precoce (SCF, FLT-3 ligand), in grado di stimolare la crescita cellulare in combinazione di altri fattori, intermedia, (GM-CSF, IL-3) attivi su molteplici linee emopoietiche, e tardiva (G-CSF, EPO, trombopoietina, IL-5, M-CSF), che regolano l'emopoiesi a livello di singole filiere e modulano le funzioni a livello degli elementi terminali maturi [11]. I segnali che regolano la produzione di GF sembrano essere in relazione alla necessità di produzione di cellule emopoietiche a livello midollare, alla necessità di attivazione funzionale di cellule mature nei tessuti periferici sedi di infiammazione o stimolazione immunitaria e dalla regolazione dell'apoptosi [10].

La regolazione della cellula staminale ematopoietica dal punto di vista molecolare, ovvero come essa esca dal suo stato quiescente cominciando a proliferare o differenziare, non è ancora del tutto chiara. Sono stati identificati un gruppo di geni responsabili della regolazione trascrizionale delle CSE, e vengono raggruppati sotto il nome di homeobox; sono di fatto geni altamente conservati nelle specie e svolgono un ruolo importante nell'emopoiesi normale e non.

Emopoiesi mielodisplastica

Allo stesso modo di ciò che si verifica nelle altre leucemie, anche nelle MDS si può parlare di emopoiesi mielodisplastica; tuttavia gli eventi molecolari e funzionali coinvolti e responsabili di tale anomalo processo non sono ancora del tutto noti come non è assolutamente chiaro a quale livello maturativo si verifichi l'evento trasformante. Proprio per la complessità della patogenesi delle MDS verranno qui solamente accennati

gli aspetti ritenuti più importanti in tale processo molti dei quali verranno poi ripresi ed approfonditi nei paragrafi successivi.

La trasformazione di una cellula staminale normale in una neoplastica è un processo che richiede il susseguirsi di lesioni cellulari genetiche ed epigenetiche; questo concetto può essere esteso anche all'alterata emopoiesi mielodisplastica, nella quale è stato però dimostrato come il microambiente midollare eserciti un ruolo chiave nella genesi di tale patologia [12].

Dal punto di vista genetico, le MDS sono caratterizzate *alterazioni cromosomiche* quali perdite e traslocazioni cromosomiche, che coinvolgono geni coinvolti nella regolazione emopoietica e nel differenziamento mieloide; sono molto frequenti soprattutto le delezioni e i cromosomi più coinvolti sono, in ordine di frequenza, il 5, 7, 11, 12, 13 e 20. Nelle MDS, è stato dimostrato come le lesioni genetiche siano molto meno frequenti delle *alterazioni epigenetiche*; sembra proprio infatti che esse siano caratterizzate principalmente da silenziamento di geni oncosoppressori, determinato prevalentemente da meccanismi epigenetici quali l'ipermetilazione del DNA a livello dei promotori di geni critici ed in misura minore, da instabilità citogenetica ed instabilità mutazionale [13, 14].

Il quadro che evinciamo dalla letteratura circa l'evolversi della mielodisplasia sembra decisamente complicato e multifattoriale, associato a più eventi anomali che impediscono la normale crescita e maturazione emopoietica. Fra questi, rivestono un ruolo importante le *alterazioni della trasduzione del segnale* che conferiscono un vantaggio in termini di crescita e sopravvivenza a queste cellule attivando effettori a valle di

importanti vie di segnalazione intracellulare (le proteine STAT, PI3K, RAS-MAPK); inoltre rivestono un ruolo importante anche le *alterazioni a carico dei fattori trascrizionali e di controllo del ciclo cellulare*. Si assiste pertanto ad una complessa situazione alterata che si manifesta in displasia cellulare ed incremento dell'apoptosi. Proprio l'elevata apoptosi dei progenitori midollari è una caratteristica ampiamente dimostrata nelle MDS: infatti, mentre nelle LMA si osserva un blocco differenziativo che determina un accumulo di blasti, nelle MDS si assiste ad un difetto differenziativo che induce apoptosi delle cellule displastiche. Quando la mielodisplasia evolve in leucemia si verifica uno sbilanciamento delle vie di trasduzione del segnale verso quelle pro-proliferative. L'incremento dell'apoptosi delle cellule emopoietiche nei pazienti con MDS sembra dovuto all'innescò sia della via recettoriale che di quella mitocondriale. Infatti, insieme all'aumento dell'espressione dei recettori CD95 (FAS), TRAIL e dei loro ligandi, la cui causa potrebbe essere la produzione eccessiva di TNF-alpha da parte di macrofagi, cellule stromali o linfociti-T citotossici [15], è stato osservato anche un incremento nei livelli della caspasi-9 attivata, coinvolta nella via mitocondriale.

Recentemente sono emersi importanti studi che hanno mostrato come le *mutazioni somatiche dei regolatori epigenetici* (fra cui DNMT3A, TET2, IDH1 e IDH2, EZH2) esercitino un ruolo importante nella trasformazione della cellula ematopoietica e come queste mostrino una correlazione significativa con la prognosi di MDS. Inoltre, un notevole interesse rivestono gli studi [16, 17] condotti dal gruppo di Maciejewski che ha mostrato come le alterazioni della regolazione dello splicing, un meccanismo di regolazione trascrizionale fino a questo momento poco

studiato in ambito ematologico, sembrano essere fortemente correlate con la prognosi e la progressione delle MDS. Maciejewski et al. hanno mostrato come le mutazioni a carico del gene SFR3B1, codificante una proteina funzionale del complesso dello spliceosoma, risultino nel 60-80% delle RARS e delle RARS-T e, per la prima volta, che queste siano responsabili della caratteristica struttura dell'accumulo del ferro intracitoplasmatico che si osserva in questo gruppo WHO [18].

Infine, anche il concetto di clonalità nelle MDS merita un accenno benché esse siano definite patologie clonali dell'emopoiesi. La frequente presenza di anomalie cromosomiche non casuali suggerisce fortemente la clonalità della cellula alla base dello sviluppo della mielodisplasia, che potrebbe così essere verosimilmente una cellula staminale pluripotente. Questa considerazione è alquanto controversa, visto che numerosi lavori mostrano risultati in parte contrastanti riguardo all'evoluzione diretta della patologia verso leucemie di altro tipo, e non mettono del tutto in chiaro quale sia il reale rango della cellula responsabile dello sviluppo e del mantenimento della malattia nel tempo [19, 20, 21]. Alcuni lavori hanno mostrato, mediante analisi FISH, un coinvolgimento clonale di linfociti B ma non T [22]; altri ancora [23] hanno messo in evidenza una riduzione del funzionamento delle cellule NK in corso di mielodisplasia. Da questi risultati, si evince che la clonalità delle MDS è un fenomeno altamente complesso da definire, che sembra coinvolgere cellule staminali pluripotenti di vario livello, e pertanto il numero di linee ematopoietiche coinvolte dalla displasia potrebbe essere variabile da caso a caso di MDS, incrementando ulteriormente l'eterogeneità clinica caratteristica della malattia. Inoltre, l'evoluzione della patologia può essere caratterizzata

dall'incremento progressivo di mutazioni a diversi stadi maturativi del progenitore ematopoietico, dando così luogo a diverse forme cliniche e biologiche di sindrome mielodisplastica [15].

ALTERAZIONI CROMOSOMICHE NELLE MDS

Le MDS presentano in circa la metà dei casi anomalie cromosomiche ma, a differenza delle AML, non identificano sottotipi clinici specifici. Traslocazioni come t(15;17), t(8;21), e t(16;16) sono tipiche delle AML mentre aberrazioni quali inv(3), del(5q) e/o del(5), del (7q) e/o del(7) sono state riscontrate sia in MDS che in AML. I casi di MDS che presentano queste anomalie frequentemente progrediscono in AML in un periodo di tempo relativamente breve [1].

Nelle MDS vi è predominanza di delezioni cromosomiche rispetto alle leucemie "de novo" che sono caratterizzate prevalentemente da traslocazioni reciproche bilanciate [24].

Delezione 5q-

La presenza isolata di questa anomalia cromosomica è associata nel 10% dei casi a un'entità clinica definita nella classificazione WHO come Sindrome 5q-, qualora si presenti in associazione con una percentuale di blasti midollari inferiore al 5%. L'analisi citogenetica e quella FISH dimostrano la delezione interstiziale del cromosoma 5 del(5) (q13q33). L'analisi molecolare ha consentito di identificare i geni che mappano sulla regione deleta, nella quale ne sono localizzati alcuni che codificano recettori e fattori di crescita emopoietica, fra cui IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IRF1

(Interferon Regulator Factor) ed EGR-1 (Early Growth Factor) [25]. Un recente lavoro, che ha avuto una grande eco nel mondo scientifico, ha dimostrato che l'aploinsufficienza della proteina ribosomale S14 (RPS14), una componente della subunità 40S del ribosoma, (il cui gene è localizzato nella regione deleta del cromosoma 5), determina il fenotipo della sindrome 5q-, caratterizzato da differenziamento eritroide difettivo e megacariopoiesi normale. Poiché l'alterazione della subunità 40S dei ribosomi potrebbe coinvolgere l'espressione di una grande varietà di geni, è improbabile che la sola aberrazione di RPS14 sia responsabile di questa sindrome [26].

Monosomia 7 e delezione 7q

La seconda tipologia di anomalie cromosomiche in ordine di frequenza, dopo quelle che coinvolgono il braccio lungo del cromosoma 5 (52.3%), è rappresentata dalle alterazioni del cromosoma 7, 7q- e del7q (21%). Queste alterazioni sono associate ad una cattiva prognosi. I geni responsabili di questo andamento tuttavia, non sono ancora stati identificati. Alcuni di questi, che si trovano nel tratto deletato, sono OSBPL3 e STARD3NL entrambi coinvolti nel metabolismo lipidico; inoltre, sul cromosoma 7 vi si trovano anche i geni homeobox della famiglia HOXA, che codificano fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento e nel commissionamento della cellula staminale ematopoietica. Fra questi, HOXA9, localizzato sulla banda 7q36, sembra essere associato ad una prognosi infausta di MDS [1].

Delezione 20q-

La delezione cromosomica 20q- è un'anomalia ricorrente nelle sindromi mieloproliferative e si osserva in circa il 7% dei pazienti con MDS. La presenza della del(20q) è associata ad una prognosi favorevole. Molti sforzi sono stati fatti per identificare la regione generalmente deleta del cromosoma 20. Uno dei geni ivi localizzato (20q11.2), E2F1, codifica un fattore di trascrizione coinvolto nel controllo del ciclo cellulare, nella regolazione della proliferazione e nel controllo dell'apoptosi p53 mediata. Un gruppo di ricercatori ha inaspettatamente osservato un incremento nei livelli di E2F1 nelle cellule mononucleate provenienti da midollo di pazienti mielodisplastici rispetto ai controlli sani; inoltre, elevati livelli di E2F1 sono risultati associati ad un aumento dell'espressione della ciclina D1, coinvolta nella progressione del ciclo cellulare [1].

Trisomia 8

L'incidenza della +8 è di circa il 10% e non è correlata né ai diversi citotipi, né all'età o al sesso. Non sembra associata ad esposizione ad agenti tossici e/o radiazioni.

Sindrome 17p-

La perdita del braccio corto del cromosoma 17 è stata riportata nel 5% delle MDS de novo. Questa perdita può derivare non solo da una semplice delezione, ma anche da traslocazioni bilanciate, riarrangiamenti dicentrici o meno frequentemente dalla monosomia del cromosoma 17. Clinicamente, la malattia è aggressiva con resistenza al trattamento.

Delezione del cromosoma Y

Il significato clinico-biologico della perdita del cromosoma Y non è noto; pur non rivestendo un significato diagnostico nelle MDS, l'incidenza è circa il 7% e conferisce secondo l'IPSS, quando presente come unica anomalia, un significato prognostico favorevole.

Traslocazioni 11q23

L'anomalia della 11q23, osservata in circa il 5% dei casi con MDS, si associa spesso ad un cariotipo complesso o a -7/del(7q), sia nelle forme de novo sia nelle forme secondarie [27]. Le più comuni traslocazioni sono la t(9;11) (p22;q23), la t(11;19) (q23;p13.1) e la t(11;16) (q23;q13.3). In particolare, la t(11;16) (q23;p13.1) si osserva soprattutto nelle forme di mielodisplasia secondarie; l'analisi molecolare ha dimostrato che il gene MLL (q23) (Mixed Lineage Leukemia) forma un gene ibrido di fusione con il gene CBP (CREB Binding Protein) del cromosoma 16. Entrambi questi geni sono coinvolti nella regolazione dei meccanismi di trascrizione cellulare.

Traslocazioni 3q

La t(3;21) (q26;q22.1) si osserva nelle MDS secondarie ma si riscontra anche nella leucemia mieloide cronica in crisi blastica e nelle AML. Sono stati identificati i geni coinvolti in tale traslocazione; in particolare l'EAP (Epstein-Barr Small RNAs associated protein), che è sito sul braccio lungo del cromosoma 3 (q26.2) e forma un gene di fusione con RUNX1 (Runt Related Transcription Factor) che mappa sul cromosoma 21 (q22.1) [28].

Altri autori hanno dimostrato che sulla regione q26 del cromosoma 3 sono situati i geni MDS1/EVI1 e EVI1 (Ectopic Virus Insertion site) che codificano fattori trascrizionali che regolano la differenziazione cellulare [29].

Cariotipo complesso

La maggior parte dei casi con cariotipo complesso, cioè con 3 o più alterazioni cromosomiche, è riscontrabile nel 15-20% delle MDS de novo e nel 90% delle forme secondarie. La presenza di cariotipi complessi si riscontra prevalentemente nel sottogruppo RAEB, comporta una breve sopravvivenza e una rapida progressione in AML.

ALTERAZIONI EPIGENETICHE

Le modificazioni epigenetiche sono eventi potenzialmente reversibili che determinano riarrangiamenti cromatinici trasmissibili da una cellula alla sua progenie; esse modulano ed alterano l'espressione genica senza mutare la sequenza del DNA. Sono costituite da: metilazione del DNA, acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione ed espressione di siRNA.

Metilazione del DNA

E' un meccanismo fondamentale nella differenziazione cellulare, nei fenomeni di imprinting, nell'embriogenesi, nell'inattivazione del cromosoma X ma anche nella patogenesi dei tumori.

L'ipermetilazione delle isole CpG, tratti ripetitivi di citosina e guanina localizzati generalmente in corrispondenza dei promotori di alcuni geni e catalizzata dagli enzimi DNA metiltransferasi (DNMT), determina il superavvolgimento del DNA intorno agli istoni e dunque una conformazione "chiusa" della cromatina. Essa risulta associata a silenziamento genico, che si verifica frequentemente a carico di geni oncosoppressori coinvolti nel DNA-repair, nel controllo del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella detossificazione [30].

L'ipermetilazione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e nell'apoptosi è una caratteristica particolarmente riscontrata nelle MDS ad alto rischio. Importanti geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, quali p15 e p16, sono raramente mutati o deleti ma p15 è spesso silenziato a causa dell'anormale metilazione a livello del suo promotore e molti studi

indicano che il 50% dei pazienti con MDS mostrano questa alterazione [31]. Altri geni frequentemente ipermetilati nelle MDS sono E-caderina (CDH1), il recettore estrogenico (ER), la Death-associated protein kinase (DAP Kinasi); un dato interessante è che l'ipermetilazione incrementa con il progredire della malattia. A differenza delle aberrazioni genetiche, il silenziamento genico causato dalla metilazione aberrante del DNA è un processo reversibile; l'introduzione di agenti demetilanti quali 5-Azacitidina (AZA) e 5-aza-2'-deossicitidina (DAC), stanno dando risultati incoraggianti, particolarmente nel trattamento delle MDS ad alto rischio [32].

Acetilazione istonica

L'acetilazione e la deacetilazione degli istoni giocano un ruolo fondamentale nel processo di trascrizione. L'acetilazione istonica, catalizzata dall'enzima HAT, determina una destabilizzazione delle interazioni istoni-DNA che porta all'apertura della struttura del nucleosoma e dunque permette la trascrizione. L'azione opposta alle HAT è invece esercitata dalle istone deacetilasi (HDAC) che rimuovono i gruppi acetili dai residui aminoacidici degli istoni rendendo la cromatina più compatta ed impedendo dunque l'accesso dei fattori di trascrizione ai promotori sul DNA (Figura 1).

L'acido valproico (VPA), noto inibitore degli HDAC, è stato mostrato determinare una risposta ematologica nel 40% dei pazienti con mielodisplasia a basso rischio [33]. Poiché la metilazione del DNA e l'acetilazione istonica sono due eventi strettamente correlati, ci sono evidenze che l'uso combinato del VPA con agenti demetilanti eserciti un

effetto addizionale negli stadi più avanzati di mielodisplasia e nelle AML [34].

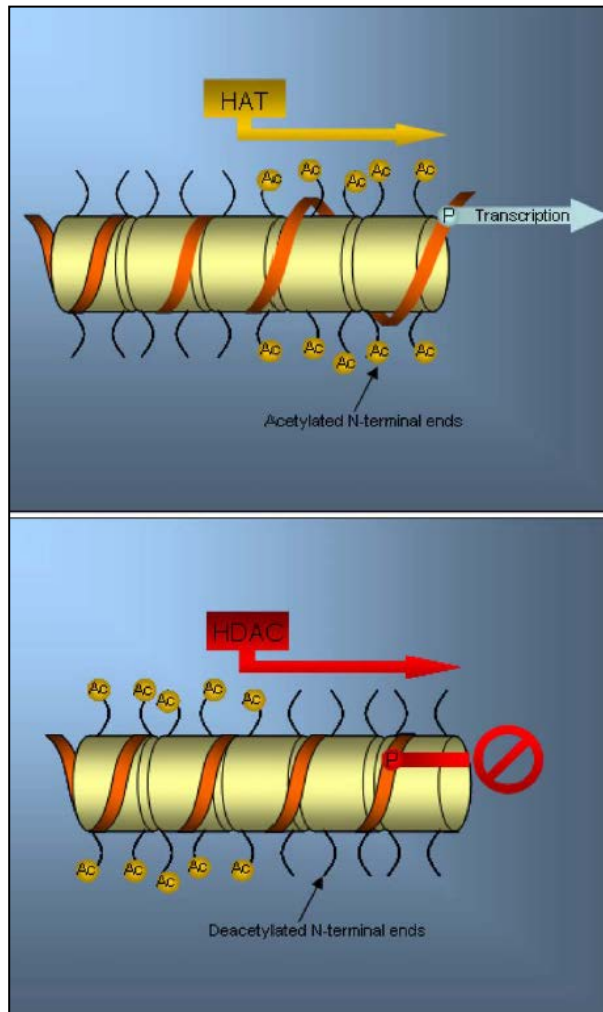


Figura 1. Acetilazione e deacetilazione degli istoni.

ALTERAZIONI DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

RAS ed ERK1/2

La famiglia dei geni RAS è costituita da H-, N-, e K-RAS; essi esercitano un importante ruolo nella proliferazione e nel differenziamento ma sono anche coinvolti nella trasformazione cellulare. Brevemente, le proteine RAS hanno attività di binding del GTP e la capacità di idrolizzarlo. RAS/GDP è la forma inattiva ed è convertita in quella attiva (RAS/GTP) da un fattore di scambio (GEP) dopo il legame di specifici ligandi ai recettori ad attività tirosin-chinasica. RAS/GTP è convertito poi nella forma RAS/GDP grazie all'azione di GTPasi (GAP). RAS attivo è coinvolto in numerose vie di segnalazione intracellulari; fra queste, una delle più note è quella delle MAPK (Figura 2).

Le MAPK sono una famiglia di enzimi conservati nell'evoluzione comprendenti ERK1/2, p38, JNK ed ERK5 [35] e costituiscono un sistema di trasmissione di segnali innescati da stimoli di varia natura, extracellulari (fattori di crescita, citochine, stress meccanico) o intracellulari (ROS), coinvolti in molte funzioni, tra le quali la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi [36]. Le MAPK svolgono un ruolo determinante nel controllo della regolazione dell'espressione genica e raggruppano varie vie di segnalazione tra loro indipendenti, ciascuna delle quali è tipicamente costituita da tre fosfo-chinasi che agiscono in sequenza e che includono una MAPK, cioè l'enzima terminale della singola via, un attivatore di MAPK (MAPK-chinasi o MEK o MKK) e un attivatore di MEK (MEK-chinasi o MEKK o MKKK) (Figura 3). La

trasmissione dei segnali avviene a seguito della fosforilazione e della conseguente attivazione sequenziale di questi componenti.

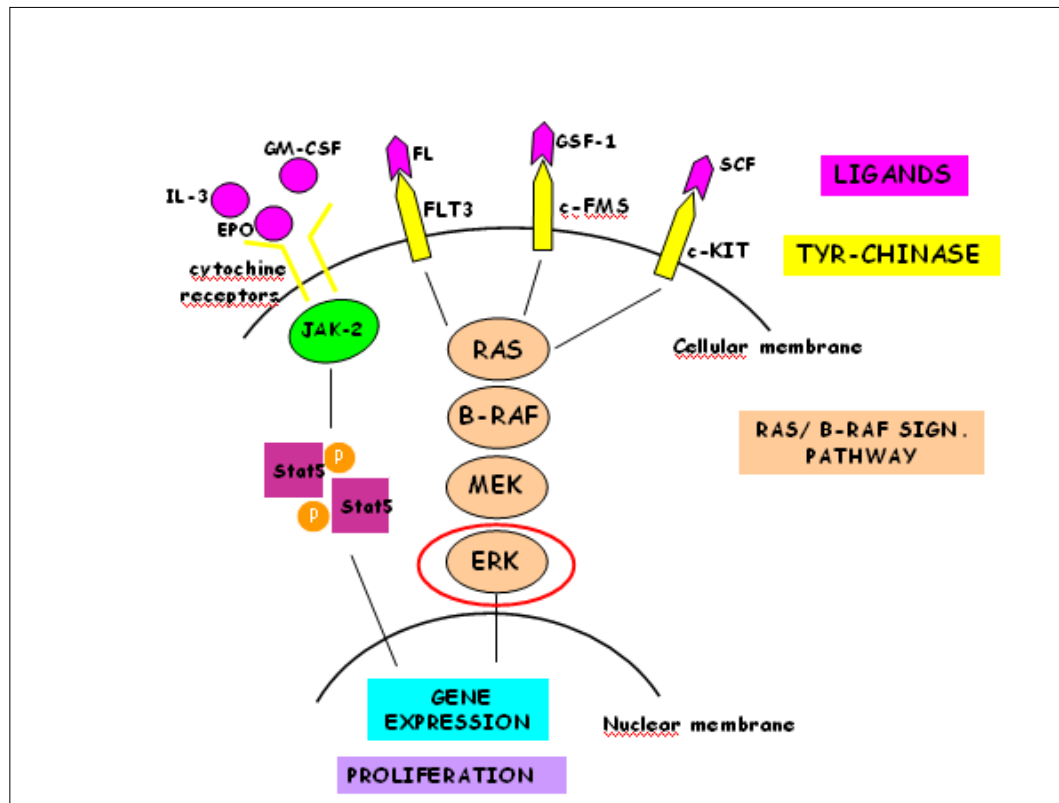


Figura 2. Pathway di attivazione di RAS ed ERK1/2.

Le mutazioni di RAS vengono riscontrate nel 10-15% di queste patologie. La più frequentemente mutata risulta essere N-RAS con mutazioni puntiformi a carico dei codoni 12, 13 o 61 che determinano un'attivazione costitutiva della proteina; esse sono associate ad una prognosi sfavorevole [1].

Per quanto riguarda l'attivazione di ERK1/2 nelle MDS pochi dati sono attualmente disponibili; un lavoro ormai datato ha dimostrato come l'alterata attivazione di ERK1/2 e di STAT5 contribuisca alla

trasformazione dal fenotipo mielodisplastico a quello di leucemia acuta [37]. Un più recente studio ha pubblicato dati interessanti che mostrano mediante tecnica citofluorimetrica come la fosforilazione di ERK1/2 sia significativamente inferiore nelle cellule CD71+CD45-GPA- che derivano da pazienti che non rispondono ad EPO rispetto a quelle di pazienti che rispondono ad EPO ed ai controlli normali [38].

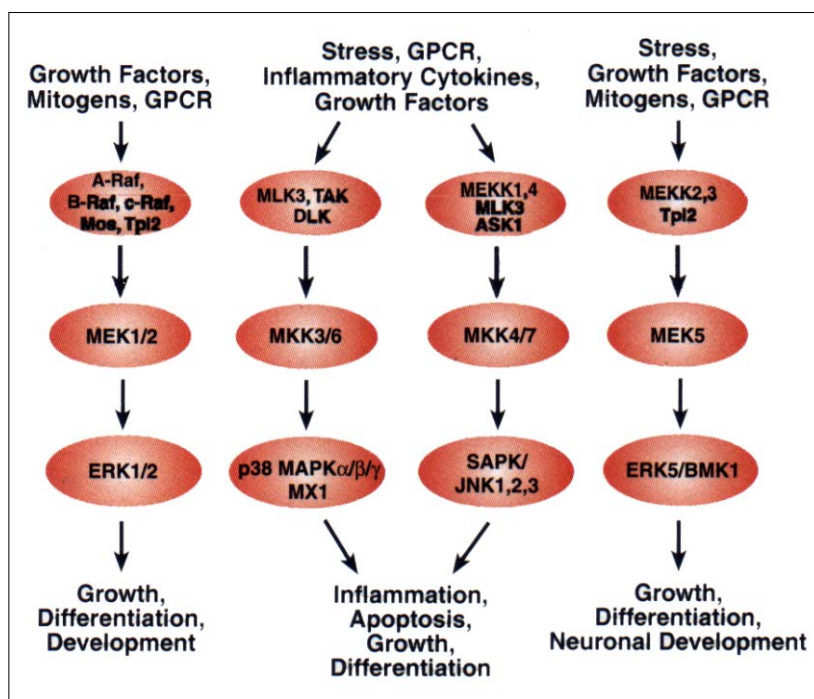


Figura 3. Il sistema delle MAPK.

p38

La MAPK p38 è una serino/treonino-chinasi, originariamente scoperta come una chinasi attivata da stress che è stato successivamente mostrato essere coinvolta nel controllo del ciclo cellulare e nella regolazione dell'apoptosi. Citochine mielosoppressive come gli interferoni (IFN- α , - β ,

e $-\gamma$) TGF β , e TNF α possono attivare p38 nei progenitori ematopoietici [39].

Un gruppo di ricercatori americani ha osservato un'attivazione costitutiva di p38 in blasti midollari di pazienti affetti da mielodisplasia che è risultata uniforme in vari sottotipi morfologici di MDS a basso rischio. Inoltre ha valutato gli effetti di un nuovo inibitore dell'isoforma alpha di p38, SCIO-469, che ha determinato un decremento dell'apoptosi in cellule CD34+ e un incremento dose dipendente della formazione delle colonie eritroidi e mieloidi [40].

JAK2 e STAT5

L'importanza delle tirosin-chinasi Janus nella regolazione dell'espressione genica citochino-dipendente è ormai accertata.

Brevemente, l'attivazione delle chinasi JAK avviene dopo il legame di ligandi citochinici agli specifici recettori e determina la creazione di siti specifici di legame per le proteine STAT. Queste ultime, dopo essere state attivate per fosforilazione JAK-dipendente, dimerizzano e migrano nel nucleo dove esercitano la loro azione di transattivatori trascrizionali (Figura 4). Nella famiglia delle chinasi JAK, JAK2 ha recentemente suscitato particolare interesse poiché esercita un ruolo cruciale nella patogenesi delle sindromi mieloproliferative. Infatti, vari gruppi di ricerca hanno identificato la mutazione V617F, ovvero la sostituzione della valina in posizione 617 con una fenilalanina. Come risultato di questa mutazione le cellule mostrano una maggiore sensibilità alle citochine dovuta all'attivazione costitutiva di JAK2. Questa mutazione non è frequente nelle MDS e compare solo nel 5% dei casi [1].

STAT3 e STAT5 sono le principali proteine STAT ad essere attivate via JAK nei progenitori ematopoietici in risposta ad alcune citochine quali IL-3, GM-CSF, Eritropoietina (EPO). Un importante lavoro ha mostrato come EPO non attivi STAT5 in cellule CD71+ di pazienti affetti da MDS sebbene in queste stesse cellule STAT5 sia attivato da IL-3 [41]; d'altra parte è stato anche osservato come EPO attivi STAT5 in cellule di midollo normale ed in alcuni casi di MDS studiati senza alcuna correlazione fra i suoi livelli di attivazione e la formazione delle colonie eritroidi da esse derivanti. Infatti, la proliferazione deficitaria dei progenitori eritroidi sembra essere correlata ad una incrementata apoptosi nelle cellule Glicoforina A+ [42, 43]. Inoltre, dati ottenuti mediante macro-arrays da un'analisi del pattern di espressione di cellule di midollo Glicoforina A+ di 5 pazienti mielodisplastici che rispondono ad EPO (ERs) e 5 che non rispondono (ENRs) hanno mostrato che geni coinvolti in proliferazione/differenziazione e riparazione/stabilità del DNA sono differenzialmente espressi nei due gruppi di pazienti ma nessuno di questi è strettamente implicato nel differenziamento eritroide [44].

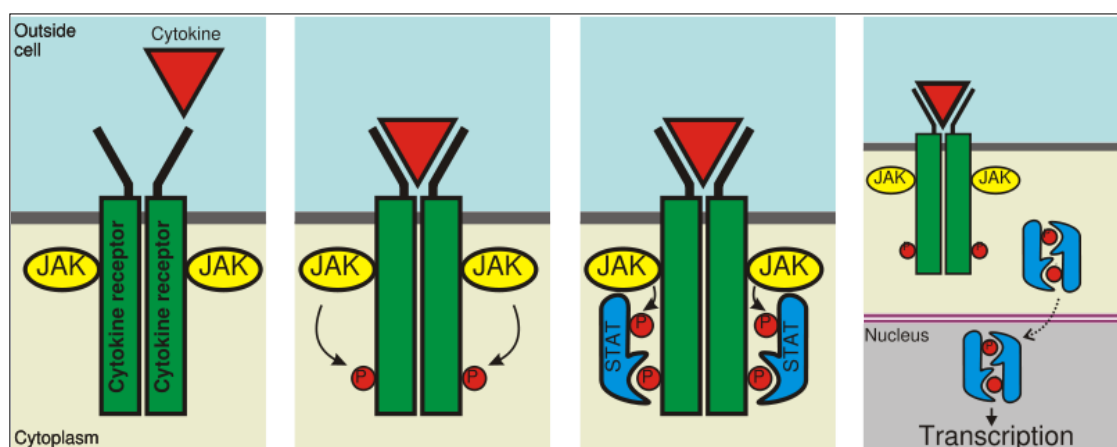


Figura 4. Attivazione del sistema JAK-STAT.

RECETTORE DELL'EPO

Una delle domande più importanti sulla possibile causa dell'attivazione difettiva di STAT5 in risposta all'EPO nelle cellule MDS [41] riguarda la struttura stessa del recettore. Esso risulta espresso a densità normale nelle cellule MDS anche se sono stati ipotizzati difetti della struttura intracellulare; tuttavia essi non sono stati mai specificamente dimostrati [45, 46].

FLT3

Il gene FLT3 codifica un recettore tirosin chinasi che è coinvolto nella proliferazione, differenziazione ed apoptosi nelle cellule ematopoietiche [24]. La mutazione più frequente del gene FLT3 è rappresentata dalla duplicazione in tandem del dominio iuxtamembranario e dalla mutazione puntiforme nel dominio chinasi che determina un'attivazione ligando-indipendente del recettore.

Le mutazioni del gene FLT3 sono meno comuni nelle MDS rispetto alle AML (5% rispetto al 25-30%) e sembrano esercitare un ruolo importante nella progressione in AML [1].

PI-PLC β 1

Le alterazioni a livello maturativo, tipiche delle MDS, sono determinate indubbiamente da più fattori; in questo senso, interessanti sono i lavori del gruppo di Follo Yung et al. [47, 48] che hanno dimostrato come anche il signaling lipidico eserciti un ruolo importante nella regolazione ematopoietica, in particolare nella progressione mielodisplastica verso la

leucemia acuta. Essi, infatti, hanno individuato una stretta correlazione tra la riduzione di espressione della PI-PLC β 1 e la risposta ematologica al trattamento con AZA [49], e come questa sembri in stretta relazione con i livelli di metilazione del promotore del gene.

ALTERAZIONI DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE E DI CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE

p53

p53 è un gene oncosoppressore che si trova a livello del braccio corto del cromosoma 17 e la cui alterazione si manifesta in vari tipi di tumori maligni [24]. Nelle mielodisplasie l'inattivazione di p53 è presente nel 5-10% dei casi, soprattutto negli stadi clinicamente avanzati ed in quelli con cariotipo instabile, indicando che la sua mutazione è importante nella progressione leucemica; le mutazioni di p53 infatti, determinano la sua impossibilità di legarsi al DNA e di transattivare geni target fra cui la p21, coinvolta nella progressione del ciclo cellulare [1].

AML1

Il gene umano AML1, localizzato nel cromosoma 21q22, codifica una delle due subunità che formano il fattore di trascrizione eterodimerico CBF. AML1 è normalmente espresso in tutte le linee emopoietiche e regola l'espressione di vari geni coinvolti nell'ematopoiesi fra cui IL-3, CSF2 e CD4 giocando un ruolo particolare nel differenziamento mieloide. Le

mutazioni di AML1 compaiono in circa il 25% dei casi di AML (soprattutto nel fenotipo M0) e sono frequenti anche nelle MDS con eccesso di blasti. La sola perdita di funzione di AML1 dovuta alla sua mutazione è stato dimostrato non essere sufficiente ad indurre il fenotipo MDS/AML ma sembra essere necessaria un'altra alterazione epigenetica (metilazione o deacetilazione istonica) [1].

EVI1

Il gene EVI1 è localizzato sul cromosoma 3q26.2 e codifica una proteina nucleare che contiene 10 motivi zinc-finger. Esiste in 2 forme: EVI1 e MDS/EVI1, entrambi scarsamente espressi nelle cellule ematopoietiche. La loro inappropriata espressione sembra coinvolta nello sviluppo e nel progredire dei disordini mieloidi, sia in AML che in MDS e potrebbe dipendere da riarrangiamenti quali inversioni e traslocazioni a carico della banda 3q26 sebbene alcuni dati riportino la frequente espressione di EVI1 in MDS senza alterazioni del 3q26, suggerendo così una possibile up-regolazione della sua espressione per meccanismi non ancora noti [50]. Nei pazienti mielodisplastici l'espressione di EVI1 è un fattore prognostico negativo ed è associato ad anemia non responsiva ad EPO [51].

MUTAZIONI DI REGOLATORI EPIGENETICI

DNMT3A

La DNA Metil Transferasi 3A è una delle proteine con attività enzimatica che aggiunge un gruppo metile alle citosine dei dinucleotidi CpG nel DNA. Nel 2010, il gruppo di Ley e colleghi identificarono per la prima volta una mutazione somatica della DNMT3A in adulti affetti da AML con citogenetica normale mediante sequenziamento genico; tale mutazione era presente nel 22% dei casi studiati ed era associata ad un aumento del rischio di ricaduta di malattia [52]. Successivamente sono state osservate mutazioni di DNMT3A anche in pazienti affetti da MDS con una frequenza dell'8%; soltanto uno studio tuttavia per il momento ne ha dimostrato una correlazione con la prognosi avversa [53].

TET2

Le proteine TET sono degli enzimi che catalizzano la conversione della 5metil-citosina (5-mC) in 5 idrossi-metil-citosina nel DNA (5-hmC), un evento intermedio nella de-metilazione del DNA [54]. Studi condotti su cellule staminali embrionali hanno dimostrato un aumento delle 5-hm-C nei dinucleotidi CpG localizzati vicino ai siti di inizio della trascrizione nelle regioni intrageniche e come questi siano associati con un incremento dell'attività trascrizionale [55].

Le mutazioni di TET2 sono state osservate nelle MDS con una frequenza del 20-25%; tuttavia i diversi lavori pubblicati non riescono per il

momento a dimostrare una chiara ed univoca rilevanza prognostica di tale mutazione in queste patologie [56, 57, 58].

IDH1 e IDH2

IDH1 e 2 sono enzimi che catalizzano uno step essenziale del ciclo di Krebs che converte l'isocitrato in α -chetoglutarato. IDH1 agisce nel citoplasma e nei perossisomi mentre IDH2 nei mitocondri. Mutanti di IDH1 e 2 producono 2 idrossi-glutarato che ha attività inibitoria su TET2. [59, 60]. Nelle MDS tali mutazioni presentano una frequenza del 3.5% ed al momento non rivestono un chiaro ruolo prognostico in queste patologie [57].

EZH2

EZH2 è una proteina del Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) che a sua volta fa parte del gruppo delle proteine del *Polycomb*; catalizza la metilazione della lisina 27 dell'istone H3 che è associata a repressione trascrizionale. Studi recenti hanno identificato mutazioni somatiche di EZH2 nel 6% dei pazienti con MDS [61]. Questo gene mappa nel cromosoma 7q36 e potrebbe essere uno dei geni responsabili della cattiva prognosi delle MDS con delezione del cromosoma 7. Le mutazioni di EZH2 sono state trovate anche in MPN ed in CMML come anche in linfomi ed altri tumori solidi [62, 63]; tuttavia, diversamente dalle altre neoplasie maligne, le mutazioni di EZH2 in pazienti mielodisplastici sono principalmente frameship/nonsense, suggerendo così che la perdita di funzione di EZH2 contribuisca alla patogenesi delle MDS.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Abbiamo utilizzato cellule primarie ottenute da prelievo di sangue midollare di 60 pazienti affetti da MDS diagnosticata presso l'Unità Funzionale di Ematologia dell'AOU Careggi, Università di Firenze, Italia, previo consenso informato. Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riportate in Tabella 1. La diagnosi di MDS è stata effettuata in accordo con i criteri WHO; inoltre, nel nostro studio, sono stati inclusi anche 3 casi di CMML e 2 casi di CMML-2 diagnosticate secondo la classificazione FAB ed anche 6 donatori. Le analisi sono state effettuate al momento della diagnosi. Le cellule di midollo venivano coltivate e processate per l'analisi del cariotipo dopo 24 ore mediante bandeggio G (GTG-banding) ed i cariotipi descritti in accordo con l'International System for Human Cytogenetic Nomenclature [64]. I livelli endogeni di EPO nel siero venivano diagnosticati alla diagnosi mediante un metodo chemiluminescente (Immulate 2000 EPO; Siemens Healthcare Diagnostics Inc).

	IPSS LOW	IPSS INT-1	IPSS INT-2	IPSS HIGH
No of patients	31	17	10	2
Median age	73	75	68.5	66.5
Gender M; F	16; 15	12; 5	7; 3	2; 0
WHO				
RA; RARS	20; 1	7; 1	0; 0	0; 0
RCMD; 5q-	6; 1	6; 0	0; 0	0; 0
RAEB-1; RAEB-2	0; 0	2; 0	5; 4	0; 1
MDS/MPL	1	0	0	0
FAB				
CMML; CMML-2	2; 0	1; 0	0; 1	0; 1
KARYOTYPE				
Normal	30	13	4	0
-7q; -5q	0	0	1	0
-5q	1	0	0	0
-11q	0	0	1	0
t(9;21)	0	0	0	1
8	0	3	1	0
COMPLEX	0	1	3	1

Tabella 1. Principali caratteristiche dei pazienti.

Abbreviazioni: RA, anemia refrattaria; RARS, RA con sideroblasti ad anello; RAEB-1, RA con eccesso di blasti-1; RAEB-2, RA con eccesso di blasti-2; RCMD, citopenia refrattaria con displasia multilineare; CMML-1, leucemia mielomonocitica cronica-1; CMML-2, leucemia mielomonocitica cronica-2; MPL/MDS, disordini mieloproliferativi/sindromi mielodisplastiche; N, controlli normali.

Cellule

Le cellule mononucleate (BMNC) venivano ricavate mediante separazione in gradiente di densità discontinuo di Ficoll sodio metrizoato (Lympholyte-H; Cedarlane Laboratories) e mantenute in terreno RPMI 1640 (EuroClone) con aggiunta di 1% di penicillina/streptomomicina (EuroClone), 1% di L-Glutammmina (EuroClone) e 10% di Siero Fetale Bovino (EuroClone) a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Le cellule Kasumi-1, una linea cellulare AML1/ETO positiva derivante da AML umana [65], venivano coltivate nello stesso modo. La vitalità cellulare veniva valutata mediante Trypan Blue Solution (0,4%) (Sigma).

Stimolazione in vitro

Le cellule mononucleate MDS e dei donatori come anche le cellule Kasumi-1 venivano risospese in RPMI 1640 addizionato del 5% di FBS e stimulate dopo un tempo di incubazione a 37°C di circa 30min con G-CSF ricombinante umano (100 ng/ml per 10 min), EPO (100 U/ml per 15 min) o 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; 400nM per 10 min) a 37°C (Sigma-Aldrich). I tempi di stimolazione sono stati scelti dopo esperimenti di time-course precedentemente effettuati nel nostro laboratorio (dati non mostrati).

Lisi delle cellule

Le cellule venivano lavate 2 volte con PBS preraffreddato a 4°C contenente Na₃VO₄ 100 µM, lisate in tampone di Laemmli, contenente Tris-HCl (pH 6.8), 62.5 mM, glicerolo 10%, blu bromofenolo 0.005 % p/v, sodio-dodecil-solfato (SDS) 2% p/v, impiegato in volume adeguato alla quantità di cellule. La lisi veniva completata incubando tali provette in apparecchio Thermomixer (agitazione continua per 10 min a 95°C). Il dosaggio delle proteine avveniva mediante il metodo dell'acido bicinconinico (BCA) impiegando un sistema di reagenti (Pierce). La concentrazione delle proteine nei lisati veniva determinata mediante spettrofotometria.

Separazione elettroforetica delle proteine cellulari

30 µg di proteine di ciascun lisato venivano poi bolliti 10 min a 95°C in presenza di 100 mM di 2-mercaptoethanolo.

Le proteine venivano separate mediante gel di poliacrilamide in presenza di SDS (SDS-PAGE), impiegando mini-gel a varia concentrazione di poliacrilamide. Questi gel venivano allestiti a partire da una soluzione di acrilamide/bis-acrilamide 29.2:0.8, con l'aggiunta di Tris/HCl 0.39 M a pH 8.8, SDS 0.1%, ammonio persolfato 0.05% e TEMED 0.04 % come catalizzatore e iniziatore rispettivamente della polimerizzazione (*resolving gel*). Al di sopra di questo gel veniva disposto un secondo gel di poliacrilamide al 3% contenente Tris HCl 0.13 M a pH 6.8, SDS 0.2%, ammonio persolfato 0.05% e TEMED 0.1% (*stacking gel*). I campioni per l'SDS-PAGE preparati come sopra descritto venivano caricati in pozzetti ricavati all'interno dello *stacking gel*.

La separazione elettroforetica veniva eseguita impiegando un tampone di corsa (pH 8.1-8.4; Tris 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 0.05%) e applicando una differenza di potenziale costante di 200V, a corrente non limitante, per tempi variabili. Le proteine separate nel gel venivano quindi elettrotrasferite su una membrana di PVDF (Hybond-ECL, Amersham), in una cella per *electroblotting* contenente un tampone di trasferimento (pH 8.1-8.4; Tris 250 mM, glicina 1.92 mM, metanolo 10%) e applicando una differenza di potenziale costante di 100V, a corrente non limitante, per 90 min. Al termine del trasferimento, la resa qualitativa della corsa elettroforetica e del trasferimento su membrana veniva stimata visualizzando le bande proteiche sulla membrana stessa mediante incubazione di quest'ultima in una soluzione acquosa di Rosso Ponceau-S

(0.2% in 3% acido tricloroacetico e 3% acido sulfosalicilico), un colorante azoico che si lega alle proteine in modo reversibile. Il colorante veniva poi eliminato mediante brevi lavaggi in PBS contenente 0.1% Tween-20 (T-PBS).

Rivelazione di proteine mediante immunoblotting ed anticorpi utilizzati

Le membrane di PVDF venivano incubate in un *blocking buffer* costituito da T-PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) all'1% per 3h a temperatura ambiente in agitazione continua, in modo da saturare i siti di legame aspecifico per le proteine (*blocking*). Le membrane venivano quindi incubate in *blocking buffer* contenente un anticorpo primario policlonale di coniglio in grado di riconoscere la fosfo-Thr202 e la fosfo-Tyr204 di ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling Technology n. 9101) per 16-18h a 4°C in agitazione, e poi lavate con T- PBS (2 lavaggi rapidi, 1 da 15min e 2 da 5min su agitatore orbitale) e trattate con una diluizione di anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP) (Sigma-Aldrich n. A-6154), per 45 min a temperatura ambiente, in agitazione. Gli immunocomplessi associati con HRP venivano infine evidenziati mediante incubazione della membrana in un reattivo che, in presenza di HRP, genera chemio-luminescenza (ECL; Amersham). Per valutare la medesima quantità di proteine in ciascun campione, le membrane venivano incubate in stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol) per 30 min a 50°C, lavate 3 volte con T-PBS, e

reincubate con un anticorpo policlonale di coniglio in grado di riconoscere p38 (1:500; Cell Signaling Technology n. 9212).

Valutazione dell'attivazione delle proteine intracellulari in specifiche sottopopolazioni cellulari mediante citofluorimetria

La metodica che abbiamo eseguito è costituita da numerosi passaggi, finalizzati al legame di specifici anticorpi primari coniugati a fluorocromi, diretti a determinare l'attivazione delle proteine di nostro interesse. I metodi più utilizzati per tale determinazione, fra i quali Western Blotting e l'immunoprecipitazione, richiedono grandi quantità di campione; talvolta essi non permettono tale valutazione in sottopopolazioni cellulari costituite da un numero esiguo di cellule quali sono quelle di cui disponiamo. La citofluorimetria invece, richiedendo una ridotta quantità di cellule, è ideale per ottenere un'analisi multiparametrica, rapida, quantitativa e sensibile di distinte sottopopolazioni cellulari. Abbiamo utilizzato una tecnologia ideata dal Dott. Garry Nolan [66] che combina l'utilizzo di anticorpi specifici per proteine fosforilate con il potere della citofluorimetria (Phosflow Analysis -BD Biosciences-). Per la determinazione di ogni proteina abbiamo utilizzato 250000 cellule alla concentrazione di 2×10^6 cell/ml.

La metodica, precedentemente messa a punto nel nostro laboratorio, prevedeva che le cellule venissero stimulate direttamente nei tubi da citofluorimetro con EPO, G-CSF o TPA come già precedentemente descritto oppure mantenute per lo stesso tempo nel terreno di coltura; successivamente le cellule venivano fissate per mantenere lo stato di

attivazione con un buffer costituito da para-formaldeide al 4% incubandole a 37°C per 10 minuti (BD Cytotfix Buffer n. 554655). Le cellule così fissate venivano poi permeabilizzate con un buffer costituito per il 90% da metanolo, (BD Phosflow Perm Buffer III n. 558050) per 30 minuti in ghiaccio. Successivamente, le cellule erano incubate contemporaneamente con gli anticorpi monoclonali coniugati a diversi fluorocromi diretti sia contro le proteine di superficie che contro le proteine intracitoplasmatiche di nostro interesse. I dettagli relativi all'utilizzo di questi anticorpi sono estesamente descritti nel paragrafo successivo. Per l'analisi, abbiamo utilizzato il citofluorimetro FacsCanto (BD Biosciences) studiando circa 20000 eventi ed analizzando i dati mediante il software BD FacsDiva.

Anticorpi per citofluorimetria e condizioni d'impiego

Le proteine di superficie sono state riconosciute grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali di topo della BD Biosciences così strutturati:

-Le cellule CD34+ sono state rivelate usando un anticorpo coniugato all'AlloPhicoCianina (APC) (clone 581) in grado di riconoscere l'epitopo umano CD34 Classe III.

-Le cellule CD45+ sono state rivelate utilizzando un anticorpo coniugato al fluorocromo PerCP (clone 2D1) in grado di riconoscere gli antigeni dei leucociti umani (180-220KDa), che appartengono alla famiglia dei T200.

-Le cellule CD71+ umane sono state identificate utilizzando un anticorpo coniugato alla Ficoeritrina (PE) (clone M-A712) in grado di riconoscere il recettore per la transferrina (95KDa).

Le modificazioni post-traduzionali delle proteine intracitoplasmatiche sono state riconosciute grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali di topo della BD Biosciences PhosFlow, come segue:

-La fosforilazione di ERK1 ed ERK2 è stata rivelata utilizzando un anticorpo coniugato al fluorocromo AlexaFluor 488 (clone 20A) in grado di riconoscere la fosfo-Thr 202 e la fosfo-Tyr 204 di ERK1 e la fosfo-Thr 183 e la fosfo-Tyr 185 di ERK2.

-La fosforilazione di p38 è stata rivelata utilizzando un anticorpo coniugato al fluorocromo Alexa Fluor® 488 (clone 36/p38) in grado di riconoscere la fosfo-Thr 180 e la fosfo-Tyr 182.

-La fosforilazione di STAT5 è stata rivelata utilizzando un anticorpo monoclonale di topo coniugato al fluorocromo Alexa Fluor® 488 (clone 47) in grado di riconoscere la fosfo-Tyr 694.

La caspasi 3 clivata è stata rilevata utilizzando invece un anticorpo policlonale di coniglio coniugato al fluorocromo AlexaFluor488 in grado di riconoscere l'Aspartato 175 che risulta dal clivaggio della Caspasi-3 (Cell Signaling Technology n. 9669).

Come controllo isotipico, abbiamo utilizzato l'anticorpo IgG1, κ Isotype control Alexa Fluor 488 (BD Biosciences PhosFlow clone MOPC-21).

Questi anticorpi sono stati tutti utilizzati alla concentrazione di 20µl/10⁶ cellule.

Analisi statistica ed in cluster

Le attivazioni basali delle proteine che abbiamo studiato sono state calcolate dividendo la Median Fluorescence Intensity (MFI) ottenuta da ciascun campione con la MFI del controllo isotipico.

Il cut-off che abbiamo scelto per considerare attivata una proteina (>1.2) è stato stabilito calcolando la media dei valori delle MFI dei controlli normali non stimolati \pm la deviazione standard.

Abbiamo considerato una proteina:

- molto attivata se $MFI \geq 5$
- attivata se $2 \leq MFI < 5$
- debolmente attivata se $1.2 < MFI < 2$
- non attivata se $MFI \leq 1.2$.

Le modificazioni nello stato di attivazione delle proteine dopo stimolazione citochinica sono state determinate calcolando il rapporto fra la MFI del campione stimolato rispetto alla MFI del campione non stimolato.

Le significatività statistiche sono state valutate mediante i test non parametrici di Wilcoxon e Kruskal-Wallis. Si è considerata statisticamente significativa una $P \leq 0.05$.

La risposta al trattamento in vivo con EPO è stata valutata in accordo ai criteri IWG, ovvero considerata positiva se si osservava un incremento nei livelli ematici di emoglobina di 2g/dl dopo 8 settimane di trattamento con EPO o si osservava trasfusione-indipendenza per più di 8 settimane [67]. La risposta ad EPO in vitro è stata definita positiva quando la stimolazione con EPO determinava un incremento nel rapporto fra la MFI

di STAT5 nel campione non stimolato rispetto allo stimolato > 1.2 nella sottopopolazione cellulare CD71+CD45- .

La correlazione fra la risposta in vivo ad EPO e quella in vitro è stata calcolata mediante il test non parametrico di Spearman. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il programma StataCorp 2003.

L'analisi dei dati citofluorimetrici è stata effettuata utilizzando un algoritmo che permette di raggruppare insieme campioni che presentino attivazioni basali simili come anche simili risposte in vitro alle citochine. Le mappe dei cluster sono state ottenute utilizzando la versione del programma Cluster TreeView disponibile gratuitamente sul web all'indirizzo <http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>.

SCOPO DELLO STUDIO

Poichè le sindromi mielodisplastiche sono patologie eterogenee caratterizzate da citopenie come manifestazione di emopoiesi inefficace e delle cui alterazioni della trasduzione del segnale ancora poco è conosciuto, lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'attivazione proteolitica della caspasi-3 e la fosforilazione di ERK1/2, p38 e di STAT5 sia a livello basale che dopo stimolazione con G-CSF o Eritropoietina specificamente nelle sottopopolazioni cellulari CD34+, CD45+ e CD71+CD45- mediante tecnica citofluorimetrica.

Ci siamo inoltre proposti di elaborare i risultati ottenuti per evincerne eventuali pattern di attivazioni basali caratteristici di una sottopopolazione cellulare o di un sottogruppo WHO come anche eventuali pattern caratteristici di risposta alle citochine.

RISULTATI

Attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 nelle cellule CD34+

L'attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 è stata valutata nelle cellule CD34+ provenienti da 60 casi di MDS e 6 donatori. 6 dei 60 casi di MDS non presentavano cellule CD34+, pertanto gli studi sono stati condotti sui 54 casi rimanenti. La Tabella 2 mostra una sintesi di tale attivazione.

STAT5 risultava fosforilata nella maggior parte dei casi di MDS studiati ma particolarmente in 1 RA, 1 RCMD, 2 RAEB-1 e 1 RAEB-2.

La caspasi-3 era fortemente attivata in 5 casi: 1 RA, 1 RARS, 1 RCMD, 1 RAEB-1 e 1 RAEB-2 e con intensità minore nella maggior parte dei campioni. La contemporanea attivazione dell'apoptosi e del pathway pro-proliferativo STAT5 dipendente è un dato che ci è sembrato molto interessante e non in contraddizione tenendo conto che questa patologia è caratterizzata da una difettiva maturazione dei progenitori midollari, i quali, proprio perché difettivi, tentando di proliferare, vanno in apoptosi.

ERK1/2 risultava debolmente fosforilata in 6 casi di MDS, in 2 CMML-2 ed in una CMML; p38 era attivata in 26 casi appartenenti a varia WHO anche se soprattutto nelle RA e con un'intensità variabile. Una elevata attivazione basale di p38 (MFI ≥ 5) è stata osservata in una RA ed in una RCMD. Le cellule CD34+ dei donatori non presentavano attivazione basale delle proteine da noi studiate (Tabella Supplementare 1).

L'analisi statistica effettuata su questi dati con il Wilcoxon test ha mostrato che solo STAT5 e la caspasi-3 risultano significativamente attivate nelle cellule CD34+ MDS rispetto a quelle dei donatori (rispettivamente $P= 0.001$ e $P= 0.002$; Figura 5). Inoltre, il test di Kruskal-Wallis ci ha permesso di studiare se qualche sottogruppo WHO influenzasse particolarmente tale significatività. Ne è risultato che sono le RA ($P< 0.001$) e le RAEB-1 ($P<0.001$) a influenzare maggiormente la significatività dell'attivazione di STAT5 nelle MDS rispetto ai donatori.

L'analisi in cluster ha mostrato un pattern eterogeneo e consistente di attivazione basale in questa sottopopolazione cellulare nella quale tuttavia non si è assistito ad un raggruppamento dei casi studiati in base alla classificazione WHO (Figura 6). I citogrammi relativi ad un caso rappresentativo (#18) sono mostrati nella Figura 7.

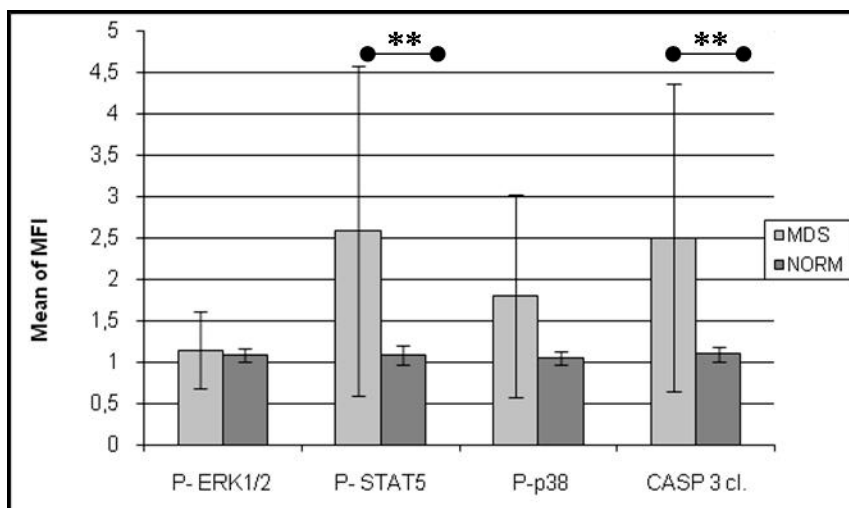


Figura 5. Attivazione basale di ERK1/2, STAT5, p38 e caspasi-3 nelle cellule mononucleate CD34+ MDS (n=54) e normali (n=6) indicate come MFI rilevato rispetto a quello del controllo isotipico (** $P< 0.01$).

	P- ERK1/2	P- STAT5	P- p38	Caspase 3 cleav.
CD34+ cells	7/54	45/54	11/54	43/54
CD45+ cells	3/45	34/45	6/45	34/45
CD71+CD45- c	1/43	28/43	4/43	12/43

Tabella 2. Attivazioni basali di ERK1/2, STAT5, p38 e caspasi-3 nelle sottopopolazioni CD34+, CD45+ e CD71+CD45-. Sono indicati i rapporti fra i casi MDS considerati positivi per l'attivazione basale di ERK1/2, STAT5, p38 e caspasi-3 rispetto al numero totale di casi analizzati.

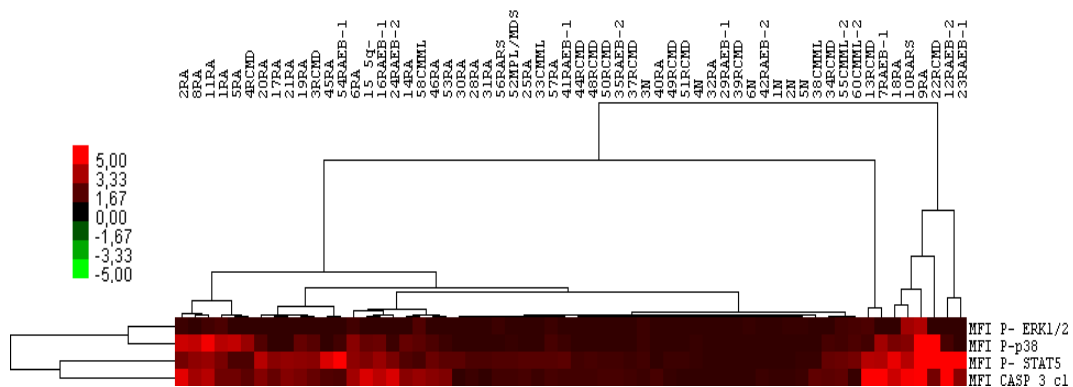


Figura 6. Analisi gerarchica in cluster dei dati citofluorimetrici relativi all'attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 nella sottopopolazione CD34+ in 54 casi di MDS e 6 casi normali. L'algoritmo di calcolo è basato sul metodo *complete-linkage* ed utilizza la distanza euclidea come misura della similarità. Ogni quadrato rappresenta il valore di attivazione per ciascun campione; le righe rappresentano i campioni analizzati e le colonne rappresentano le proteine studiate. I livelli di attivazione da 0% (nero) a 100% (rosso intenso; pixel setting=5) sono stati calcolati come rapporto fra la MFI dell'anticorpo specifico rispetto all'MFI del controllo isotipico. I casi di MDS sono stati numerati progressivamente.

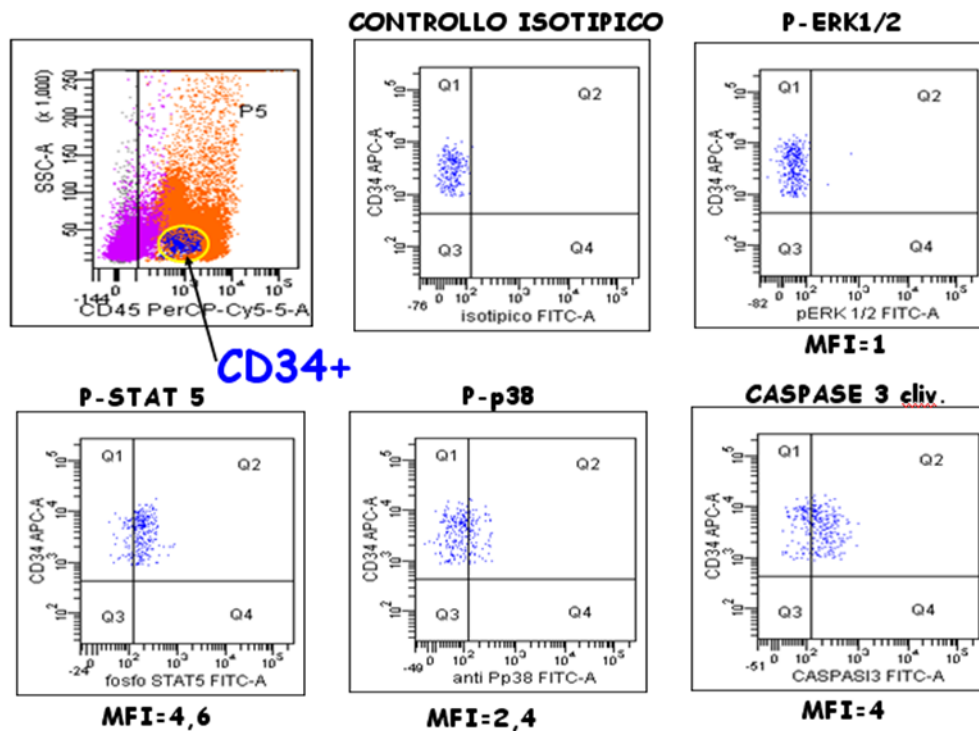


Figura 7. Valutazione mediante analisi citofluorimetrica dell'attivazione basale nella sottopopolazione CD34+ di un caso rappresentativo (#18). BMMC ricavate da paziente affetto da MDS sono fissate, permeabilizzate e incubate con gli anticorpi anti-CD34+ APC, anti-CD45+ PerCP, anti-CD71+CD45- PE e controllo isotipico, anti P-ERK1/2, anti P-STAT5, anti P-p38, anti caspasi 3 clivata coniugati con il fluorocromo AlexaFluor488 prima di essere analizzate al citofluorimetro.

Attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 nelle cellule CD45+

L'attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 è stata studiata nelle cellule CD45+ provenienti da 45 casi di MDS e da 6 donatori. La Tabella 2 mostra una sintesi di tale attivazione.

Nella sottopopolazione CD45+ la fosforilazione di ERK1/2 e di p38 erano perlopiù un raro evento.

La fosforilazione di STAT5 invece era presente in 34/45 casi di MDS appartenenti a varia WHO di cui, 18 debolmente, 15 con $2 \leq \text{MFI} < 5$ e una RA fortemente attivata.

La caspasi-3 risultava attivata in 34/45 casi studiati appartenenti a varia WHO e per la maggior parte con un'intensità di attivazione debole.

Le cellule CD45+ dei donatori non presentavano attivazione basale delle proteine ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 (Tabella Supplementare 2).

L'analisi statistica ha mostrato che:

-STAT5 e la caspasi-3 risultano significativamente attivate nelle cellule CD45+ MDS rispetto a quelle dei donatori (rispettivamente $P < 0.001$ e $P = 0.003$; Figura 8).

-STAT5 risulta significativamente attivata nei sottogruppi WHO RA ($P < 0.001$) e RAEB-1 ($P = 0.001$) rispetto ai donatori.

L'analisi in cluster ha mostrato un pattern eterogeneo di attivazione basale in questa sottopopolazione cellulare nella quale non si è osservato un raggruppamento dei casi studiati in base alla classificazione WHO come invece si è osservato nei donatori che clusterizzano insieme (Figura 9).

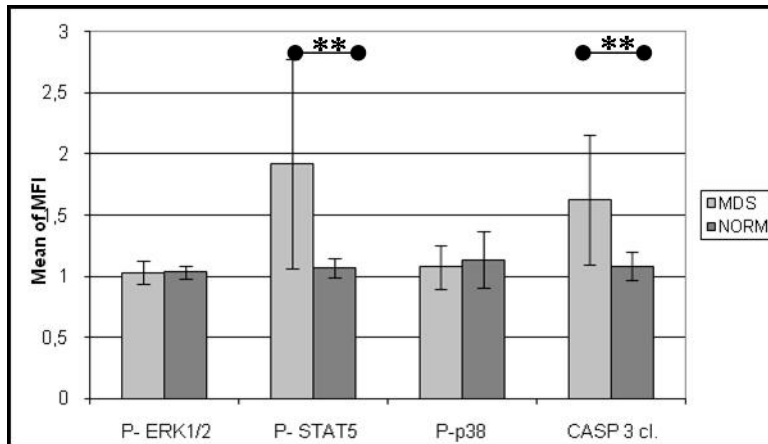


Figura 8. Attivazione basale di ERK1/2, STAT5, p38 e caspasi-3 nelle cellule mononucleate CD45+ MDS (n=45) e normali (n=6) indicata come MFI rilevato rispetto a quello del controllo isotipico (** $P < 0.01$).

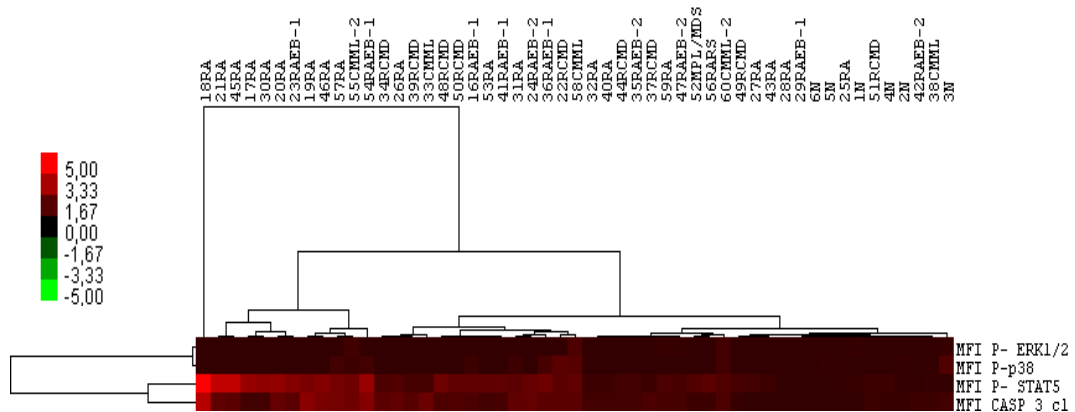


Figura 9. Analisi gerarchica in cluster dei dati citofluorimetrici relativi all'attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 nella sottopopolazione CD45+ in 45 casi di MDS e 6 casi normali. Per i dettagli sull'analisi in cluster vedere Figura 6.

Attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 nelle cellule CD71+CD45-

L'attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 è stata studiata nelle cellule CD71+CD45- provenienti da 45 casi di MDS e da 6 donatori. 2 casi di MDS non avevano cellule CD71+CD45-. L'attivazione globale in questa sottopopolazione era scarsa ed una sintesi è mostrata nella Tabella 2. ERK1/2 e p38 non risultavano fosforilate; la caspasi-3 era debolmente attivata in 12 casi di MDS appartenenti a varia WHO (Tabella Supplementare 3). Solo STAT5 risultava significativamente attivata nelle cellule CD71+CD45- MDS rispetto a quelle dei donatori ($P= 0.006$; Figura 10). Le RA e le RAEB-1 presentavano attivazione significativa di STAT5 rispetto alle normali in assenza di stimoli (rispettivamente $P= 0.001$ e $P=0.001$). Cinque casi di RA con i livelli più alti di attivazione di STAT5 (MFI >3) raggruppavano insieme nell'analisi in cluster dalla quale si può avere conferma della scarsa attivazione globale in questa sottopopolazione cellulare (Figura 11).

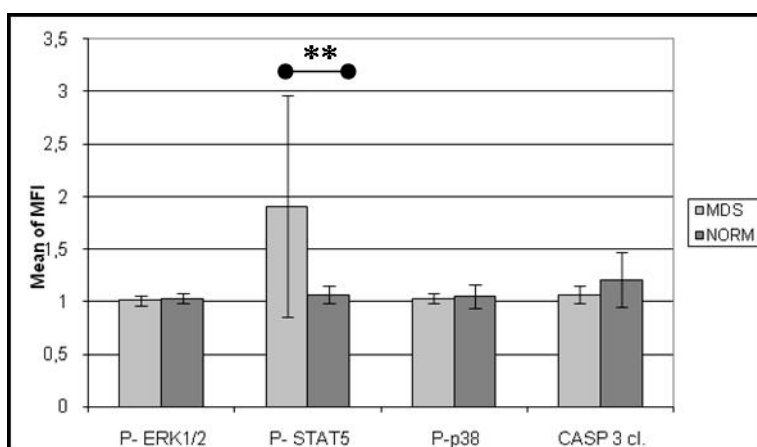


Figura 10. Attivazione basale di ERK1/2, STAT5, p38 e caspasi-3 nelle cellule mononucleate CD71+CD45- MDS (n=45) e normali (n=6) indicata come MFI rilevato rispetto a quello del controllo isotipico (** $P < 0.01$).

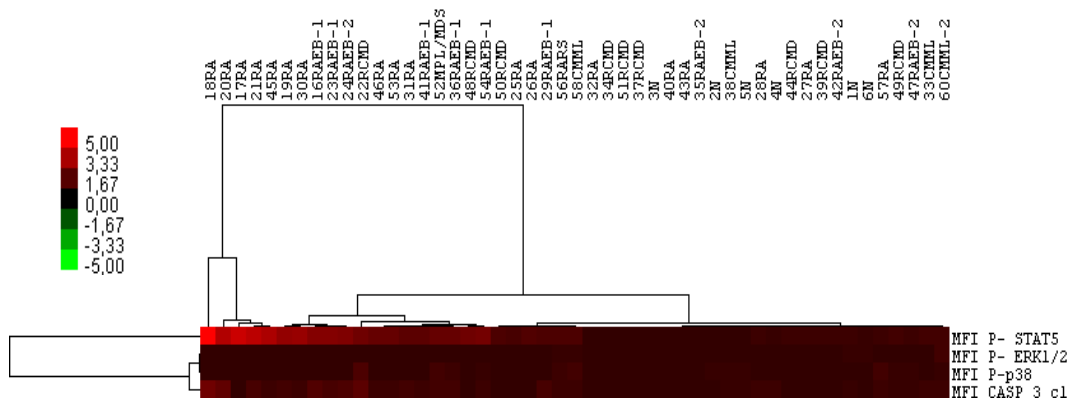


Figura 11. Analisi gerarchica in cluster dei dati citofluorimetrici relativi all'attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e caspasi-3 nella sottopopolazione CD71+CD45- in 43 casi di MDS e 6 casi normali. Per i dettagli sull'analisi in cluster vedere Figura 6.

Risposta citochinica in vitro

Attivazione di ERK1/2 in Kasumi-1 ed in cellule mononucleate di donatore

Per valutare l'affidabilità del metodo citofluorimetrico circa la valutazione delle attivazioni proteiche, abbiamo stimolato cellule Kasumi-1, CD34+ per l'85%, con TPA, noto attivatore di ERK1/2. Abbiamo osservato un'attivazione potente di ERK1/2 in citofluorimetria che è stata qualitativamente validata in immunoblotting (Figura 12A-B).

In parallelo, l'attivazione di ERK1/2 è stata studiata anche in cellule mononucleate di donatore dopo stimolazione con EPO per 15 min o TPA per 10 min. La stimolazione con EPO non determinava attivazione di ERK1/2 nelle cellule CD71+CD45- (Figura 12C in basso a sx) sia in citofluorimetria sia in immunoblotting, effettuato su tutte le cellule mononucleate delle quali le CD71+CD45- rappresentavano il 17.6% del totale (figura 12D). Invece, l'attivazione di ERK1/2 dopo stimolazione con

TPA è stata osservata in citofluorimetria nelle cellule CD45+ (79% del totale) e nelle CD34+ (1.4% del totale) ma non nelle CD71+CD45-. Questo risultato è stato validato dall'immunoblotting effettuato su tutte le cellule mononucleate di donatore (figura 2D).

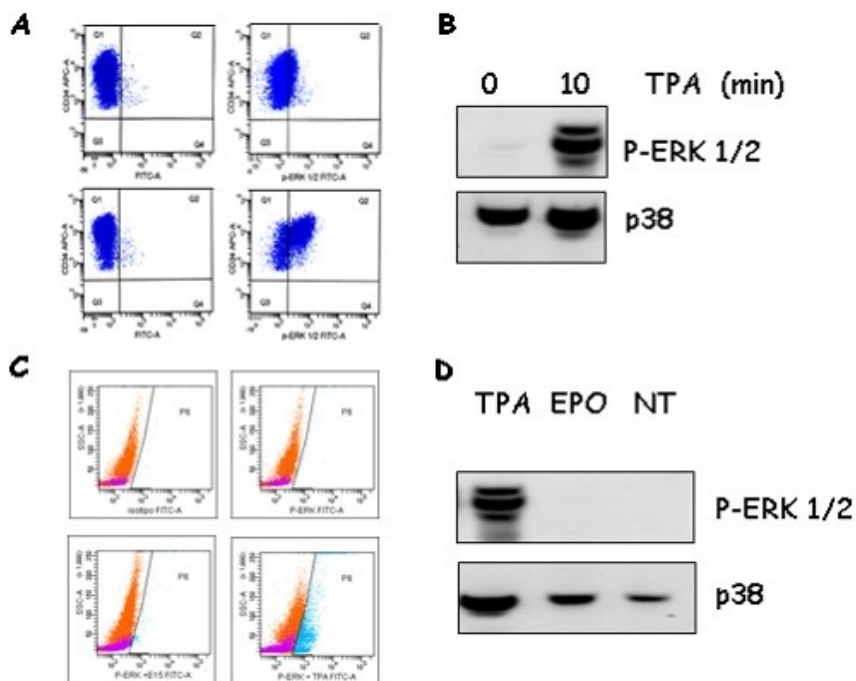


Figura 12. Attivazione di ERK1/2 in cellule Kasumi-1 e in cellule mononucleate di donatore. (A) Analisi citofluorimetrica della fosforilazione di ERK1/2 prima (in alto a dx) e dopo (in basso a dx) stimolazione con TPA. (B) Immunoblot relativo all'attivazione di ERK1/2 prima e dopo stimolazione con TPA. (C) Analisi citofluorimetrica della fosforilazione di ERK1/2 in cellule mononucleate di donatore prima e dopo stimolazione con EPO e con TPA. In alto a sx osserviamo il controllo isotipico, in alto a dx la fosforilazione basale di ERK1/2, in basso a sx la fosforilazione di ERK1/2 dopo stimolazione con EPO e in basso a dx la fosforilazione di ERK1/2 dopo stimolazione con TPA. Le cellule CD45+ sono indicate in arancio, le CD71+CD45- in violetto, le CD34+ in blu e tutte le cellule attivate in celeste. (D) Immunoblot relativo all'attivazione di ERK1/2 prima e dopo stimolazione con EPO e con TPA.

Stimolazione con EPO

La risposta alla stimolazione in vitro con EPO è stata valutata in 36/60 casi di MDS studiati e nei 6 donatori. Essa non modificava l'attivazione di ERK1/2, p38 e della caspasi-3 nelle cellule CD34+, CD45+ e CD71+CD45- MDS come anche quella di STAT5 nelle cellule CD34+ e CD45+. Invece, la fosforilazione di STAT5 nelle cellule CD71+CD45- veniva indotta in 13/36 casi di MDS appartenenti a varia WHO con un incremento dato dal rapporto fra la MFI del campione stimolato e quello non stimolato compreso fra i valori di 1.3 e 2.5 e nei donatori compreso fra 2.1 e 2.9. I rimanenti 23 casi non presentavano modificazione della fosforilazione di STAT5 dopo stimolazione in vitro con EPO (Tabella Supplementare 4). I citogrammi relativi ad un caso rappresentativo (#34) sono mostrati nella Figura 16.

L'analisi statistica ha mostrato che l'attivazione di STAT5 EPO-dipendente è significativamente inferiore nelle cellule CD71+CD45- MDS rispetto a quelle dei casi di controllo ($P < 0.001$; Figura 13).

E' interessante notare che nessuna delle MDS responsive ad EPO in vitro presenta attivazione basale della caspasi-3 in questa sottopopolazione cellulare e che, nessuna delle MDS che ha la caspasi-3 attivata risponde ad EPO.

L'analisi in cluster mostra la formazione di 3 raggruppamenti:

- il cluster 1 include i 6 donatori, 1 RCMD ed un caso di CMML-2.
- Il cluster 2 contiene 11 MDS appartenenti a varia WHO che presentano attivazione di STAT5 in risposta alla stimolazione in vitro con EPO ma inferiore a quella dei casi del cluster 1.

– il cluster 3 include i rimanenti casi che non rispondono ad EPO in vitro (Figura 14).

Successivamente, abbiamo cercato di valutare una eventuale correlazione fra la risposta ad EPO che osservavamo in vitro con il test citofluorimetrico e l'eventuale risposta in vivo del paziente. Solo 22/36 pazienti MDS presentavano probabilità di risposta ad EPO in accordo con i criteri clinici cioè la trasfusione indipendente, i livelli endogeni di EPO < 500U/ml e l'assenza di blasti nel midollo.

La risposta clinica ad EPO veniva definita positiva, in accordo ai criteri IGW 2006 [67], quando si osservava un incremento dei livelli ematici di emoglobina di 2g/dl dopo 8 settimane di trattamento. La risposta ad EPO in vitro veniva definita positiva quando la stimolazione con EPO determinava un incremento nel rapporto fra la MFI di STAT5 nel campione non stimolato rispetto allo stimolato >1.2 nella sottopopolazione cellulare CD71+CD45-. Le caratteristiche dei pazienti trattati con EPO sono mostrate nella Tabella 3. Secondo i criteri appena definiti, abbiamo osservato una correlazione fra la risposta in vivo e quella in vitro ad EPO in 20/22 casi studiati (90.9%) (Tabella Supplementare 5). Tale correlazione è risultata essere statisticamente significativa (ρ di Spearman = 0.62 e $P = 0.002$) (Figura 15). I due casi che non mostravano correlazione con la risposta in vivo ad EPO presentavano elevata attivazione basale di STAT5 ($2 \leq \text{MFI} < 5$).

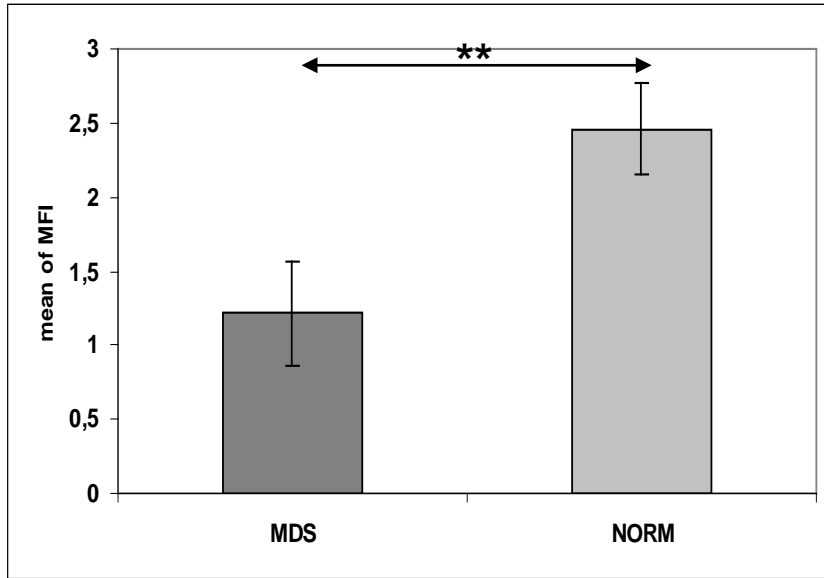


Figura 13. Attivazione di STAT5 nelle cellule CD71+CD45- MDS (n=36) e normali (n=6) dopo stimolazione in vitro con EPO. Essa è indicata come rapporto fra la MFI del campione stimolato rispetto alla MFI del non stimolato (** $P < 0.01$).

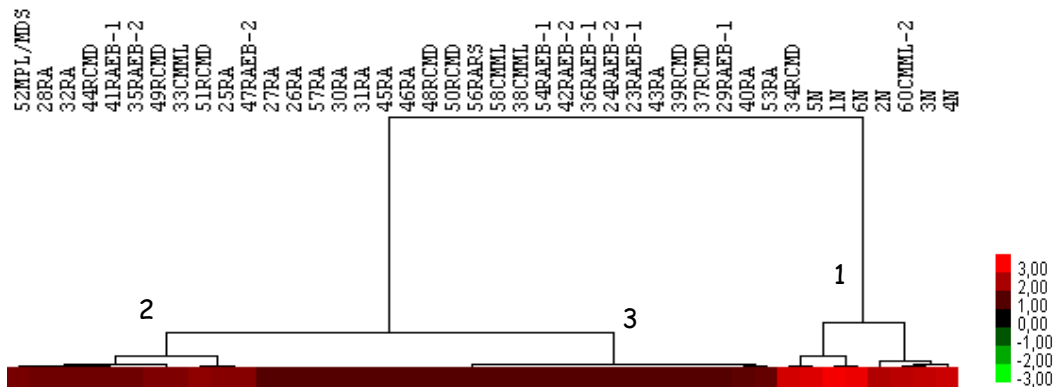


Figura 14. Analisi gerarchica in cluster dei dati citofluorimetrici relativi all'attivazione di STAT5 nella sottopopolazione CD71+CD45- in 36 casi di MDS e 6 casi normali dopo stimolazione in vitro con EPO. L'algoritmo di calcolo è basato sul metodo *complete-linkage* ed utilizza la distanza euclidea come misura della similarità. Ogni quadrato rappresenta il valore di attivazione per ciascun campione; le righe rappresentano i campioni analizzati. I livelli di attivazione da 0% (nero) a 100% (rosso intenso; pixel setting=3) sono stati calcolati come rapporto fra la MFI di P-STAT5 nelle cellule CD71+CD45- del campione stimolato rispetto al non stimolato.

	IPSS LOW	IPSS INT-1	IPSS INT-2
No of patients	11	6	5
Median age	76	74.5	69
Clinical EPO response	5	1	1
WHO			
RA; RARS	6; 1	4; 0	0; 0
RCMD; 5q-	3; 0	2; 0	0; 0
RAEB-1; RAEB-2	0; 0	0; 0	3; 2
MDS/MPL	1	0	0

Tabella 3. Caratteristiche dei pazienti trattati in vivo con EPO.

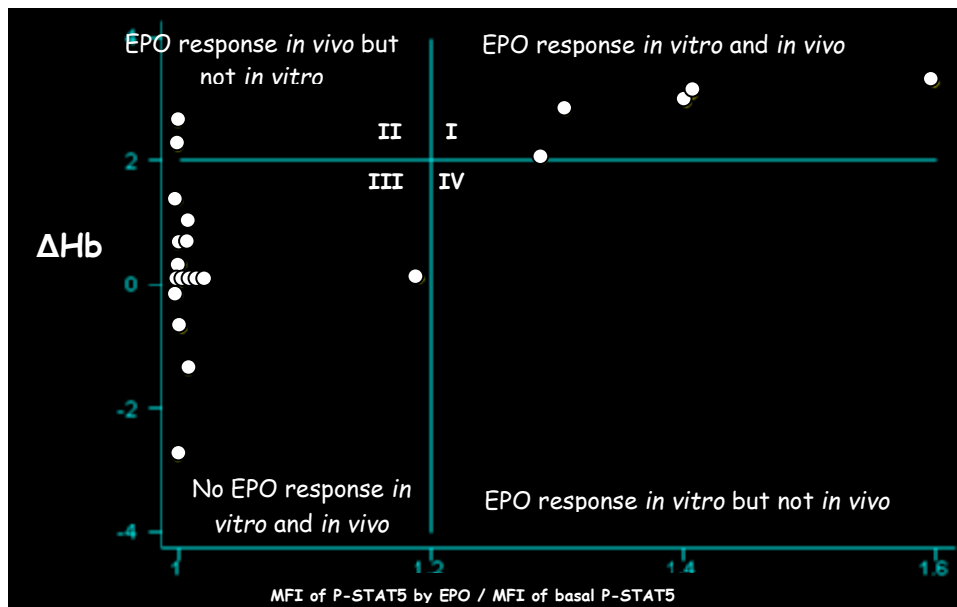


Figura 15. Correlazione fra la risposta in vitro ed in vivo con EPO. L'asse X rappresenta l'attivazione di STAT5 in risposta alla stimolazione con EPO, l'asse Y indica l'incremento dei livelli di emoglobina dopo il trattamento in vivo con EPO. I casi che mostrano correlazione fra la risposta ad EPO in vivo ed in vitro si trovano: nel quadrante I quelli che presentano risposta positiva (n=5); nel quadrante III (n=15) quelli con risposta negativa. I casi che non mostrano correlazione fra la risposta ad EPO in vivo ed in vitro si trovano: nel quadrante II (n=2) e nel quadrante IV (n=0).

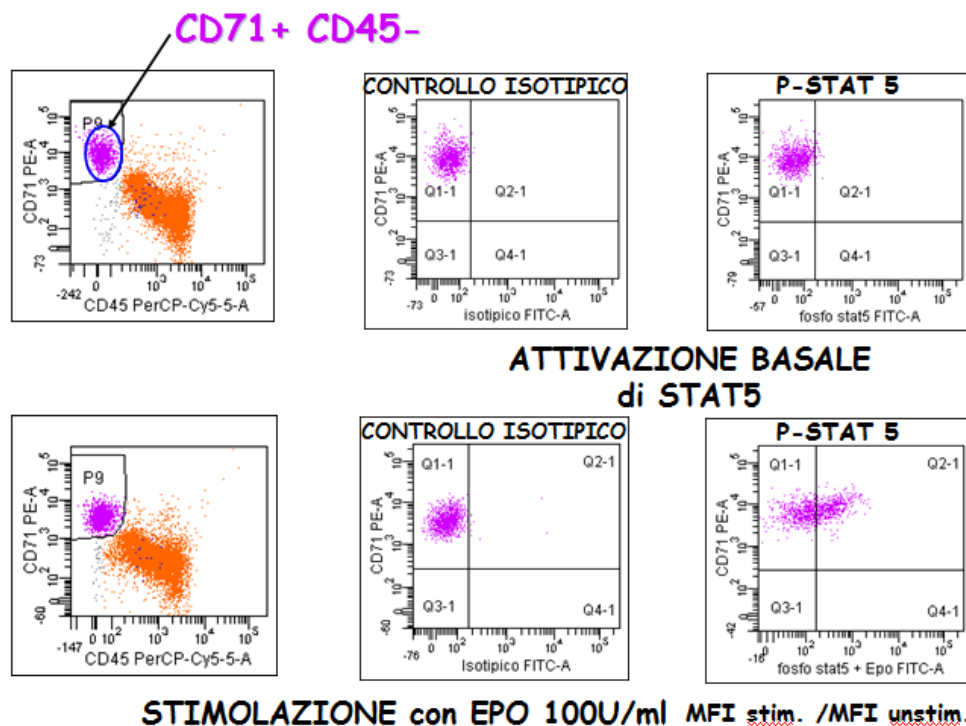


Figura 16. Valutazione mediante analisi citofluorimetrica dell'attivazione di STAT5 nella sottopopolazione CD71+CD45- di un caso rappresentativo (#34) dopo stimolazione con EPO. BMMC ricavate da paziente MDS sono stimulate con EPO 100U/ml 15 min, poi fissate, permeabilizzate e infine incubate con gli anticorpi anti-CD34+ APC, anti-CD45+ PerCP, anti-CD71+CD45- PE e controllo isotipico, anti P-ERK1/2, anti P-STAT5, anti P-p38, anti caspasi 3 clivata coniugati con il fluorocromo AlexaFluor488 prima di essere analizzati al citofluorimetro.

Stimolazione con G-CSF

La stimolazione con G-CSF è stata studiata in 40/60 casi di MDS e nei 6 donatori. Non è stato possibile effettuarla in 6/40 casi per mancanza di cellule CD34+.

La stimolazione con G-CSF non induceva modificazione dell'attivazione di:

-p38 e della caspasi-3 nelle sottopopolazioni CD34+, CD45+ e CD71+CD45-
-ERK1/2 e di STAT5 nella sottopopolazione CD71+CD45-.

Invece, essa determinava fosforilazione di STAT5 nelle cellule CD45+ in 9/40 casi. Ma sono state senza dubbio le cellule CD34+ le più sensibili alla stimolazione con questa citochina. Infatti, abbiamo osservato un incremento nell'attivazione di STAT5 in:

-32/34 casi MDS con $1.3 \leq \text{MFI stimolato} / \text{MFI non stimolato} < 10$

-6/6 casi di controllo con $1.9 \leq \text{MFI stimolato} / \text{MFI non stimolato} < 2.8$.

L'analisi statistica non ha mostrato differenze significative nell'attivazione di STAT5 in risposta al G-CSF nelle cellule CD34+ MDS rispetto a quelle dei casi normali ($P = 0.49$) (Figura 17).

L'analisi in cluster ha mostrato che il pattern di fosforilazione di STAT5 G-CSF dipendente è estremamente eterogeneo e riconferma quanto dimostrato dall'analisi statistica ovvero che i casi normali ed i casi MDS non presentano differenze nella risposta a questa citochina (Figura 18). Infine, abbiamo osservato in 6/8 casi di MDS ed in tutti i casi normali una attivazione di ERK1/2 G-CSF dipendente nelle cellule CD34+ con $1.3 \leq \text{MFI stimolato} / \text{MFI non stimolato} < 1.9$ (Tabella Supplementare 6).

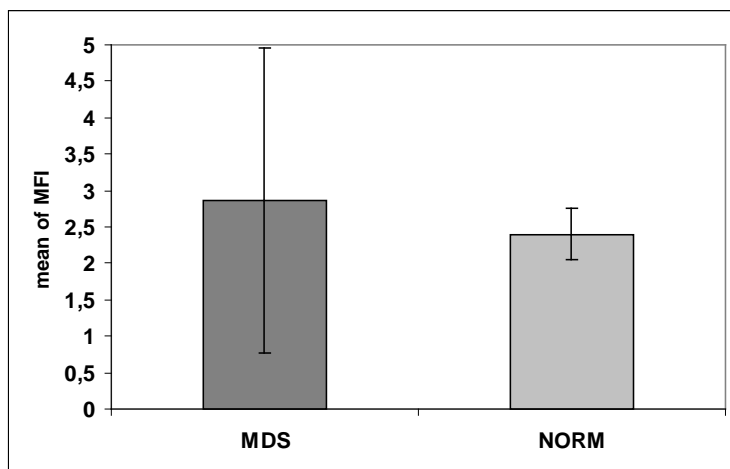


Figura 17. Attivazione di STAT5 nelle cellule CD34+ MDS (n=34) e normali (n=6) dopo stimolazione in vitro con G-CSF. Essa è indicata come rapporto fra la MFI del campione stimolato rispetto alla MFI del non stimolato (** $P < 0.01$).

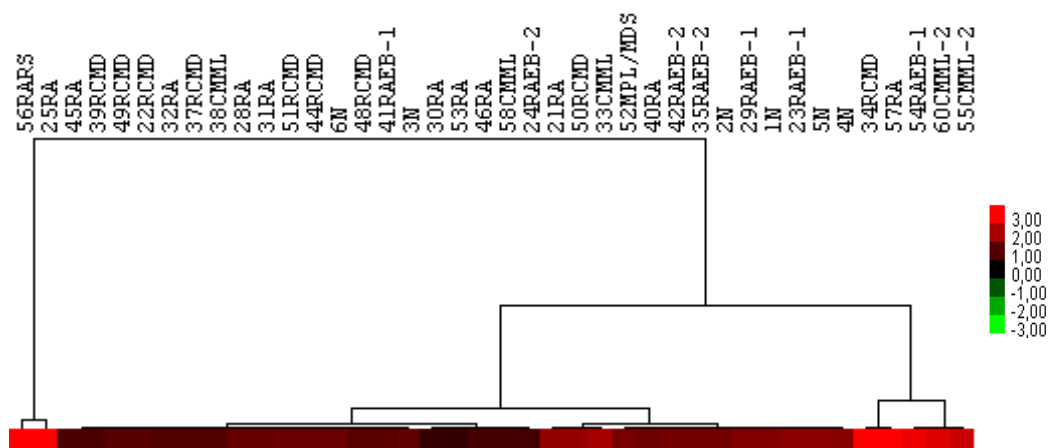


Figura 18. Analisi gerarchica in cluster dei dati citofluorimetrici relativi all'attivazione di STAT5 nella sottopopolazione CD34+ in 34 casi di MDS e 6 casi normali dopo stimolazione in vitro con G-CSF. L'algoritmo di calcolo è basato sul metodo *complete-linkage* ed utilizza la distanza euclidea come misura della similarità. Ogni quadrato rappresenta il valore di attivazione per ciascun campione; le righe rappresentano i campioni analizzati. I livelli di attivazione da 0% (nero) a 100% (rosso intenso; pixel setting=3) sono stati calcolati come rapporto fra la MFI di P-STAT5 nelle cellule CD34+ del campione stimolato rispetto al non stimolato.

DISCUSSIONE

Le MDS sono un gruppo eterogeneo e complesso di patologie. Non sono molte al momento le pubblicazioni che analizzano il signaling nelle cellule mielodisplastiche [38, 40]; piuttosto sono usciti alcuni lavori che riguardano il silenziamento o la over-espressione/mutazione di oncogeni correlati con la progressione della malattia [13, 68, 69, 70]. Questo studio, che è stato pubblicato nel 2012 su *Clinical Cancer Research* [71], si è proposto di valutare l'attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e la caspasi-3 in 60 casi di MDS appartenenti a varia classificazione WHO e rischio IPSS ed anche la modulazione dell'attivazione di queste proteine in risposta alla stimolazione con EPO e G-CSF utilizzando una metodica in citofluorimetria che ha permesso di quantificare queste attivazioni in specifiche sottopopolazioni cellulari midollari quali le CD34+, CD45+ e le CD71+CD45-.

Abbiamo osservato una differenza marcata nell'attivazione basale di ERK1/2, p38, STAT5 e della caspasi-3 fra le cellule normali e quelle mielodisplastiche ed una grande eterogeneità fra i diversi casi di MDS e fra le sottopopolazioni studiate. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che nel midollo mielodisplastico sono presenti cellule progenitrici in differenti stadi maturativi e con diversi genotipi. Il nostro studio non si è proposto di valutare il signaling in una sottopopolazione specifica, come avrebbero potuto molto meglio fare gli studi di *gene expression profiling*, ma di esaminare eventuali differenze nei pathways di queste sottopopolazioni cellulari.

L'intensità di attivazione di STAT5, della caspasi-3 e di p38 è risultata essere più elevata nelle cellule CD34+ anche in ragione dell'elevato numero di casi in cui si è osservata, suggerendoci che questa sia la sottopopolazione più "attiva" in queste complesse patologie. Questo signaling elevato potrebbe contribuire alla progressiva riduzione del compartimento staminale già osservata nelle MDS e dovuta a difetti nei processi di self-renewal, di differenziazione e di quiescenza [72].

ERK1/2 è risultato essere basalmente attivato solo marginalmente nelle cellule CD34+ e completamente inattivo nelle cellule CD71+CD45- sia nei casi normali che in quelli mielodisplastici. La sottopopolazione eritroide ci è apparsa inerte nei casi normali mentre ha mostrato attivazione basale di STAT5 in circa la metà dei casi studiati; ciò potrebbe essere interpretato come un segno di eritropoiesi inefficace. Inoltre, la mancanza di correlazione fra i pattern di attivazione e la classificazione WHO potrebbero riflettere una possibile inadeguatezza degli attuali sistemi di classificazione basati sulle caratteristiche morfologiche delle cellule displastiche.

Anche noi, come mostrato da altri autori, abbiamo osservato come l'attivazione di STAT5 e di ERK1/2 in risposta ad EPO sia ridotta o addirittura assente nelle cellule CD71+CD45- MDS rispetto alle normali. Inoltre, non abbiamo rilevato differenze fra casi rispondenti e non rispondenti ad EPO per quanto riguarda la presenza del clone MDS indicato da metafasi anomale. Questa anomalia sembra suggerirci una distinzione fra progenitori eritroidi normali e MDS; infatti, una delle domande che ci siamo posti, è se la risposta che osservavamo dipendeva dal clone MDS oppure dalla presenza del clone normale residuo nel

midollo. La nostra ipotesi, in accordo con quanto già osservato da altri autori, è che il difetto intrinseco nella maturazione eritroide sia caratteristico della malattia e coinvolga funzionalmente soprattutto le cellule CD71+CD45 [26, 41]. A dimostrazione di ciò, proponiamo il caso #25 nel quale tutte le metafasi sono anomale (+8) e si osserva risposta in vitro ad EPO.

La risposta in vitro ad EPO, misurata con la citofluorimetria nelle cellule CD71+CD45-, correla strettamente con la risposta in vivo. Questo metodo potrebbe essere utilizzato come un test di predizione in vitro della risposta in vivo del paziente ad EPO al pari dei parametri clinico/biologici considerati attualmente criteri favorevoli di risposta ad EPO quali i livelli endogeni di EPO nel siero < 500U/ml, bassa percentuale di blasti nel midollo e trasfusione-indipendenza. Queste caratteristiche identificano un gruppo di MDS [73] che hanno alta probabilità di risposta ad EPO (+ G-CSF), come confermato da una recente meta-analisi [74]. Dentro questo subset di possibili pazienti responsivi, il nostro test citofluorimetrico ha predetto quali fossero i pazienti clinicamente non responsivi ad EPO.

Alcuni tentativi sono stati fatti per identificare una signature di risposta ad EPO nelle MDS; fra questi merita citare un lavoro che dimostra come casi con caratteristiche clinico/biologiche simili rispondenti e non rispondenti ad EPO presentino espressione differenziale di 37 geni e che nessuno di questi geni differenzialmente espressi nei due gruppi di pazienti sia connesso alla maturazione eritroide [44]. Analogamente a quanto osservato per la risposta ad EPO, anche le MDS non-5q- che rispondono a lenalidomide non differiscono dalle non rispondenti per caratteristiche

cliniche come l'età, la percentuale di blasti midollari o la conta cellulare nel periferico ma ne differiscono per l'espressione genica [75].

Recentemente è stato pubblicato un lavoro che ha mostrato una correlazione fra l'attivazione di ERK1/2 nelle cellule MDS e la risposta clinica ad EPO [38]. Inizialmente abbiamo pensato che non riproducevamo questo dato per problemi metodologici; perciò abbiamo introdotto la stimolazione in vitro con TPA, un noto attivatore di ERK1/2, non solo nelle cellule MDS ma anche in cellule AML di linea ed in quelle di donatore ottenendo sempre forte attivazione di ERK1/2 in risposta alla stimolazione con TPA. Ci sembra pertanto che l'attivazione del pathway di ERK, sebbene presente, non sia così frequente nelle MDS come anche nelle cellule midollari sane.

Infine, per quanto riguarda la risposta al G-CSF, abbiamo osservato come sia STAT5 che ERK1/2 siano fosforilate in seguito alla stimolazione con questa citochina nelle cellule CD34+ MDS come in quelle normali e perciò non si identifichi un pattern tipico di displasia in questa sottopopolazione progenitrice midollare. Probabilmente le cellule staminali di più alto rango, quali le CD34+CD38- o CD133+ MDS dovrebbero essere valutate in questo senso, come alcuni esperimenti di gene expression profiling hanno iniziato a dimostrare [76]. Comunque, questi dati al momento supportano l'utilizzo ampio e sicuro del G-CSF nel trattamento delle MDS.

Concludendo, questo studio ha mostrato per la prima volta che è possibile identificare una signature di fosforilazione in cellule displastiche, discriminando fra specifiche sottopopolazioni cellulari e aprendo nuove possibilità di ricerca nella complessa ed eterogenea fisiopatologia delle sindromi mielodisplastiche. Inoltre, il test citofluorimetrico di valutazione

della fosforilazione di STAT5 in vitro nelle cellule CD71+CD45- si è rivelato un test rapido e con un potere predittivo di risposta accurato che potrebbe essere utilizzato insieme ai parametri clinico/biologici che vengono al momento valutati.

BIBLIOGRAFIA

1. Nolte F et al. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol.* 87, 777-95 (2008).
2. Jädersten M et al. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *J Intern Med.* 265, 307-28 (2009).
3. Malcovati L et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision-making. *J Clin Oncol.* 23, 7594-603 (2005).
4. Dexter TM et al. Regulation of hemopoietic cell growth and development: experimental and clinical studies. *Leukemia* 3, 469-74 (1989).
5. Ratajczak MZ et al. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 18, 29-40 (2004).
6. Orlic D et al. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood.* 84, 3991-4 (1994).
7. Sutherland HJ et al. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74, 1563-70 (1989).

8. Sutherland RD et al. The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical application. *J Hematotherapy* 1, 115 (1992).

9. Small D, Levenstein M et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 459-63 (1994).

10. Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtelety? *Blood* 82, 3515 (1993).

11. Ruosiathi E, Reed J. Anchorage dependence, integrins and apoptosis *Cell* 77, 477 (1994).

12. Epling-Burnette PK et al. reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood* 109, 4816-24 (2007).

13. Jiang Y et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Semin Cell Dev Biol*. 14, 143-50 (2003).

14. Ohishi K et al. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*. 14, 143-50 (2003).

15. Corey SJ et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*. 7, 118-29 (2007).
16. Makishima H et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*. 119, 3203-10 (2012).
17. Bejar R et al. Validation of a Prognostic Model and the Impact of Mutations in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 30, 3376-82 (2012).
18. Visconte V et al. SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* 120, 3173-86 (2012).
19. San Miguel JF et al. Myelodysplastic syndrome evolving to a mixed myeloid-lymphoid leukaemia. *Hematol Oncol*. 4, 175-6 (1986).
20. van Kamp H et al. Clonal involvement of granulocytes and monocytes, but not of T and B-lymphocytes and natural killer cells in patients with myelodysplasia: analysis by X-linked restriction fragment length polymorphisms and polymerase chain reaction of the phosphoglycerate kinase gene. *Blood*. 80, 1774-80 (1992).
21. Kerndrup G et al. Natural killer cell-mediated inhibition of bone marrow colony formation (CFU-GM) in refractory anaemia (preleukaemia): evidence for patient-specific cell populations. *Br J Haematol*. 69, 457-62 (1988).

22. Asano H et al. Evidence for nonclonal hematopoietic progenitor cell populations in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 84, 588-94 (1994).
23. Epling-Burnette PK et al. reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood* 109, 4816-24 (2007).
24. Hirai H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome *Jpn J Clin Oncol* 33, 153-60 (2003).
25. Boulton H. et al. Loss of both CSF1R (FMS) alleles in patients with myelodysplasia and a chromosome 5 deletion. *Proc Natl Acad Sci* 88, 6176–8 (1991).
26. Ebert BL et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335-9 (2008).
27. Andersen M et al. Duplication or amplification of chromosome band 11q23, including the unrearranged MLL gene, is a recurrent abnormality in therapy related MDS and AML, and is closely related to mutation of TP53 gene and previous therapy with alkylating agents. *Genes Chromo Cancer* 31, 33-41 (2001).

28. Lahortiga I et al. Molecular heterogeneity in AML/MDS patients with 3q21q26 rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 40, 179-89 (2004).
29. Martinelli G et al. Association of 3q21q26 syndrome with different RPN1/EVI1 fusion transcripts. *Haematologica*. 88, 1221-8 (2003).
30. Herman JG et al. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 349, 2042-54 (2003).
31. Quesnel B et al. Methylation of the p15 (INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 91, 2985-90 (1998).
32. Silverman LR et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 20, 2415-6 (2002).
33. Kuendgen A et al. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukaemia *Cancer*.106, 112-9 (2006).
34. Garcia-Manero G et al. Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood*. 108, 3271-9 (2006).

35. Uddin S et al. The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem.* 275, 27634-27640 (2000).
36. Cano E et al. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trend Biochem Sci* 20, 117-22 (1995).
37. Kolonics A et al. Unregulated activation of STAT-5, ERK1/2 and c-Fos may contribute to the phenotypic transformation from myelodysplastic syndrome to acute leukaemia. *Haematologia* 31, 125-38 (2001).
38. Frisan E et al. p-ERK1/2 is a predictive factor of response to erythropoiesis-stimulating agents in low/int-1 myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 95, 1964-8 (2010).
39. Johnson GL et al. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912 (2002).
40. Navas TA et al. Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood* 108, 4170-7 (2006).

41. Hoefsloot et al. Erythropoietin-induced activation of STAT5 is impaired in the myelodysplastic syndrome *Blood* 89, 1690-700 (1997).
42. Fontenay-Roupie et al. Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. *Br J Haematol.* 106, 464-73 (1999).
43. Fontenay-Roupie et al. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood* 99, 1594-601 (2002).
44. Cortellezzi et al. Bone marrow glycophorin-positive erythroid cells of myelodysplastic patients responding to high-dose rHuEPO therapy have a different gene expression pattern from those of nonresponders. *Am J Hematol.* 83, 531-9 (2008).
45. Mittelman M et al. Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 20, 459-466 (1996).
46. Shimizu R et al. Dominant negative effect of a truncated erythropoietin receptor (EPOR-T) on erythropoietin-induced erythroid differentiation:

possible involvement of EPOR-T in ineffective erythropoiesis of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol* 27, 229-233 (1999).

47. Follo MY et al. Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1 methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 16811-6 (2009).

48. Follo MY et al. Nuclear inositide signaling in myelodysplastic syndromes. *J Cell Biochem.* 109, 1065-71 (2010).

49. Follo MY et al. Phosphoinositide-phospholipase C beta1 mono-allelic deletion is associated with myelodysplastic syndromes evolution into acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 27, 782-90 (2009).

50. Russell M et al. Expression of EVI1 in myelodysplastic syndromes and other hematologic malignancies without 3q26 translocations. *Blood.* 84, 1243-8 (1994).

51. Raza A et al. Arsenic trioxide and thalidomide combination produces multi-lineage hematological responses in myelodysplastic syndromes patients, particularly in those with high pre-therapy EVI1 expression. *Leuk Res.* 28, 791-803 (2004).

52. Ley TJ et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia N Engl J Med. 363, 2424-33 (2010).
53. Walter MJ et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia 25, 1153-8 (2011).
54. Tahiliani M et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science 324, 930-5 (2009).
55. Pastor WA et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. Nature 473, 394-397 (2011).
56. Metzeler KH et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 29, 1373-81 (2011).
57. Bejar R et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. N Engl J Med. 364, 2496-506 (2011).
58. Kosmider O et al. TET2 mutation is an independent favourable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). Blood. 114, 3285-91 (2009).

59. Ward PS et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 17, 225-34 (2010).
60. Dang L et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 465, 966 (2010).
61. Nikoloski G et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 42, 665-7 (2010).
62. Ernst T et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 42, 722-6 (2010).
63. Simon JA et al. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res*. 647, 21-9 (2008).
64. Shaffer LG et al. eds. *ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: S. Karger (2005).
65. Asou H et al. Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 77, 2031-2036 (1991).

66. Irish JM et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell* 118, 217-228 (2004).
67. Cheson BD et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood* 108, 419-425 (2006).
68. Pellagatti A et al. Gene expression profiles of CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: involvement of interferonstimulated genes and correlation to FAB subtype and karyotype. *Blood* 108, 337-345 (2006).
69. Kosmider O et al. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 24, 1094-1096 (2010).
70. Jasek M et al. TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia* 24, 216-219 (2010).
71. Spinelli E et al. Distinct signal transduction abnormalities and erythropoietin response in bone marrow hematopoietic cell subpopulations of myelodysplastic syndrome patients. *Clin Cancer Res.* 18, 3079-89 (2012).

72. Nimer SD. MDS: a stem cell disorder--but what exactly is wrong with the primitive hematopoietic cells in this disease? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 43-51 (2008).

73. Hellstrom-Lindberg E et al. A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. *Br J Haematol* 120, 1037-1046 (2003).

74. Mundle S et al. An assessment of erythroid response to epoetin alpha as a single agent versus in combination with granulocyte- or granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in myelodysplastic syndromes using a meta-analysis approach. *Cancer* 115, 706-715 (2009).

75. Ebert BL et al. An erythroid differentiation signature predicts response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome. *PLoS Med* 5, e35 (2008).

76. Pellagatti A et al. Identification of prognostic markers by gene expression profiling in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstract)* 298 (2010).

TABELLE SUPPLEMENTARI

Tabella 1. Valori di MFI indicanti l'attivazione basale nelle cellule CD34+.

CASE#/WHO	MFI P- ERK1/2	MFI P- STAT5	MFI P-p38	MFI CASP.3 cl.
1RA	1.5	2.4	3.6	2.2
2RA	1.2	2.3	4	4.5
3RCMD	1	2.7	1.7	2
4RCMD	1	1.5	3	1.8
5RA	1	1.5	3.8	2.2
6RA	1.3	2.8	2.7	3.2
7RAEB-1	1	3.5	3.2	9
8RA	1	2.8	3.8	3.2
9RA	3.5	5	5	5.5
10RARS	3.2	3.6	2.6	5
11RA	1.3	3	4.8	3.6
12RAEB-2	1	10.8	1.4	6
13RCMD	1.5	3.6	1.3	10
14RA	1	1.6	2	2.7
15 5q-	1	2.5	2	4.3
16RAEB-1	1	3	2.1	3.7
17RA	1	2.7	1	2
18RA	1	4.6	2.4	4
19RA	1	2.8	2	2.4
20RA	1	3.6	1.6	2.6
21RA	1	2.9	1	2.6
22RCMD	1	6.6	6.3	2.3
23RAEB-1	1	10.5	1	2.7
24RAEB-2	1	2.4	1.2	4.3
25RA	1	1.7	1	1.4
26RA	CD34+ NEGATIVE			
27RA	CD34+ NEGATIVE			
28RA	1	1.5	1	1.2
29RAEB-1	1	1	1	1
30RA	1	1.8	1	1
31RA	1	1.5	1	1

32RA	1	1	1	1
33CMML	1	1.7	1	1.2
34RCMD	1	2	1.4	1.8
35RAEB-2	1	1.3	1	1.4
36RAEB-1	CD34+ NEGATIVE			
37RCMD	1	1.2	1	1.3
38CMML	1	1.1	1	1.9
39RCMD	1	1	1	1
40RA	1	1	1	1.4
41RAEB-1	1	1.8	1.2	1.3
42RAEB-2	1	1	1	1.2
43RA	CD34+ NEGATIVE			
44RCMD	1	1.3	1	1.3
45RA	1	4.3	1	1.6
46RA	1	2.1	1.5	2.7
47RAEB-2	CD34+ NEGATIVE			
48RCMD	1	1.4	1	1.3
49RCMD	1	1.2	1	1.1
50RCMD	1	1.3	1	1.4
51RCMD	1	1.2	1	1
52MPL/MDS	1	1.6	1.1	1.3
53RA	1	1.8	1.2	2.5
54RAEB-1	1	5	1.3	1.5
55CMML-2	1.3	2.1	1.3	1.9
56RARS	1.2	1.6	1	1.3
57RA	1.2	1.7	1.4	1.4
58CMML	1.6	1.4	1.8	3
59RA	CD34+ NEGATIVE			
60CMML-2	1.4	2.3	1.5	1.1
1N	1	1	1	1.1
2N	1.1	1	1	1.1
3N	1.2	1.3	1.2	1.2
4N	1	1.1	1.1	1
5N	1.1	1.1	1	1.2
6N	1.1	1	1	1

Tabella 2. Valori di MFI indicanti l'attivazione basale nelle cellule CD45+.

CASE#/WHO	MFI P- ERK1/2	MFI P- STAT5	MFI P-p38	MFI CASP.3 cl.
16RAEB-1	1	1.9	1.2	1.5
17RA	1	3	1	1.3
18RA	1	5.1	1	3.6
19RA	1	2.4	1	2.7
20RA	1	2.9	1	2
21RA	1	3.8	1	1.9
22RCMD	1	1.8	1.8	1.8
23RAEB-1	1	2.6	1	1.8
24RAEB-2	1	2	1	2
25RA	1	1.1	1	1
26RA	1	1.6	1	1.9
27RA	1	1.3	1	1
28RA	1	1	1	1
29RAEB-1	1	1	1	1
30RA	1	2.8	1	1.3
31RA	1	1.8	1.2	1.9
32RA	1	1.2	1	1.3
33CMML	1	1.4	1	2.1
34RCMD	1	1.5	1	1.8
35RAEB-2	1	1.3	1	1.3
36RAEB-1	1	2.2	1.4	1.8
37RCMD	1	1.2	1	1.5
38CMML	1	1.1	1	1.2
39RCMD	1	1.4	1	1.7
40RA	1	1.2	1	1.3
41RAEB-1	1	1.9	1	1.4
42RAEB-2	1	1	1	1.2
43RA	1	1.2	1	1
44RCMD	1	1.3	1	1.3
45RA	1	3.8	1	1.8
46RA	1	2.6	1	2.4
47RAEB-2	1.1	1.4	1	1.4
48RCMD	1	2.2	1	1.5
49RCMD	1	1.4	1	1.1

50RCMD	1	1.9	1	1.6
51RCMD	1	1.2	1	1.2
52MPL/MDS	1	1.6	1	1.2
53RA	1	1.9	1	1.3
54RAEB-1	1	3	1.3	2.6
55CMML-2	1.3	2.2	1.2	2.2
56RARS	1	1.8	1	1.2
57RA	1	2.3	1.3	2.3
58CMML	1.5	1.9	1.7	1.8
59RA	1.1	1.5	1	1.4
60CMML-2	1.3	1.6	1.3	1.5
1N	1.1	1.1	1	1
2N	1	1.1	1.1	1.1
3N	1.1	1	1.6	1.3
4N	1	1.2	1	1.1
5N	1	1	1.1	1
6N	1	1	1	1

Tabella 3. Valori di MFI indicanti l'attivazione basale nelle cellule CD71+CD45-.

CASE#/WHO	MFI P- ERK1/2	MFI P- STAT5	MFI P-p38	MFI CASP.3 cl.
16RAEB-1	1	2.6	1	1.6
17RA	1	4	1	1
18RA	1	6.2	1	2.2
19RA	1	2.9	1	1.3
20RA	1	3.5	1	1.9
21RA	1	3.7	1	1.4
22RCMD	1	2.2	1.5	1.8
23RAEB-1	1	2.6	1	1.4
24RAEB-2	1	2.5	1	1.5
25RA	1	1.4	1	1
26RA	1	1.6	1	1
27RA	1	1.2	1	1
28RA	1	1.2	1	1.2
29RAEB-1	1	1.5	1	1.4
30RA	1	3	1	1.2
31RA	1	1.8	1	1.3
32RA	1	1	1	1
33CMML	1	1.3	1	1.2
34RCMD	1	1	1	1
35RAEB-2	1	1	1	1
36RAEB-1	1	2	1.2	1.3
37RCMD	1	1	1	1
38CMML	1	1	1.1	1.1
39RCMD	1	1.2	1	1
40RA	1	1	1	1
41RAEB-1	1	1.8	1	1.2
42RAEB-2	1	1.2	1	1
43RA	1	1	1	1
44RCMD	1	1.2	1	1
45RA	1	3.4	1	1.2
46RA	1	2	1	1.2
47RAEB-2	1	1.2	1.1	1.1
48RCMD	1	2.2	1	1
49RCMD	1	1.3	1.1	1.1

50RCMD	1	1.5	1	1
51RCMD	1	1	1	1
52MPL/MDS	1	2	1.3	1.3
53RA	1	2	1	1.2
54RAEB-1	1	2.3	1.1	1.2
55CMML-2	CD71+CD45- NEGATIVE			
56RARS	1.1	1.5	1.2	1.2
57RA	1	1.2	1.3	1.2
58CMML	1.1	1.5	1.3	1.2
59RA	CD71+CD45- NEGATIVE			
60CMML-2	1.3	1.3	1.1	1.2
1N	1.1	1.2	1	1.1
2N	1	1	1.1	1
3N	1	1	1	1
4N	1	1.1	1	1.2
5N	1	1	1.1	1.1
6N	1.1	1.1	1	1

Tabella 4. Valori di MFI indicanti l'attivazione di STAT5 nelle cellule CD71+CD45- dopo stimolazione con EPO.

CASE#/WHO	MFI stim/MFI unstim. P-STAT5
23RAEB-1	1
24RAEB-2	1
25RA	1.6
26RA	1
27RA	1
28RA	1.3
29RAEB-1	1
30RA	1
31RA	1
32RA	1.3
33CMML	1.5
34RCMD	2.5
35RAEB-2	1.3
36RAEB-1	1
37RCMD	1
38CMML	1
39RCMD	1
40RA	1.1
41RAEB-1	1.3
42RAEB-2	1
43RA	1
44RCMD	1.3
45RA	1
46RA	1
47RAEB-2	1.6
48RCMD	1
49RCMD	1.5
50RCMD	1
51RCMD	1.7
52MPL/MDS	1.4
53RA	1.2

54RAEB-1	1
55CMML-2	CD71+CD45-NEGATIVE
56RARS	1
57RA	1
58CMML	1
59RA	CD71+CD45-NEGATIVE
60CMML-2	2.2
1N	2.9
2N	2.1
3N	2.3
4N	2.4
5N	2.6
6N	2.8

Tabella 5. Valori di MFI e di incremento di emoglobina che indicano rispettivamente la risposta in vitro ed in vivo ad EPO.

CASE	MFI stim/MFIunstim. P-STAT5	EPO response in vivo Hb final-Hb initial
23RAEB-1	1	0
25RA	1,6	3,1
27RA	1	1,2
30RA	1	2,5
31RA	1	-0,9
32RA	1,4	3,1
35RAEB-2	1,3	2,8
36RAEB-1	1	0
37RCMD	1	0,1
39RCMD	1	0,6
40RA	1,1	-1,3
41RAEB-1	1,2	0
42RAEB-2	1	-2,8
43RA	1	0,2
45RA	1	0,8
46RA	1	0
48RCMD	1	2
49RCMD	1,5	2
50RCMD	1	0,2
52MPL/MDS	1,4	3
56RARS	1	0,3
57RA	1	1

Tabella 6. Valori di MFI indicanti l'attivazione di STAT5 e di ERK1/2 nelle cellule CD34+ dopo stimolazione con G-CSF.

CASE#/WHO	MFI stim/MFI unstim. P-STAT5	MFI stim/MFI unstim. P-ERK1/2
21RA	2.9	1.6
22RCMD	1.7	1
23RAEB-1	2.8	1.4
24RAEB-2	1.3	/
25RA	8.4	/
26RA	CD34+ NEGATIVE	
27RA	CD34+ NEGATIVE	
28RA	2	/
29RAEB-1	2.6	/
30RA	1.1	/
31RA	2	/
32RA	1.6	/
33CMML	3.3	/
34RCMD	6.1	/
35RAEB-2	2.3	/
36RAEB-1	CD34+ NEGATIVE	
37RCMD	1.6	/
38CMML	1.6	/
39RCMD	1.5	/
40RA	2.2	/
41RAEB-1	1.8	/
42RAEB-2	2.3	/
43RA	CD34+ NEGATIVE	
44RCMD	2.1	/
45RA	1.5	/
46RA	1.4	/
47RAEB-2	CD34+ NEGATIVE	
48RCMD	1.8	/
49RCMD	1.7	/
50RCMD	3	/

51RCMD	2.1	/
52MPL/MDS	2.4	/
53RA	1	/
54RAEB-1	4.7	/
55CMML-2	4	1.3
56RARS	10	1.8
57RA	6.8	1.6
58CMML	1.4	1.3
59RA	CD34+ NEGATIVE	
60CMML-2	4.4	1.2
1N	2.6	1.4
2N	2.3	1.4
3N	1.9	1.9
4N	2.7	1.3
5N	2.8	1.5
6N	2.1	1.4