



Università degli Studi di Udine

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE CLINICHE
CICLO XXIV**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**MECCANISMI EPIGENETICI ALLA BASE
DELL' ESPRESSIONE DEL GENE BAALC
NELLE LEUCEMIE ACUTE MIELOIDI**

Dottoranda:

Dott.ssa Alessandra Franzoni

Tutor:

Prof. Giuseppe Damante

Coordinatore:

Prof. F.S. Ambesi Impiombato

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Ad Aaron e Cristina

PREMESSA

In questi tre anni di Dottorato mi sono occupata principalmente di due argomenti: le neoplasie tiroidee ed i marcatori prognostici nelle leucemie acute mieloidi. Su quest'ultimo argomento ho voluto concentrare i miei studi, in particolare su *BAALC*, gene indicato come fattore prognostico negativo nelle leucemie acute mieloidi, ma di cui ancora poco si conosce in termini di regolazione dell'espressione.

Questa tesi rappresenta quindi un'indagine su come l'espressione aberrante di questo gene possa essere controllata da modificazioni epigenetiche, e di come queste ultime a loro volta possano essere trattate con i farmaci oggi a disposizione.

INDICE

SINOPSI	7
<u>CAPITOLO 1- INTRODUZIONE</u>	8
1. LA LEUCEMIA	8
1. 1 LA LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE	10
1.1.1 Definizione	10
1.1.2 Epidemiologia	10
1.1.3 Classificazione WHO	12
1.1.4 Eziopatogenesi	14
1.1.5 Clinica	15
1.1.6 Diagnosi	17
1.1.7 Sottotipi di LAM	22
1.2 FATTORI PROGNOSTICI	25
1.2.1 Caratteristiche cliniche	25
1.2.2 Secondarietà	25
1.2.3 Cariotipo e alterazioni citogenetiche	26
1.2.4 Mutazioni e alterazioni molecolari	29
1.3 DECORSO E PROGNOSI	32
1.3.1 Iperespressione della MDR	38
1.3.2 Espressione di CD34 e di CD56	39
1.4 TERAPIA	40
1.5 LAM CON CARIOTIPO NORMALE (LAM-NC)	41
1.6 <i>BAALC</i>	42
1.6.1 Il gene, RNA e proteina	42
1.7 EPIGENETICA	45
1.7.1 Significato	45
1.7.2 Modificazioni istoniche	45
1.7.3 La metilazione del DNA	47
1.7.4 I miRNA	48
1.8 EPIGENETICA E CANCRO	49
1.8.1 Modificazioni istoniche e cancro	50

1.8.2 Metilazione del DNA e cancro	52
1.8.3 miRNA e cancro	54
1.9 APPLICAZIONI CLINICHE: BIOMARKERS TUMORALI EPIGENETICI	55
1.9.1 Modificazioni istoniche e il “modello della marcatura bivalente”	55
1.9.2 La metilazione del DNA e cancro	57
1.9.3 miRNA nella diagnosi, classificazione e prognosi tumorale	58
1.10 APPLICAZIONI TERAPEUTICHE: LA FARMACOEPIGENETICA	58
<u>CAPITOLO 2- SCOPO DELLA TESI</u>	65
<u>CAPITOLO 3- MATERIALI E METODI</u>	66
3.1 PAZIENTI E LINEE CELLULARI	66
3.1.1 La casistica	66
3.1.2 Le linee cellulari	66
3.2 ESTRAZIONE DI RNA	66
3.3 RETROTRASCRIZIONE	67
3.4 REAL TIME-PCR	67
3.4.1 Approcci	68
3.4.1.1 I coloranti fluorescenti	68
3.4.1.2 Sonde sequenza-specifiche	69
3.4.2 Protocollo	72
3.4.3 Efficienza di amplificazione saggio RQ-PCR	73
3.4.3.1 Il metodo Livak o del $2^{-\Delta\Delta Ct}$	74
3.4.4 Espressione di <i>BAALC</i>	75
3.5 SAGGIO IMMUNOPRECIPITAZIONE ChIP	76
3.5.1 Protocollo ChIP	77
<u>CAPITOLO 4- RISULTATI</u>	80
4.1 <i>BAALC</i> risulta overespresso nei pazienti con leucemia acuta mieloide	80
4.2 Iperespressione del gene <i>BAALC</i> e variabili cliniche	82

4.3 Espressione di <i>BAALC</i> in linee cellulari leucemiche e identificazione del suo promotore putativo	85
4.4 Analisi in silico delle sequenze al 5' del gene <i>BAALC</i>	86
4.4.1 ARID3A	89
4.4.2 MZF1	93
4.5 Le modificazioni epigenetiche associate ai livelli di espressione del gene <i>BAALC</i>	97
4.6 Trattamento con inibitore delle HDAC	101
<u>CAPITOLO 5- DISCUSSIONE E PROSPETTIVE</u>	102
<u>CAPITOLO 6- BIBLIOGRAFIA</u>	106
<u>CAPITOLO 7-APPENDICE</u>	138
7.1 Pubblicazioni inerenti l'argomento della tesi	138
7.2 Pubblicazioni ottenute durante il dottorato e non inerenti l'argomento della tesi	139

SINOPSI

Le aberrazioni cromosomiche sono importanti fattori prognostici nelle leucemie acute mieloidi (LAM). Il 45% delle LAM *de novo* mancano di alterazioni cromosomiche e sono definite a cariotipo normale (NC).

Per le LAM-NC la caratterizzazione di nuovi markers molecolari risulta di estrema utilità al fine di individuare precocemente i pazienti ad alto rischio di ricaduta, potenzialmente candidati a strategie terapeutiche più intensive.

Tra i diversi marcatori prognostici delle LAM scoperti negli ultimi 10 anni ci siamo voluti concentrare sul gene *BAALC*. A causa della sua rilevanza come indice predittivo in diversi sottogruppi di leucemie, quali le LAM-NC, e di cui poco è riferito in letteratura, abbiamo voluto studiare più attentamente la sua espressione ed i meccanismi regolativi che stanno alla base di essa.

Dal momento che risulta noto che i meccanismi epigenetici, quali le modificazioni post-traduzionali degli istoni, possono svolgere un ruolo fondamentale in quella che è la regolazione dell'espressione genica, abbiamo analizzato alcune di queste modifiche a livello del promotore del gene *BAALC* in linee cellulari leucemiche. Utilizzando due linee cellulari leucemiche, Kasumi-6 e Kyo, abbiamo visto come esse dimostrino sia diversi livelli di mRNA di *BAALC*, sia profili distinti in termini di acetilazione H3K9K14, di trimetilazione H3K4 e di trimetilazione H3K23.

I nostri dati indicano che il gene *BAALC* nelle cellule leucemiche dunque risulta in uno stato "sospeso" e che la sua trascrizione può essere attivata o repressa da meccanismi che agiscono attraverso dei segnali di tipo epigenetico.

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1. LA LEUCEMIA

La parola leucemia deriva dal greco: leukos λευκός, "bianco" e aima αίμα, "sangue", letteralmente "sangue bianco" (Mosby, 1994). Quando si parla di leucemie si fa riferimento ad un gruppo di patologie neoplastiche monoclonali del sistema emopoietico originatesi da una singola cellula staminale pluripotente o multipotente mutata (Tura S. et al., 2007). La trasformazione neoplastica altera i meccanismi di proliferazione e differenziazione della cellula staminale. Ne conseguono la mancata maturazione della sua progenie e una proliferazione autonoma, da cui deriva l'accumulo di elementi immaturi, definiti blasti, principalmente nel midollo osseo, nel sangue periferico e, talvolta, in altri organi e tessuti. Vi è dunque l'immissione in circolo di cellule, mature o immature, appartenenti alla linea mieloide, linfoide o ad entrambe (leucemie ibride)(Baccarani M e Tura S, 2007).

La distinzione tra mieloide e linfoide non si basa quindi sull'origine cellulare della neoplasia ma piuttosto sul fenotipo, inteso come l'insieme delle caratteristiche morfologiche, immunologiche e molecolari, della popolazione leucemica.

A determinare queste caratteristiche concorrono sia il livello differenziativo della cellula colpita dalla trasformazione neoplastica, sia il mantenimento o la soppressione della capacità differenziativa e maturativa della cellula trasformata.

Su quest'ultima differenza si basa la distinzione tra le leucemie, sia mieloidi che linfoidi, in *acute* e *croniche*.

Le acute si caratterizzano per infiltrazione dei tessuti emopoietici ed extraemopoietici da parte di linee cellulari monomorfe senza chiaro orientamento maturativo (blasti), ad esordio improvviso e con decorso aggressivo, invasione del midollo osseo (dolori ossei, sindrome anemica, infettiva, emorragica). Le forme croniche hanno un decorso lento e si caratterizzano per la proliferazione di cellule più differenziate, molto simili ai normali costituenti.

Le forme acute si distinguono in:

- a) *leucemie linfoidi* (LAL), a forme “comuni”, “nulle”, di tipo B, pre B e T cellulari;
- b) *leucemie mielodi* (LAM) o non linfoidi (LANL), caratterizzate dalla proliferazione di blasti originati dalla linea granulo-emonocitopoietica, con decorso grave (es. leucemia acuta mieloblastica, promielocitica, mielocitica, monolitica, eritorleucemica) (Hoffman R, 2008).

Le forme croniche si suddividono invece in:

- a) *leucemia mieloide cronica*, che nell'85% dei casi presenta un marker cromosomico, il cromosoma Philadelphia;
- b) *leucemia linfatica cronica*, ad andamento lento, dell'anziano e con sopravvivenza attorno ai 4-6 anni;
- c) *leucemia a cellule capellute* o “*hairy*”, una forma che si caratterizza per la presenza di cellule provviste di villi citoplasmatici, le “*hairy cells*” appunto, probabilmente di natura B-linfoide e presentanti immunoglobuline di superficie. Il quadro clinico di questa forma è sovrapponibile a quello delle altre forme croniche;
- d) *leucemia prolinfocitica*, disordine linfoproliferativo a decorso subacuto caratterizzato dalla proliferazione di linfociti che si accumulano nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici. Colpisce maggiormente i soggetti anziani (65-70 anni) e di sesso maschile (M/F: 1/4) (Hoffman R, 2008).

1.1 LA LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE

1.1.1 Definizione

Le leucemie mieloidi, anche dette sindromi mieloproliferative o leucemie non-linfoidi, possono distinguersi in acute, subacute e croniche sulla base del decorso e della durata di malattia (Kasper D. et al., 2008); a tale distinzione correlano determinate caratteristiche biologiche. Infatti, a differenza di quanto accade nelle sindromi mieloproliferative croniche, nella patologia acuta la trasformazione neoplastica altera i meccanismi che regolano la proliferazione e la differenziazione della cellula staminale, impedendo la maturazione della sua progenie). Tale blocco maturativo esita nell'accumulo, primariamente nel midollo e nel sangue periferico e secondariamente in altri organi e tessuti, di cellule blastiche mieloidi che proliferano autonomamente, senza meccanismi di controllo e senza differenziazione (Tura S et al., 2007).

Suddetti blasti non sono in grado di dare origine a cellule mieloidi mature, quali granulociti, eritrociti, monociti e piastrine; tuttavia, essi conservano alcune caratteristiche morfologiche, citochimiche ed immunofenotipiche normalmente espresse dai precursori della linea mieloide, e ciò permette nella maggioranza dei casi di individuare la linea mielopoietica di appartenenza del clone leucemico, e di stabilire pertanto se la leucemia produca una popolazione di tipo mieloblastica, monoblastica, eritroblastica o megacarioblastica.

1.1.2 Epidemiologia

La leucemia mieloide acuta (LAM) è una patologia relativamente rara, con un'incidenza di 4,4 ogni 100.000 uomini e di 3,4 ogni 100.000 donne ogni anno (AIRT Working Group, 2006). Nonostante possa manifestarsi anche in età infantile e giovanile, è una malattia neoplastica prevalentemente dell'età avanzata e l'età mediana dei pazienti alla diagnosi è compresa tra i 60 e 65 anni (Tura S et al., 2007). Rappresenta circa il 90% delle leucemie acute dell'adulto, mentre è relativamente infrequenti nel bambino (Jemal A et al., 2002).

Da un punto di vista biologico, clinico e soprattutto prognostico, la LAM deve essere suddivisa in tre categorie (Tura S et al., 2007):

- *LAM “de novo”*
- *LAM “secondaria ad esposizione nota ad agenti leucemogeni”*
- *LAM “secondaria ad una precedente sindrome mielodisplastica”*

Le *LAM “de novo”* compaiono acutamente in soggetti per i quali non è dimostrabile un'esposizione significativa ad agenti leucemogeni e si caratterizzano per una prognosi migliore rispetto alla LAM secondarie (Tura S. et al., 2007). Tra le *LAM “secondarie ad esposizione nota ad agenti leucemogeni”*, rivestono particolare importanza quelle che insorgono come complicanza tardiva di trattamento con chemioterapia e/o radioterapia per altra neoplasia (Swerdlow SH et al., 2008).

I farmaci maggiormente chiamati in causa sono gli agenti alchilanti, caratterizzati da un intervallo di latenza tra esposizione e insorgenza relativamente lungo (5-10 anni), e con minor frequenza gli inibitori delle topoisomerasi II (1-5 anni di latenza)(Yin CC et al., 2008).

Lo sviluppo di neoplasie ematologiche in seguito all'esposizione a tali terapie è il risultato del combinarsi di diversi fattori, quali: l'effetto mutageno diretto di tali agenti citotossici, la presenza di un microambiente midollare inefficace a svolgere il suo ruolo a causa del danno vascolare e della fibrosi prodotte dalla terapia, l'instabilità genetica, l'immunosoppressione, una predisposizione genetica del soggetto e infine la tendenza di tali agenti a dar luogo a mutazioni estese del genoma con alterazioni cromosomiche multiple e complesse (Yin CC et al., 2008). La prognosi di tali patologie è pertanto più sfavorevole rispetto alle *LAM “de novo”* (Manuscript A, 2009). Anche per quanto concerne le *LAM “secondarie ad una precedente sindrome mielodisplastica”*, la secondarietà della malattia è indice di prognosi negativa (Tura S et al., 2007).

Le sindromi mielodisplastiche costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie neoplastiche mieloidi ad evoluzione subacuta, accomunate

da una clinica legata alla pancitopenia e da un'evoluzione, in tempi più o meno rapidi, in una LAM (Sanz GF et al., 1989).

1.1.3 Classificazione WHO

La recente classificazione delle LAM fornita dalla World Health Organization (2008), riportata in Tabella 1, ha messo in luce come siano presenti, in un numero sempre maggiore di casi, anomalie molecolari genetiche o alterazioni citogenetiche ricorrenti che permettono di considerare queste entità clinico-genetico-patologiche in un unico gruppo, le "LAM con anomalie genetiche ricorrenti" (Swerdlow SH et al., 2008; Vardiman JW et al., 2009) *Tabella 1- Classificazione WHO 2008.*

ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH RECURRENT GENETIC ABNORMALITIES
AML with t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL with t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i>
AML with t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
AML with t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Provisional entity: AML with mutated NPM1</i>
<i>Provisional entity: AML with mutated CEBPA</i>
ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH MYELOYDYSPLASIA-RELATED CHANGES
THERAPY-RELATED MYELOID NEOPLASMS
ACUTE MYELOID LEUKEMIA, NOT OTHERWISE SPECIFIED (NOS)
Acute myeloid leukemia with minimal differentiation
Acute myeloid leukemia without maturation
Acute myeloid leukemia with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Acute erythroid leukemia (<i>Pure erythroid leukemia; Erythroleukemia, erythroid/myeloid</i>)
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis (syn.: acute myelofibrosis; acute myelosclerosis)
MYELOID SARCOMA (SYN.: EXTRAMEDULLARY MYELOID TUMOR; GRANULOCYTIC SARCOMA; CHLOROMA)
MYELOID PROLIFERATIONS RELATED TO DOWN SYNDROME
Transient abnormal myelopoiesis (syn.: transient myeloproliferative disorder)
Myeloid leukemia associated with Down syndrome
BLASTIC PLASMACYTOID DENDRITIC CELL NEOPLASM
ACUTE LEUKEMIAS OF AMBIGUOUS LINEAGE
Acute undifferentiated leukemia
Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranged
Mixed phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS
Mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS
<i>Provisional entity: Natural killer (NK)-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma</i>

Oltre a quelle riportate in Tabella 1, altre alterazioni genetiche ricorrenti che coinvolgono l'espressione di *RAR α* dovrebbero essere tenute in considerazione, quali ad esempio t(11;17)(q23;q12) *ZBTB16-RAR α* , t(11;17)(q13;q12) *NUMA1-RAR α* , t(5;17)(q35;q12) *NPM1-RAR α* ed AML con *STAT5BRAR α* (quest' ultima avente il cromosoma 17 normale)(Döhner H et al., 2010). Anche per quanto riguarda *MLL* sono riportate ulteriori traslocazioni ricorrenti, quali ad esempio t(6;11)(q27;q23) *MLLT4-MLL*, t(11;19)(q23;p13.3) *MLLMLLT1*, t(11;19)(q23;p13.1) *MLL-ELL* e t(10;11)(p12;q23) *MLLT10-MLL* (Döhner H et al., 2010).

Vengono raggruppate all'interno della categoria "*LAM con anomalie mielodisplastico-correlate*" le LAM in cui (1) esiste una precedente storia di sindrome mielodisplastica (MDS) o di neoplasia mielodisplastica/ mieloproliferativa (MDS/MPN) che evolve in LAM con una conta di blasti nel midollo o nel sangue periferico maggiore o uguale al 20%; (2) sono presenti anomalie citogenetiche mielodisplastico-correlate; oppure (3) se più del 50% degli elementi in 2 o più linee cellulari sono displastiche.

Le alterazioni genetiche mielodisplastico-correlate sono: un cariotipo complesso (3 o più anomalie cromosomiche) o particolari alterazioni, quali $_7$ o del(7q); $_5$ o del(5q); i(17q) o t(17p); $_13$ o del(13q); del(11q); del(12p) o t(12p); del(9q); idic(X)(q13); t(11;16)(q23;p13.3); t(3;21)(q26.2;q22.1); t(1;3)(p36.3;q21.1); t(2;11)(p21;q23); t(5;12)(q33;p12); t(5;7)(q33;q11.2); t(5;17)(q33;p13); t(5;10)(q33;q21); t(3;5)(q25;q34)(Döhner H et al., 2010).

Le "*neoplasie mieloidi terapia-relate*" sono un'entità distinta ed unica all'interno della classificazione: infatti, poiché la maggioranza dei pazienti sottoposti a chemioterapia per precedente neoplasia ha ricevuto plurimi trattamenti, sia con agenti alchilanti sia con inibitori delle topoisomerasi, non è possibile distinguere le due categorie in sottogruppi differenti (Swerdlow SH et al., 2008; Vardiman JW et al., 2009; Yin CC et al., 2010).

I "*disordini mieloproliferativi correlati alla sindrome di Down*" nella classificazione WHO del 2008 sono stati categorizzati come una entità distinta.

1.1.4 Eziopatogenesi

I fattori responsabili dello sviluppo della LAM, e più in generale delle leucemie, non sono del tutto noti. Risulta dato certo che l'abitudine voluttuaria al fumo determini un rischio aumentato di sviluppo di leucemie rispetto alla popolazione dei non-fumatori, soprattutto per quanto riguarda le leucemie mieloidi (Lichtman MA, 2007).

In assenza di una chiara eziopatogenesi, è importante stratificare la popolazione generale in gruppi che presentano un aumentato rischio di insorgenza di tali patologie. I fattori di rischio riconosciuti sono:

- l'esposizione cronica al benzene (Khalade A et al., 2010), per esposizioni annuali pari o superiori ai 10 p.p.m. I lavoratori che entrano maggiormente in contatto con la suddetta sostanza sono gli addetti alle raffinerie ed alle industrie manifatturiere. Inoltre l'esposizione a vernici, ossido di etilene, erbicidi e pesticidi sembrano essere fortemente associati (Kasper D et al., 2008);
- l'esposizione alle radiazioni ionizzanti, ad alte dosi e per tempi brevi. Sembra che un'esposizione di lunga durata ed a basse dosi, quale ad esempio la radioterapia per carcinoma dell'utero, non provochi l'aumento di incidenza di leucemie (Tura S et al., 2007); tuttavia esistono evidenze di un aumentato rischio dello sviluppo di LAM in seguito a terapia radiante per carcinoma della mammella (Manuscript A, 2009);
- una storia di precedente chemioterapia e/o terapia immunosoppressiva; come già riportato, i farmaci maggiormente presi in causa sono gli agenti alchilanti (melphalan e ciclofosfamide) e gli inibitori delle topoisomerasi II. I primi si associano con maggiore frequenza ad anomalie citogenetiche quali un cariotipo complesso o la delezione del cromosoma 5 o 7 (Beau et al., 1996; Zhao N et al., 1997; Rowley JD et al., 2002). I difetti cromosomici più frequentemente associati alla terapia con inibitori delle topoisomerasi II sono invece traslocazioni a carico delle bande 11q23 e 21q22 (Olney HJ et al., 2002); a differenza di quanto avviene per gli agenti alchilanti, le LAM che si sviluppano in seguito a tale trattamento solo raramente sono precedute da una sindrome mielodisplastica e inoltre tendono ad una migliore risposta alla terapia di induzione (Ratain MJ et al., 1992).

Più recentemente anche altri farmaci, quali analoghi delle purine (fludarabina) ed immunosoppressori (azitromicina), sono stati chiamati in causa come fattori predisponenti allo sviluppo di una LAM (Manuscript A, 2009). Inoltre si è reso evidente come sia la dose totale del farmaco somministrata e sia le modalità di somministrazione rivestano un importante ruolo nell'incremento del rischio di sviluppo di una LAM (Tura S et al., 2007);

- una precedente diagnosi di sindromi mieloproliferative croniche, quali la leucemia mieloide cronica (LMC)(Hackanson B et al., 2009), la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (TE)(Thepot S et al, 2010), o di sindromi mielodisplastiche (Sanz GF et al., 1989);
- sindromi con aneuploidia cromosomica delle cellule somatiche, come la sindrome di Down (Webb DKH, 2005), la sindrome di Klinefelter e la sindrome di Patan, e malattie genetiche caratterizzate da eccessiva fragilità cromatinica, come l'anemia di Fanconi, la sindrome di Bloom e la sindrome di Kostmann (Kasper D et al., 2008).

1.1.5 Clinica

La maturazione abortiva che caratterizza le cellule neoplastiche della LAM comporta sostituzione del parenchima emopoietico midollare da parte di blasti immaturi e, di conseguenza, insufficiente e difettiva produzione di cellule ematiche mature. La clinica si caratterizza dunque per la presenza di sintomi e di segni legati all'insufficienza midollare, cioè alla mancata produzione di cellule ematiche mature quali globuli rossi, globuli bianchi e piastrine.

I sintomi che più spesso si riscontrano sono pertanto astenia, cardiopalmo e dispnea, secondari all'anemia; la neutropenia (riduzione del numero dei granulociti neutrofili) si manifesta soprattutto con infezioni opportunistiche, batteriche e virali che interessano principalmente cavo orale, orofaringe, apparato respiratorio e cute.

La piastrinopenia è causa di svariate manifestazioni emorragiche quali porpora, ecchimosi, epistassi, gengivorragia, disturbi del visus causati dalle emorragie retiniche, ipermenorrea e metrorragia, macroematuria, emorragie del tratto gastro-intestinale, fino ad arrivare alle più gravi emorragie a localizzazione nel sistema nervoso centrale. L'aumentata

suscettibilità alle infezioni è causata dalla ridotta presenza in circolo di granulociti neutrofili; tali infezioni, di origine soprattutto batterica, tendono a localizzarsi a livello del tratto respiratorio superiore ed inferiore, al cavo orale ed a livello cutaneo. Il paziente può risultare positivo agli esami colturali, sia del sangue che di altri fluidi corporei, oppure può avere una forma di infezione febbrile meno localizzabile e non documentabile. Sintomi sistemici quali febbre, dolori muscolari, calo ponderale e sudorazioni profuse, legati alla liberazione di citochine da parte dei blasti, possono completare il quadro clinico.

Tutti questi sintomi e segni possono presentarsi insieme o singolarmente, e con gradi diversi di gravità: è importante ricordare come il quadro d'esordio di una LAM sia molto variabile, potendo passare da situazioni subdole e di difficile riconoscimento a condizioni di gravi emorragie, importante anemia e quadri settici. L'insufficienza midollare non è l'unica fonte di problematiche nel paziente leucemico, essendo le cellule neoplastiche in grado di espandersi ed infiltrare altri tessuti od organi non emopoietici e potendo causare la liberazione di mediatori chimici dell'infiammazione, sia da parte dei blasti stessi, sia andando ad attivare le cellule dei sistemi linfatico e monocitomacrofagico. meccanismi danno luogo a sintomi generali, quali febbre, dolori osteo-muscolari, astenia, sudorazioni profuse, calo ponderale e, dal punto di vista obiettivo, seppur rari, epato-splenomegalia, linfadenomegalia ed interessamento di cute e sistema nervoso, centrale e periferico (Tura S et al., 2007; Kasper D et al., 2008). Pazienti affetti da alcuni sottotipi citologici di LAM manifestano, all'esordio o durante il decorso di malattia, caratteristiche cliniche particolari che possono essere di aiuto nel sospetto diagnostico e nella prevenzione di alcune complicanze. In particolare, la LAM promielocitica M3 si presenta tipicamente con un quadro caratterizzato da emorragie estese ed importanti. Tale citotipo, infatti, si associa sempre ad una sindrome da coagulazione intravasale disseminata (CID), condizione causata dalla liberazione di materiale tromboplastinico da parte delle cellule leucemiche e considerata una vera e propria emergenza ematologica, potendo portare a morte il paziente in pochi giorni (Stein E et al., 2009; Sanz MA e Montesinos P, 2010). Un altro citotipo a presentazione particolare è la LAM

monoblastica M5, la quale, caratterizzandosi per un elevato potenziale proliferativo con grande espansione della massa neoplastica, tende a manifestarsi con epato-splenomegalia, linfadenomegalia, infiltrazione cutanea e gengivale ed interessamento del SNC (Tura S et al., 2007). Il paziente affetto da LAM megacarioblastica M7 si presenta generalmente all'esordio con una clinica grave, caratterizzata da anemia, piastrinopenia e neutropenia gravi; l'aspirato midollare esita in una punctio sicca e pertanto risulta necessario il ricorso ad una biopsia osteomidollare, la quale tipicamente mostra un quadro di fibrosi marcata (Gassmann W e Löffler H, 1995).

1.1.6 Diagnosi

La diagnosi di LAM si esegue esaminando il sangue periferico e il midollo osseo del paziente. Dal punto di vista laboratoristico l'emocromo evidenzia generalmente un'anemia normocromica e normocitica, di grado variabile, ed una piastrinopenia, solitamente di grado moderato o severo.

Il numero dei globuli bianchi è estremamente variabile: non sono infrequenti le forme leucopeniche, ma generalmente si riscontra una leucocitosi, anche di grado elevato (valori superiori a 100.000/mm³).

Nel soggetto sano i leucociti circolanti sono: granulociti neutrofilii (50-70%), eosinofili (1-3%) e basofili (0-2%), linfociti (20-40%) e monociti (3-8%). Nelle LAM una parte dei leucociti circolanti è costituita da blasti mieloidi, talora rari (meno del 10%), molto più spesso predominanti (dal 50 al 100%)(Tura S et al., 2007).

L'esame dello striscio di sangue periferico al microscopio ottico consente di evidenziare la presenza dei blasti circolanti. Il midollo osseo appare generalmente ipercellulato, con una quota di cellule blastiche per definizione superiore al 20% della cellularità totale, spesso superiore all'80-90%. Una volta confermata la presenza di cellule immature in circolo, diventa necessario riconoscere la loro linea di appartenenza; l'esame morfologico dei blasti circolanti può già dare indicazioni sul tipo di leucemia, ma l'esame indispensabile al fine di identificare le caratteristiche morfologico-fenotipiche delle cellule è l'esame del midollo. Tale esame va sempre eseguito su materiale

ottenuto tramite agoaspirato midollare; si rende necessaria l'esecuzione della biopsia osteomidollare solamente nel caso in cui l'aspirato esiti in una punctio sicca (Döhner H et al., 2010). Lo striscio periferico e l'aspirato midollare vengono esaminati morfologicamente utilizzando le colorazioni di May Grunwald-Giemsa o di Wright-Giemsa, tenendo presente che, al fine di considerare tali metodiche appropriate, è raccomandabile la presenza di almeno 200 leucociti allo striscio periferico e di almeno 500 cellule nucleate all' aspirato midollare (Fig.1) (Vardiman JW et al., 2009). Nelle LAM la cellularità del midollo è quasi sempre aumentata con infiltrazione di grado variabile del tessuto emopoietico da parte delle cellule blastiche; la base per la diagnosi è costituita dal riconoscimento di caratteristiche fenotipiche mieloidi nei blasti leucemici (Fig. 2). La diagnosi differenziale con una leucemia acuta linfoide viene eseguita nel 90% dei casi su base morfologica (Tura S et al., 2007), grazie ad una somma di criteri cui fa capo la presenza di granulazioni citoplasmatiche, presenti nelle LAM ed assenti nelle LAL.

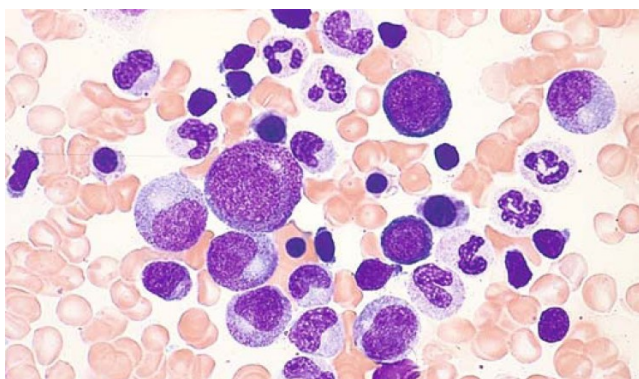


Fig 1: Cellule nel midollo normale.

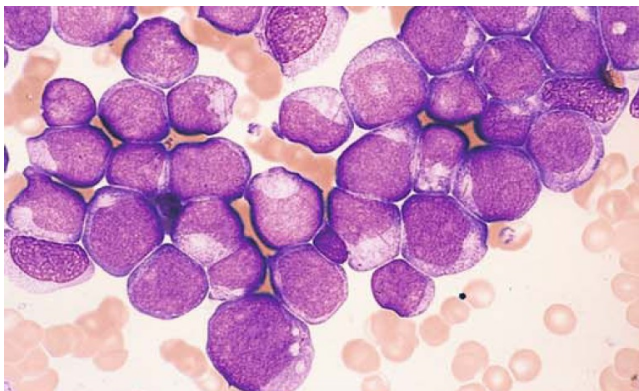


Fig 2: Blasti morfologicamente indifferenziati nel midollo di un paziente LAM.

La certezza diagnostica si basa sull'identificazione dei caratteri fenotipici mieloidi dei blasti: tale riconoscimento avviene principalmente su criteri morfologici (riscontro di granulazioni citoplasmatiche nei blasti al microscopio ottico), citochimici (reazione positiva alle perossidasi e alle esterasi) ed immunofenotipici (espressione di specifici marcatori di membrana) (Tura S et al., 2007).

La citochimica utilizza le reazioni mieloperossidasi (MPO), Sudan Nero (SBB) ed esterasi non-specifica (NSE). La positività per MPO (quando presente nel 3% dei blasti) indica differenziazione mieloide; tuttavia la sua assenza non esclude l'appartenenza a tale linea in quanto i mieloblasti e monoblasti giovani potrebbero esserne ancora privi. Lo stesso concetto è valido per SBB che però è meno specifica. NSE risulta positiva in presenza di monoblasti (80% positiva) e di monociti (20% positiva). Nella leucemia eritroblastica acuta, la colorazione con l'acido periodico di Schiff (PAS) permette di individuare grandi granuli PAS-positivi (Döhner H et al., 2010). Per quanto riguarda l'immunofenotipizzazione, la citofluorimetria a flusso multiparametrica permette di individuare, mediante anticorpi monoclonali, la presenza di antigeni o di determinanti antigenici (di membrana e intracellulari) associati ad un particolare citotipo leucemico (Tabella 2); tale tecnica fornisce un utile supporto alla diagnosi ma riveste grande importanza anche in fase di monitoraggio della terapia e nella valutazione della malattia residua minima (Craig FE e Foon K, 2008). Inoltre, l'immunofenotipizzazione è richiesta per fare diagnosi di LAM con differenziazione minima, LAM megacarioblastica e leucemia di differenziazione ambigua (Swerdlow SH et al., 2006). Le LAM con differenziazione minima non possono essere diagnosticate tramite metodi morfologici o citochimici; nella maggior parte dei casi esprimono antigeni precoci emopoiesi-associati (ad esempio CD34, CD38 e HLA-DR) mentre sono carenti dei comuni markers di maturazione mieloide e monolitica (Bennett JM et al., 1991). Nella leucemia acuta megacarioblastica, il 50% o più tra le cellule blastiche è caratterizzato da una differenziazione di tipo megacariocitico; i megacarioblasti esprimono tipicamente una o più tra le glicoproteine piastriniche CD41, CD61 e, più raramente, CD42. Le leucemie con differenziazione ambigua sono leucemie rare che comprendono i casi in cui non c'è

evidenza di differenziazione (*Acute Undifferentiated Leukemia-AUL*) ed i casi in cui vengono espressi markers tipici di diverse linee differenziative (*Mixed Phenotype Acute Leukemia-MPAL*). Le AUL esprimono frequentemente HLA-DR, CD34 e/o CD38, mentre non esprimono markers lineage-associati. Le MPAL possono essere costituite da diverse popolazioni neoplastiche di linee differenti oppure da un'unica popolazione blastica esprimente markers di linee differenziative diverse sulle stesse cellule, oppure comprendere entrambi i costituenti (Tabella 2) (Döhner H et al., 2010).

MARKERS DIAGNOSTICI DELLE LAM	
Precursori emopoiesi	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Linea granulocitaria	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cMPO
Linea monocitaria	NSE, CD11c, CD14, CD64, lisozima, CD4, CD11b, CD36
Linea megacariocitaria	CD41, CD61, CD42
Linea eritroide	Glicoforina A
MARKERS UTILI NELLA DIAGNOSI DI MPAL	
Linea mieloide	MPO oppure differenziazione monocitaria (almeno 2 markers di tale linea)
Linea linfocitaria B	CD19 (strong) con almeno uno dei seguenti: CD79a, cCD22, CD10, oppure CD19 (weak) con almeno 2 dei seguenti: CD79a, cCD22, CD10
Linea linfocitaria T	CD3, citoplasmatico o di superficie

Tabella 2- Markers diagnostici della LAM.

Alcune LAM con anomalie genetiche ricorrenti si associano a caratteristiche immunofenotipiche precise, ad esempio la LAM con t(8;21) esprime frequentemente il marker linfoide CD19 o in minor misura CD7 e CD56 (Kita K et al., 1992; Adriaansen HJ et al., 1993), con inv(16) frequentemente esprimono il marker T-lineage-associato CD2 (Adriaansen HJ et al., 1993); le LAM con mutazione di *NPM1* tipicamente esprimono alti livelli di CD33 ma bassi o assenti livelli di CD34 (Falini B et al., 2005). L'analisi citogenetica e la biologia molecolare hanno acquisito grande importanza nella caratterizzazione

e nella prognosi delle leucemie acute mieloidi; il riscontro di forti associazioni tra quadri citomorfologici ed aspetti citogenetici ha permesso di individuare anomalie ricorrenti cromosomiche e molecolari aventi un forte impatto sulla prognosi e sul trattamento del paziente. Ne consegue che l'analisi citogenetica convenzionale sia un passo obbligatorio nella valutazione diagnostica di un paziente con sospetta LAM (Döhner H et al., 2010). Alterazioni cromosomiche si riscontrano in circa il 55% delle LAM dell'adulto (Grimwade D et al., 2001; Mrózek K et al., 2007); tra queste, sette vengono classificate dalla WHO come "LAM con anomalie genetiche ricorrenti". Inoltre, diverse anomalie citogenetiche vengono considerate sufficienti al fine di fare diagnosi di "LAM con caratteristiche mielodisplastico-correlate" in concomitanza di un quadro midollare leucemico. Nel caso in cui l'analisi citogenetica convenzionale non dovesse rivelare risultati diagnostici, si considera necessario ricorrere all'analisi citogenetica molecolare tramite metodica FISH: tra le indagini di maggior rilievo vengono ricercati riarrangiamenti genetici, quali ad esempio RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11 e la fusione di MLL e EVI1, oppure la perdita di materiale cromosomico di 5q e 7q (Fröhling S et al., 2002; Lugthart S et al., 2008). Un aspirato midollare ed un campione di sangue periferico dovrebbero essere sottoposti regolarmente ad analisi molecolare, tramite estrazione dell' RNA ed esecuzione di RT-PCR, al fine di ricercare mutazioni genetiche ricorrenti dei geni *NPM1*, *CEBPA* e *FLT3*; tuttavia, la ricerca di tali geni non viene considerata obbligatoria e risulta raccomandata solo nei casi in cui la LAM si presenti normale dal punto di vista citogenetico (LAM-NC)(Döhner H et al, 2010). Il quadro citogenetico e molecolare risulta sempre di fondamentale importanza per seguire il decorso di malattia, permettendo di individuare le fasi di remissione completa, le fasi di ricaduta e l'eventuale comparsa di nuove anomalie.

In conclusione, la diagnosi di LAM prevede il riscontro allo striscio periferico o all'esame dell'aspirato di un numero di blasti fenotipicamente mieloidi in misura superiore al 20% della cellularità totale. Mieloblasti, monoblasti e megacarioblasti vengono inclusi nella conta delle cellule blastiche; nella LAM con differenziazione monocitica

o mielomonocitica, i monoblasti ed i promonociti (ma non i monociti anomali) vengono considerati equivalenti di cellule blastiche.

Gli eritroblasti vengono contati tra le cellule blastiche solo nel raro caso in cui si tratti di una leucemia eritroblastica pura. In assenza del riscontro di tale percentuale a livello midollare o periferico, ed in presenza di sospetto clinico fondato, ulteriori indagini di tipo citogenetico e molecolare possono aiutare nel porre diagnosi. Infatti anomalie ricorrenti quali t(15;17), t(8;21), inv(16) o t(16;16) ed alcuni casi di differenziazione eritroide vengono considerate diagnostiche anche in presenza di popolazioni blastiche inferiori al 20% (Döhner H et al, 2010).

1.1.7 Sottotipi di LAM

Il sistema di classificazione delle LAM si basa sulla morfologia delle cellule blastiche ed è conosciuto come sistema FAB (French American British) (Bennett JM et al., 1991). Questa classificazione identifica otto differenti sottotipi di LAM (da M0 a M7) in base alla linea differenziativa prevalente della popolazione leucemica e alla soppressione, completa o parziale, della capacità maturativa del clone neoplastico (Tabella 3). In tale contesto, il ruolo dell' immunofenotipizzazione è variabile a seconda del sottotipo differenziativo della popolazione neoplastica (Koreth J et al., 2009). Nella LAM M1 i blasti, oltre a mostrare reattività per CD45 (marcatore immunologico non-lineage) e per i comuni markers mieloidi CD13 e CD33, per la mieloperossidasi citoplasmatica e per CD34, manifestano elevata risposta per CD38 e per antigeni HLA-DR. I marcatori CD45, CD13, CD33, HLA-DR e MPO7 risultano positivi anche nella LAM M2, pertanto ciò che la distingue dal sottotipo M1 è la presenza di una maggior complessità strutturale che consente di attribuire alle cellule neoplastiche un più alto grado di maturazione. La LAM M3 presenta una maggiore omogeneità di espressione di CD13 e CD33, mentre CD34 risulta molto ridotto o assente e HLA-DR risulta sempre assente; costante è la presenza degli antigeni CD117 e MPO, più variabile quella di CD15, CD2, CD9 e CD56 (Tura S et al., 2007; Lewis RE et al., 2007). Il clone neoplastico della LAM M4 presenta marcatori della linea monocitaria (CD14) e granulocitaria

(CD15), oltre ad esprimere gli antigeni mieloidi CD13 e CD33 e, solo per quanto riguarda le cellule più immature, CD34; risultano inoltre positivi per antigeni HLA-DR e per il lisozima. La LAM M5 presenta blasti fenotipicamente associabili alla linea monocitaria il cui marcatore immunologico più rappresentativo risulta CD33; sono quindi spesso negativi per il CD14 che viene presentato usualmente dai monociti maturi. La reattività per CD64, CD4, CD11b e per il lisozima è di riscontro comune (Tura S et al., 2007). Nel sottotipo LAM M6 è osservabile un'importante eterogeneità cellulare, comprendente elementi immaturi mieloidi, precursori eritroidi ed eritroblasti, determinando una parallela eterogeneità nella caratterizzazione immunofenotipica: i blasti mieloidi esprimono maggiormente CD13, CD33, CD34, CD117 e MPO mentre gli eritroblasti risultano positivi per CD42, CD71, CD36 e per la glicoforina A (Zuo Z et al., 2010). Gli antigeni caratteristicamente espressi dagli elementi cellulari della LAM M7 sono quelli appartenenti alla linea megacariocitaria, ovvero CD41, CD61 e CD36, mentre spesso risultano negativi i marcatori mieloidi (Gassmann W e Löffler H, 2009).

TIPO		%	MORFOLOGIA	IMMUNOFENOTIPO
M1	Mieloblastica senza maturazione	18	Blasti (tipo I e II) >90%	CD13, CD33, MPO7, CD38, HLA-DR, CD45
M2	Mieloblastica con maturazione	35	Blasti (tipo I e II) <90% PMC, MC, MMC e PMN >10%. Cell. monocitarie <20%	CD13, CD33, MPO7, CD38, HLA-DR, CD45
M3	Promielocitica tipica	9	Blasti ipergranulati tipo PMC con bastoncelli di Auer	CD13, CD33, MPO7, CD117
	Microgranulare	1	Blasti con nuclei fogliacei bi- o multilobati, con fini granuli. Rari blasti ipergranulati	CD13, CD33, MPO7, CD117
M4	Mielomonoblastica	20	Blasti (tipo I e II) e altre cell. granulocitarie più mature <80%	CD13, CD33, CD14, CD15
M5a	Monoblastica senza maturazione	7	Monoblasti >80%	CD13, CD33
M5b	Monoblastica con maturazione	6	Monoblasti, pro monociti e monociti >80%	CD14, CD13, CD33
M6	Eritroblastica	3	Eritroblasti >50% e blasti (tipo I e II) >30% delle cell. non eritroidi	CD42, CD71, CD36
M7	Megacariocitica	1	Blasti (tipo I e tipo linfoide) >30%, marcata mielofibrosi	CD41, CD61, CD36

Tabella 3- Classificazione FAB delle LAM.

Oltre ai particolari aspetti immunofenotipici appena descritti, vi sono anche alcune alterazioni citogenetiche ricorrenti che correlano frequentemente ad aspetti citomorfologici della popolazione blastica e che possono pertanto risultare utili nella sua caratterizzazione. L'alterazione cromosomica con la più stretta associazione con un particolare citotipo FAB è la $t(15;17)(q22;q11-q12)$, la quale genera un clone neoplastico di tipo promielocitico (LAM M3)(Rowley J e Olney HJ, 2002). Il punto di rottura sul cromosoma 17 è stato localizzato a livello del gene per il recettore α per l'acido retinoico, mentre il punto di rottura sul cromosoma 15 è situato all'interno di un nuovo gene chiamato *PML* (promyelocitic); tale traslocazione produce sempre il trascritto chimérico neoplastico *PML-RAR α* . Un'altra anomalia genetica ricorrente è la $t(8;21)(q22;q22)$, traslocazione che correla nel 90% dei casi con una LAM M2 e nel restante 10% con una LAM M4; i pazienti con LAM M2 presentano la suddetta traslocazione nel 30% dei casi. Il gene di fusione generatosi dalla traslocazione produce un trascritto denominato *AML1/ETO* (Peterson LF, 2007). L' $inv(16)(p13q22)$ è associata dal punto di vista citomorfologico ad un citotipo FAB M4 con incremento degli elementi eosinofili spesso atipici per la commistione di granulazioni basofile ed eosinofile. E' presente nell'8% di tutti i pazienti affetti da LAM e nel 25% circa dei pazienti con LAM M4; il prodotto di trascrizione dell'inversione pericentrica del cromosoma 16 è denominato *CBF β /MYH11* (Reilly JT, 2005). Tuttavia, le anomalie che più frequentemente si associano alla LAM mielomonoblastica M4 e monoblastica M5 sono alterazioni a carico del cromosoma 11 ed in particolare a livello di q23: $t(9;11)(p21;q23)$, $t(6;11)(q27;q23)$, $t(1;11)(q21;q23)$, $t(10;11)(1;q23)$ e $t(11;19)(q23;p13)$; le alterazioni coinvolgenti la banda 11q23 sono più tipiche dell'età pediatrica e neonatale, possono associarsi ad altre patologie ematologiche (ad esempio ad alcune forme di leucemia acuta linfoblastica) e coinvolgono la trascrizione del gene *MLL-1*, anche chiamato *ALL-1* (Tamai H e Inokuchi K, 2010). Esistono numerose alterazioni cromosomiche più o meno frequenti, tra cui ricordiamo la monosomia del cromosoma 7 e la delezione o monosomia del cromosoma 5, entrambe correlate a peggiorata terapia, soprattutto con agenti alchilanti, che tuttavia non

risultano associate ad un particolare sottotipo citologico (Beau MM et al., 1996; Zhao N et al., 1997).

1.2 FATTORI PROGNOSTICI

Le leucemie acute mieloidi sono caratterizzate da una prognosi severa a variabile, in base alle caratteristiche cliniche della malattia e agli aspetti biologici della popolazione leucemica (Tura S et al., 2007).

1.2.1 Caratteristiche cliniche

a) *Età*: pazienti di età avanzata hanno una prognosi sfavorevole. Ciò è legato sia all'impossibilità di approcci terapeutici aggressivi per la frequente presenza di comorbidità, sia all'elevata incidenza di forme leucemiche secondarie a preesistenti patologie ematologiche (mielodisplasie e sindromi mieloproliferative croniche), caratterizzate da elevata chemio-resistenza.

b) *Iperleucocitosi*: i casi in cui si riscontra, alla diagnosi, un numero di globuli bianchi superiori a 30.000/mm³ sono caratterizzati da una prognosi più severa. Ciò sembra essere legato ad una massa neoplastica di maggiori dimensioni, come evidenziato anche da alcuni lavori che hanno correlato un decorso peggiore in pazienti con splenomegalia ed elevati livelli sierici di lattico-deidrogenasi, considerati marcatori di "tumour burden".

1.2.2 Secondarietà

Le LAM secondarie a una precedente mielodisplasia o ad una sindrome mieloproliferativa cronica risultano avere una prognosi peggiore rispetto alle LAM insorte *de novo*. Ciò è legato ad una maggiore chemio-resistenza ed a un'incrementata incidenza di anomalie citogenetiche con significato prognostico negativo (in particolare i cariotipi complessi).

1.2.3 Cariotipo e alterazioni citogenetiche

Le alterazioni citogenetiche a carico dei blasti leucemici possono essere numeriche (trisomie, monosomie) e/o strutturali (traslocazioni, delezioni, inserzioni). In base alla presenza o assenza di anomalie cromosomiche e al tipo e numero di tali alterazioni, si possono dividere i pazienti in tre gruppi di rischio (alto, intermedio e basso) (Grimwade D et al., 1998; Slovak M et al., 2000; Tallman MS et al., 2005), con diverse percentuali di remissione completa (RC), condizione caratterizzata dalla scomparsa delle cellule leucemiche e dalla normalizzazione del quadro ematologico periferico e midollare, e di sopravvivenza totale ("Overall Survival"-OS) ovvero il tempo che intercorre tra la diagnosi e la morte per qualsiasi causa (Tallman MS, 2005).

L'incidenza di anomalie citogenetiche alla diagnosi varia tra 50% il 60% nelle casistiche più numerose (Mrózek K e Bloomfield C, 2006).

Le anomalie citogenetiche con significato prognostico positivo sono:

- *traslocazione (15;17) (q22;q21)*: è caratteristica della leucemia mieloide acuta a promielociti (M3). Il punto di rottura sul cromosoma 17 si trova all'interno del gene che codifica per la subunità α del recettore per l'acido retinoico ($RAR\alpha$), mentre il punto di rottura sul cromosoma 15 è all'interno del gene *PML* (promyelocytic leukemia). Il gene *RAR* codifica per una proteina che funziona come recettore nucleare per gli acidi retinoici, elementi necessari alla maturazione in senso mieloide.

La mutazione *PML/RAR α* rende la cellula insensibile all'azione dell'acido retinoico presente a concentrazioni fisiologiche in circolo, con conseguente blocco della maturazione cellulare ed accumulo di precursori displastici (promielociti).

L'uso di sonde molecolari specifiche per le sequenze $RAR\alpha$ e *PML* permette l'identificazione del riarrangiamento nel 100% dei casi di leucemia acuta a promielociti (M3), incluse alcune varianti citomorfologiche e vari casi che, apparentemente, non hanno la traslocazione $t(15;17)$.

La leucemia acuta a promielociti si manifesta quasi invariabilmente con una CID (Coagulazione Intravasale Disseminata) causata dal materiale tromboplastinico liberato dalle cellule leucemiche, con sindrome

emorragica estesa e severa che può portare all'exitus del paziente in pochi giorni. Una diagnosi tempestiva di LAM M3 (*PML/RAR α* +) è fondamentale per iniziare tempestivamente la terapia.

Il trattamento consiste nella somministrazione combinata di dosi farmacologiche di acido all-transretinoico (ATRA), che induce la maturazione dei promielociti leucemici, e di un'antraciclina. La terapia determina una remissione completa, anche citogenetica e molecolare, in più del 90% dei casi (Tura S et al., 2007).

- *traslocazione (8;21) (q22;q22)*: è presente nel 10-12% dei pazienti con LAM: l'80% di queste ha una morfologia mieloblastica (M2) e spesso si riscontra un incremento della quota basofila nel sangue periferico. Colpisce spesso i giovani, con un'età mediana di insorgenza attorno ai 25-30 anni, ed è più frequente nei bambini rispetto agli adulti. Il meccanismo molecolare è rappresentato dalla fusione di parte del gene *AML1* (localizzato sul cromosoma 8) con parte del gene *ETO* (localizzato sul cromosoma 21). Il gene *AML1* codifica per la subunità α di un fattore trascrizionale dimerico denominato "core binding factor" (CBF) e il prodotto di fusione interferisce con la normale attività di *AML1*.

Le LAM t(8;21) positive hanno un'alta percentuale di remissioni complete ed una sopravvivenza mediana relativamente lunga.

In oltre il 50% dei casi tale traslocazione si associa ad altre alterazioni del cariotipo, tra le quali la perdita del cromosoma sessuale (-X, -Y), la delezione del braccio lungo dei cromosomi 9 e 7 (9q- e 7q-) e la trisomia del cromosoma 8. La presenza di alterazioni addizionali non sembra apportare modificazioni al significato prognostico della t(8; 21) (Tura S et al., 2007).

- *inversione pericentrica del cromosoma 16 (p13 q22)*: è una alterazione associata in circa il 90% dei casi alla leucemia mielomonoblastica (M4) con elevata presenza nel midollo e nel sangue di precursori eosinofili spesso atipici per la concomitante presenza granulazioni eosinofile e basofile. I rimanenti casi hanno altri citotipi, ma tutti presentano un'atipica eosinofilia. E' presente in circa l'8% di tutti i pazienti con LAM e circa nel 25% dei casi di M4. Coinvolge sul 16q il gene *CBF β* , che codifica per la subunità β del "core binding factor" e sul 16p il gene *MYH11*, codificante la catena pesante della

miosina del muscolo liscio. La traslocazione interferisce con la normale attività trascrizionale della cellula, con conseguente blocco della maturazione.

Le anomalie cromosomiche con significato prognostico negativo sono:

- *anomalie dei cromosomi 5 e 7*: si trovano con maggior frequenza nei pazienti che sviluppano una leucemia secondaria a progressa chemioterapia con agenti alchilanti. Non sono specificatamente associate a un singolo citotipo FAB. Sul braccio lungo del cromosoma 5 si trovano numerosi geni che codificano per fattori di crescita dell'emopoiesi e per i loro recettori. I pazienti, generalmente di età avanzata, ottengono raramente una remissione completa che è generalmente di breve durata (Tura S et al, 2007).

Le delezioni, le traslocazioni e le monosomie di tali cromosomi tendono a essere associate ad altre alterazioni.

- *alterazioni del cromosoma 11 (banda q23)*: la prima alterazione descritta fu la traslocazione (9; 11) (p22; q23) in pazienti con citotipo M5a. Successivamente diverse traslocazioni coinvolgenti la banda 11q23 e altri cromosomi furono associate a casi di LAM M5. Studi citogenetici e molecolari hanno dimostrato traslocazioni dell'11q23 con almeno altre 20 bande cromosomiche. Le anomalie più frequenti sono: t(9;11) (p21;q23), t(6;11) (q27; q23), t(1;11) (q21; q23), t(10; 11) (p11; q23), t(11; 19) (q23; p13).

Sul cromosoma 11q23 è stato identificato un gene chiamato *MLL* o *ALL1* che codifica per un fattore trascrizionale altamente conservato nelle cellule eucariotiche. Il punto di rottura su tale gene non è unico, ma spazia dall'esone 5 all'esone 12. Indipendentemente dal punto di rottura *MLL* perde la regione di controllo, con conseguente disregolazione dell'attività trascrizionale.

Le alterazioni di *MLL* sono frequenti in età pediatrica e neonatale, ma si riscontrano anche in leucemie secondarie post-terapia.

- *alterazioni del braccio lungo del cromosoma 3 (3q)*: comprendono l'inversione (q21q26), la traslocazione (3;3) (q21;q26) e l'inserzione (5;3) (q14;q21q26). La frequenza di queste alterazioni non supera il 3-4% dei casi di LAM. E' presente un numero relativamente alto di piastrine che si associa a un aumento del numero di

megacariociti nel midollo, molti dei quali morfologicamente atipici con presenza in alcuni casi di microcariociti.

- *traslocazione (6; 9) (p23; q33)*: è relativamente rara (1-2% delle LAM). È stata descritta nei citotipi M1, M2, M4, spesso con basofilia. Di solito si tratta di pazienti precedentemente esposti ad agenti mielotossici. Insorge più spesso nei giovani con un'età mediana di insorgenza di circa 30 anni. La prognosi è sfavorevole e le anomalie addizionali sono rare (Tura S et al., 2007).

- *traslocazione (9; 22) (q34; q11) o cromosoma Philadelphia*: si tratta della traslocazione patognomonica della leucemia mieloide cronica (LMC), ma si ritrova anche nel 20-25% delle leucemie acute linfoblastiche (LAL) dell'adulto, mentre è estremamente rara nelle LAM (1-2%) dove ha un significato prognostico negativo. Si associa spesso ad altre alterazioni, tra cui la monosomia del cromosoma 7 e la delezione del braccio lungo del cromosoma 5.

Le alterazioni numeriche o strutturali possono essere presenti singolarmente o, più spesso, associate. Quando sono presenti in un singolo clone neoplastico in un numero superiore o uguale a tre si parla di cariotipo complesso.

1.2.4 Mutazioni e alterazioni molecolari

Le mutazioni o l'iperespressione di specifici geni tra i quali *FLT3* (Fröhling S et al., 2002; Tallman MS et al., 2005), *CEBPA* (Marcucci G et al., 2005), *NPM1* (Schittger S et al., 2005), *BAALC* (Baldus C et al., 2003), *BAX* e *Bcl-2* (Lowenberg B et al., 2003; Tallman MS et al., 2005), *cKIT* (Lück SC et al., 2010) e *WT1* (Schmid D et al., 1997) sono altri fattori prognostici delle LAM, non associati a specifiche alterazioni del cariotipo.

Tra questi è ormai noto il ruolo delle mutazioni del gene *FLT3* (*Fms-Like Tyrosine 3*) in tutti i sottogruppi di pazienti con LAM. Questo gene è localizzato sulla banda cromosomica 13q12 e codifica per una proteina di membrana appartenente alla famiglia dei recettori tirosin-kinasi di classe terza, coinvolta nei processi di regolazione della proliferazione, differenziazione ed apoptosi dei progenitori emopoietici (Thiede C et al., 2002; Beran M et al., 2004; Zheng R et al., 2004).

La duplicazione di *FLT3-ITD* (*Internal Tandem Duplication*) è tra le mutazioni geniche più frequenti nelle LAM, specialmente nei pazienti con t(15;17) e in quelli con cariotipo normale (28-38% dei casi) (Schnittger S et al., 2002; Zheng R et al., 2004; Reindl C et al., 2006). Altri due tipi di mutazioni puntiformi sono state riportate nel gene *FLT3*: quelle localizzate all'interno del loop di attivazione del dominio tirosin-kinasi (TKD), presenti anche nel 5-14% dei pazienti con cariotipo normale (Stirewalt DL et al., 2004; Grundler et al., 2005), e quelle localizzate nel dominio juxtamembrana (JMD), la cui incidenza è del 2% in tutti i pazienti con LAM (Choudhary C et al., 2005; Wadleigh M et al., 2005).

FLT3-ITD provoca l'allungamento del dominio juxtamembrana (JMD) della proteina (Smith BD et al., 2004): ne deriva la trascrizione di una proteina anomala che provoca la dimerizzazione del recettore, con autofosforilazione ed attivazione costitutiva dello stesso e conseguente attivazione delle varie vie intracellulari di trasmissione del segnale che regolano la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza della cellula (O'Farrell AM et al., 2003; Stone RM et al., 2005).

Il gene *CEBPA* (*CCATT/Enhancer Binding Protein Alfa*) è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19 (19q13) e codifica per una proteina che agisce come fattore di trascrizione coinvolto nella differenziazione granulocitaria dei progenitori mieloidi. Questo gene è mutato nel 4-15% dei pazienti con sottotipi di LAM M1 e M2 (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S et al., 2003).

Il 50% delle mutazioni coinvolge l'N-terminale della proteina e provoca o la trascrizione di una proteina tronca non funzionale, o l'aumento dell'espressione della sua isoforma inattiva, mentre l'altra metà delle mutazioni coinvolge il C-terminale e dà origine a una proteina incapace di legarsi al DNA o inattiva (Fröhling S et al., 2004). I primi studi clinici hanno dimostrato che le mutazioni di *CEBPA* si associano a una sopravvivenza più lunga in tutti i pazienti inclusi quelli appartenenti al gruppo a rischio intermedio (Preudhomme C et al., 2002; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S et al., 2003). Studi successivi, limitati a soggetti con cariotipo normale, i quali presentano mutazioni di *CEBPA* nel 15-19% dei casi, hanno confermato il suo significato prognostico positivo (Fröhling S et al., 2004; Bienz M et al., 2005).

Benché la presenza di mutazioni di *CEBPA* non modifichi la probabilità di ottenere una remissione completa (Fröhling S et al, 2004; Bienz M et al., 2005) né la sua durata, la sopravvivenza (sia quella libera da malattia sia quella totale) sono significativamente più lunghe nei pazienti con mutazioni del gene. Questo riscontro si spiega con il fatto che la presenza della proteina mutata facilita l'azione di alcuni chemioterapici fase-specifici come la citarabina (Fröhling S et al., 2004).

Il gene *NPM1* è coinvolto in traslocazioni cromosomiche ricorrenti in alcune leucemie e linfomi quali la t(2;5) nel linfoma anaplastico a grandi cellule, e la t(3;5) nelle LAM (Morris SW et al., 1994; Redner RL et al., 1996). Esso codifica per una fosfoproteina, la nucleofosmina (NPM), localizzata prevalentemente nei nucleoli, che svolge una funzione di "shuttle" tra nucleo e citoplasma. NPM previene l'aggregazione delle proteine nel nucleo e regola l'assemblaggio e il trasporto delle molecole pre-ribosomiali attraverso la membrana nucleare (Falini B et al., 2005).

Le mutazioni di *NPM1* sono tra quelle più frequenti nei soggetti con LAM-NC, infatti ricorrono nel 46-62% dei casi (Döhner et al., 2005; Falini B et al., 2005; Schittger S et al., 2005; Thiede C et al., 2006) e risultano confinate a livello dell' esone 12 (Falini B et al., 2007), con rare eccezioni consistenti nel coinvolgimento dell'esone 11 (Albiero E et al., 2007; Pitiot AS et al., 2007) e dell'esone 9 (Mariano AR et al., 2006). Ad oggi, sono state identificate circa 40 diverse mutazioni ed esse tendono ad essere stabili (Suzuki T et al., 2005; Chou WC et al., 2006), in quanto la perdita delle mutazioni alla ricaduta è estremamente rara e talvolta associata a un cambiamento del cariotipo da normale a non normale (Suzuki T et al., 2005; Chou WC et al., 2006). L'interazione delle mutazioni di *NPM1* con altre alterazioni genetiche nei soggetti LAM-NC risulta particolarmente interessante, in quanto in questi pazienti, la mutazione *FLT3-ITD* si presenta con un'incidenza doppia rispetto ai soggetti con *NPM1* normale. A tal proposito, le mutazioni in *NPM1* sono molto probabilmente degli eventi primari, ovvero precedenti all'acquisizione della mutazione in *FLT3-ITD* o di altre mutazioni (Thiede C et al., 2006). Le proteine NPM mutanti si caratterizzano per una localizzazione aberrante a livello di citoplasma:

dal momento che *NPM1* è un oncosoppressore, una mutazione che modifica la sua localizzazione all'interno della cellula potrebbe essere implicata nella trasformazione maligna delle cellule (Falini B et al., 2005).

Diversi studi hanno messo in evidenza come i pazienti con mutazioni di *NPM1* e senza mutazioni *FLT3-ITD* raggiungano più facilmente una remissione completa, e abbiano una sopravvivenza libera da malattia e una sopravvivenza totale più lunghe, mentre la presenza di mutazioni di *NPM1* non modifica la prognosi sfavorevole dei pazienti portatori di mutazioni *FLT3-ITD* (Döhner K et al., 2005; Thiede C et al., 2006).

Dunque mutazioni a livello di *NPM1* rappresentano un fattore prognostico positivo in termini di incremento della durata delle remissioni complete e del prolungamento della sopravvivenza globale (Falini B et al., 2005).

1.3 DECORSO E PROGNOSI

Tra gli elementi utili nel definire il rischio di malattia si annoverano fattori prognostici sia clinici che biologici. Alcuni fattori clinici sono univocamente condivisi: è stabilito che l'età avanzata del paziente alla diagnosi, la mancata risposta al ciclo di chemioterapia di induzione e la secondarietà di malattia siano condizioni sfavorevoli. I pazienti di età superiore ai 60 anni presentano fattori biologici sfavorevoli, spesso non possono essere sottoposti a chemioterapia ad alte dosi ed inoltre presentano comorbidità che rendono ancor più difficile la gestione del trattamento (Appelbaum FR et al., 2006; Juliusson G et al., 2009). Questi pazienti frequentemente non sono in grado di tollerare le complicanze della chemioterapia e di conseguenza hanno un aumentato rischio di morte durante l'induzione. Nei pazienti più giovani è stata invece osservata una percentuale di remissione completa (RC) dell'85% ed una sopravvivenza a 5 anni del 38% (Burnett AK et al., 2010). Più in generale, la mancata risposta alla terapia di induzione, come anche la presenza di una LAM secondaria (Larson RA, 2007), suggeriscono che ci troviamo di fronte ad una malattia resistente, difficilmente trattabile con terapie convenzionali. Altri fattori prognostici

clinici sono: il numero di blasti circolanti, surrogato di grande massa leucemica (considerando sfavorevole la presenza di un numero superiore ai 30.000/mm³)(Burnett AK et al., 1999; Martin G et al., 2000; Nguyen S et al., 2002), l'infiltrazione neoplastica di tessuti extramidollari (epato-splenomegalia) e la presenza di alti livelli sierici di LDH all'esordio (Dalley CD et al., 2001).

Per quanto riguarda i fattori prognostici biologici, un ruolo dominante è svolto dal cariotipo (Grimwade D et al., 1998 e 2001). Circa il 10-20% delle LAM presenta anomalie citogenetiche sfavorevoli, come ad esempio la delezione del cromosoma 7, la monosomia o delezione del cromosoma 5, anomalie del cromosoma 3 oppure un cariotipo complesso; solitamente si tratta di pazienti anziani, spesso con una storia alle spalle di sindrome mielodisplastica o di trattamenti chemioterapici. La probabilità di ottenere una RC in tali pazienti non supera il 60% e la loro aspettativa di vita è del 10% a 5 anni; proprio a causa di una così bassa risposta alle terapie convenzionali, l'avvio di codeste persone ad un allotrapianto in prima RC è considerato un approccio ragionevole (Koreth J et al., 2009). Alterazioni ricorrenti quali t(15;17), t(8;21) e inv(16) hanno invece carattere favorevole caratterizzandosi per una buona prognosi con una percentuale di RC superiore al 90% ed una sopravvivenza a 5 anni di almeno il 65%.

Più complesso risulta il discorso che riguarda le traslocazioni coinvolgenti il gene *MLL* della banda 11q23: il carattere sfavorevole di tali anomalie è condizionato dal tipo di gene di fusione che si viene a creare, anche se nella maggioranza dei casi si tratta di alterazioni che conferiscono una cattiva prognosi al paziente (Balgobind BV et al., 2009; Krauter J et al., 2009; Grimwade et al., 2010). La traslocazione t(9;22) che determina la formazione del gene di fusione *BCR-ABL* è compresa tra le anomalie sfavorevoli (Cuneo A et al., 1996) e, allo stesso modo, la traslocazione t(6;9)(p23;q34) che conduce alla formazione di *DEK-NUP214*, sembra essere associata ad una prognosi severa (Grimwade D et al, 2009), probabilmente a causa della forte associazione con la presenza di *FLT3-ITD* (Thiede C et al., 2002).

Dal punto di vista immunofenotipico, sono considerate a prognosi peggiore le LAM in cui le cellule blastiche presentano in superficie

antigeni particolari (ad esempio CD34 e CD56 contemporaneamente) o antigeni appartenenti a lineage sia mieloide che linfoide oppure che iperesprimono proteine correlate alla resistenza ai farmaci, soprattutto la glicoproteina Pgp, che determina l'estrusione dei chemioterapici dall'ambiente intracellulare (Kern W et al., 2010).

Cariotipo e immunofenotipo non sono gli unici fattori biologici importanti da valutare al momento della diagnosi al fine di inquadrare il possibile decorso di malattia. Un ruolo importante, soprattutto per quanto riguarda i pazienti a cariotipo normale (circa il 40% delle LAM), è svolto dalla biologia molecolare (Estey H, 2010). Come già precedentemente riportato, diverse mutazioni genetiche e fenomeni di de-regolazione dell'espressione di alcuni geni sono stati identificati come meccanismi leucemogeni; oltre a svelare l'enorme eterogeneità genetica-molecolare appartenente ad alcuni sottotipi di LAM, in particolar modo nelle LAM-NC, l'individuazione di tali anomalie genetiche ha permesso l'osservazione di una correlazione tra la loro presenza ed una probabile evoluzione di malattia, e quindi di un loro valore prognostico (Mrózek K et al., 2007 e 2009; Döhner K et al., 2008; Mardis ER et al., 2009).

I principali geni deputati a questo scopo sono *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* e *BAALC*. Tramite studio del RNA e mediante tecniche immunoistochimiche su biopsia ossea, è possibile individuare rispettivamente la mutazione del gene *NPM1* e la delocalizzazione citoplasmatica della proteina NPM. Mutazioni di *NPM1* sono frequentemente associate ad alcune alterazioni genetiche ricorrenti, ad anomalie cromosomiche secondarie come ad esempio +8, +4, del(9q) (Haferlach C et al., 2009), e a mutazioni genetiche aggiuntive, in particolar modo di *FLT3* (Mrózek K et al., 2007; Döhner K et al., 2008; Schlenk RF et al., 2008) e *IDH1* (Metzeler KH et al., 2009; Schlenk et al., 2009; Boissel N et al., 2010; Paschka P et al., 2010; Schnittger S et al., 2010; Wagner et al., 2010). I diversi studi compiuti in proposito hanno anche dimostrato come mutazioni del gene *NPM1* senza la contemporanea presenza di *FLT3*-ITD correlino ad alte probabilità di RC e ad un outcome favorevole (Mrózek K et al., 2007; Döhner K et al., 2008; Schlenk RF et al., 2008), determinando l'inclusione di tale patologia tra le LAM con fattori di rischio genetici favorevoli (Döhner K

et al., 2008). In considerazione dell'alta frequenza di suddetta mutazione e della buona prognosi riscontrata in sua presenza, risulterebbe razionale la sua ricerca in tutti i soggetti, anche in quelli più anziani; in questi ultimi infatti permetterebbe di predire un miglior outcome per il paziente e di valutare la possibilità di intraprendere un regime chemioterapico convenzionale intensivo (Büchner T et al, 2009; Schlenk et al, 2009; Becker et al, 2010).

Per quanto concerne il gene *CEBPA*, sono stati identificati due tipi di mutazione nei pazienti affetti da LAM, la prima a livello della regione N- e l'altra della regione C-terminale. In circa due terzi dei casi si tratta di mutazioni bialleliche, ovvero doppie mutazioni, sia N- che C-terminali (Koschmieder S et al., 2009). Le mutazioni di *CEBPA* si associano più frequentemente ad un cariotipo normale oppure possono correlarsi a delezioni del9q (Döhner K et al., 2008); per quanto riguarda i casi con cariotipo normale, la mutazione di *CEBPA* risulta spesso associata ad un outcome di malattia favorevole (Döhner K et al., 2008; Mrózek K et al., 2007; Schlenk RF et al., 2008). Tuttavia, gli ultimi studi hanno dimostrato come solamente la doppia, e non la singola, mutazione di *CEBPA* sia un fattore prognostico positivo (Koschmieder S et al., 2009). Attualmente le mutazioni dei geni *NPM1* e *CEBPA* costituiscono un'entità patologica provvisoria nella classificazione WHO (2008), in attesa di un chiarimento circa il ruolo patogenetico di tali geni. Di un valore prognostico negativo è invece stata investita la presenza di *FLT3-ITD*. L'inserzione della *ITD* è riscontrabile in circa il 20% di tutte le LAM e si trova più comunemente a livello del dominio iuxtamembrana della proteina, mentre nel 30% dei casi è presente a livello del dominio tirosin-chinasico (Breitenbuecher F et al., 2009). Quando trattati con chemioterapia convenzionale, i pazienti con cariotipo normale e mutazione *FLT3-ITD* hanno una prognosi significativamente peggiore rispetto ai pazienti con cariotipo normale privi di tale mutazione; sebbene attualmente esistano evidenze sull'effetto benefico del trapianto allogenico in tale popolazione (Schlenk RF et al., 2008; Döhner H et al., 2010), risulta necessario approfondire, tramite ulteriori studi clinici, l'effettiva validità di tale approccio.

BAALC (*Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic*), gene che verrà descritto in uno specifico capitolo, è frequentemente iperespresso in caso di trisomia 8, ma alti livelli sono stati evidenziati anche in presenza di cariotipo normale; tale dato viene considerato predittivo di una scarsa probabilità di remissione completa e di una minor sopravvivenza sia libera da malattia sia assoluta (Baldus CD et al., 2003; Langer C et al., 2008).

Tutte le altre mutazioni genetiche identificate nelle LAM non sono ancora entrate a far parte della pratica clinica e rimangono in fase di studio. Tra queste la mutazione di *KIT*, gene codificante per una tirosin-chinasi di classe III (Bullinger et al., 2004; Paschka P et al., 2008); nella maggior parte degli studi la sua mutazione è stata associata ad un più sfavorevole outcome (Lück SC et al., 2010), ma al momento non vi sono dati che supportino l'utilizzo della valutazione dello status di *KIT* ai fini della scelta terapeutica.

Mutazioni di *IDH1* e *IDH2* sono state identificate inizialmente nel glioma, e solo più recentemente nella LAM (Boissel N et al., 2010; Marcucci G et al., 2010; Paschka P et al., 2010; Schnittger S et al., 2010; Wagner K et al., 2010). Questi due geni codificano per enzimi, rispettivamente citosolico e mitocondriale, catalizzanti la decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato a chetoglutarato, rivestendo pertanto un ruolo fondamentale nella difesa cellulare contro gli stress ossidativi (Ward PS et al., 2010). Le mutazioni riguardanti questi geni sono abbastanza frequenti, potendosi rilevare nel 15-20% di tutte le LAM e nel 25-30% delle LAM a cariotipo normale. Recenti studi dimostrano come alcune mutazioni di *IDH1*, e probabilmente anche di *IDH2*, si associno in maniera significativa a mutazioni di *NPM1* e come tale associazione sia indicativa di un peggiore outcome (Marcucci G et al., 2007; Boissel N et al., 2010; Paschka P et al., 2010; Wagner K et al., 2010); la possibilità di raggiungimento della remissione completa di malattia risulta ridotta anche nel caso di mutazione *IDH1/IDH2* non associata ad altre anomalie (Marcucci G et al., 2007; Boissel N et al., 2010; Paschka P et al., 2010).

Il gene *WT1*, fattore di trascrizione coinvolto nei processi di regolazione del ciclo cellulare, è mutato nel 10-13% delle LAM a cariotipo normale (Paschka P et al., 2008; Virappane P et al., 2008),

ma la sua rilevanza prognostica è contraddittoria, essendo i risultati degli studi in merito discordanti (Virappane P et al., 2008; Gaidzik VI et al., 2009). Mutazioni del gene *RUNX1*, anch'esso fattore di trascrizione con ruolo decisivo nell'emopoiesi, si sono riscontrate nel 13% delle LAM de novo non-M3 (Tang JL et al., 2009), soprattutto in associazione con alcune aberrazioni cromosomiche (trisomia 21 e trisomia 13) e, dal punto di vista morfologico, con la LAM indifferenziata M0; il suo valore prognostico è ancora sotto studio, tuttavia gli attuali risultati suggeriscono l'associazione della mutazione di *RUNX1* con una minor probabilità di remissione completa ed una più bassa sopravvivenza.

Il gene *MLL* codifica per una proteina legante il DNA responsabile della regolazione dell'espressione genica nell'emopoiesi, probabilmente tramite meccanismi epigenetici; una sua mutazione, in particolare una Partial Tandem Duplication (*PTD*), è riscontrabile nel 5-11% delle LAM a cariotipo normale e più frequentemente in caso di trisomia del cromosoma 11 (Mrózek K et al., 2007; Döhner K e Döhner H., 2008). La *MLL-PTD* contribuisce al processo di leucemogenesi attraverso l'ipermetilazione del DNA ed il silenziamento epigenetico dei geni oncosoppressori, ponendo pertanto in questione il potenziale ruolo della DNA-metiltransferasi e/o degli inibitori dell'istone-deacetilasi nel trattamento di questo sottotipo di LAM (Mrózek K et al., 2007).

Il valore prognostico di *MLL-PTD* è ancora oggi controverso: in alcuni studi tale alterazione risulta correlata ad una più breve durata della RC e ad un minor periodo libero da malattia mentre, in analisi più recenti, Non vi è ancora dimostrazione circa un possibile impatto prognostico di *MLL-PTD* in pazienti con cariotipo normale trattati con trapianto autologo o con più cicli di consolidamento (Mrózek K et al., 2007; Döhner K e Döhner H, 2008).

Altre mutazioni genetiche facenti parte del corredo molecolare tipico delle LAM sono a carico dei geni *NRAS* (Neubauer A et al., 2008), *TET2* (Delhommeau F et al., 2009; Langemeijer SMC et al., 2009), *TP53* (Haferlach C et al., 2008), *ASXL1* (Carbuccia N et al., 2010), *PTPN11* (Loh ML et al., 2004) e *CBL* (Reindl C et al., 2009), ma ad oggi tutti gli studi che hanno esaminato l'importanza di tali mutazioni

sono limitati e non hanno evidenziato fino ad oggi un valore prognostico per nessuna di esse.

Oltre alle aberrazioni genetiche, anche la deregolazione dell'espressione di alcuni specifici geni, come il sovraccitato *BAALC*, sembra giocare un ruolo fondamentale nella prognosi di alcuni sottotipi di LAM. Il gene *ERG* appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione ETS ed alcune sue mutazioni sono coinvolte in altre neoplasie, ad esempio nel carcinoma della prostata; risulta iperespresso più frequentemente nelle LAM-NC, in quelle a cariotipo complesso ed in quelle megacarioblastiche. Alcuni studi hanno evidenziato come la overespressione di *ERG* abbia un impatto prognostico negativo maggiore nei casi di LAM con anomalie genetiche a basso rischio (ad esempio *NPM1* senza *FLT3-ITD*), correlando ad un minor tasso di RC (Marcucci G et al., 2007; Metzeler KH et al., 2009).

PROGNOSI	ALTERAZIONI CITOGENETICHE E MOLECOLARI
Favorevole	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutazione di <i>NPM1</i> senza <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normale) Mutazione di <i>CEBPA</i> (cariotipo normale)
Intermedia-1	Mutazione di <i>NPM1</i> con <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normale) Wild-type <i>NPM1</i> con <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normale) Wild-type <i>NPM1</i> senza <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normale)
Intermedia-2	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> Anomalie citogenetiche non correlate a prognosi favorevole né avversa
Sfavorevole	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); riarrangiamento di <i>MLL</i> _5 or del(5q); _7; abnl(17p); cariotipo complesso

Tabella 4: Correlazione osservata tra alcuni gruppi genetici e outcome di malattia.

1.3.1 Iperespressione della MDR

L'espressione delle proteine responsabili della Multidrug Resistance (MDR), o resistenza pleiotropica ai farmaci, conferisce alle cellule una minore sensibilità all'azione citotossica di farmaci antitumorali di classi diverse (antracicline, alcaloidi della vinca, epipodofillotossine, actinomicina D e colchicina) (Moscòw JA et al., 1988; Tsuruo T, 1988;

Leith C et al., 1997; Kim DH et al., 2005; Tallman MS et al., 2005). Tale resistenza è dovuta all'azione di alcune proteine transmembrana che funzionano come pompe di efflusso, cioè sono in grado di espellere il farmaco dalla cellula: questo meccanismo fa sì che nelle cellule MDR positive le concentrazioni intracellulari degli antiblastici siano inferiori rispetto alle cellule sensibili (Luk C et al., 1989).

1.3.2 Espressione di CD34 e di CD56

L'antigene CD34 è una glicoproteina transmembrana espressa nell' 1-2% delle cellule normali del midollo osseo, a livello dei precursori emopoietici più precoci (cellule staminali e progenitori commissionati) (Katz FE et al., 1985; Kanda Y et al., 2000). Tale antigene viene espresso anche a livello delle cellule leucemiche, in particolare nei sottotipi M2 con t (8;21) e M0, mentre si trova raramente espresso nella leucemia a promielociti (Cuneo A et al., 1995; Sperling C et al., 1995; Fruchart C et al., 1996; Porwit-MacDonald A et al., 1996; Venditti A et al., 1997).

Gli studi condotti per chiarire il significato prognostico dell'espressione di CD34 nelle LAM hanno prodotto dei risultati controversi: alcuni studi hanno messo in evidenza l'associazione tra l'espressione di CD34 e una proteina responsabile della MDR, il che spiegherebbe la scarsa risposta alla terapia nei pazienti che coesprimono questi due marcatori (Campos L et al., 1992; Boekhorst PAW et al., 1993). Negli ultimi anni è emersa da numerosi studi l'associazione tra l'espressione di CD34 e una scarsa risposta alla terapia di induzione che si traduce in una bassa quota di remissioni complete (RC) anche in assenza della coespressione di altri antigeni di membrana (Kanda Y et al., 2000).

L'antigene CD56 è un'isoforma delle molecole di adesione neurale (NCAM) (Lanier LL et al., 1986 e 1989; Raspadori D et al., 2001) espressa anche in molte neoplasie emolinfopoietiche, comprese le LAM (Lanier LL et al., 1986 e 1989; Dumphy CH et al., 1992).

In alcuni studi si è osservato che l'espressione di CD56 si associa in modo significativo all'iperespressione di una proteina della MDR che viene espressa normalmente in cellule CD56 positive, quali le natural killer (NK) e i linfociti T citotossici (Drach D et al., 1992; Te Boekhorst

PA et al., 1993; Klimecki WT et al., 1994), ma a livelli più bassi rispetto alle cellule tumorali (Damiani D et al., 2002). L'espressione di CD56 sui blasti rappresenta un fattore prognostico negativo indipendente per la durata della sopravvivenza totale (OS) (Raspadori D et al., 2001) e per il raggiungimento e la durata della RC.

1.4 TERAPIA

La terapia delle LAM si basa sulla somministrazione di agenti citotossici con la finalità di ridurre e, possibilmente, eradicare la popolazione leucemica, consentendo alle cellule staminali emopoietiche normali residue di ripopolare il midollo, ottenendo così una remissione completa. Tale condizione è caratterizzata da un quadro ematologico periferico normale e da una percentuale di blasti nel midollo inferiore al 5%, con eritropoiesi, granulopoiesi e megacariocitopoiesi normali (Kim DH et al., 2005).

La terapia delle leucemie acute si compone di un primo ciclo, definito di *induzione* che, a tutt'oggi, favorisce una remissione completa nel 60-75% dei pazienti ma solo il 20-30% manterrà nel tempo tale condizione (Grimwade et al., 1998; Tallman MS et al., 2005).

In caso di ottenimento della remissione, segue uno o più cicli di consolidamento, per consolidare e mantenere tale condizione. Le terapie più comunemente utilizzate sono:

- *una chemioterapia di consolidamento*, dove pazienti che traggono maggior beneficio da questo tipo di approccio sono quelli con meno di 60 anni;
- *una terapia di mantenimento*: sono candidati in prima linea a questo tipo di trattamento i pazienti con cariotipo favorevole che vanno in remissione completa con il primo ciclo di induzione e dopo 2 cicli di consolidamento (Tura S et al., 2007);
- *il trapianto di cellule staminali*:
 - a) *trapianto autologo*: in questo tipo di trapianto il donatore è il paziente stesso e la sorgente di cellule è il midollo osseo o il sangue periferico. Consiste nell'infusione di cellule staminali emopoietiche, raccolte in remissione completa, dopo un ciclo di chemioterapia intensiva.

b) *trapianto allogenico*: si tratta di una procedura potenzialmente curativa che mira alla sostituzione completa del patrimonio staminale del paziente con cellule ottenute da un idoneo donatore sano, familiare o da registro, HLA (Human Leukocytes Antigens) compatibile.

Sono candidati in prima linea a questo tipo di trapianto i pazienti giovani e quelli con cariotipo sfavorevole (Stone SM et al., 2004).

Il trapianto allogenico rimane inoltre la principale strategia terapeutica di salvataggio nei pazienti ricaduti dopo chemioterapia o trapianto autologo (Stone SM et al., 2004).

1.5 LAM CON CARIOTIPO NORMALE (LAM-NC)

A dispetto dei progressi nelle metodiche di studio citogenetico, che hanno portato all'utilizzo di tecniche avanzate come l'ibridazione in situ con sonde fluorescenti (FISH) (Whitman SP et al., 2001; Bienz M et al., 2005), circa il 40-50% dei pazienti adulti con LAM presenta un cariotipo normale (NC) al momento della diagnosi, rappresentando così il sottogruppo più numeroso di pazienti (Grimwade D et al., 1998; Byrd J et al., 2002).

Dalla mancanza di alterazioni cariotipiche caratteristiche che permettano di stratificare i pazienti per rischio deriva la difficoltà di individuare la strategia terapeutica più adatta a ciascun paziente.

I pazienti con cariotipo normale vengono generalmente inseriti nella classe di rischio intermedio, con una sopravvivenza a lungo termine attorno al 24% (Byrd J et al., 2002). Nonostante ciò, recenti studi hanno dimostrato che i pazienti con LAM NC hanno un decorso clinico estremamente eterogeneo e una sopravvivenza media a 5 anni che varia tra il 35% e il 45% (Grimwade D et al., 1998; Byrd J et al., 2002). Tale variabilità clinica sembra essere legata ad un assetto genetico diverso: è stato ormai dimostrato che nei pazienti con LAM NC sono frequentemente presenti alterazioni di alcuni geni non associate ad anomalie cromosomiche specifiche (Stirewalt DL et al., 2004).

Uno dei geni che si ritrova overespresso in questi pazienti è il gene *BAALC*, di cui in questa tesi è stata indagata la possibile regolazione

epigenetica posta alla base della stessa espressione genica aberrante che fortemente caratterizza i pazienti con prognosi infausta.

1.6 BAALC

1.6.1 Il gene, RNA e proteina

Il gene *BAALC* (*Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic gene*) è localizzato sul cromosoma 8q22.3, è costituito da 8 esoni e ha una grandezza di 90 Kb (Fig.3). *BAALC* codifica per una proteina che non ha omologia con nessuna proteina nota né con alcun dominio funzionale. Questo gene viene espresso nel SNC e a bassi livelli nei tessuti di derivazione neuroectodermica, nei precursori emopoietici, mentre non risulta una sua espressione nelle cellule mature del midollo e nelle cellule mononucleate del sangue (Tanner SM et al., 2001; Mrózek K et al., 2006).

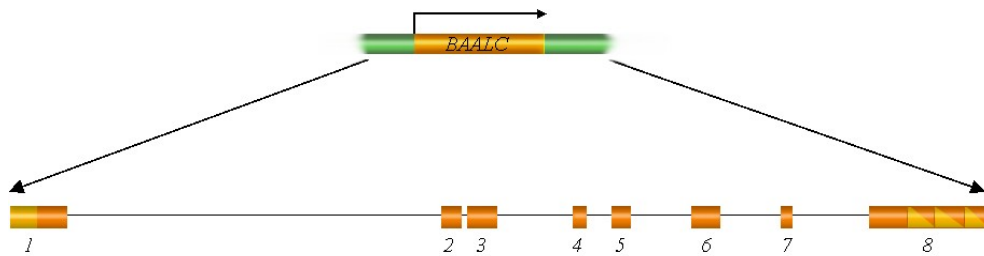


Fig 3: Struttura del gene *BAALC*.

Dalla trascrizione di *BAALC* si ottengono 8 trascritti (Fig. 4), due dei quali con espressione nei tessuti di origine neuroectodermica (1-6-8 e 1-8), mentre gli altri sei si ritrovano espressi nelle cellule ematopoietiche CD34+ Langer et al, 2008), in particolare nei blasti leucemici (Tanner SM et al., 2001).

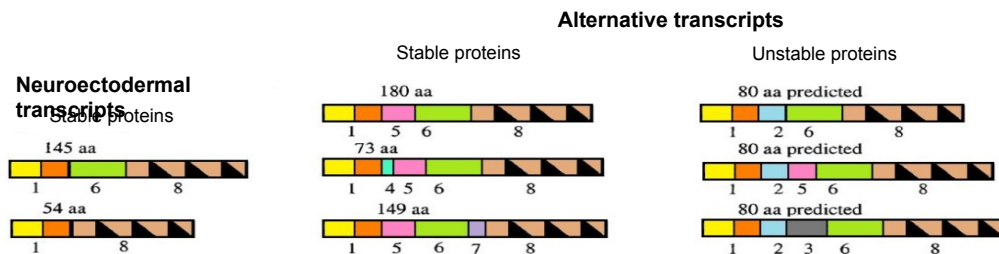


Fig 4: Struttura dei trascritti di *BAALC*.

Tutte le isoforme proteiche hanno in comune i primi 53 amminoacidi derivanti dalla trascrizione dell'esone 1, mentre la restante sequenza amminoacidica differisce per tutte le proteine. Le isoforme contenenti l'esone 2 ovvero 1-2-6-8, 1-2-5-6-8- e 1-2-3-6-8 non codificano per una proteina funzionante, indicando così che l'esone 2 conferisce un'instabilità sul risultante trascritto. La presenza di queste isoforme instabili non va però ad inficiare la funzione delle proteine stabili (Tanner SM et al., 2001).

BAALC è altamente conservato nei mammiferi ed in zebrafish, mentre non si rileva una sua espressione negli organismi inferiori quali *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Nel ratto l'isoforma 1-6-8, con omologia nel 98% rispetto all'uomo, codifica per una proteina di 22 KDa che si ritrova espressa nel cervello, in particolare a livello dei siti sinaptici dove aumenta in parallelo all'attività di sinaptogenesi. Questa proteina interagisce con la subunità α della CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II), ed il legame risulterebbe necessario per il targeting della proteina nella regione post-sinaptica per mezzo di vescicole lipidiche. Inoltre l'isoforma 1-8 in topo, ratto e maiale, ha un grado di conservazione pari al 95% rispetto a quella umana (GenBank: accession nos. AF371319-AF371326) (Tanner SM et al., 2001).

Durante la normale emopoiesi, *BAALC* risulta up-regolato nelle cellule CD34+ del midollo osseo, e una sua down-regolazione ha come conseguenza una differenziazione cellulare che porta all'ipotesi che *BAALC* rappresenti un marcatore precoce dei progenitori ematopoietici (Baldus CD et al., 2003).

In ambito tumorale questo gene si ritrova espresso in un sottogruppo di pazienti con LAM, leucemia linfoblastica e LMC in crisi blastica (Tanner SM et al., 2001). In un altro studio l'identificazione di un'overespressione di *BAALC* si è rivelata un fattore prognostico particolarmente utile nei pazienti con LAM NC e senza mutazioni nei geni *FLT3* e *CEBPA* (Tanner SM et al., 2001; Bienz M et al., 2005; Langer C et al., 2008).

Nel più ampio studio condotto fino ad oggi, che includeva 307 adulti con cariotipo normale e con meno di 60 anni, l'elevata espressione di *BAALC* condizionava negativamente la possibilità di ottenere una

remissione completa e la durata della sopravvivenza totale (Baldus CD et al., 2006).

Il valore prognostico di *BAALC* è stato indagato dallo stesso gruppo di ricercatori anche in associazione all'espressione di altri markers molecolari quali *FLT3*, *CEBPA*, *NPM1* e *WT1* (Paschka P et al., 2008; Langer C et al., 2008 e 2009; Santamaria C et al., 2010), ed è stato confermato nelle LAM-NC, ma non in LAM caratterizzate da aberrazioni cromosomiche.

Si suppone che *BAALC*, grazie alla sua posizione cellulare, abbia inoltre un ruolo nel network a livello del citoscheletro (Tanner SM et al., 2001; Baldus CD et al., 2003).

Diversi studi hanno dimostrato come un'elevata espressione di *BAALC* sia un indice predittivo poco rilevante in termini di OS, DFS (Disease Free Survival) e resistenza alla malattia (Baldus CD et al., 2003 e 2006).

In uno studio condotto su 86 pazienti affetti da LAM-NC, l'alta espressione di *BAALC* risulta essere un fattore di rischio indipendente sia se si considera l'OS (1,7 vs 5,8 anni), e sia per la DFS (1,4 vs 7,3 anni). Le diverse strategie post-remissione adottate sui pazienti presentanti livelli di espressione diversi di *BAALC* (consolidamento, trapianto autologo ed allogenico), non hanno alcuna influenza sull'OS. Tuttavia, i pazienti con elevata espressione di *BAALC* e sottoposti a trapianto allogenico presentavano una percentuale più bassa di sopravvivenza libera da malattia rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto autologo (Baldus CD et al., 2006).

Innumerevoli studi riportano un'associazione di *BAALC* con diversi marcatori molecolari delle LAM-NC quali *ERG*, *WT1*, *FLT3*, *CEBPA* e *NPM1*, questo per predire un possibile outcome dei pazienti (Langer C et al., 2008).

Inoltre un'alta espressione di *BAALC* si è evidenziata in soggetti LAM con trisomia del cromosoma 8 (LAM+8) come unica anormalità citogenetica, ciò in associazione all'espressione del gene *MN1* (Langer C et al., 2009; Metzeler KH et al, 2009), un oncogene protagonista della trasformazione leucemica (Heuser M et al., 2007). Esso infatti codifica per un'oncoproteina con proprietà di coattivatore trascrizionale. Nelle LAM è stato evidenziato infatti un suo coinvolgimento nella

traslocazione t (12; 22) (p13, q11) che porta al gene di fusione *MN1-TEL* (Heuser M et al., 2007). Nei modelli animali, questo gene di fusione collabora con l'oncogene *HOXA9* per indurre la trasformazione neoplastica delle cellule ematopoietiche in cellule leucemiche (Langer C et al., 2009). Recentemente, alti livelli di espressione di *MN1* sono stati utilizzati come marcatore prognostico nelle LAM-NC, anche se l'esatta funzione di *MN1* nelle cellule ematopoietiche non risulta ancora del tutto chiara.

1.7 EPIGENETICA

1.7.1 Significato

Con il termine “epigenetica” vengono indicati dei cambiamenti ereditabili stabilmente che interessano l'espressione genica e che non vanno a modificare la sequenza del DNA (Berger et al., 2009). Fanno parte di questi meccanismi le modificazioni post-traduzionali degli istoni, la metilazione del DNA ed i miRNA.

1.7.2 Modificazioni istoniche

Le modificazioni post-traduzionali degli istoni rappresentano un'importante piattaforma regolatoria per processi quali espressione genica, replicazione e riparo del DNA, condensazione e segregazione dei cromosomi e apoptosi cellulare (Füllgrabe J et al., 2011).

Ovviamente alterazioni a carico di questi processi sono correlate con molteplici condizioni patologiche, prima fra tutti la carcinogenesi.

Gli istoni sono le principali componenti proteiche della cromatina e fungono da rocchetti attorno ai quali il DNA si avvolge (Luger K et al., 1997). Negli eucarioti sono presenti in forma di ottamero costituito da due copie di ciascuno dei quattro istoni formanti il core (H2A, H2B, H3 e H4), il quale è avvolto da 147 bp di DNA, andando così a formare il nucleosoma, l'unità fondamentale della cromatina (Kornberg RD e Lorch Y, 1999) (Fig.24).

Al microscopio elettronico la serie nucleosomica appare come una collana di perle in cui i nucleosomi (le perle) sono unite dal DNA *linker*.

Sia istoni *linker*, come l'istone H1, sia proteine non istoniche possono interagire con la serie nucleosomica determinando un maggiore grado di impacchettamento e la formazione di strutture cromatiniche di ordine superiore (Fig. 5). Gli istoni però non vanno considerati semplicemente delle proteine deputate all'impacchettamento del DNA, bensì sono in realtà degli importanti regolatori della dinamica cromatinica. Essi sono infatti soggetti ad un'ampia varietà di modificazioni post-traduzionali, principalmente a livello delle code N-terminali protrudenti dalla superficie dei nucleosomi (Cosgrove MS et al., 2004). Le modificazioni possono essere svariate: acetilazione delle lisine, metilazione di lisine e arginine, fosforilazione di serine e treonine, ubiquitinazione, glicosilazione, sumoilazione, ribosilazione e carbonilazione, tutte realizzate in maniera dinamica da appositi complessi enzimatici (Khorasanizadeh S et al., 2004).

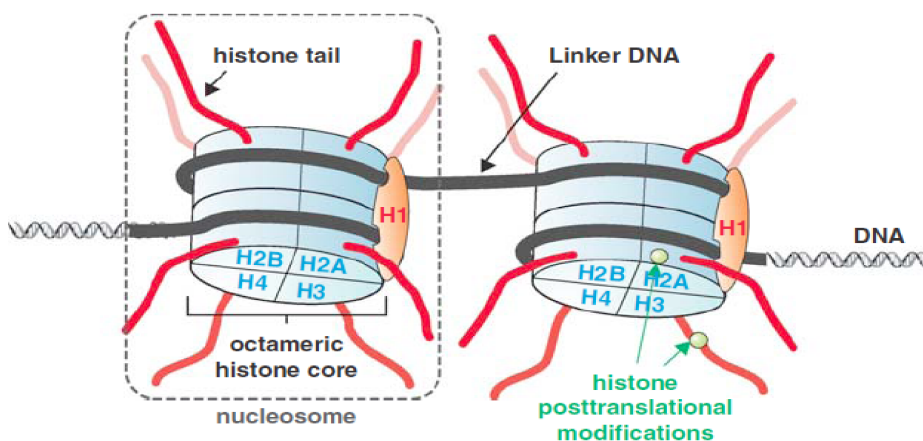


Fig 5: La struttura cromatinica.

Le modificazioni istoniche sono in grado di modulare la funzionalità cromosomica principalmente attraverso due distinti meccanismi: innanzitutto vanno ad alterare la carica elettrostatica degli istoni modificandone la struttura o il legame al DNA, ed in secondo luogo, possono fungere da siti di legame per domini di riconoscimento proteici come bromo- o cromo-domini. Per ciascuna di queste modificazioni degli istoni esistono enzimi deputati alla loro aggiunta e rimozione. Tra questi i principali sono: le acetiltransferasi istoniche (HAT) che acetilano le code istoniche inducendo decondensazione della cromatina, le deacetilasi istoniche (HDACs) che rimuovono invece i gruppi acetilici,

le metiltransferasi istoniche (HMTs) che aggiungendo gruppi metilici promuovono o inibiscono la trascrizione a seconda del residuo target e le demetilasi istoniche (HDMs) che agiscono in maniera opposta alle HMTs (Allis CD et al., 2007; Füllgrabe J et al., 2010).

Questi enzimi possono modificare gli istoni sia localmente, dopo essere stati reclutati da fattori di trascrizione sequenza-specifici (Rundlett SE et al., 1998), sia globalmente lungo l'intero genoma (Vogelauer M et al., 2000). Nel 2000 Strahl e Turner (Strahl BD e Allis CD, 2000; Turner BM, 2000) hanno proposto l'ipotesi del codice istonico (*histone code*) che inseriva la funzione delle modificazioni a carico degli istoni nella struttura cromatinica e nella regolazione delle funzioni nucleari. Distinte combinazioni di modificazioni post-traduzionali covalenti a carico degli istoni influenzano infatti la struttura cromatinica e in definitiva l'*output* trascrizionale (Strahl BD e Allis CD, 2000).

Evidenze crescenti suggeriscono che gli enzimi modificanti gli istoni sono spesso deregolati nel cancro, indicando quindi che sono importanti non solo nel contesto fisiologico ma anche nello sviluppo della neoplasia.

1.7.3 La metilazione del DNA

La metilazione del DNA è sicuramente la modificazione epigenetica più studiata e aberrazioni a carico di questo processo sono tra i primi eventi riconosciuti nella carcinogenesi. Nel 1983, Feinberg e Vogelstein (Feinberg AP e Vogelstein B, 1983) dimostrarono per la prima volta il legame esistente tra cancro e metilazione del DNA: il genoma delle cellule tumorali risultava ipometilato rispetto alla controparte normale. La demetilazione globale nelle regioni ripetitive del DNA negli stadi precoci della tumorigenesi predisporrebbe le cellule all'instabilità genomica (Robertson KD, 2005). L'ipermetilazione aberrante nel cancro è invece caratteristica delle isole CpG e risulta nel silenziamento trascrizionale. Geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nell'invasività, nel riparo del DNA, nel rimodellamento della cromatina, nel *signaling* cellulare e nell'apoptosi risultano ipermetilati e quindi silenziati nella maggior parte dei tumori (Füllgrabe J et al.,

2011). Per quanto siano le metiltransferasi del DNA, le quali risultano responsabili di questo processo, recentemente si è evidenziato come la metilazione del DNA e le modificazioni istoniche siano correlate, ed inoltre che di come tra loro esista un forte *cross-talk* (Tachibana M et al., 2008; Cedar H e Bergman Y, 2009; Zhao Q et al., 2009). L'ipermetilazione delle isole CpG a livello di diversi promotori nelle cellule tumorali è associato infatti ad un particolare *pattern* di marcatori istonici, come la deacetilazione degli istoni H3 e H4, la perdita della trimetilazione delle lisine sull'istone H3 e l'acquisto delle trimetilazioni H3K9 e H3K27.

Per quanto diversi enzimi modificanti gli istoni siano risultati alterati nelle cellule neoplastiche, finora solo alcune delle 60 modificazioni istoniche note sono state correlate al cancro (Kouzarides T, 2007). Un esempio è rappresentato dalle di- e tri- metilazioni della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me2/me3) che sono associate ad attivazione trascrizionale; i livelli più elevati sono stati osservati in prossimità dei siti di inizio trascrizione dei geni più altamente espressi (Shi Y et al., 2004).

La trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 (H3K9me3) è invece un tipico *marker* eterocromatinico, ed è quindi associato a repressione trascrizionale; al contrario l'acetilazione del medesimo residuo è indice di cromatina attiva e ne previene la metilazione. Un ulteriore esempio è dato dalla trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3), la quale è implicata nella formazione di domini di cromatina compatta ed è frequentemente associata a silenziamento genico.

1.7.4 I miRNA

Recentemente si è compreso che un elevato numero di piccoli ncRNA sono di fondamentale importanza per regolare l'espressione dei geni. Tali RNA a doppio filamento (dsRNA) si possono formare per appaiamento di un mRNA con un trascritto antisenso complementare o per appaiamento interno di una singola molecola di RNA. Questi ultimi trascritti, noti come miRNA, sono piccoli RNA di 80-100 bp in grado di formare delle strutture a forcina (stem-loop-stem) e derivano da precursori più lunghi trascritti dalla RNA polimerasi II e tagliati nel

nucleo dalla RNAsi Drosha. I dsRNA vengono poi ulteriormente tagliati nel citoplasma dall'enzima Dicer (RNAsi III) e convertiti in siRNA (short interfering RNA). Questi ultimi sono lunghi 21-25 bp e vengono incorporati in un complesso ribonucleoproteico noto come RISC (RNA-Induced Silencing Complex) che, utilizzando uno dei due filamenti del siRNA, può appaiarsi a mRNA complementari e degradarli (se l'appaiamento è perfetto) o inibirne la traduzione (se l'appaiamento non è perfetto) (Ghildiyal M et al, 2009). Tale fenomeno, è noto anche come *PTGS* (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) o *RNAi* (*RNA interference*). Esiste inoltre un'altra modalità secondo la quale i siRNA dirigerebbero il silenziamento genico, il *TGS* (*Transcriptional Gene Silencing*) o *RdDM* (*RNA-dependent DNA Methylation*), meccanismo in cui vi è la metilazione del DNA e la formazione di tratti di eterocromatina, impedendo selettivamente la trascrizione del DNA e di conseguenza l'espressione di specifici geni (Neri G. e Genuardi M, 2010). Un singolo miRNA può avere centinaia di mRNA diversi come target, sottolineando così l'importanza di questo meccanismo a livello di espressione genica e quindi di come questo sistema di regolazione svolga un ruolo direttivo su diverse funzioni cellulari, quali crescita, differenziamento ed apoptosi (Lim LP et al., 2005; Davalos V et al., 2010).

E' interessante notare inoltre come i miRNA sono essi stessi regolati epigeneticamente a livello del loro promotore, e l'intero sistema in sé risulta oggetto di intensi studi, specialmente dopo la scoperta di una loro implicazione, non solo nelle sovraccitate funzioni cellulari, bensì anche nella trasformazione in senso neoplastico (Schickel R et al., 2008).

1.8 EPIGENETICA E CANCRO

L'intero genoma delle cellule tumorali possiede delle aberrazioni a carico dei livelli epigenetici, e ciò include ipometilazione, ipermetilazione promotore-specifica, acetilazione istonica, deregolazione globale mediata dai miRNA e upregolazione di alcuni attori facenti parte del macchinario epigenetico quali EZH2.

Queste aberrazioni conferiscono un vantaggio selettivo alla crescita delle cellule neoplastiche, portando così ad una deficienza dei meccanismi apoptotici, ad una proliferazione incontrollata ed alla tumorigenesi (Fig.6).

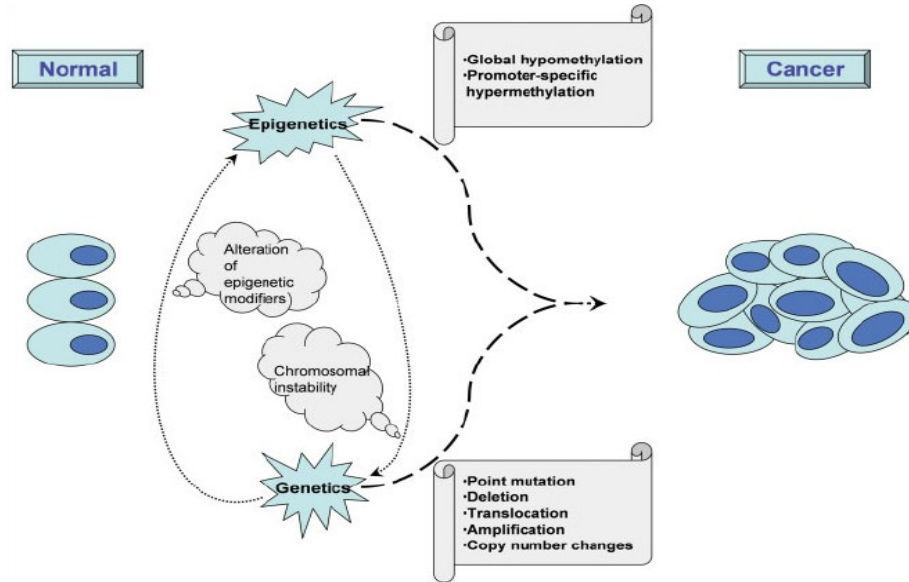


Fig 6: Meccanismi epigenetici e tumorigenesi.

Le modificazioni epigenetiche sovraccitate possono quindi avere un ruolo chiave nella patologia neoplastica.

1.8.1 Modificazioni istoniche e cancro

Queste modificazioni, importanti nella regolazione dell'espressione genica, sono state trovate disregolate nelle cellule cancerose (Fig. 7).

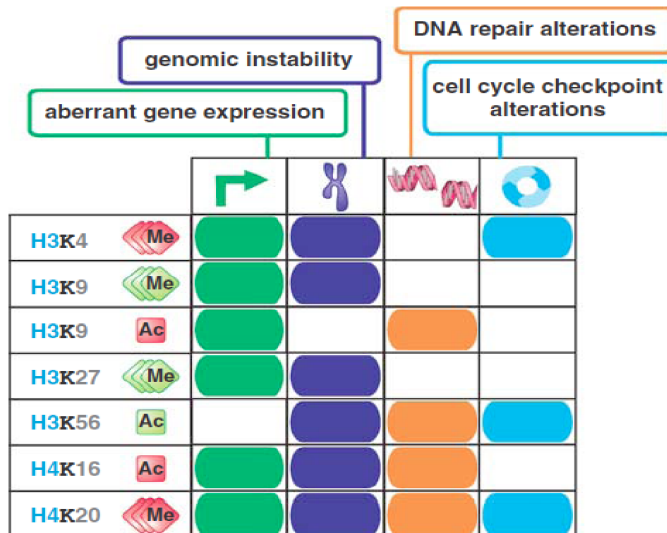


Fig.7: Conseguenze funzionali delle onco-modificazioni istoniche.

La perdita di *markers* epigenetici repressivi può determinare infatti un aumento dell'instabilità genomica favorendo la traslocazione dei trasposoni o l'overespressione di protooncogeni; parallelamente un'alterazione nell'*imprinting* istonico può causare il silenziamento di geni oncosoppressori.

Un silenziamento aberrante può riguardare anche proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, come gli inibitori delle cicline chinasi-dipendenti (cdk) o proteine coinvolte nel riparo del DNA.

E' infatti ben noto come tutte queste *pathways* siano alterate nel cancro. A tal proposito Füllgrabe e colleghi hanno recentemente proposto una nuova terminologia, "*histone onco-modifications*", per descrivere le modificazioni covalenti post-traduzionali degli istoni che sono correlate con il cancro (Füllgrabe et al., 2011). Questo termine epigenetico, ispirandosi al termine genetico di "*onco-gene*", vuole sottolineare il contributo attivo e l'importanza delle modificazioni istoniche nello sviluppo del cancro. Finora ci si era focalizzati principalmente sul fenomeno della metilazione del DNA, mentre specifici *pattern* di modificazioni istoniche potrebbero spiegare come le cellule maligne acquisiscano un *pattern* di metilazione distinto rispetto alla controparte normale. Il quadro epigenetico si fa ancor più complesso se si considerano le interdipendenze tra le diverse modificazioni istoniche ma anche le loro interazioni con la metilazione del DNA e gli RNA non codificanti. Le conseguenze delle onco-modificazioni sulla carcinogenesi sono diverse ed hanno sia effetti locali che globali. La perdita della stabilità genomica, la disregolazione del ciclo cellulare, la perdita dell'*imprinting*, l'alterazione delle vie di riparo del DNA e dell'apoptosi, la neoangiogenesi, l'invasività e la capacità di metastatizzare, l'insensibilità ai fattori di crescita e l'enorme potenziale proliferativo sono tutte caratteristiche delle cellule tumorali correlabili alle modificazioni istoniche (Fig. 7). Queste potrebbero quindi rappresentare degli ottimi marcatori prognostici ed inoltre, trattandosi di modificazioni reversibili, i nuovi approcci terapeutici antitumorali potrebbero avere come bersaglio proprio le onco-modificazioni istoniche. A tal proposito sono già diversi i farmaci, aventi come bersaglio gli enzimi modificanti gli istoni, utilizzati nella pratica clinica o sottoposti a *trials* clinici.

1.8.2 Metilazione del DNA e cancro

Si è recentemente compreso come il silenziamento di geni oncosoppressori non avvenga solo tramite la presenza di mutazioni, bensì esiste un meccanismo di silenziamento equivalente, ovvero la metilazione del DNA (Jones PA et al., 2007). Gli esempi di questi meccanismi che mediano la tumorigenesi sono numerosi, come la metilazione a carico di *MLH1* (*Mismatch repair gene human mutL Homolog 1*) nel carcinoma colon rettale, la metilazione del gene che media la riparazione del DNA MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) nei gliomi e nel carcinoma colonrettale, e *p16* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2-CDKN2A), gene deputato alla regolazione del ciclo cellulare, e che si ritrova anch'esso metilato nel carcinoma colonrettale ed in altre forme tumorali (Herman JG et al., 2003). La metilazione del DNA può intervenire sul meccanismo di trasformazione tumorigenica agendo direttamente a livello del promotore, o indirettamente silenziando gli inibitori degli oncogeni, conferendo così un vantaggio selettivo della proliferazione alla cellula soggetta a metilazione, e mediandone potenzialmente l'invasività e facilitando la formazione di metastasi.

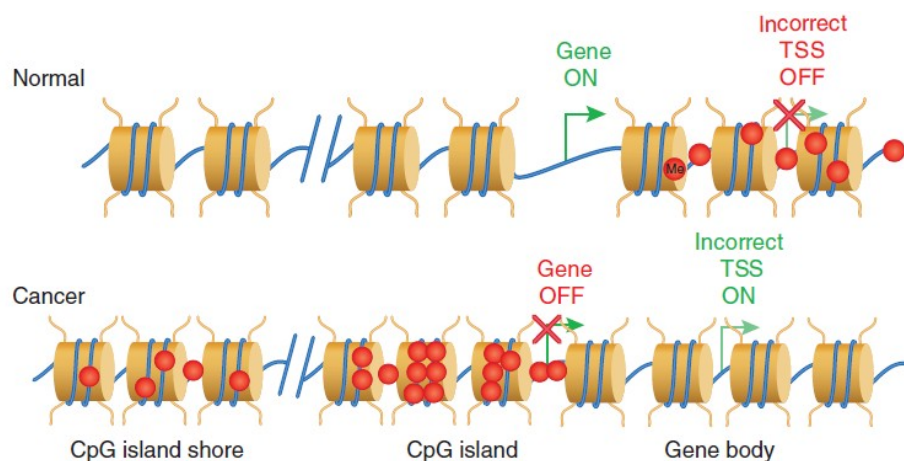


Fig. 8: La metilazione del DNA e tumorigenesi.

L'ipermetilazione del DNA è un evento precoce nella tumorigenesi, in quanto svolge un ruolo importante nella trasformazione maligna e nella sua progressione, creando la base per un accumulo di innumerevoli e simultanee mutazioni ed aberrazioni epigenetiche (Issa JP, 2008).

I pattern di metilazione del DNA nei tumori mostrano una significativa variabilità intra- ed inter- individuale, non solo riferita alla forma tumorale ma anche alla variabilità associata alla persona affetta (Aggerholm A et al., 1999). Esistono infatti sottogruppi di pazienti in cui si è riscontrata un'ipermetilazione simultanea su promotori di geni divesi, caratterizzando così il fenomeno chiamato *CIMP* (*CGI Methylator Phenotype*) (Toyota M et al, 1999). Le neoplasie CIMP-positive sono spesso clinicamente distinte dal resto della popolazione dei pazienti, suggerendo come la metilazione del DNA può essere utilizzata per trattare in maniera personalizzata il paziente durante la terapia oncologica. Altri studi condotti hanno però dimostrato che l'ipometilazione globale del DNA risulta essere la prima modificazione epigenetica riscontrata nelle cellule tumorali (Lapeyre JN et al., 1979). Questa condizione interessa elementi ripetitivi quali le sequenze LINE1 e Alu (Estecio MR et al., 2007) e specifici promotori genici (Dunn BK, 2003). L'attivazione di elementi mobili associata a ipometilazione possono essere causativi di instabilità genomica, predisponendo il genoma del paziente ad essere maggiormente colpito da mutazioni, delezioni, amplificazioni, inversioni e traslocazioni (Chen RZ et al., 1998). Infatti l'ipometilazione correla sia con un alto tasso di aberrazioni cromosomiche in pazienti con carcinoma colonrettale (Issa JP, 2008), sia con una prognosi sfavorevole (Ogino S et al., 2008). Un'altra potenziale conseguenza dell'ipometilazione del DNA può manifestarsi con la riattivazione di geni silenziati (Ehrlich M, 2002); questo può portare all'interruzione della normale espressione genica e ha una potenziale attivazione di pathways antiapoptotiche. Inoltre l'ipometilazione del promotore può riattivare i miRNA situati a livello della regione codificante in diversi geni, avendo così come risultato il silenziamento o un'espressione aberrante della proteina corrispondente (Davalos V e Esteller M, 2010). Importante notare come una ipometilazione a livello di geni codificanti enzimi responsabili della metilazione delle citosine, ovvero il gene *DNMT1* che codifica per la cytosine-5-methyltransferase 1, può avere un ruolo protettivo contro il fenomeno della carcinogenesi in diversi modelli di studio (Trinh BN et al., 2002), ma può anche farsi promotrice della formazione tumorale in altri (Eden A et al., 2003).

1.8.3 miRNA e cancro

I primi studi effettuati su *C. elegans* (Reinhart BJ et al., 2000) e le successive conferme ottenute sui modelli animali (Hipfner DR et al., 2002), hanno mostrato come il modello *knockout* di Dicer potesse portare ad una produzione in difetto dei miRNA e dare come risultato finale una ridotta differenziazione cellulare (Kanellopoulou C et al., 2005). Queste osservazioni suggeriscono una possibile implicazione nei miRNA nelle neoplasie umane.

Studi condotti tramite microarray mostrano la presenza di alterazioni globali dell'espressione dei miRNA nei tumori (Calin GA et al., 2006), e che questi fenomeni di up- o down- regolazione sono causati da eventi genetici o epigenetici. Un esempio è dato da let-7, una famiglia di miRNA down-regolata nel carcinoma della mammella ed in quello polmonare, dove questa espressione aberrante porta all'attivazione della pathway oncogenica di RAS (Peter ME, 2009). Un ulteriore esempio di down-regolazione è fornito da miR-15 e miR-16 nella leucemia linfatica cronica (LLC), fenomeno che porta all'attivazione del proto-oncogene *Bcl2* (Cimmino A, 2005).

L'overespressione dei miRNA include il cluster miR-17-92, il quale svolge un importante ruolo nello sviluppo del carcinoma polmonare, della mammella e nella leucemia mieloide cronica attivando il fattore di trascrizione E2F1, uno dei maggiori regolatori del ciclo cellulare (Olive V et al., 2010).

L'amplificazione del cluster miR-17-92 riveste inoltre un ruolo nello sviluppo del linfoma a cellule B (Inomata M et al., 2009), ed in un aumento dell'aggressività nei modelli murini (Xiao C et al., 2008).

Questo cluster di miRNA è inoltre attivata dall'oncogene *c-myc* (Mu P et al., 2009), sottolineando il ruolo fondamentale nella tumorigenesi.

Molti miRNA sono trascrizionalmente regolati in maniera simile a geni codificanti proteine e possono essere overespressi tramite meccanismi genetici (es. amplificazione) o soppressi (es. delezione), o interessati da meccanismi epigenetici (es. ipermetilazione). Recentemente si è riscontrato che l'espressione di Dicer e Drosha risulta alterata in alcune forme tumorali (Merritt WM et al., 2008).

1.9 APPLICAZIONI CLINICHE: BIOMARKERS TUMORALI EPIGENETICI

Le tre modificazioni discusse finora sono associate dunque allo sviluppo ed alla progressione tumorale, e ciò può avere delle potenziali applicazioni nella pratica clinica. La clinica oncologica può beneficiare dunque dell'utilizzo delle modificazioni epigenetiche come biomarkers, i quali presentano un pattern caratteristico che può essere studiato durante l'identificazione tumorale, e successivamente può dare informazioni circa la prognosi e la risposta al trattamento, dando così vita al nuovo campo denominato farmacoepigenetica (Fig. 9).

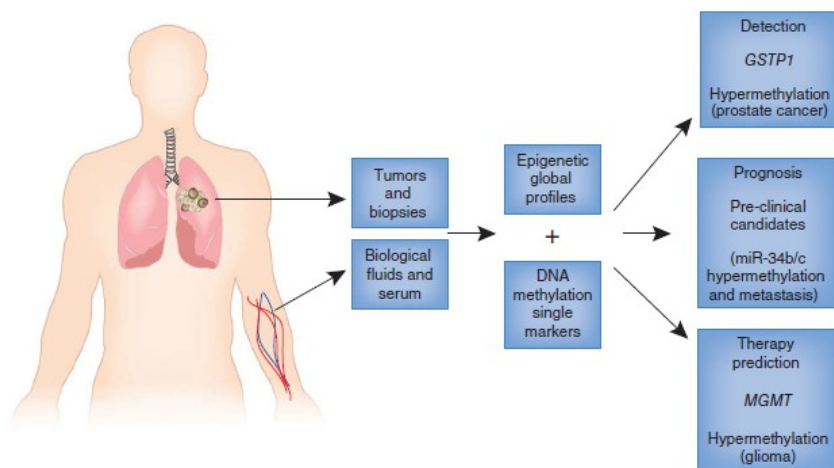


Fig. 9: Applicazioni della farmacoepigenetica.

1.9.1 Modificazioni istoniche e il modello della “marcatura bivalente”

Come già visto precedentemente la trimetilazione H3K4 (H3K4me3) è mediata nei mammiferi dal complesso Set1/Trithorax related/COMPASS-like, ed è associata ad attività trascrizionale (Shilatifard A, 2006). La trimetilazione H3K27 risulta mediata dal gruppo delle proteine Polycomb EZXH2 attraverso la formazione del Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), ed è invece associata a repressione genica (Shilatifard A, 2006). Interessante notare come

entrambe le modificazioni istoniche siano state riscontrate simultaneamente a livello del promotore delle cellule staminali embrionali (ESc) sia di topo che umane (Bernstein BE et al., 2006; Mikkerlsen TS et al., 2007; Zhao X et al., 2007).

La scoperta di una coesistenza tra una promozione ed una repressione dell'espressione genica ha introdotto il modello della "marcatura bivalente". In questo modello la trimetilazione H3K27 risulta una marcatura dominante rispetto a H3K4me3, suggerendo quindi che i geni sottoposti a doppia marcatura sono regolati in senso repressivo. Molti di questi geni sono regolatori molto importanti nel differenziamento e nello sviluppo. I promotori di questi geni legano la RNA polimerasi II (RNAPII) e successivamente entrano in uno stato "poised", ovvero in *standby*, e con bassissimo livello di trascrizione.

Durante il differenziamento H3K4me3 è presente a livello di suddetti geni, mentre H3K27me3 non è presente. Tuttavia, il meccanismo molecolare con il quale la marcatura bivalente causi lo *standby* della RNAPII, non è ad oggi ancora noto (Fig.10).

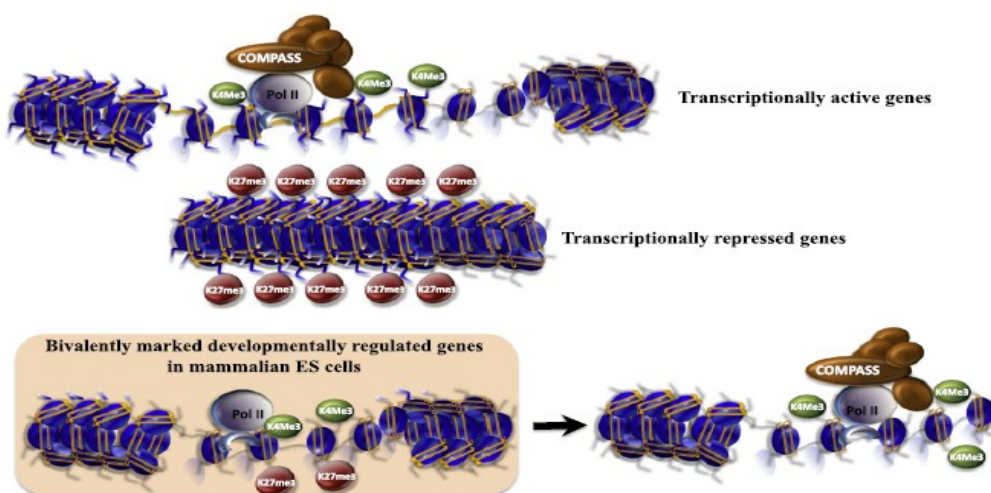


Fig. 10: Meccanismo della marcatura bivalente.

Diversi studi hanno confermato che in eucarioti quali la *Drosophila* e lo *Xenopus*, dove i complessi Trithorax e Polycomb sono paragonabili a quelli dei mammiferi, non manifestano la presenza della marcatura bivalente nei primi stadi di sviluppo (Fig.11).

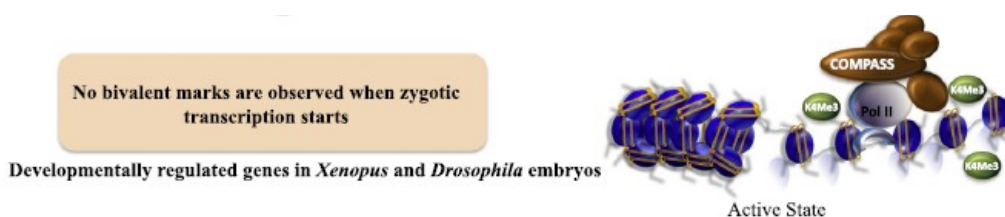


Fig. 11: Assenza della marcatura bivalente nello stadio embrionale in *Xenopus* e *Drosophyla*.

Non vi è alcun dubbio invece circa l'esistenza di una marcatura a livello di promotore nelle ESC dei mammiferi, meccanismo che si estende anche dopo il differenziamento cellulare (Bernstein BE et al., 2006). Attualmente non è ancora stato compreso il motivo per il quale le ESC necessitano della marcatura bivalente per una corretta espressione dei geni durante il differenziamento, né di come un particolare pattern di marcature blocchi le cellule in uno stato di differenziamento quiescente.

Si può però affermare che la presenza di uno stato bivalente indichi uno "stato di transizione" tra silenziamento ed attività trascrizionale dei geni deputati allo sviluppo (Herz HM et al., 2009). In futuro sono necessari ulteriori esperimenti in diversi modelli di studio, ciò per poter ottenere un quadro più chiaro e comprensibile circa i meccanismi alla base della regolazione dell'espressione genica dovuti all'assenza o alla presenza della marcatura bivalente.

1.9.2 La metilazione del DNA e cancro

Numerosi studi hanno dimostrato come esista un unico profilo di ipermetilazione specifico per forma tumorale (Costello JF et al., 2000; Esteller M et al., 2001), e come la presenza di un promotore ipermetilato a livello di geni oncosoppressori, sia un fenomeno che appare precocemente nella tumorigenesi (Herman JG e Baylin SB, 2003; Esteller M, 2008). Questo risultato ha innumerevoli implicazioni per un'identificazione precoce del tumore, specialmente in persone con un rischio genetico ereditario (es. portatori di mutazioni per i geni *BRCA1* e *2*). Sulla base di ciò, recentemente l'ipermetilazione delle

isole CpG tumore-specifica è stata studiata in diversi tipi di liquidi biologici (siero, urine e feci) e tessuti bioptici (Laird PW, 2003; Shivapurkar N et al., 2010). Ad oggi sono presenti tecnologie sempre più sofisticate in grado di rilevare anche la più minima variazione della metilazione del tessuto patologico rispetto al corrispettivo sano, metodologie note come *MS-q-FRET (Methylation Status-quantum dots Fluorescence Resonance Energy Transfer)* (Bailey WG et al., 2009; Li M et al., 2009).

1.9.3 miRNA nella diagnosi, classificazione e prognosi tumorale

Il profilo dei miRNA risulta informativo sia come strumento diagnostico e sia come potenziale biomarker prognostico (Calin GA et al., 2006).

Il significato prognostico dei miRNA nei tumori è recentemente stato studiato in maniera approfondita: nelle LLC l'espressione di 13 miRNA è stata vista correlare con l'aggressività della malattia, in relazione al tempo trascorso tra la diagnosi e il primo trattamento (Calin GA et al., 2005), mentre il miR-155 mostra un valore predittivo in pazienti con linfoma a cellule B diffuso (Eis PS et al., 2005). Il profilo dei miRNA può dunque essere utilizzato nel futuro come parte di un modello integrativo di diverse informazioni prognostiche (Marcucci G et al., 2008).

1.10 APPLICAZIONI TERAPEUTICHE: LA FARMACOEPIGENETICA

Le epimutazioni, in contrasto con le mutazioni genetiche, sono reversibili. Questo è il principio su cui si sono focalizzati gli studi di farmacoepigeneica, i quali utilizzano farmaci che potenzialmente possono ripristinare il pattern epigenetico normale, inibendo dunque i fenomeni di metilazione del DNA e di rimodellamento cromatinico. Esistono 2 classi di farmaci in grado di agire sulle modificazioni epigenetiche, o meglio, sugli enzimi che conferiscono un determinato pattern di modificazioni (Figg. 12 e 13), e che sono stati approvati dalla US Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento dei tumori: gli inibitori della metilazione del DNA e gli inibitori delle HDAC

(Kaminskas E et al., 2005; Kantarjian H et al., 2007; Mann BS et al., 2007; Fenaux P et al., 2009; Piekarz RL et al., 2009).

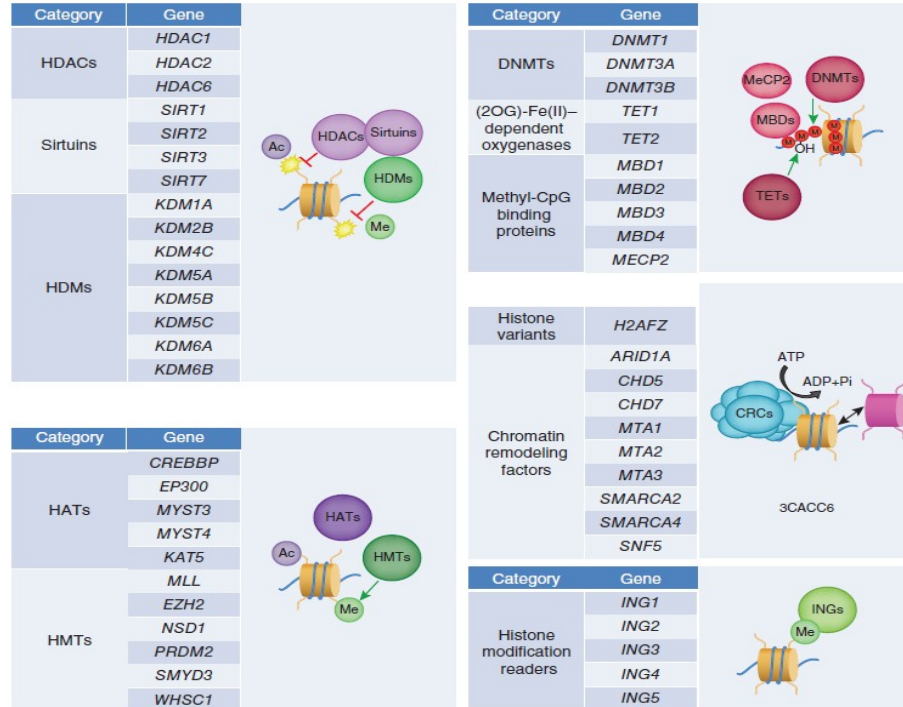


Fig. 12: Complessi enzimatici che conferiscono il pattern epigenetico.

Gli inibitori della metilazione del DNA sono degli analoghi nucleosidici i quali esercitano la loro attività de metilante attraverso la fomazione di un legame covalente irreversibile con i DMNT dopo incorporazione nel DNA (Issa JP e Kantarjian HM, 2009). Questi inibitori svolgono una funzione citotossica a dosaggi elevati (Von Hoff DD, 1976), ma non è stata riscontrata un'attività antitumorale. Negli ultimi 10 anni questi farmaci sono stati utilizzati in dosi inferiori e ripetute, con risultati migliori circa gli effetti antineoplastici (Issa JP et al., 2004). Questo permise l'introduzione di farmaci quali l'azacitina nel 2004 (Kaminskas et al., 2005), della decitabina e di vidaza (5-aza e 5-aza-2'-deoxycytidine)(Gore SD et al., 2006) per la cura dei pazienti affetti da MDS (MyeloDysplastic Syndrome).

Per quanto riguarda gli inibitori delle HDAC, sono suddivisi in diverse classi (dalla I alla IV), ed hanno come target un dominio catalitico-metallo-dipendente delle HDAC, interferendo così con il

riconoscimento del substrato e quindi inibendo la chelazione dello zinco da parte delle HDAC. Gli inibitori delle HDAC sono suddivisi in quattro gruppi in base alla loro natura chimica; i gruppi comprendono gli acidi grassi a catena corta (es. sodio butirato e acido valproico), gli acidi idrossamici (es. trichostatina A e vorinostat o SAHA), peptidi ciclici (es. romidepsina) e benzamidi (es. MGCD-0103 e entinostat)(Tab.5).

HDAC inhibitors		
Chemical class	Selected members	Comments
Short-chain fatty acids	Sodium <i>n</i> -butyrate (NaB)	Butyrates such as NaB inhibit proliferation of colon, prostate, endometrial and cervical carcinomas at high millimolar concentrations.
	Phenylacetate Phenylbutyrate Valproate	Valproate is quite active against HDACs 1–5, 7 and 9 but less so against HDACs 6 and 10. It is more efficient as an inducer of differentiation in carcinoma cells, transformed hematopoietic progenitor cells and leukemic blasts from individuals with AML.
Hydroxamic acids	Trichostatin A	Trichostatin A inhibits HDACs 1–7 and 9 at the single-digit nanomolar level and HDAC8 at the single-digit micromolar level. Despite its proven antitumoral activity, it has too many side effects to be used clinically.
	Vorinostat (SAHA)	Vorinostat is FDA-approved for hematological malignancies.
	Panobinostat	Panobinostat is highly active against HDACs 1–4, 7 and 9 but less so against HDAC6 and, especially, HDAC8. It is undergoing clinical trials for the treatment of CML, refractory CTCL and multiple myelomas. It may also be relevant to the treatment of hormone-dependent breast cancers, as it causes strong inhibition of their typically upregulated aromatase gene.
	Belinostat	Belinostat is quite active against HDACs 1–10. It is in clinical trials for the treatment of hematological malignancies and solid tumors.
Cyclic peptides	Romidepsin (formerly FK-228)	A natural, stable prodrug that, once converted to its active form (redFK) by cellular reducing activity, is capable of inhibiting HDACs 1, 2, 4 and 6. After showing strong preclinical antitumoral activity, it was approved by the FDA and has undergone clinical trials for the treatment of AML, CML and CTCL.
Benzamide derivatives	MS-275 (or entinostat)	MS-275 inhibits HDACs 1–3 and 9 and has also been used in clinical trials in conjunction with other agents.
	MGCD-0103	MGCD-0103 can inhibit HDACs 1 and 2 and, to a lesser extent, HDACs 3 and 11. It is also in clinical trials for the treatment of hematological malignancies and solid tumors.

CML, chronic myeloid leukemia.

Tabella 5: Classificazione degli inibitori delle HDAC.

Il principale potere antitumorale degli inibitori delle HDAC si espleta con un effetto sulle fasi G1 e G2-M del ciclo cellulare, sull'apoptosi e con un'inibizione dell'angiogenesi e della formazione di metastasi (Nebbio A et al., 2001; Joseph J et al., 2004). Nel 2006, il vorinostat o SAHA fu introdotto nella terapia di pazienti con linfoma a cellule T (Mann BS et al., 2007), anche se ad oggi le sperimentazioni di altri inibitori delle HDAC sono ancora in studio. Tuttavia i risultati preliminari suggeriscono l'utilizzo di questi farmaci una possibile strategia terapeutica in altre neoplasie linfoidi (es. linfoma di Hodgkin), ma sottolineando una modesta attività nei tumori solidi (Prince HM et al., 2009). Ad oggi il meccanismo con il quale questi farmaci agiscano non è ancora del tutto noto: una possibile via riguarda l'induzione di un'iperacetilazione degli istoni, che si traduce in una configurazione cromatinica aperta e ad attivazione trascrizionale (Xu WS et al., 2007).

Tuttavia il meccanismo d'azione di questi farmaci risulta molto più complesso in quanto essi sono attivi sia nel nucleo che nel citoplasma, agendo quindi anche a livello di proteine non istoniche. La mancanza di specificità dei target dei farmaci epigenetici si basa sulla possibilità di riattivazioni di geni normalmente silenziati (es. elementi ripetitivi) o geni imprinted. La riattivazione potrebbe portare ad uno sbilanciamento allelico, instabilità genomica o ad altri effetti deleteri mediati dall'attivazione dei retrotrasposoni. Ad oggi, non esistono dati a prova di ciò, ma niente esclude una possibile insorgenza di complicazioni dopo anni di terapia. Gli ultimi esperimenti si basano sulla creazione di farmaci in grado di riconoscere uno specifico target, ed un esempio è dato dall'oligonucleotide metilato diretto verso la regione 5' del promotore del fattore di crescita *insulin-like* (Yao X et al., 2003), ma questi studi risultano ancora ad uno stadio molto precoce.

Importante notare come un farmaco epigenetico non venga utilizzato singolarmente, bensì in associazione con altri farmaci epigenetici o chemioterapici (Kim MS et al., 2003). Diversi studi, condotti sia in vitro che in vivo, hanno dimostrato effetti sinergici di somministrazioni di inibitori DNMT (decitabina) e inibitori HDAC (vorinostat)(Issa JP e Kantarjian HM, 2009).

Accanto agli inibitori delle DNMT e delle HDAC, esistono altri gruppi di inibitori molto studiati, ovvero gli inibitori delle HAT (Histone acetyltransferase), di HMT (Histone methyltransferase) e di HDM (Histone demethylase)(Fig. 13).

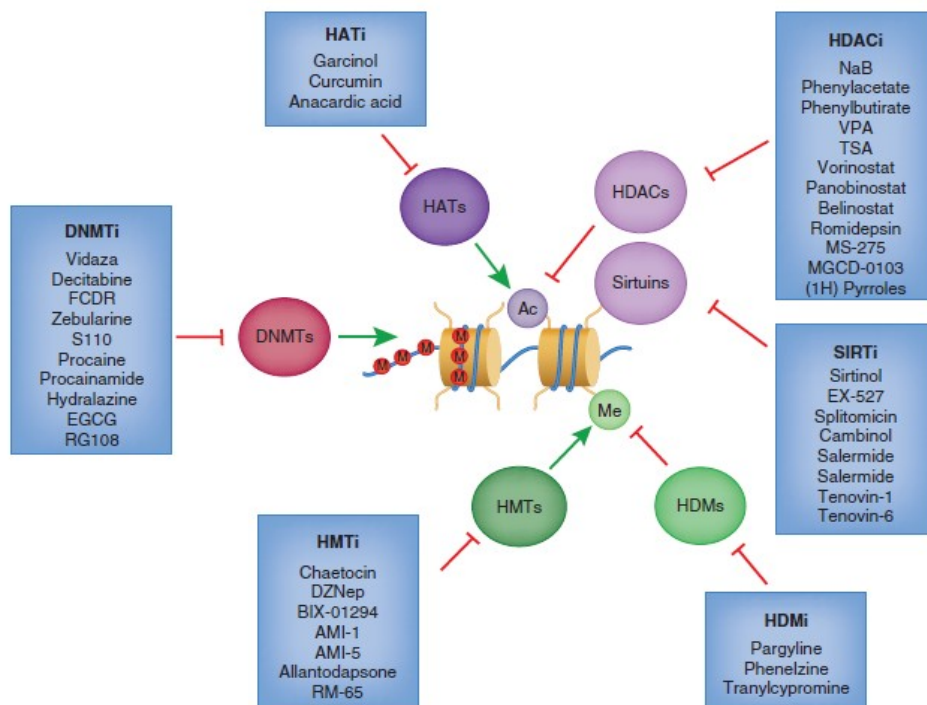


Fig. 13: Sostanze inibenti i diversi complessi enzimatici.

Gli inibitori della deacetilasi SIRT (sirtinolo e splitomicina) sono molto meno studiati rispetto a quelli di DNMT e HDAC, ma si è vista una loro rilevanza per mezzo dell'induzione dell'apoptosi delle cellule tumorali tramite l'aumento dell'attività di p53 (Ota H et al., 2006). Il sirtinolo inibisce SIRT1 e 2 ed è inoltre in grado di aumentare la sensibilità ai farmaci antitumorali quali la camptotecina ed il cisplatino (Kojima K et al., 2008).

Tre sono le molecole che costituiscono gli inibitori delle HAT: la curcumina, il garcinol e l'acido anacardico. La curcumina è un inibitore specifico di EP300 e CREBBP e svolge la sua funzione antitumorale in diverse forme tumorali, up- o down- regolando CCDN1 (cyclin D1) e CASP8 (caspase 8) ed inibendo l'attivazione costituzionale di NFκB (Nuclear Factor-κB) (Mukhopadhyay A et al., 2002; Shishodia et al., 2005 e 2007).

Il garcinol possiede proprietà apoptotiche sulle cellule HeLa, mentre l'acido anacardico sensibilizza le cellule tumorali alle radiazioni ionizzanti (Balasubramanyam K et al., 2004; Sun Y et al., 2006).

Tre sono le molecole descritte come inibitori HMT: la chaetocina, DZNep e BIX-01294. La prima, la chaetocina, fu originariamente identificata in *Drosophila* e nella controparte umana svolge la stessa funzione antitumorale, dimostrata in studi su mieloma multiplo (MM) (Grenier et al., 2005; Isham et al., 2007). DZNep induce l'apoptosi nelle cellule tumorali mammarie MCF7 e tumorali colonrettali HCT116, promuovendo la deplezione di EZH2 (polycomb repressive complex-2 protein) ed inibendo la metilazione di H3K27 (Tan J et al., 2007).

Evidenze sperimentali mostrano uno stretto legame tra le kinasi e le modificazioni epigenetiche: la tirosin-kinasi JAK2 è in grado di fosforilare H3Y41, prevenendo così di- o tri- metilazione di H3K9 mediata da CBX5 tramite il legame con la cromatina (Dawson MA et al., 2009). La kinasi aurora B, la quale fosforila H3S10 e mantiene la stabilità cromosomica durante la mitosi, è overespressa in diversi tumori solidi umani (Hirota T et al., 2005; Dar AA et al., 2010). E' stato recentemente scoperto che nei linfomi a cellule B, aurora B in associazione all'isoforma A, è essenziale per la progressione tumorale mediata da Myc (den Hollander J et al., 2010). Un considerevole numero di inibitori delle diverse isoforme della kinasi aurora è dunque in fase di trial clinico, tra cui il danusertib (PHA-739358) ed MLN8237 sono ad oggi in fase II con risultati promettenti (Steeghs N et al., 2009, Dar AA et al., 2010; Gorgun G et al., 2010). Infine l'uso degli inibitori delle HDAC in associazione agli inibitori delle tirosin-kinasi come ad es. AEE788 ed imatinib, è stato dimostrato efficace verso molti tipi di cellule tumorali (Yu C et al., 2007; Zhang B et al., 2010).

Le future terapie antineoplastiche utilizzeranno sicuramente gli effetti sinergici tra i farmaci epigenetici o tra questi ultimi ed altri agenti antitumorali. I farmaci epigenetici come gli inibitori delle HDAC potrebbero agire con agenti in grado di danneggiare il DNA tumorale, poiché questi ultimi permettono un migliore accesso alla cromatina.

Ad oggi farmaci chemioterapici di rilievo sono già stati testati assieme ad inibitori di DNMT, HDAC e SIRT, ed è stata dimostrata la loro efficacia tramite numerosi *trials clinici* (Ma X et al., 2009; Yang X et al., 2010).

L'efficacia terapeutica di qualsiasi farmaco antitumorale è altamente associata al suo *uptake* cellulare, dunque risulta di estremo rilievo lo

studio di questo meccanismo al fine di migliorare le terapie farmacoepigentiche.

CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI

Le LAM con cariotipo normale alla diagnosi rappresentano il 40-50% di tutti i pazienti con questa malattia. Abbiamo studiato in particolare il meccanismo di regolazione di uno tra i marcatori molecolari maggiormente studiati, il gene *BAALC*. Questo gene è overespresso in una frazione di LAM e la sua overespressione si associa ad una maggiore aggressività clinica della malattia. Del gene *BAALC* non è presente in letteratura alcun dato riguardante la sua regolazione trascrizionale. Data l'importanza delle modificazioni epigenetiche nel controllo della trascrizione, allo scopo di comprendere le basi molecolari della sovra espressione di *BAALC* in soggetti LAM, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su questi fenomeni.

In particolare, gli obiettivi dello studio sono i seguenti:

- A. Verificare se nella nostra casistica di LAM esiste una overespressione del gene *BAALC*. Abbiamo studiato una casistica di 200 pazienti affetti da LAM, raccolta da gennaio 2001 a maggio 2011 presso l'Istituto di Genetica medica di Udine, su cui sono stati eseguiti i saggi molecolari.
- B. Identificare un modello cellulare sul quale studiare i meccanismi alla base della regolazione dell'espressione del gene *BAALC*. Abbiamo studiato diverse linee cellulari leucemiche concentrandoci poi sulle cellule Kasumi-6 e Kyo.
- C. Utilizzando queste linee cellulari, identificare modificazioni post-traduzionali dell'istone H3 che si associano all'espressione di *BAALC*.

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI E LINEE CELLULARI

3.1.1 La casistica

Questo studio ha coinvolto 200 pazienti con diagnosi di LAM reclutati da gennaio 2001 a maggio 2011. La diagnosi di LAM è stata posta analizzando la morfologia cellulare e i marcatori immunofenotipo di analisi citogenetica, secondo la classificazione FAB (Francese-Americana-Britannica).

Il consenso informato è stato ottenuto da ciascun paziente prima di cominciare lo studio.

3.1.2 Linee cellulari

La linea cellulare leucemica Kasumi-6 è stata coltivata in RPMI 1640 con il 20% di siero fetale bovino (Gibco, Milano, Italia) integrato con 2 ng/ml di rh GM-CSF (ricombinant human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) (ImmunoTools GmbH, Germania).

La linea cellulare leucemica Kyo è stata coltivata in RPMI 1640 con 10% di siero fetale bovino (Gibco, Milano, Italia).

Successivamente è stato condotto un esperimento con l'inibitore della deacetilasi istonica SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), mediante un trattamento di 48 h sulle cellule e ad una concentrazione di 6 μ M.

3.2 ESTRAZIONE DI RNA

Per la maggior parte dei casi, gli acidi nucleici sono stati estratti dal midollo osseo dei pazienti. Per l'estrazione dell'RNA il campione è stato prima sottoposto ad una separazione su gradiente di densità su Ficoll-Hypaque per separare le cellule mononucleate mature dai globuli rossi e granulociti. Viene eseguita una breve centrifugazione (20') durante la quale avviene la formazione di un anello di globuli bianchi nell'interfaccia tra il plasma e il Ficoll. Questi ultimi vengono raccolti con una pipetta Pasteur e sottoposti a due brevi lavaggi con soluzione

salina (PBS) per rimuovere tracce di piastrine, plasma a Ficoll stesso. Successivamente, dal pellet di globuli bianchi è stato estratto l'RNA totale tramite il QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen).

3.3 RETROTRASCRIZIONE

L'RNA totale ottenuto viene retrotrascritto nel DNA complementare (cDNA) usando una miscela di random esaprimers ad una concentrazione di 500 ng/ μ l in un volume di reazione di 20 μ l ed utilizzando come enzima la M-MLV-RT (Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase-INVITROGEN), in presenza di inibitori delle RNasi. Lavorando in condizioni di sterilità, si prepara la miscela di reazione: per ogni campione si aggiungono 5X Buffer 4 μ l, DTT 0.1 M 2 μ l, dNTPS (200 mM) 4 μ l, esaprimers 0.4 μ l, RNasi OUT 0.6 μ l ed 1 μ l di enzima M-MLV. Per ogni campione in una provetta da 0.2 ml, in ghiaccio, si pongono H₂O e l'equivalente in μ l di 1 μ g di RNA in un volume totale di 8 μ l. Successivamente si denaturano le provette per 10' a 70°C, si ripongono in ghiaccio e si dispensano 12 μ l di miscela di reazione. Segue un'incubazione a temperatura ambiente per 15' e si procede con la retrotrascrizione a 42°C per 50'.

Le successive amplificazioni vengono eseguite usando 2 μ l di cDNA.

3.4 REAL TIME-PCR

Il principio della Real Time-PCR si basa sulla rivelazione e quantificazione di un segnale fluorescente durante l'amplificazione PCR, in quanto la quantità di fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR (Manuale Roche, 2005). Questa nuova tecnica automatizza il processo di amplificazione, rivelazione e quantificazione della PCR o dell'RT-PCR e quantifica i prodotti di reazione in ogni campione, in ogni ciclo. Non essendo necessarie altre fasi post-PCR, la possibilità di contaminazioni incrociate da parte del prodotto di PCR è ridotta al minimo; questo vantaggio rende la Real Time-PCR un metodo di particolare valore per applicazioni diagnostiche, e può inoltre essere applicata a:

- *quantificazione virale e batterica*

- *quantificazione dell'espressione genica*
- *genotipizzazione*
- *rivelazione di patogeni*
- *verifica dell'efficacia terapeutica farmacologica*

3.4.1 Approcci

La tecnica può essere condotta mediante coloranti fluorescenti che si legano al DNA (bromuro d'etidio e Sybr green) o tramite sonde sequenza-specifiche (sonde di idrolisi, sonde di ibridazione, Molecular beacons, Scorpions)(Manuale Roche, 2005).

3.4.1.1 I coloranti fluorescenti

Il tipo di PCR quantitativa più semplice e meno costosa si basa sull'utilizzo di fluoro cromi in grado di intercalarsi o legarsi al dsDNA.

Essi però rilevano sia prodotti di PCR specifici che aspecifici, e di conseguenza questa metodica richiede un'attenta ottimizzazione delle condizioni di PCR e una differenziazione chiara tra i prodotti specifici e quelli aspecifici utilizzando l'analisi delle curve di fusione.

I fluorocromi, non riuscendo dunque a discriminare le diverse specie di dsDNA, permettono semplicemente la produzione di un segnale fluorescente proporzionale alla quantità totale di dsDNA presente nel saggio.

Bromuro d'etidio: è in grado di intercalarsi tra le pile di coppie di basi planari del dsDNA. Ad intercalazione avvenuta, tramite esposizione a luce ultravioletta il bromuro d'etidio fluoresce nello spettro di luce visibile.

Sybr Green: colorante in grado di emettere una fluorescenza quando non è legato al DNA, ma l'emissione di fluorescenza aumenta di molto quando esso si lega al dsDNA, in particolare al solco minore (fluorescenza letta a 530 nm). Si otterrà perciò un aumento di segnale, in quanto più ampliconi sono prodotti, più la reazione verrà resa visibile.

3.4.1.2 Sonde sequenza-specifiche

Idrolisi della sonda (TaqMan): si serve di una sonda recante un fluoroforo (TaqManProbe), la quale è costituita all'estremità 5' da una molecola ad alta energia detta *REPORTER* e da una a bassa energia all'estremità 3' detta *QUENCHER*; la sonda è in grado di legarsi ad una specifica sequenza del template. Quando la sonda è integra e viene eccitata da una fonte di luce, l'emissione del Reporter viene soppressa dal Quencher, a causa della vicinanza delle due molecole (FRET o Fluorescent Resonance Energy Transfer).

Se il probe viene tagliato, per effetto dell'attività 5'-esonucleasica caratteristica della Taq polimerasi, il trasferimento di energia tra i due ha termine in quanto l'emissione del Reporter sarà libera. Ne consegue un aumento di segnale direttamente proporzionale alla quantità di amplificato; tale segnale verrà poi catturato dal rilevatore (Manuale Roche, 2005).

Ibridazione della sonda: questa metodica richiede l'utilizzo di due sonde marcate bersaglio-specifiche. La prima sonda di ibridazione posta a monte risulta marcata all'estremità 3' con un fluorocromo FRET (colorante), che si comporta da donatore di energia di trasferimento fluorescente. La seconda sonda posizionata a valle è marcata all'estremità 5' con un fluorocromo accettore. Quando eccitati, entrambi i fluorocromi emettono un segnale fluorescente specifico. Quando le due sonde invece le due sonde marcate sono libere nella soluzione, la distanza che intercorre tra di esse impedisce il trasferimento di energia tra i rispettivi fluorocromi. Le due sonde di acido nucleico marcate sono disegnate per ibridare con determinate sequenze bersaglio in modo che i fluoro cromi finiscano in posizione adiacente. Quando entrambe le sonde sono legate alla sequenza bersaglio, la vicinanza tra il colorante donatore e l'accettore permette il trasferimento di energia. Il risultato è l'emissione di fluorescenza ad una specifica lunghezza d'onda da parte dell'accettore. L'intensità della fluorescenza misurata nella reazione è proporzionale al numero di sonde ibridate alle sequenze bersaglio e alla quantità di prodotto bersaglio-specifico presente nella reazione (Manuale Roche, 2005).

Molecular beacons: essi sono delle variazioni degli oligonucleotidi sonda a doppia marcatura. Presentano una struttura a forcina (“stelo e ansa”) contenente un fluorocromo con un quencher interno e, in soluzione libera, non emettono livelli di fluorescenza rilevabili. L’ansa della molecular beacon è una sequenza specifica con funzione di sonda complementare ad una molecola di acido nucleico bersaglio. Le sequenze del braccio ai lati della sonda sono complementari tra loro ma non sono correlate alla sequenza bersaglio e sono in grado di ibridare formando uno stelo. All’estremità di un braccio è legato un fluorocromo reporter mentre all’estremità dell’altro braccio è legato un quencher. Le sequenze del braccio formanti lo stelo, quando ibridate tra loro, mantengono il fluorocromo ed il quencher strettamente vicini, facendo sì che la potenziale fluorescenza del fluorocromo possa essere “spenta” con un trasferimento di energia.

Quando una molecular beacon incontra la sua sequenza bersaglio di acido nucleico, le due molecole si legano formando un ibrido più stabile e più lungo dello stelo della molecular beacon. Essa va incontro spontaneamente ad un cambio conformazionale che allontana lo stelo, facendo così aumentare la distanza tra fluorocromo e quencher. In questo modo si interrompe il trasferimento di energia ed aumenta notevolmente il segnale fluorescente della molecular beacon, fino a livelli rilevabili. Questo meccanismo di rilevamento è abbastanza efficiente da permettere la discriminazione di singoli appaiamenti errati tra coppie di basi (Manuale Roche, 2005).

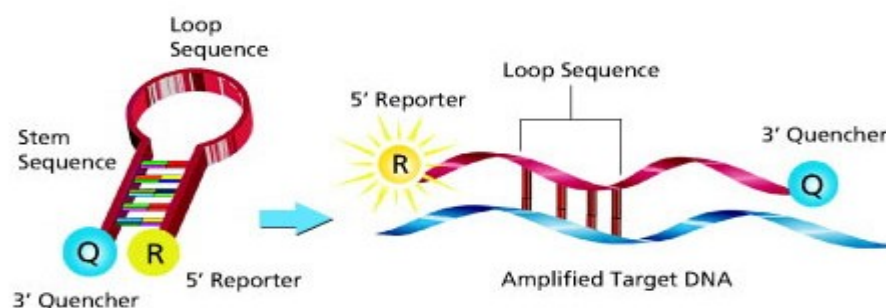


Fig.14: Molecular beacon.

Primer scorpion: sono primer PCR costituiti da uno stelo ed una coda ad ansa contenente un fluorocromo ed un quencher. In questa conformazione il primer scorpion non è in grado di fluorescere perchè il fluorocromo è spento e lo stelo e l’ansa sono separati dalla sequenza

del primer da un “bloccante PCR”, ovvero una modifica chimica che impedisce alla DNA polimerasi di copiare la sequenza dello stelo e dell’ansa del primer scorpion durante l’amplificazione.

Nel corso della PCR, il primer scorpion è esteso a partire dalla sua estremità 3’; durante la fase di ibridazione, la sequenza della sonda nella coda del primerscorpion si ricurva per ibridare con la sequenza bersaglio del prodotto di PCR, separando così il fluorocromo dal quencher, e permettendo l’emissione di una fluorescenza rilevabile (Manuale Roche, 2005).

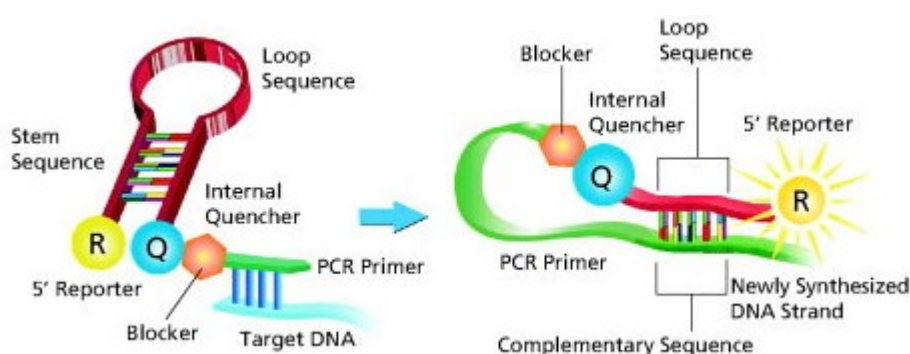


Fig. 15: Primer scorpion.

Il primo tipo di approccio, ovvero i coloranti fluorescenti, risulta il più semplice e meno costoso. Esso consente di monitorare l’amplificazione della doppia elica di DNA senza necessitare dell’utilizzo di una sonda, con lo svantaggio però, come già detto in precedenza, di ottenere falsi positivi per l’incapacità del colorante di discriminare tra le diverse specie di dsDNA. Di conseguenza ogni artefatto del primer ed altri prodotti di reazione non specifici contribuiranno alla misurazione dell’intensità del segnale fluorescente.

Per quanto riguarda la metodica basata su sonde sequenza-specifiche, in particolare la TaqMan, data la presenza della sonda stessa, essa possiede un’alta specificità. La sensibilità dei due approcci risulta comunque simile. Per tutti questi motivi, abbiamo utilizzato la metodica TaqMan al fine di valutare l’espressione del gene *BAALC*.

3.4.2 Protocollo

La metodica da noi utilizzata, ovvero la TaqMan mostrata in Figura 6, si esplica in 4 punti (Manuale Roche, 2005):

- 1) Costruzione di una sonda oligonucleotidica tramite l'utilizzo di opportuni software che ne definiscono la sequenza in base alla temperatura di melting (T_m) ed alla dimensione del prodotto di PCR (amplicone); inoltre le sequenze progettate non contengono regioni ricche in GC o regioni che potrebbero formare forti strutture secondarie. Ogni probe viene successivamente analizzato per verificare l'ibridazione potenziale (analisi di omologia), confrontando la sua sequenza con quelle contenute nei principali database a disposizione.
- 2) Se la sequenza target è presente, la sonda lega nel sito 3' del primer forward e viene tagliata dalla Taq polimerasi quando questa inizia a polimerizzare.
- 3) Il taglio della sonda porta a:
 - separazione tra Quencher e Reporter, aumentandone così il segnale;
 - rimozione della sonda dall'elica target, permettendo così l'estensione da parte dei primer la cui attività non viene perciò inibita.
- 4) Ad ogni ciclo le molecole di reporter subiscono un distacco dai rispettivi probe, con il risultato di un aumento dell'intensità della fluorescenza, la quale risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di amplicone prodotto.

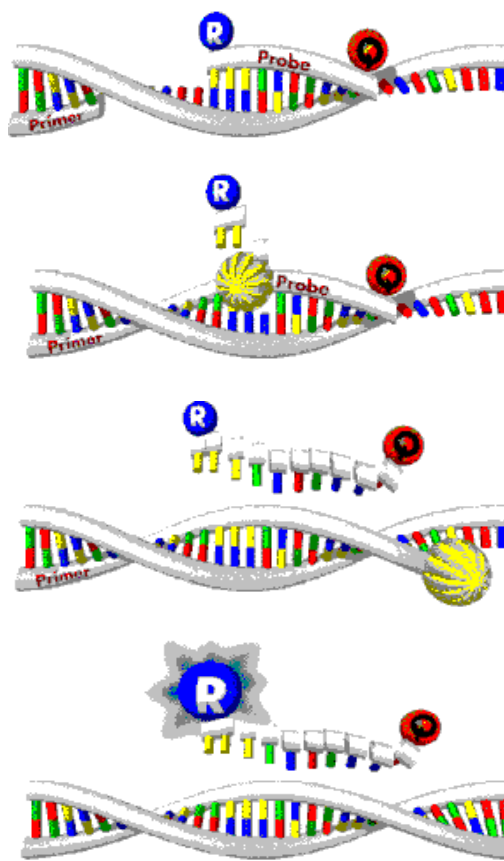


Fig. 16: Rappresentazione schematica di un saggio di RQ-PCR con il metodo TaqMan.

3.4.3 Efficienza di amplificazione di un saggio di RQ-PCR

L'efficienza di amplificazione di un saggio di Real Time-PCR è dato dal coefficiente angolare della retta (slope) che si ottiene amplificando delle diluizioni seriali del gene target e determinando il valore di C_T per ogni diluizione. Successivamente, viene costruito un grafico dei C_T contro il log della concentrazione. Con questo metodo, il coefficiente angolare atteso per una serie di diluizioni scalari di 10 in 10 di un template di DNA è -3.32.

L'efficienza di amplificazione sarà del 100% se la retta ha un coefficiente angolare di -3.32.

La formula che si applica per calcolare l'efficienza di un saggio di PCR quantitativo sarà, dunque, la seguente:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

3.4.3.1 Il metodo Livak o del $2^{-\Delta\Delta Ct}$

L'analisi dell'espressione del gene *BAALC* è stata eseguita con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Il metodo assume che sia il gene target che il gene endogeno siano amplificati con la stessa efficienza vicino al 100%.

Prima di utilizzare il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, è necessario verificare questa assunzione determinando singolarmente l'efficienza di amplificazione dei due geni. L'efficienza di amplificazione dei due geni viene valutata amplificando due curve standard, una per il gene target e una per il gene endogeno, e confrontando tra loro i coefficienti angolari (m) delle equazione che rappresentano le due rette $y = mx + q$. Se i coefficienti angolari delle due rette sono uguali, con $m < +/- 0.1$, allora le due rette sono parallele e, dunque, i due geni si sono amplificati con la stessa efficienza.

Una volta stabilito che il gene target e il gene endogeno hanno un'efficienza di amplificazione simile e vicina al 100%, si può calcolare la differenza relativa di espressione del gene target in diversi campioni usando il seguente procedimento:

1) Normalizzare il Ct del gene target a quello del gene endogeno, sia per il campione che per il calibratore (un campione usato come base per il confronto dei risultati).

$$\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$$

$$\Delta C_{T(\text{calibrator})} = C_{T(\text{target, calibrator})} - C_{T(\text{ref, calibrator})}$$

2) Normalizzare il ΔC_T del campione test al ΔC_T del calibratore:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{calibrator})}$$

Infine, calcolare il rapporto dell'espressione

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{rapporto dell'espressione normalizzato}$$

Il risultato ottenuto è l'incremento (o decremento) del gene target nel campione test relativo al calibratore ed è normalizzato all'espressione del gene endogeno (Fig. 17). Normalizzando l'espressione del gene target a quello del gene endogeno si compensano le differenze nelle eventuali quantità dei campioni.

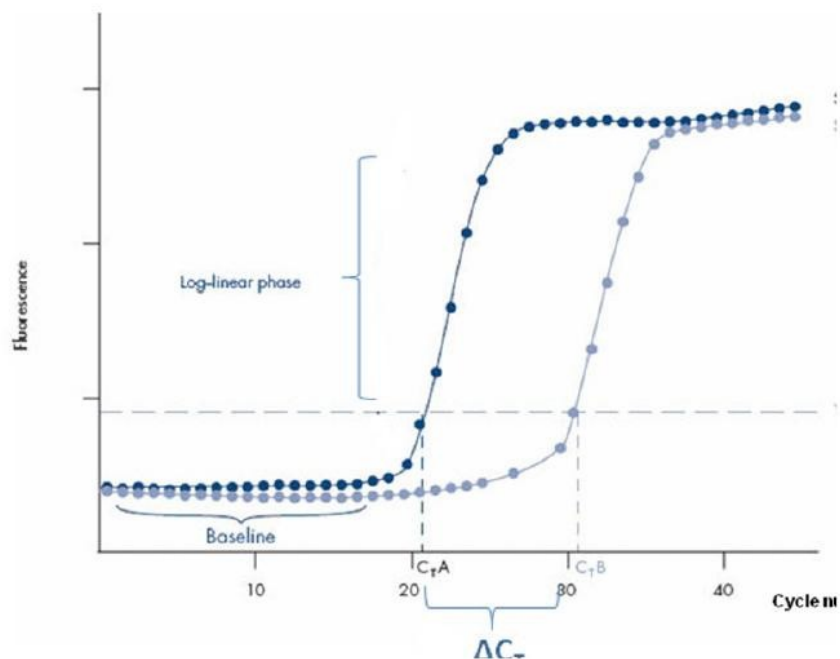


Figura 17: Schema del calcolo del ΔC_t in un saggio di quantizzazione relativa.

3.4.4 Espressione di **BAALC**

L'espressione di *BAALC* è stata valutata in PCR quantitativa utilizzando un sistema TaqMan. Le sequenze relative al sistema utilizzato sono di seguito riportate di seguito in Tabella 6.

GENE	SEQUENCE
<u>BAALC</u>	Primer F: 5'-GCCCTCTGACCCAGAAACAG-3'
	Primer R: 5'-CTTTTGCAGGCATTCTCTTAGCA-3'
	Probe: 6FAM 5'-CTCTTTTAGCCTCTGTGGTCTGAAGGCCAT-3'
<u>ABL</u>	Primer F: 5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGG T-3'
	Primer R: 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'
	Probe: 5'-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-3'

Tabella 6: Sequenze oligonucleotidi per i geni *BAALC* e *ABL*.

L'espressione dell'RNA messaggero di *BAALC* è stata normalizzata con il gene endogeno *ABL*. In ogni saggio erano stati inclusi un controllo positivo, la linea cellulare leucemica Kasumi-6, ed un controllo negativo. Ogni campione è stato analizzato in triplicato sia per *BAALC*

che per *ABL* in un volume finale di 25 μ l. I primers per *BAALC* e *ABL* erano intronici.

I probes erano marcati rispettivamente con i fluorofori 6FAM al 5' e TAMRA al 3'. I parametri di amplificazione sono i seguenti:

50° per 2'

95° per 10'

60° per 1' ripetuto per 50 cicli

Per determinare il *cut-off* che delimita valori di espressione di *BAALC* alti o bassi, è stato utilizzato l'approccio di Bienz e colleghi (Bienz M et al., 2005). L'espressione genica di *BAALC* è stata analizzata anche in 21 campioni di sangue periferico da donatori volontari e il cut off è rappresentato dal valore mediano di queste misure (0.069). Quindi, un valore più alto di 0.069 era considerato alta espressione, mentre un valore inferiore bassa espressione.

3.5 SAGGIO DI IMMUNOPRECIPITAZIONE (ChIP)

Il saggio di immunoprecipitazione (ChIP-Chromatin ImmunoPrecipitation) serve per valutare la presenza di modificazioni post-traduzionali istoniche grazie l'utilizzo di un anticorpo specifico verso la modificazione che si trova sul DNA. Si utilizzano degli agenti crosslinkanti che mantengono la modificazione legata al DNA, il quale successivamente viene frammentato (mediante sonicazione), segue l'immunoprecipitazione ottenendo così la proteina d'interesse legata alla sequenza di DNA. Per staccare la proteina si reverta il crosslink ed a questo punto si può analizzare in dettaglio la proteina ottenuto tramite diverse metodiche (PCR, Real time-PCR, microarray, sequenziamento). Il protocollo dettagliato del saggio ChIP è riportato dopo la Figura 18 che mostra i passaggi fondamentali.

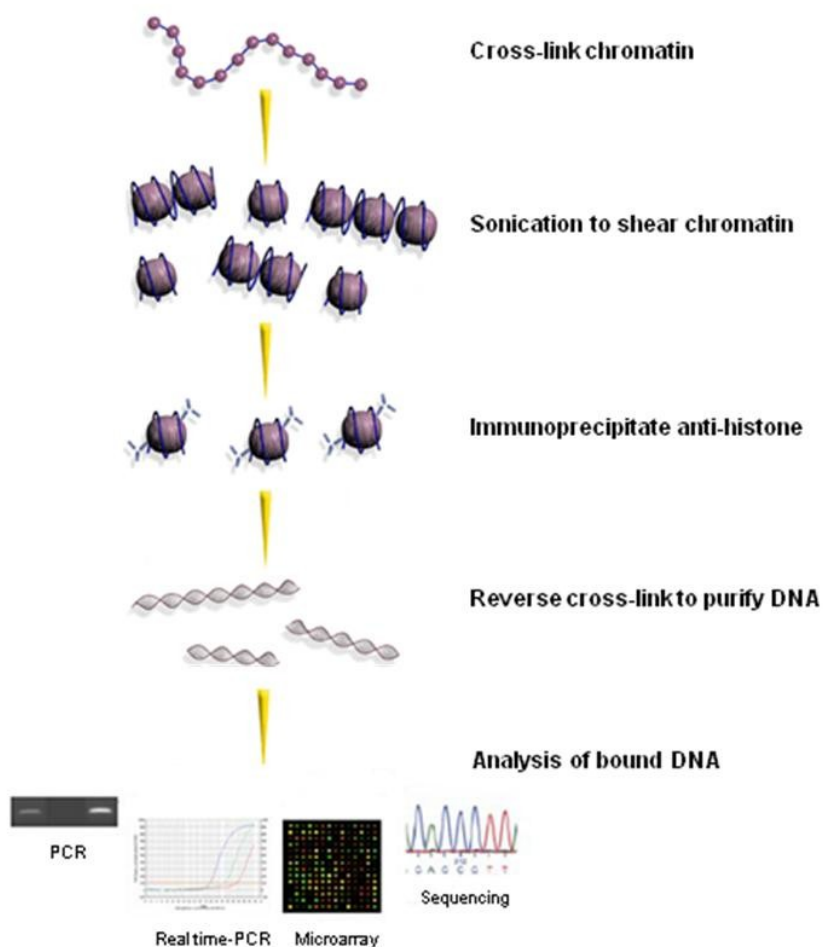


Fig 18: Passaggi saggio ChIP.

3.5.1 Protocollo ChIP

Le linee cellulari leucemiche Kasumi-6 e Kyo sono state fissate con l'aggiunta di formaldeide ad una concentrazione finale di 1% per 10 minuti prima della raccolta. Le cellule sono state raccolte dalle fiasche di coltura, centrifugate per eliminare il surnatante 4 minuti a 1000 rpm e lavate due volte con PBS freddo, e sospese in un tampone di lisi cellulare (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1 e cocktail di inibitori della proteasi-PMSF-NaF-Na ortovanadato) e sonicate per 6 minuti, questo per generare frammenti cromatinici con una lunghezza media di circa 200-600 bp.

Successivamente si esegue una centrifugazione a 13000 rpm per 10 min a 4 °C, e si preleva il surnatante. Diluizione dei campioni di 10 volte con tampone di diluizione (0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl pH 8,1, 167 mM NaCl). Un'aliquota (circa il 10% del totale) è stata utilizzata come input totale di cromatina ed è stata analizzata con i campioni eluiti ottenuti dopo immunoprecipitazione all'inizio della fase di inversione (**1° controllo negativo**).

PRE-CLEARING: incubazione con 80 µl di resina (protein A Agarose/Salmon sperm-Millipore) per 30 minuti a 4 °C in agitazione su una ruota, successivamente si centrifuga per 1 minuto a 7000 rpm e si raccoglie il surnatante. La frazione di surnatante è stata immunoprecipitata overnight a 4 °C con 10 µg di anticorpo monoclonale anti-H3K9K14 (Upstate Biotechnology, Waltham, MA, USA) o con anticorpo policlonale di coniglio anti-H3K4me3 (Activ motif attivo, Carlsbad, CA, USA), o con anticorpo policlonale anti-H3K27me3 (Sctiv motif, Carlsbad, CA, USA). Come controllo negativo, è stato utilizzato un campione senza l'aggiunta di alcun anticorpo.

I campioni ed i controlli negativi sono stati incubati con 60 µl di resina per un'ora a 4 °C in agitazione. Pellettare la resina tramite centrifugazione (3000 rpm a 4 °C) raccogliere il surnatante (**2° controllo negativo**).

LAVAGGI RESINA: lavare per 5 min a RT su una piattaforma rotante con 1 ml di ogni buffer: basso sale, alto sale, tampone di lavaggio LiCl, buffer TE. Centrifugare 1 minuto a 3000 rpm a 4 °C e scartare il surnatante.

ELUIZIONE: gli immunocomplessi sono stati eluiti con 250 µl tampone di eluizione (1% SDS, 50 mM NaHCO₃), vortexare ed incubare per 15 minuti in agitazione sulla ruota a RT. Successiva centrifugazione di 1 minuto a 3000 rpm a 4 °C, tenere il surnatante (ripetere il passaggio con il buffer di eluizione per due volte, totale eluito 500 µl).

DECROSSLINK: aggiungere ai 500 μ l di eluato 20 μ l di NaCl 5 M, mentre 16 μ l di NaCl negli INPUT. Successiva incubazione a 65 °C per 4 h.

DIGESTIONE PROTEINASI K: aggiungere ai campioni 1 μ l di proteinasi K (20 mg/ml), 20 μ l di Tris HCl 1 M pH 6,5 e 10 μ l di EDTA 0,5 M ed incubare per 1 ora a 45 °C.

PURIFICAZIONE DNA: il DNA è stato purificato aggiungendo ai campioni eluiti 500 μ l di fenolo/cloroformio e 500 μ l di alcool isoamilico (per gli INPUT 300 μ l di entrambi i reattivi). Vortexare e centrifugare per 10 minuti a 13000 rpm a RT. Prelevare il surnatante e depositarlo in nuove provette.

PRECIPITAZIONE: aggiungere al surnatante 1/10 di Na acetato 3 M pH 5.2, 5 μ l di glicogeno e 2,5 volumi di etanolo 100% freddo. Vortexare e congelare a -80 °C per 30 minuti. Centrifugare a 13000 rpm a 4 °C per 20 minuti. Lavare successivamente con 150 μ l di etanolo 70% e centrifugare 5 minuti a 13000 rpm. Scartare infine il surnatante e risospendere con 50 μ l di acqua sia gli eluiti che gli INPUT.

CAPITOLO 4 – RISULTATI

4.1 *BAALC* risulta overespresso nei pazienti con leucemia acuta mieloide

In una prima fase dello studio, sono stati valutati i livelli di mRNA di *BAALC* in soggetti con LAM. Questi dati sono stati paragonati ai livelli dell'mRNA di *BAALC* in soggetti normali. Globalmente sono stati valutati 21 soggetti normali e 200 soggetti LAM.

I risultati ottenuti sono delineati in Figura 19. Nei soggetti con LAM i livelli di messaggero risultano superiori di più di due ordini di grandezza rispetto ai soggetti normali (N). In quest'ultimo gruppo, la differenza tra il valore massimo e minimo è stata di circa 10 volte. Nei soggetti LAM questa variazione risulta molto più alta: una differenza di 10.000 volte è stata rilevata tra i pazienti con il più alto ed il più basso valore d'espressione di *BAALC* (la barra rossa posta su entrambe le casistiche, N e LAM, indica il valore medio).

Dunque, il confronto tra dell'espressione di *BAALC* tra soggetti normali e soggetti con LAM fornisce principalmente due tipi di risultato:

- a) nei soggetti LAM *BAALC* risulta overespresso;
- b) all'interno del gruppo dei soggetti LAM esiste un'enorme variazione dei livelli di mRNA di *BAALC*.

Questi dati indicano che nelle cellule leucemiche è presente una deregolazione dell'espressione del gene *BAALC*.

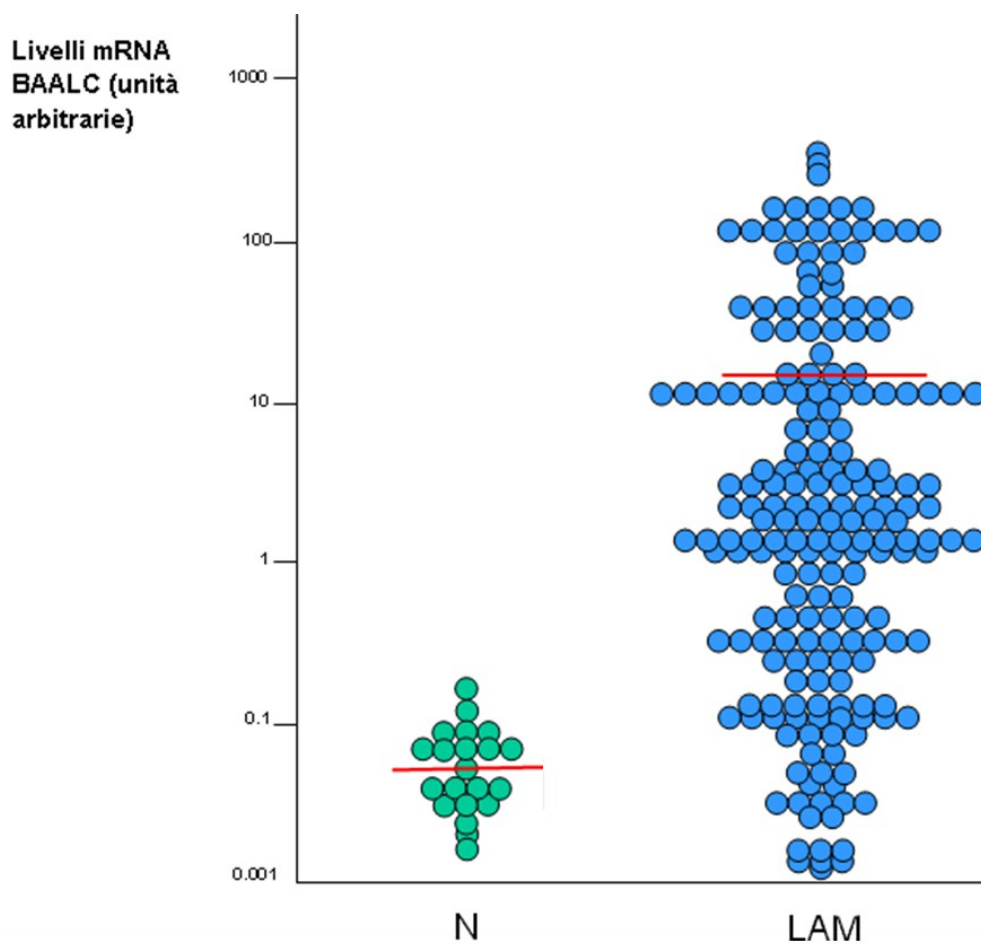


Fig. 19: Livelli di mRNA di BAALC nella casistica di soggetti sani (N) ed in pazienti affetti da leucemia (LAM).

4.2 Iperespressione del gene *BAALC* e variabili cliniche

Abbiamo messo in relazione l'espressione di *BAALC* con alcune variabili cliniche delle LAM. Il dato più interessante è quello evidenziato nella Figura 20. Quando i pazienti LAM vengono divisi in due categorie utilizzando come *cut-off* il 50° percentile rispetto all'espressione di *BAALC* (si hanno dunque un gruppo con alta espressione e uno con bassa espressione di *BAALC*), si può notare che il gruppo avente più alta espressione presenta una riduzione della sopravvivenza globale (OS-Overall Survival) ($p=0.0069$).

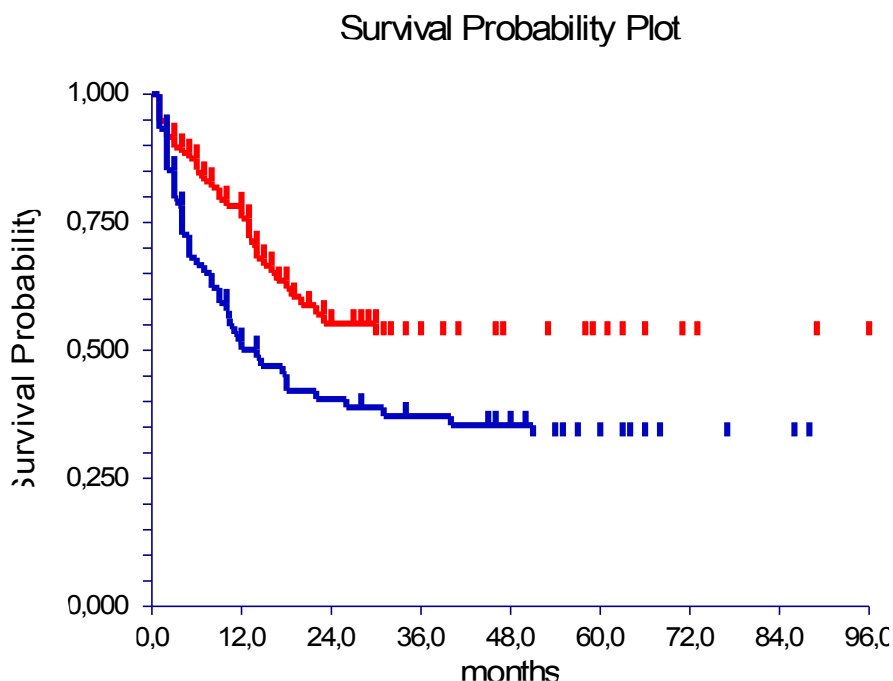


Fig. 20: Grafico della sopravvivenza globale (OS) nei pazienti LAM; curva blu: Baalc iperespresso, curva rossa: Baalc non iperespresso.

Anche quando, utilizzando lo stesso *cut-off*, viene analizzata la sopravvivenza libera da malattia (Disease Free Survival-DFS), pur essendoci lo stesso trend osservato nella OS, la differenza tra le due classi non è statisticamente significativa ($p=0.14$).

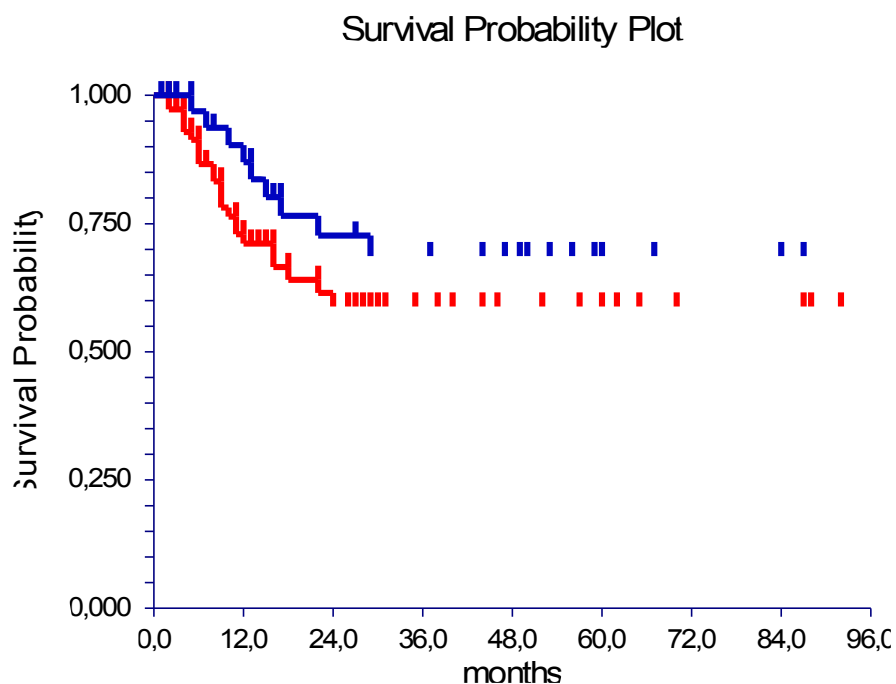


Fig. 21: Grafico relativo alla sopravvivenza libera da malattia (DFS); curva blu: BaalC non iperespresso, curva rossa: BaalC iperespresso.

Lo studio delle curve di sopravvivenza è stato effettuato tramite il metodo Kaplan-Meier ed i gruppi sono stati comparati tramite il Logrank test.

Nella Tabella 7 sono indicate analisi in univariata e multivariata di una serie di fattori associati a sopravvivenza nella nostra casistica LAM.

	Univariata		Multivariata	
	Z-value	P	Z-value	P
Età	4.02	0.0006	3.7	0.0001
Secondarietà	3.6	0.002	2.4	0.01
WBC>30x10⁹/L	0.131	0.896		
Cariotipo	0.141	0.8		
CD34	3.46	0.0005	1.4	0.15
CD56	1.48	0.13		
Bcl2	0.8	0.41		
ABCB1	1.59	0.4		
ABCG2	0.6	0.53		
Flt3-ITD	1.48	0.137		
Baalc	3.09	0.002	2.38	0.001

Tabella 7: Fattori associati a sopravvivenza.

Come si vede anche in multivariata l'overespressione di *BAALC* mantiene una significatività statistica ($p=0.01$).

Complessivamente i nostri dati confermando le indicazioni presenti in letteratura, indicano che l'iperespressione di *BAALC* tende ad associarsi ad una maggiore aggressività della malattia.

4.3 Espressione di *BAALC* in linee cellulari leucemiche e identificazione del suo promotore putativo

Al fine di definire un modello sperimentale per studiare il controllo dell'espressione del gene *BAALC*, abbiamo analizzato linee continue di tipo leucemico. Complessivamente i livelli dell'mRNA di questo gene sono stati valutati in 5 linee leucemiche: HL60, K562, NB4, Kyo e Kasumi-6. Tramite RT-PCR quantitativa, sono stati misurati i livelli di mRNA di *BAALC*. Come gene di riferimento è stato utilizzato *ABL*. Come mostrato in Figura 22, le HL60 e le K562 mostrano livelli di mRNA del gene *BAALC* rilevabili, mentre le linee cellulari NB4 e Kyo mostrano livelli molto bassi di mRNA di *BAALC*. Al contrario, nelle cellule Kasumi-6, l'espressione di *BAALC* risulta molto elevata.

Dunque, abbiamo rilevato tre tipi di situazioni:

1. cellule in cui l'espressione di *BAALC* è completamente silenziata;
2. cellule in cui *BAALC* è espresso a bassi livelli;
3. cellule in cui l'espressione di *BAALC* è molto elevata.

Così, per i modelli rappresentativi di una bassa e di un'alta espressione di *BAALC*, sono state scelte, rispettivamente, le cellule Kyo e Kasumi-6.

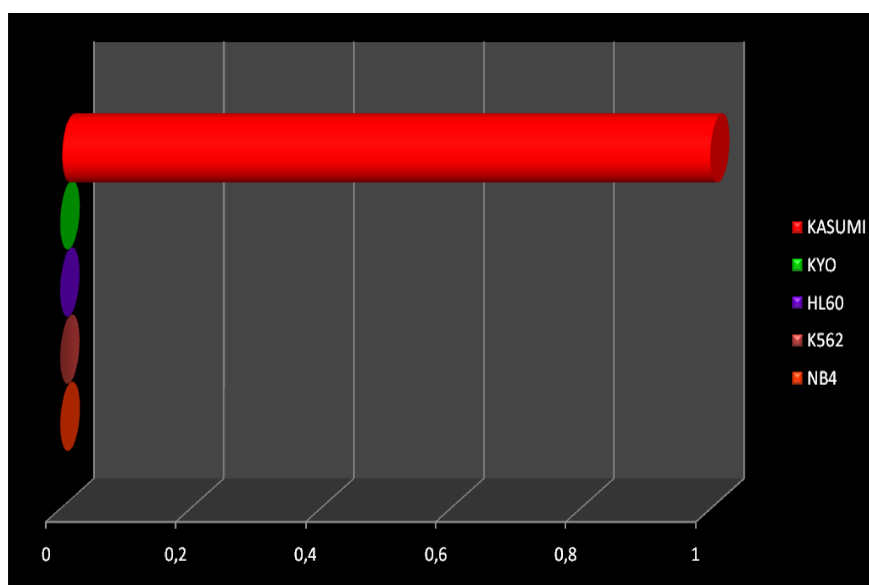


Fig. 22: Livelli di espressione di *BAALC* nelle 5 linee leucemiche analizzate.

4.4 Analisi in silico delle sequenze al 5' del gene *BAALC*

Allo scopo di studiare la regolazione trascrizionale del gene *BAALC*, il primo passo da fare consiste nell'identificazione del suo promotore o di altri elementi di regolazione. Sebbene la struttura del gene umano *BAALC* sia nota (Tanner SM et al, 2001), non sono disponibili informazioni sulla presenza di elementi di regolazione trascrizionale *in-cis* di questo gene. Dunque, abbiamo utilizzato un approccio di tipo bioinformatico.

Al fine di individuare il promotore putativo del gene *BAALC*, abbiamo cercato i possibili siti di legame di alcuni fattori di trascrizione indagando all'interno di una zona di 2 Kb posta a monte del sito di inizio della trascrizione di *BAALC* (Sequenza di riferimento del NCBI: NM024812.2) utilizzando il database Jaspar (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?rm=browse&db=core&tax_group=vertebrates) (Fig. 23).

Sono stati identificati 17 siti putativi di legame per fattori di trascrizione (Fig. 23). Sicuramente alcuni dei siti identificati corrispondono a dei falsi positivi. Peraltro, per due fattori di trascrizione si osservano due siti ciascuno relativamente vicino all'altro. Questo dato è molto importante perché spesso siti di fattori di trascrizione rilevanti dal punto di vista funzionale si trovano in più copie vicine tra loro (Read D et al., 1990; Gao B et al., 1995).

17 putative sites were predicted with these settings (100%) in sequence named*BAALC***

Model ID	Model name	score	Relative score	start	End	strand	predicted site sequence
MA0063.1	Nkx2-5	9.317	0.99992299524	49	55	-1	TTAATTG
MA0075.1	Prrx2	9.124	0.999984728392131	50	54	1	AAATTA
MA0151.1	ARID3A	9.844	0.99999069872	51	56	1	ATTAAA
MA0095.1	YY1	8.383	0.999993345000489	516	521	1	GCCATC
MA0081.1	SPIB	10.470	1.00001471989	673	679	1	AGAGGAA
MA0075.1	Prrx2	9.124	0.999984728392131	721	725	1	AAATTA
MA0075.1	Prrx2	9.124	0.999984728392131	729	733	-1	AAATTA
MA0075.1	Prrx2	9.124	0.999984728392131	745	749	1	AAATTA
MA0075.1	Prrx2	9.124	0.999984728392131	772	776	-1	AAATTA
MA0075.1	Prrx2	9.124	0.999984728392131	890	894	1	AAATTA
MA0151.1	ARID3A	9.844	0.999990698725	940	945	1	ATTAAA
MA0103.1	ZEB1	9.262	1.00000260163691	1188	1193	1	CACCTG
MA0006.1	Arnt::Ahr	9.603	1.000007711741	1386	1391	1	TGCGTG
MA0103.1	ZEB1	9.262	1.00000260163691	1396	1401	-1	CACCTG
MA0056.1	MZF1_I-4	9.085	0.9999873587911	1517	1522	-1	TGGGGA
MA0103.1	ZEB1	9.262	1.00000260163691	1626	1631	-1	CACCTG
MA0056.1	MZF1_I-4	9.085	0.9999873587911	1953	1958	1	TGGGGA

*Comment: * This type of analysis has a high sensitivity but abysmal selectivity. In other words: while true functional will be detected in most cases, most predictions will correspond to sites bound in vitro but with no function in vivo. A number of additional constraints of the analysis can improve the prediction; phylogenetic footprinting is the most common. we recommend using the consite <<http://www.phylfoot.org/consite>> service, which uses the JASPAR datasets.

The review Nat Rev Genet. 2004 Apr;5(4):276-87
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15131651&query_h1=1>
 gives a comprehensive overview of transcription binding site prediction

Fig. 23: Sequence dei 17 siti putativi, in giallo ed in verde i siti analizzati, rispettivamente, ARID3A e MZF1

Alle posizioni -1176 -1181 e -2064 -2069 sono presenti le sequenze che costituiscono i siti di legame per il fattore di trascrizione ARID3A. Più vicino al sito di inizio della trascrizione, sono stati invece identificati i siti di legame per il fattore di trascrizione MZF1 (in posizione -223 -228 e -672 e -677) (Fig. 24). La presenza di questi siti di legame suggerisce che questa regione corrisponde al promotore del gene *BAALC*. In realtà, è stato dimostrato che sia ARID3A e MZF1 sono espressi nelle cellule staminali ematopoietiche e che contribuiscono al loro differenziamento in senso mieloide (Gaboli M et al., 2001; Webb CF et al., 2011).

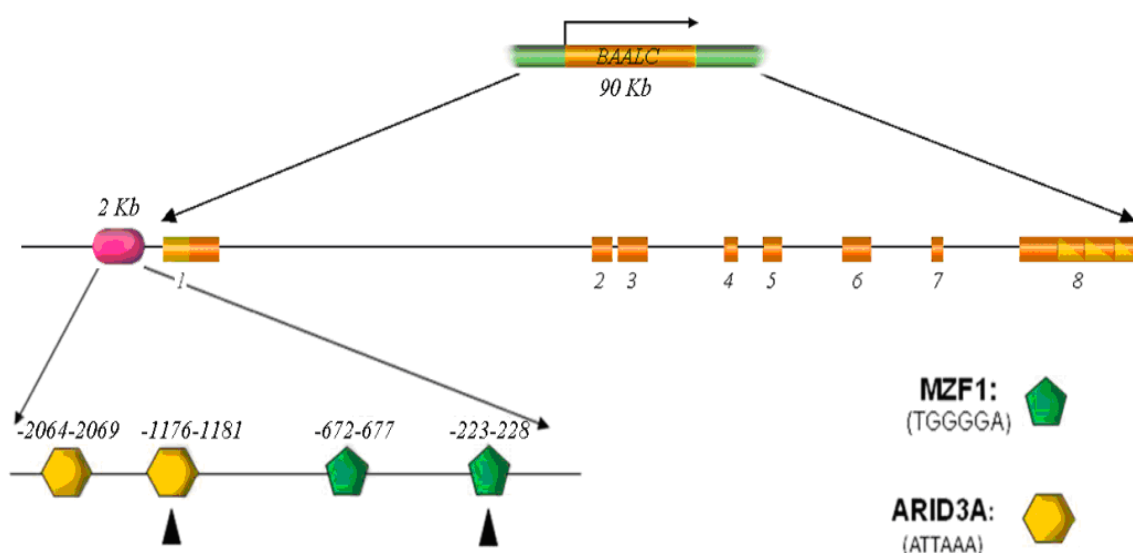


Fig. 24: Posizione dei siti ARID3A e MZF1 a monte del 5' del gene *BAALC*.

Dunque, allo scopo di studiare le modificazioni istoniche post-traduzionali presenti a livello del promotore di *BAALC*, ci siamo concentrati sui siti di legame per ARID3A e MZF1. Abbiamo disegnato oligonucleotidi da utilizzare in PCR quantitativa. Gli oligonucleotidi costituenti i primers e le sonde per ARID3A e MZF1 (Tabella 8) sono stati acquistati dalla ditta Applied Biosystems come saggi d'espressione Assay-on-Demand. I diversi esperimenti sono stati eseguiti con gli stessi parametri utilizzati per il gene *BAALC* (normalizzatore: *ABL*; calibratore: Kasumi-6) tranne che per le temperature di annealing dei primers per il saggio MZF1 (MZF1: 50°

per 2'; 95° per 10'; step aggiuntivo 58° per 1'; 60° per 1' ripetuto per 40 cicli).

GENE	SEQUENCE
<u>ARID3A</u>	Primer F: 5'- GGATATAATGAGTACTATATTCTCTATGCTTTACATGCTA-3'
	Primer R: 5'- TGGCAAAGACTGTTCTAGTAGACATAATACATATATAATA-3'
	Probe: FAM 5'-ACTATAGGGTGTGATGTTTAAT-3'
<u>MZF1</u>	Primer F: 5'-CGTCACGGAGCCCTGAG-3'
	Primer R: 5'-CCTCCTCTCCGCCTCCAA-3'
	Probe: FAM 5'-CCCCTCCGGTCCCCACC-3'

Tabella 8: Sequenze oligonucleotidiche di ARID3A e MZF1.

Le reazioni di PCR quantitativa seguivano le immunoprecipitazioni con specifici anticorpi diretti contro particolari modifiche post-traduzionali dell'istone H3. Segue una breve descrizione delle conoscenze dei geni *ARID3A* e *MZF1*.

4.4.1 ARID3A

Il gene *ARID3A* è costituito da 9 esoni, 7 dei quali sono trascritti ed è localizzato sul cromosoma 19 (19p13.13). *ARID3A* fa parte della superfamiglia ARID (AT-Rich Interaction Domain) costituita nell'uomo tra 15 fattori di trascrizione leganti il DNA. *ARID3A* è inoltre classificato nella superfamiglia ARID3 la quale è caratterizzata da una regione di 40 amminoacidi posta all'esterno del core del DNA-binding domain, il quale promuove il legame sequenza-specifico al DNA (Fig. 25). Il dominio completo della regione amminoacidica così descritto costituisce il dominio esteso di ARID (eARID) (Wilsker D et al., 2002). *ARID3A* si trova espresso a livello di muscolo, colon e talamo (Kortschak RD et al., 1998), ma la sua espressione risulta massima nella placenta, nei precursori delle cellule ematopoietiche e in una sottopopolazione di cellule B (Nixon JC et al., 2004). *ARID3A* fu inizialmente clonato per omologia e studiato attraverso l'ortologo in

Drosophila (*Dril1-Dead Ringer1*) (Kortschak RD et al., 1998), e successivamente re-identificato come proteina associata a E2F (E2FBP) (Suzuki M et al., 2005). *ARID3A*, come gli ortologi presenti in *Drosophila* e in *Xenopus*, è regolato durante lo sviluppo embrionale, ma con espressione tessuto-specifica nell'adulto. Nell'uomo *ARID3A* risulta essere prevalentemente espresso dai linfociti B, dove l'espressione risulta essere estremamente relata al grado di differenziamento linfocitario, ovvero nei pre-linfociti B l'espressione è molto marcata, mentre risulta assente nelle cellule B mature periferiche, per poi nuovamente esprimersi nelle cellule B attivate.

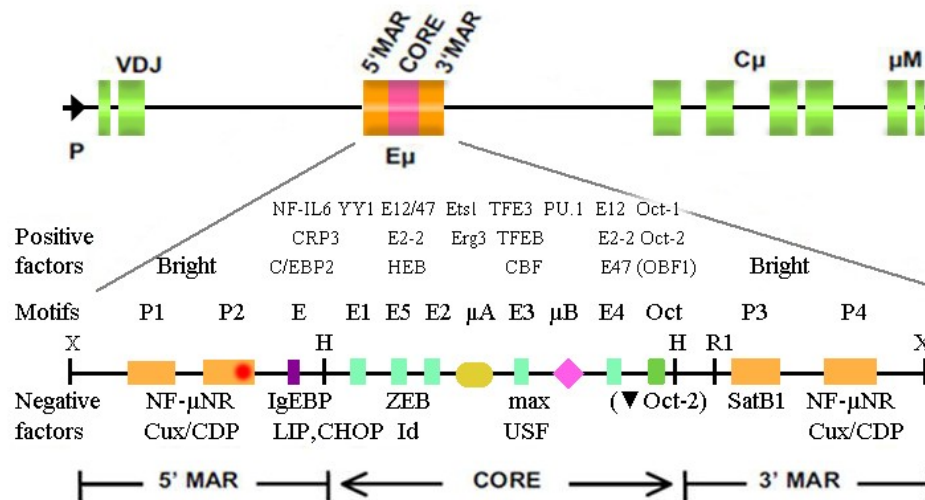


Fig. 25: Posizione del fattore di trascrizione ARID3A.

La proteina ARID3a è costituita da 593 amminoacidi ed è suddivisa in 3 domini funzionali, un dominio N-terminale, un dominio eARID DNA-binding e un dominio helix-turn-helix detto REKLES, il quale permette la dimerizzazione e l'associazione ad altre proteine (Fig. 26).



Fig. 26: Domini funzionali della proteina ARID3a.

Il dominio N-terminale (acidic) attualmente non ha una funzione definita, eccetto per il fatto che si sa non prendere parte nel folding della proteina nativa. Il dominio REKLES è necessario per l'omodimerizzazione e l'associazione con TFII-I. La proteina ARID3a presenta un'alta omologia con l'ortologo murino Bright, il quale mostra regioni coinvolte nella localizzazione nucleare e l'esportazione REKLES-mediata (Kim D et al., 2006 e 2007).

Il dominio eARID contiene 8 alfa-eliche associate a beta-sheet antiparalleli (Iwahara et al., 2002).

Studi recenti hanno dimostrato come ARID3a sia in grado di eterodimerizzare con la proteina inibitrice del legame al DNA 1 (ID1-Inhibitor DNA1) andando a regolare il TGF-beta che a sua volta risulta implicato nella trasformazione da fibroblasto a miofibroblasto (Lin L et al., 2008).

L'omologo murino, Bright, fu all'inizio caratterizzato come fattore di trascrizione in grado di upregolare la trascrizione delle immunoglobuline a catena pesante (IgH) mediante l'associazione alla tirosin-chinasi Bruton (Btk) e il TFII-I. Il complesso così formato si lega, con diversa affinità, ai quattro siti ATC-rich P (P1-P4) posti all'interno della regione di attacco della matrice nucleare (MARs), la quale fiancheggia l'enhancer intronico delle IgH (E μ) (Webb C et al., 1999) (Fig. 27).

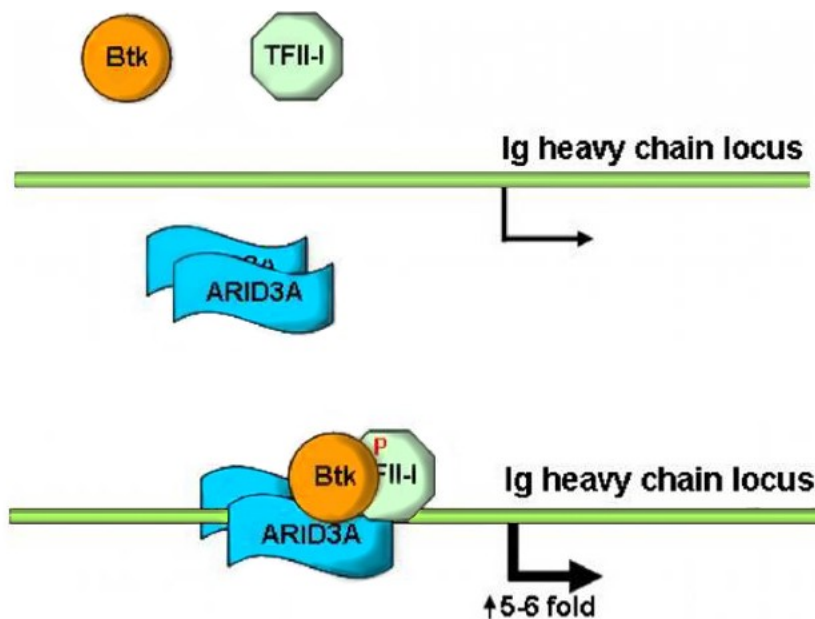


Fig. 27: Complesso formato da Btk/TFII-I/ARID3A e attivazione della trascrizione delle IgH.

Così facendo Bright seleziona i promotori delle IgH, attivandone la trascrizione. Bright, oltre ad essere associato alla matrice nucleare (B-cell restricted regulator of IgH transcription) e a stimolare l'espressione delle immunoglobuline a catena pesante (IgH), regola la progressione del ciclo cellulare E1/E2F-mediata. In egual modo, l'espressione di ARID3A presente nelle cellule B mature agisce da promotore della trascrizione sul locus delle immunoglobuline a catena pesante (Nixon JC et al., 2004).

ARID3A oltre dunque ad associarsi a Btk e TFII-I e regolare la trascrizione di IgH (Rajaiya J et al., 2006), svolge la funzione di rimodellamento della cromatina a livello di cellule emopoietiche e tessuto embrionale.

ARID3A assieme ad altri membri della famiglia ARID (anche negli ortologi presenti nella *Drosophyla* e nel lievito) è direttamente o indirettamente implicato nel rimodellamento della cromatina. Ciò viene espletato agendo direttamente come DNA demetilasi, oppure reclutando enzimi deputati a modificare gli istoni. E' stato infatti dimostrato che una overespressione di ARID3A in colture di cellule B

correla con un'ipersensibilità di E μ alla DNAsi, ovvero contribuisce ad aumentare l'accessibilità della cromatina ad E μ .

Il reclutamento di Bright risulta indispensabile per la transattivazione, ovvero Bright si lega per affinità al sito P2 all'interno di E μ 5' MAR, inducendone così un ripiegamento di circa 80-90°. L'overespressione di Bright in linee di cellule B mature induce dunque un'aumentata sensibilità all'azione della DNAsi I su tutta la regione E μ MARs. Questo dimostra dunque che l'enhancer assume una conformazione cromatinica più aperta, e che ciò è direttamente associato all'espressione di Bright.

Importante notare come un'overespressione ectopica di Bright in fibroblasti embrionali porta alla loro immortalizzazione per accumulo di ciclina E ed attivazione di E2F1. Bright può dunque avere un'implicazione nella trasformazione maligna, infatti è stato visto che sottotipi di linfomi B con prognosi infausta presentavano alti livelli di Bright. L'overespressione risulta prevalere sul meccanismo di senescenza Ras-mediato, meccanismo che si è visto avere funzione oncogenica (Peeper DS et al., 2002). Tuttavia, in altri sistemi è stato dimostrato che ARID3a svolge invece una funzione oncosoppressiva, espletata con effetti sul ciclo cellulare e sui corpi nucleari PML (Fukuyo Y et al., 2004). Tutti i sovraccitati studi riportano dunque come ARID3a prenda parte a diverse pathways tramite l'associazione ad altre proteine, e che può svolgere sia funzione oncosoppressiva che oncogenica in base al contesto in cui si viene a trovare.

4.4.2 MZF1

Il gene *MZF1* (*Myeloid Zinc Finger 1*) è posizionato sul cromosoma 19 (19q13.43), contiene 6 esoni e ha una grandezza di 11.2 Kb. L'esone 1 non è codificante ed il trascritto si trova a partire dall'introne 5 ed include solo l'esone 6 come esone codificante.

Dalla trascrizione di *MZF1* si ottengono tre trascritti di approssimativamente 3, 7.5 e 9 Kb. Tutte e tre isoforme contengono due domini leganti il DNA attraverso due sequenze consenso. Inoltre *Mzf1b* e *c* codificano per una proteina di 257 amminoacidi contenete una *SCAN box*, o dominio ricco in leucina, che facilita l'interazione tra

le proteine (Fig. 28). La proteina nella sua interezza possiede 734 amminoacidi.

MZF1 codifica per un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia Krüppel di proteine zinc finger, si trova espresso in cellule emopoietiche totipotenti e nei progenitori mieloidi.

Le proteine zinc finger svolgono un ruolo cruciale nella normale regolazione dell'emopoiesi (Shivdasani e Orkin, 1996).

Si è visto inoltre che diversi geni codificanti la trascrizione dei fattori di zinc finger sono implicati nelle traslocazioni cromosomiche associate alle neoplasie emopoietiche (Look AT, 1997), e che la loro deregolamentazione funzionale o inattivazione è un passo cruciale per la trasformazione leucemica (He LZ et al., 2000).

All'interno del compartimento emopoietico l'espressione di *MZF1* è limitata alle cellule progenitrici totipotenti presenti nel midollo osseo (BM) e nei progenitori mieloidi, non risulta invece rilevabile nelle cellule differenziate nel sangue (Bavisotto L et al., 1991).

MZF1 contiene 13 domini zinc-finger C2H2 suddivisi in due domini i quali sono separati da una corta sequenza ricca in glicina e prolina (Fig. 27)(Mudduluru G et al., 2010). Entrambi questi domini (dominio 1, zinc finger 1-4; dominio 2, zinc finger 5-13) sono in grado di legare il DNA indipendentemente l'uno dall'altro (Morris JF et al., 1994; Hromas R et al., 1996) selezionando delle sequenze consenso formate da un core contenete 4-5 residui di guanina (1-4, 5'-AGTGGGGA-3'; 5-13, 5'-CGGGnGAGGGGAAA-3').

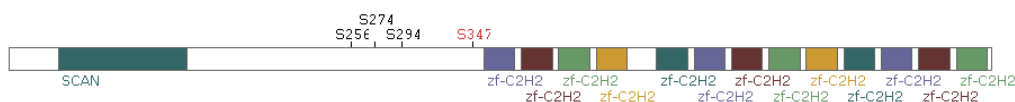


Fig. 28: Struttura di *MZF1*.

Una espressione differenziale di *MZF1* può interferire con il differenziamento e la proliferazione delle cellule ematopoietiche, e, associandosi ad un meccanismo antiapoptotico, può prendere parte alla trasformazione in senso tumorale delle cellule (Robertson KA et al., 1998). In vitro infatti, in esperimenti di trasfezione transiente, è stato visto che *MZF1* è in grado di attivare la trascrizione nelle cellule

di origine emopoietica, mentre la sopprime in cellule non-emopoietiche (Morris JF et al., 1995; Hromas R et al., 1996).

Inoltre però si è visto che una overespressione di *MZF1* in cellule staminali embrionali (ES) sembra interferire con la capacità di queste cellule di differenziarsi in senso emopoietico e di formare colonie eritromieloidi (Perrotti D et al., 1995). Questo suggerisce come *MZF1* agisca sul controllo del differenziamento mieloide, sul potenziale proliferativo delle cellule e inoltre vi è una possibile implicazione nella crescita tumorale (Gaboli M et al., 2001).

Il fattore *MZF1* regola la protein-kinasi C α nel carcinoma epatocellulare umano (Hsieh YH et al., 2006), kinasi che fa parte di un'importante famiglia di molecole segnale che regolano la proliferazione, il differenziamento, la trasformazione e l'apoptosi.

MZF1 può essere legato, tramite dei motivi *MZF1*, dal promotore del gene *Axl*, gene che codifica per il recettore tirosin-kinasico *Axl*, originariamente descritto come gene trasformante ed isolato da campioni di pazienti con LAM (Janssen JW et al., 1991).

Il gene *Axl* contiene un promotore ricco in GC, non possiede né TATA né CAAT box ma contiene siti multipli di inizio della trascrizione. Il gene *Axl* è costantemente regolato dai fattori di trascrizione Sp1/Sp3 in quanto formati da dei motivi Sp contenenti isole CpG soggette a metilazione.

Il recettore tirosin-kinasico *Axl* appartiene alla famiglia dei recettori tirosin-kinasici TAM (Tyro3, *Axl*, Mer), i quali hanno come frequente ligando Gas6, il prodotto del gene specifico per l'arresto della crescita (*Growth arrested-specific gene 6*) (Nagata K et al., 1996).

Questo gene si è visto essere upregolato in cellule con arresto di crescita (Schneider C et al., 1988), ed inoltre si è dimostrato che esso espleti un ruolo nella sopravvivenza cellulare (Melaragno MG et al., 2004; van Ginkel PR et al., 2004), nella proliferazione (Stenhoff J et al., 2004; Sainaghi PP et al., 2005), nella stimolazione della migrazione cellulare (Fridell YW et al., 1998), ed adesione cellula-cellula tramite *Axl* (McCloskey P et al., 1997).

Dopo la sua identificazione nella LAM, un'overespressione di *Axl* è stata riportata anche nei tumori solidi (Craven RJ et al., 1995; Tsou AP et al., 1998; Berclaz G et al., 2001; Meric F et al., 2002; Shieh YS et al., 2005;

Hutterer M et al., 2008). Essa correla con una prognosi infausta nelle LAM (Rochlitz C et al., 1999), nel tumore gastrico (Wu CW et al., 2002), nell'adenocarcinoma polmonare (Shieh YS et al., 2005) e nell'osteosarcoma (Nakano T et al., 2003).

Un'overespressione di *MZF1* è inoltre in grado di indurre la migrazione e l'invasione in linee di carcinoma del colon-retto e della cervice, meccanismo mediato in parte dall'espressione del gene *Axl* (Mudduluru G et al., 2010).

4.5 Le modificazioni epigenetiche associate ai livelli di espressione del gene BAALC

La diversità di espressione dei livelli di *BAALC* tra le due linee cellulari prescelte, Kasumi-6 e Kyo, ha portato a supporre che alla base di essa ci fossero dei possibili meccanismi regolativi basati su modificazioni post-traduzionali a livello degli istoni.

Sono state dunque analizzate, tramite saggio ChIP, tre diverse modificazioni a carico dell'istone H3: acetilazione a livello di K9 e K14 (H3K9K14ac), trimetilazione a livello di K4 (H3K4me3) e trimetilazione a livello di K27 (H3K27me3). La ragione fondamentale per cui abbiamo concentrato la nostra attenzione su queste 3 modificazioni post-traduzionali dell'istone H3 è relata alla loro importanza nella regolazione della trascrizione. Infatti, H3K9K14ac è sempre associata ad attivazione trascrizionale. Anche H3K4me3 è sempre associata ad attivazione trascrizionale. Invece, H3K27me3 si associa a repressione della trascrizione. Tutte queste modifiche sono state studiate in due regioni del promotore putativo del gene *BAALC*:

- 1) a livello del sito MZF1 in posizione -223 -228;
- 2) a livello del sito ARID3A in posizione -1176 -1181 (Fig. 29).

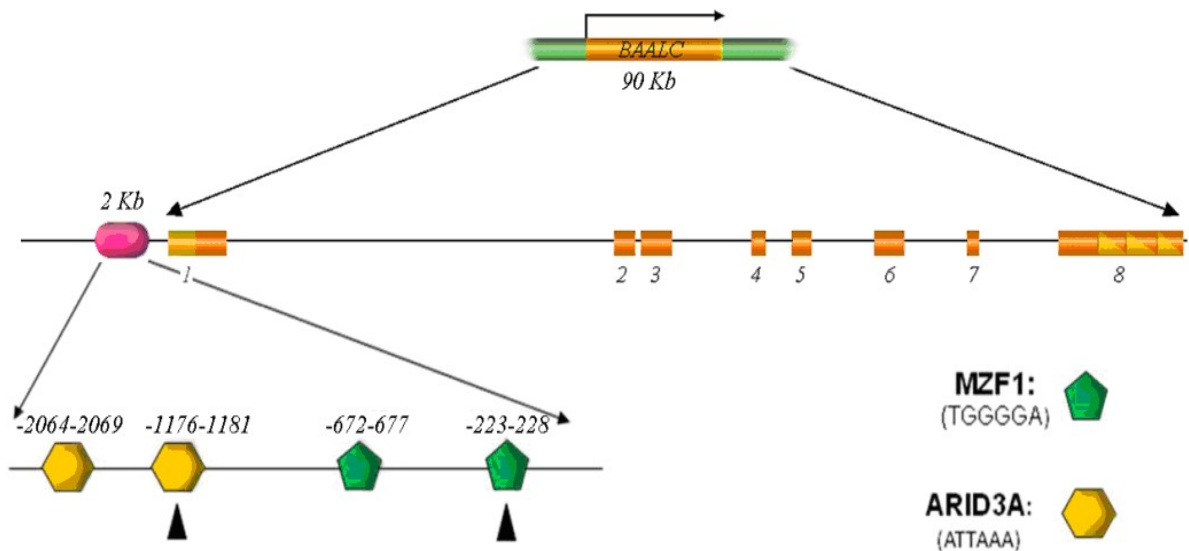


Fig. 29: Posizioni dei siti di ARID3A e MZF1.

I risultati degli esperimenti inerenti al saggio ChIP sono riportati nelle Figure 30, 31 e 32.

La Figura 30 riguarda i livelli di H3K9K14ac.

Come si vede, sia a livello del sito di ARID3A che a livello del sito di MZF1, i livelli di acetilazione dell'istone H3 sono molto più elevati nelle cellule Kasumi-6 che non nelle cellule Kyo. La differenza è molto più marcata a livello del sito MZF1 (circa 40 volte).

H3K9-14ac

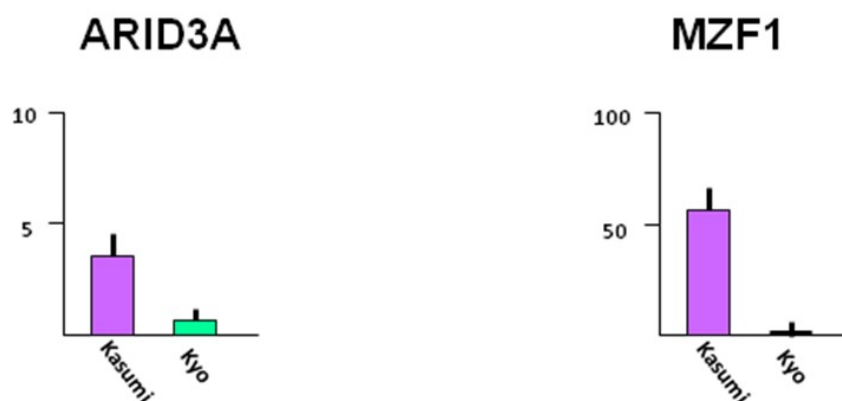


Fig. 30: Livelli di H3K9-14ac nelle linee Kasumi-6 e Kyo.

Nella Figura 31 sono indicati i livelli di H3K4me3.

Anche in questo caso, sia a livello del sito di ARID3A che a livello del sito di MZF1 nelle cellule Kasumi-6 si osservano livelli superiori a quelli presenti nelle cellule Kyo. Nelle cellule Kasumi-6 i livelli H3K4me3 del sito MZF1 sono di circa 20 volte più alto rispetto a quelli di ARID3A.

H3K4me3

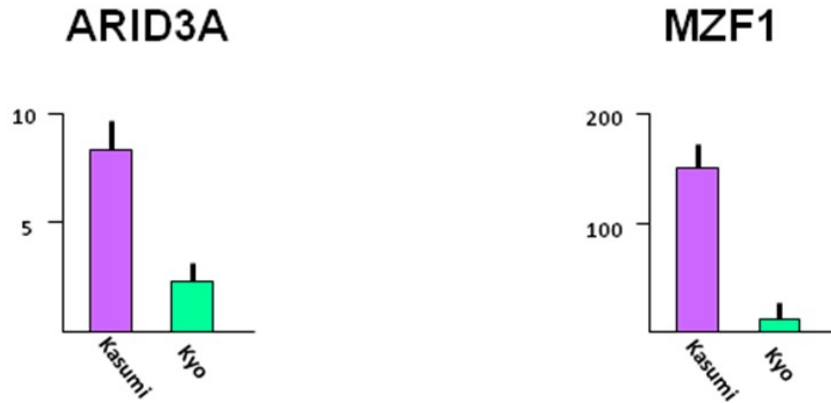


Fig. 31: Livelli di H3K4me3 nelle linee Kasumi-6 e Kyo.

Per quanto riguarda H3K27me3 si rileva un risultato opposto rispetto alle due modificazioni sopra descritte.

Infatti, in questo caso, si osserva che le cellule Kyo presentano livelli superiori rispetto a quelli rilevati in cellule Kasumi-6 (Fig. 32).

H3K27me3

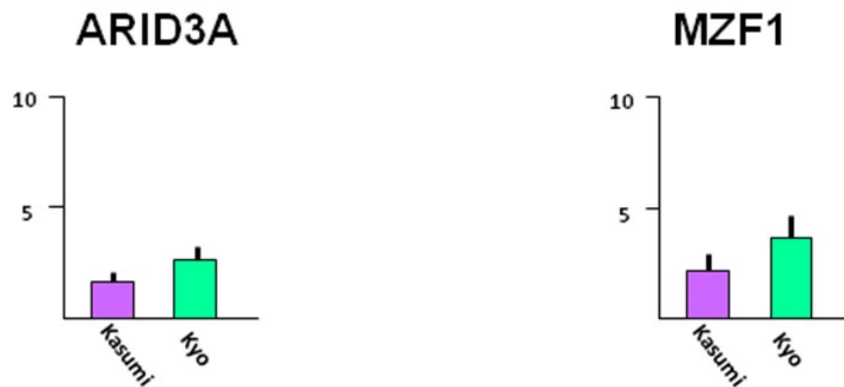


Fig. 32: Livelli di H3K27me3 nelle linee Kasumi-6 e Kyo.

Dunque, complessivamente cellule Kasumi-6 mostrano un livello di acetilazione globale e di trimetilazione della lisina 4 molto più elevato rispetto alle cellule Kyo, sia per il sito MZF1 che per ARID3. I livelli invece di H3K27me3 sono leggermente superiori nelle Kyo rispetto alle cellule Kasumi-6, e questo su entrambi i siti.

Dal momento che l'acetilazione H3 appare molto diversa tra Kasumi-6 e Kyo, abbiamo ipotizzato che gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDAC) sia in grado di aumentare i livelli di mRNA di *BAALC* presente nelle cellule Kyo in modo più rilevante rispetto alle cellule Kasumi-6.

4.6 Trattamento con inibitore delle HDAC

In Figura 33 sono riportati i dati relativi agli effetti del SAHA, un inibitore delle HDAC, sui livelli di mRNA di *BAALC*.

Come previsto, quando le cellule Kyo sono trattate con SAHA, i livelli di mRNA di *BAALC* aumentano di circa due ordini di grandezza.

Al contrario, nelle cellule Kasumi-6, è presente una diminuzione di circa due volte, diminuzione indotta appunto dal trattamento con il SAHA.

Questi risultati possono essere interpretati nel seguente modo:

- a) nelle cellule Kyo i livelli di acetilazione istonica sono molto bassi, dunque il gene è poco espresso. Il trattamento con SAHA incrementa i livelli di acetilazione istonica e questo determina un'enorme attivazione trascrizionale del gene *BAALC*.
- b) nelle cellule Kasumi-6, invece, i livelli di acetilazione istonica sono già molto elevati in assenza di trattamento con inibitori delle HDAC. Ciò determina una notevole attivazione trascrizionale del gene *BAALC*.

Il trattamento con SAHA non determina incremento dell'espressione del gene *BAALC* perché, evidentemente, i livelli d'acetilazione istonica sono già a livelli massimali. Al momento non abbiamo una spiegazione circa il lieve effetto di inibizione esercitato dal SAHA nelle cellule Kasumi-6.

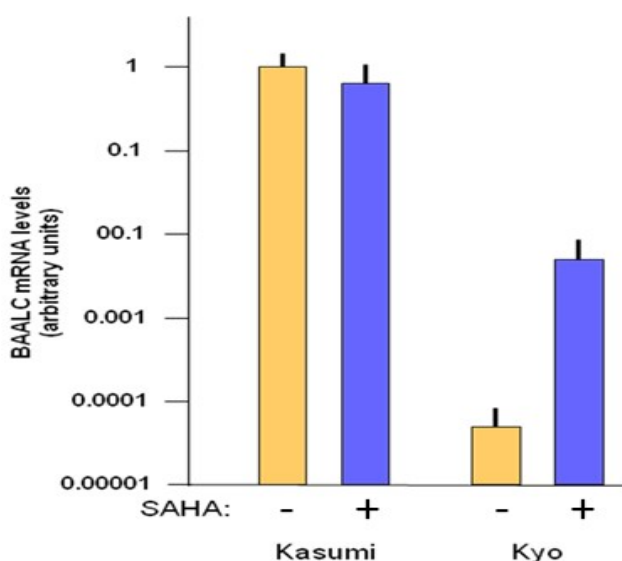


Fig. 33: Livelli di espressione di mRNA di *BAALC* dopo trattamento con SAHA nelle linee leucemiche.

CAPITOLO 5 - DISCUSSIONE E PROSPETTIVE

Le aberrazioni cromosomiche forniscono un valido strumento per classificare le LAM in gruppi con differente rischio prognostico, con implicazioni per la terapia. I casi privi di alterazioni cromosomiche, che sono circa il 45% di tutti i nuovi casi LAM diagnosticati *de novo*, sono contenuti in un gruppo a rischio intermedio (Grimwade D et al., 1998; Slovak M et al., 2000). In realtà questa è una coorte eterogenea di pazienti con esito clinico favorevole, intermedio o relativamente infausto (Bjrd J et al., 2002). Attualmente si conosce ancora poco dei meccanismi molecolari che contribuiscono alla eterogeneità clinica delle LAM NC. In questo specifico sottogruppo, l'identificazione di nuovi markers molecolari potrebbe essere utile per individuare precocemente i pazienti ad alto rischio di ricaduta, potenzialmente candidati a strategie terapeutiche più intensive. *BAALC* è uno tra i geni che possono essere utilizzati come indicatori prognostici. Infatti, l'overespressione di questo gene si associa ad una maggiore aggressività clinica delle LAM (Tanner SM et al., 2001; Bienz M et al., 2005; Langer C et al., 2008). Dunque, lo studio dei meccanismi attraverso cui *BAALC* viene overespresso in una frazione di LAM può fornire informazioni sui meccanismi molecolari alla base dell'aggressività delle LAM (Franzoni A et al., 2012). Negli ultimi anni il ruolo di modificazioni di tipo epigenetico nel controllo della trascrizione (e dunque dell'espressione genica) è emerso potentemente. In particolare, le modifiche post-traduzionali degli istoni rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione della trascrizione genica. In questa ricerca, dunque, abbiamo studiato i meccanismi epigenetici alla base del controllo dell'espressione del gene *BAALC* mediante l'utilizzo di un modello costituito da due linee cellulari leucemiche. Uno dei nostri principali risultati risulta essere che le modificazioni post-traduzionali dell'istone H3 a livello di promotore di *BAALC* sono associate in maniera specifica ai livelli di mRNA di *BAALC*. Infatti, le cellule Kasumi-6, che presentano elevati livelli di mRNA *BAALC*, mostrano alti livelli di modificazioni post-traduzionali a livello dell'istone H3 quali H3K9K14ac

e H3K4me3. Sia l'acetilazione che la trimetilazione a livello della lisina 4 dell'istone H3, sono associate ad elevata attività trascrizionale.

Le cellule Kyo, invece, mostrano bassi livelli di mRNA di *BAALC*, ed in questa linea cellulare sembra essere più diffusa la modificazione degli istoni che si sa essere associata a repressione trascrizionale (H3K27me3). Tuttavia, è importante sottolineare che in entrambe le linee cellulari leucemiche tutte le modificazioni degli istoni indagate sono presenti e ben individuabili. Questo significa che nelle cellule leucemiche vi è l'esistenza di una "marcatore bivalente" dell'espressione genica a livello del promotore di *BAALC*. Cioè, nello stesso elemento di controllo trascrizionale (nel nostro caso il promotore putativo di *BAALC*), è presente sia una marcatura di tipo positivo (attivazione trascrizionale: H3K9K14ac e H3K4me3) che una di tipo negativo (repressione trascrizionale: H3K27me3) (Franzoni A et al., 2012). Pertanto, secondo il modello generato durante gli studi condotti sulle cellule staminali (Bernstein BE et al., 2006; Mikkelsen TS et al., 2007), *BAALC* può essere considerato come un gene "in pausa", cioè un gene in cui la trascrizione può essere attivata o repressa da meccanismi che agiscono su queste marcature. Infatti, dal punto di vista quantitativo, nelle cellule Kasumi-6 prevale la marcatura di tipo attivatorio mentre nelle cellule Kyo prevale quella di tipo repressorio. L'idea che il gene *BAALC* sia in uno stato di "pausa" nei precursori delle cellule leucemiche spiegherebbe la grande variazione dei livelli di *BAALC* rilevata nei soggetti LAM (Franzoni A et al., 2012).

E' noto, infatti, che le cellule LAM sono abbastanza eterogenee in termini di modificazioni epigenetiche. Per esempio, considerando solo la metilazione del DNA, è stato dimostrato che i pazienti con leucemia mieloide acuta possono essere suddivisi in 16 sottotipi diversi (Figueroa ME et al., 2010). A causa di questa eterogeneità, nei diversi sottogruppi di pazienti con LAM, la trascrizione del gene *BAALC* sarebbe sintonizzata a diversi livelli.

E' importante notare come l'aspetto quantitativo delle modifiche post-traduzionali degli istoni sia molto importante. Dunque, la metodologia che deve essere utilizzata per lo studio di questi fenomeni deve essere di tipo quantitativo (PCR quantitativa tramite Real-time PCR). Risultati ottenuti tramite metodologie semiquantitative forniscono un risultato

non sufficientemente definito per la comprensione dei fenomeni di controllo della trascrizione di un dato gene.

Dal punto di vista medico, i nostri risultati possono suggerire un metodo per identificare nuovi indicatori prognostici (Franzoni A et al., 2012).

In realtà l'iperespressione del gene *BAALC* è associata ad esiti infausti nelle LAM NC (Baldus CD et al., 2003; Langer C et al., 2008; Santamaria C et al., 2010). Dal momento che in questo studio è stata dimostrata una relazione tra l'espressione di *BAALC* e le modifiche degli istoni a livello del promotore di *BAALC*, si potrebbe ipotizzare che la firma epigenetica a livello del promotore possa avere una rilevanza prognostica (Franzoni A et al., 2012).

Coerentemente con recenti dati, vi è l'indicazione per utilizzare le modificazioni epigenetiche globali come indicatori prognostici (Seligson DB et al., 2009; Manuyakorn A et al., 2010). Dunque, una delle prospettive di questo studio è quella di analizzare se vi è una correlazione tra modifiche epigenetiche a livello del promotore di *BAALC* e aggressività della neoplasia.

Un'altra prospettiva è quella dello studio dettagliato del promotore di *BAALC*. Infatti, noi abbiamo utilizzato un approccio bioinformatico per l'identificazione delle sequenze con la funzione putativa di promotore (Franzoni A et al., 2012). Sarà molto importante confermare questi dati tramite studio della regione identificata utilizzando l'approccio della trasfezione cellulare associata alla valutazione di geni reporter.

In un'ottica più generale il nostro studio trova inserimento nei nuovi approcci di analisi delle leucemie e dei meccanismi molecolari alla loro base. Con l'avvento dell'era epigenomica e l'utilizzo di strumentazioni sempre più high-throughput, si rende possibile lo studio delle modificazioni a carico dell'intero genoma e non più solamente del singolo gene.

Tecniche per lo studio della metilazione del DNA quali il trattamento con il bisulfite (*methyI-C-seq*), accoppiato al *NGS* (*Next Generation Sequencing*), permettono l'identificazione dei livelli di metilazione a livello di singolo nucleotide (Lister R et al., 2009; Li Y et al., 2010). Inoltre saggi di ChIP associati a microarray ad alta-densità oppure nuovamente a *NGS* (*ChIP-chip* e *ChIP-seq*, rispettivamente), possono

localizzare accuratamente le diverse modificazioni globali a carico degli istoni.

L'approccio epigenomico sta rivoluzionando la ricerca tumorale, rendendo più comprensibili meccanismi quali la tumorigenesi e fornendo possibili markers molecolari al fine della caratterizzazione e della prognosi tumorale.

Inoltre ciò permette l'utilizzo di farmaci epigenetici per il trattamento delle neoplasie, anche se tale pratica necessita di ulteriori ed approfonditi studi in quanto, si sono rilevati dei fenomeni di resistenza spontanea o acquisita ai farmaci, sia in vitro che in vivo, e si ipotizza che questi meccanismi di resistenza siano relati a variazioni nel metabolismo del farmaco (Taby R e Issa JP, 2010).

La farmacoepigenetica, non avendo target specifici, risulta dunque un'arma a doppio taglio, la quale necessita della creazione di nuove molecole al fine di creare una terapia personalizzata basata sulla specifica forma tumorale (Rodriguez-Paredes M e Esteller M, 2010).

CAPITOLO 6 - BIBLIOGRAFIA

Adriaansen HJ, Boekhorst PA, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJ. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood*. 1993;81(11):3043-51.

AIRT Working Group. I tumori in Italia-Rapporto 2006. *Epidemiologia&Prevenzione*. 2006;suppl 2:94-95.

Aggerholm A, Guldborg P, Hokland M, Hokland P. Extensive intra- e interindividual heterogeneity of p15INK4B methylation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 1999;59:436-441.

Albiero E, Madeo D, Bolli N, Giaretta I, Bona ED, Martelli MF, Nicoletti I, Rodeghiero F, Falini B. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. *Leukemia*. 2007 May;21(5):1099-103.

Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhata R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes, *Cell*. 2007 Nov 16;131(4):633-6.

Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, Anderson JE, Petersdorf SH. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3481-5.

Baccarani M, Tura S. Corso di malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici. Società Editrice Esculapio 2007.

Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Byrd JC, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). *Blood*. 1997;90(4):1643-8.

Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, Kundu TK. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, repressed chromatin transcription and alters global gene expression. *J. Biol. Chem*. 2004;279:33716-33726.

Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1613-8.

Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehninger G. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 10;24(5):790-7. Epub 2006 Jan 17.

Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, Beverloo HB, Chang M, Creutzig U, Dworzak MN, Forestier E, Gibson B, Hasle H, Harrison CJ, Heerema NA, Kaspers GJ, Leszl A, Litvinko N, Nigro LL, Morimoto A, Perot C, Pieters R, Reinhardt D, Rubnitz JE, Smith FO, Stary J, Stasevich I, Strehl S, Taga T, Tomizawa D, Webb D, Zemanova Z, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. 2009;114(12):2489-96.

Bailey VJ, Easwaran H, Zhang Y, Griffiths E, Belinsky SA, Herman JG, Baylin SB, Carraway HE, Wang TH. MS-qFRET: a quantum dot-based method for analysis of DNA-methylation. *Genome Res*. 2009;19:1455-1461.

Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, Smit EM, Beverloo HB, Verhoef G, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Sonneveld P, de Greef GE, Löwenberg B, Delwel R. High EV11 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood*. 2003; 101: 837-845.

Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, Berna Beverloo H, Tenen DG, Löwenberg B, Delwel R. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J*. 2003;4: 31-40.

Bavisotto L, Kaushansky K, Lin N, Hromas R. Antisense oligonucleotides from the stage-specific myeloid zinc finger gene MZF-1 inhibit granulopoiesis in vitro. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1097-101.

Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Paschka P, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010;28(4):596-604.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haem*. 1976;33(4):451-8.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haem.* 1991;78(3):325-9.

Beran M, Luthra R, Kantarjian H, Estey E. FLT3 mutation and response to intensive chemotherapy in young adult and elderly patients with normal karyotype. *Leuk Res* 2004;28:547-550.

Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Kieffer I, Dreher E, Andres AC. Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. *Ann Oncol.* 2001 Jun;12(6):819-24.

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009 Apr 1;23(7):781-3.

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006 Apr 21;125(2):315-26.

Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey MF, Pabst T, Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1416-1424.

Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, Bordessoule D, Pautas C, de Revel T, Quesnel B, Huchette P, Philippe N, Geffroy S, Terre C, Thomas X, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol.* 2010;28(23):3717-23.

Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, Markova B, Carius B, Brecht A, Duyster J, Haferlach T, Huber C, Fischer T. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood.* 2009;113(17):4074-7.

Büchner T, Berdel WE, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S, Müller-Tidow C, Braess J, Spiekermann K, Kienast J, Staib P, Grüneisen A, Kern W, Reichle A, Maschmeyer G, Aul C, Lengfelder E, Sauerland MC, Heinecke A, Wörmann B, Hiddemann W. Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2009;27(1):61-9.

Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshiran R, Döhner H, Pollack JR. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *The New Engl. J Med.* 2004;350(16):1605-16.

Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, Hann IM, Rees JK, Gray RG, Wheatley K. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Lancet*. 1998;351(9104):700-8.

Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood*. 1999;93(12):4131-43.

Burnett AK. Current controversies: which patients with acute myeloid leukaemia should receive a bone marrow transplantation? an adult treater's view. *Br J Haem*. 2002;118(2):357-64.

Burnett AK, Hills RK, Milligan DW, Goldstone AH, Prentice AG, McMullin MF, Duncombe A, Gibson B, Wheatley K. Attempts to optimize induction and consolidation treatment in acute myeloid leukemia: results of the MRC AML12 trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(4):586-95.

Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD. Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia. Results from cancer and leukemia group B (CALGB8461). *Blood*. 2002;100(13): 4325-4336.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793-801.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006 Nov;6(11):857-66.

Campos L, Guyotat D, Archimband E, Calmard-Oriol P, Tsuruo T, Troncy J, Treille D, Fiere D. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute non lymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood*. 1992;79: 473-476.

Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, Murati A, Rocquain J, Adélaïde J, Olschwang S, Xerri L, Vey N, Chaffanet M, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010;24(2):469-73.

Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009 May;10(5):295-304.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27;102(39):13944-9.

Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature.* 1998 Sep 3;395(6697):89-93.

Chou WC, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY, Wu SJ, Huang CF, Chiou RJ, Tseng MH, Lin DT, Lin KH, Chen YC, Tien HF. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):3310-6.

Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, Fischer T, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H. AML-associated FLT3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with FLT3 ITD mutations. *Blood.* 2005;106:265-273.

Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008;111(8):3941-67.

Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, Varnum B, Liu ET, Cance WG. Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer.* 1995 Mar 16;60(6):791-7.

Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Nov;11(11):1037-43.

Costello JF, Plass C, Cavenee WK. Aberrant methylation of genes in low-grade astrocytomas. *Brain Tumor Pathol.* 2000;17(2):49-56.

Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomäki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* 2000;24:132-138.

Cuneo A, Ferrant A, Michaux JL, Boogaerts M, Demuyneck H, Van Orshoven A, Criel A, Stul M, Dal Cin P, Hernandez J. Cytogenetic profile of minimally differentiated (FAB M0) acute myeloid leukemia: correlation with clinical and biologic findings. *Blood.* 1995;85:3688-3694.

Cuneo A, Ferrant A, Michaux JL, Demuyneck H, Boogaerts M, Louwagie A, Doyen C, Stul M, Cassiman JJ, Dal Cin P, Castoldi G, Van den Berghe H. Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: cytoimmunologic and cytogenetic features. *Haematologica*. 1996;81(5):423-7.

Dalley CD, Lister TA, Cavenagh JD, Rohatiner AZ. Serum LDH, a prognostic factor in elderly patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Cancer*. 2001;84(1):147.

Damiani D, Raspadori D, Micheli M, Stocchi R, Gentili S, Gozzetti A, Masolini, Michelutti A, Geromin A, Fanin R, Lauria F. CD56 and PGP expression in acute myeloid leukemia: impact on clinical outcome. *Haematologica* 2002;87:1135-1140.

Dar AA, Goff LW, Majid S, Berlin J and El-Rifai W, Aurora kinase inhibitors-rising stars in cancer therapeutics? *Mol. Cancer Ther*. 2010;461:819-822.

Davalos V, Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macrorevolution. *Curr Opin Oncol*. 2010 Jan;22(1):35-45.

Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, Kouzarides T. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 α from chromatin. *Nature*. 2009;461:819-822.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Vigué F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New Engl J Med*. 2009;360(22):2289-301.

den Hollander J, Rimpi S, Doherty JR, Rudelius M, Buck A, Hoellein A, Kremer M, Graf N, Scheerer M, Hall MA, Goga A, von Bubnoff N, Duyster J, Peschel C, Cleveland JL, Nilsson JA, Keller U. Aurora kinase A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. *Blood*. 2010;115:5202-5213.

Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-74.

Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H. Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106:3740-3746.

Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008;93(7):976-82.

Dongkyoon Kim and Philip W. Tucker, A Regulated Nucleocytoplasmic Shuttle Contributes to Bright's Function as a Transcriptional Activator of Immunoglobulin Genes. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26(6):2187.

Dumphy CH, Gregowicz AJ, Rodriguez G. Natural killer cell acute leukemia with myeloid antigen expression. A previously undescribed form of acute leukemia. *Ann Haematol* 1992;64:78-82.

Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gattringer C, Huber H, Andreeff M. Subpopulations of normal peripheral blood marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood*. 1992; 80: 2729-2732.

Dunn BK. Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Mar;983:28-42. Review.

Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 2003 Apr 18;300(5618):455.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 2002 Aug 12;21(35):5400-13. Review.

Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Mar 8;102(10):3627-32.

Estécio MR, Gharibyan V, Shen L, Ibrahim AE, Doshi K, He R, Jelinek J, Yang AS, Yan PS, Huang TH, Tajara EH, Issa JP. LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS One*. 2007 May 2;2(5):e399.

Esteller M, Epigenetics in cancer. *N. Engl J*. 2008;358:1148-1159.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer*. 1999;59:67-70.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3225-9.

Estey E. High cytogenetic or molecular genetic risk acute myeloid leukemia. *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. 2010;2010:474-80.

Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R,

Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettirossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New Engl J Med*. 2005;352(3):254-66.

Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):874-85.

Farag SS, Ruppert AS, Mrózek K, Mayer RJ, Stone RM, Carroll AJ, Powell BL, Moore JO, Pettenati MJ, Koduru PR, Stamberg J, Baer MR, Block AW, Vardiman JW, Kolitz JE, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD. Outcome of induction and post-remission therapy in younger adults with acute myeloid leukemia with normal karyotype: a cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005;23(3):482-493.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983 Jan 6;301(5895):89-92.

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR; International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009 Mar;10(3):223-32.

Figuroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar M, Greally JM, Valk PJ, Löwenberg B, Delwel R, Melnick A. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):13-27.

Franzoni A, Passon N, Fabbro D, Tiribelli M, Damiani D, Damante G. Histone post-translational modifications associated to BAALC expression in leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 13;417(2):721-5. Epub 2011 Dec 14.

Fridell YW, Villa J Jr, Attar EC, Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1998 Mar 20;273(12):7123-6.

Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K; Acute Myeloid Leukemia Study Group, Ulm. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Cl On*. 2002;20(10):2480-5.

Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K; AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002;100: 4372-4380.

Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004;22:624-633.

Fruchart C, Lenormand B, Bastard C, Boulet D, Lesesve JF, Callat MP, Stamatoullas A, Monconduit M, Tilly H. Correlation between CD34 expression and chromosomal abnormalities but not clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 1996;53:175-180.

Fukuyo Y, Mogi K, Tsunematsu Y, Nakajima T. E2FBP1/hDril1 modulates cell growth through downregulation of promyelocytic leukemia bodies. *Cell Death Differ*. 2004 Jul;11(7):747-59.

Füllgrabe J, Hajji N, Joseph B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ*. 2010 Aug;17(8):1238-43. Review.

Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications. *Oncogene*. 2011 Aug 4;30(31):3391-403. Review.

Gaboli M, Kotsi PA, Gurrieri C, Cattoretti G, Ronchetti S, Cordon-Cardo C, Broxmeyer HE, Hromas R, Pandolfi PP. Mzf1 controls cell proliferation and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2001 Jul 1;15(13):1625-30.

Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Döhner H, Döhner K; German-Austrian AML Study Group. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*. 2009;113(19):4505-4511.

Gao B, Spector MS, Kunos G. The rat alpha 1B adrenergic receptor gene middle promoter contains multiple binding sites for sequence-specific proteins including a novel ubiquitous transcription factor. *J Biol Chem*. 1995 Mar 10;270(10):5614-9.

Gassmann W, Löffler H. Acute Megakaryoblastic. *Leuk Lymphoma* 1995;18:(Suppl.1)69-73.

Gilliland DG, Griffin JD. The role of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100:1532-1542.

Gore SD, Jones C, Kirkpatrick P. Decitabine. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Nov;5(11):891-2.

Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer R and Imhof A, Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat. Chem. Biol.* 2005;1:143-145.

Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y, Tse W. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol.* 2009 Jun2;2:23.

Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Clinical haematology.* 2001;14(3):497-529.

Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 1998;92(7):2322-33.

Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood.* 2001 Sep 1;98(5):1312-20.

Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program.* 2009:385-95.

Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 2010;116(3):354-65.

Gröschel S, Lugthart S, Schlenk RF, Valk PJ, Eiwien K, Goudswaard C, van Putten WJ, Kayser S, Verdonck LF, Lübbert M, Ossenkoppele GJ, Germing U, Schmidt-Wolf I, Schlegelberger B, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Löwenberg B, Döhner K, Delwel R. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Cl On* 2010;28(12):2101-7.

Growney J, Clark J, Adelsperger J, Stone R, Fabbro D, Griffin JD, Gilliland DG. Activation mutations of human c-kit resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PK C412. *Blood.* 2005;106(2):721-724.

Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*. 2005;105:4792-4799.

Hackanson B, Rückert A, Lübbert M. Hyperleukocytotic secondary acute myeloid leukemia (AML) with sole monosomy 7 as sequela of Philadelphia-chromosome positive chronic myeloid leukemia (CML). *European journal of haematology*. 2009;83(6):611-2.

Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, Testoni N, Rege-Cambrin G, Santucci A, Vignetti M, Fazi P, Martelli MP, Haferlach T, Falini B. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009;114(14):3024-32.

Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008;22(8):1539-41.

He LZ, Bhaumik M, Tribioli C, Rego EM, Ivins S, Zelent A, Pandolfi PP. Two critical hits for promyelocytic leukemia. *Mol Cell*. 2000 Nov;6(5):1131-41.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003 Nov 20;349(21):2042-54. Review.

Herrscher RF, Kaplan MH, Lelsz DL, Das C, Scheuermann R, Tucker PW. The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: a B cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes Dev*. 1995 Dec 15;9(24):3067-82.

Herz HM, Nakanishi S and Shilatifard A. The curious case of Bivalent Markes. *Dev Cell*. 2009;17:301-303.

Heuser M, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Yung E, Piper J, Fung S, Schlenk RF, Dohner K, Hinrichsen T, Rudolph C, Schambach A, Baum C, Schlegelberger B, Dohner H, Ganser A, Humphries RK. MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood*. 2007;110(5):1639-47.

Heuser M, Berg T, Kuchenbauer, Lai CK, Park G, Fung S, Lin G, Leung M, Krauter J, Ganser A, Humphries RK. Functional role of BAALC in leukemogenesis. *Leukemia*. 2011;1-4.

Hipfner DR, Weigmann K, Cohen SM. The bantam gene regulates Drosophila growth. *Genetics*. 2002 Aug;161(4):1527-37.

Hoffman R. *Hematology, Basic principles and practice*. 5/ED. 2008.

Hromas R, Davis B, Rauscher FJ 3rd, Klemsz M, Tenen D, Hoffman S, Xu D, Morris JF. Hematopoietic transcriptional regulation by the myeloid zinc finger gene, MZF-1. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;211:159-64. Review.

Hsieh YH, Wu TT, Tsai JH, Huang CY, Hsieh YS, Liu JY. PKC α expression regulated by Elk-1 and MZF-1 in human HCC cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 6;339(1):217-25.

Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, Knyazeva T, Barbieri V, Reindl M, Muigg A, Kostron H, Stockhammer G, Ullrich A. Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan 1;14(1):130-8.

Inomata M, Tagawa H, Guo YM, Kameoka Y, Takahashi N, Sawada K. MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):396-402.

Isham CR, Tibodeau JD, Jin W, Xu R, Timm MM, Bible KC. Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood*. 2007;109:2579-2588.

Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1635-40.

Issa JP. Cancer prevention: epigenetics steps up to the plate. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008 Sep;1(4):219-22.

Issa JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):5939-40.

Issa JP, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res*. 2009 Jun 15;15(12):3938-46.

Iwahara J, Clubb RT. Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *EMBO J*. 1999 Nov 1;18(21):6084-94.

Iwahara J, Iwahara M, Daughdrill GW, Ford J, Clubb RT. The structure of the Dead ringer-DNA complex reveals how AT-rich interaction domains (ARIDs) recognize DNA. *EMBO J*. 2002 Mar 1;21(5):1197-209.

Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, Bartram CR. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene*. 1991 Nov;6(11):2113-20.

Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2002 Jan-Feb;52(1):23-47.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):683-92. Review.

Joseph J, Mudduluru G, Antony S, Vashistha S, Ajitkumar P, Somasundaram K. Expression profiling of sodium butyrate (NaB)-treated cells: identification of regulation of genes related to cytokine signaling and cancer metastasis by NaB. *Oncogene*. 2004;23:6304-6315.

Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, Tiddefelt U, Wahlin A, Höglund M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179-87.

Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *Oncologist*. 2005 Mar;10(3):176-82. Review.

Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, Leighton JK, Patel H, Rahman A, Sridhara R, Wang YC, Pazdur R; FDA. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3604-8.

Kanda Y, Hamaki T, Yamamoto R, Chizuka A, Suguro M, Matsuyama T, Takezako N, Miwa A, Kami M, Hirai H, Togawa A. The clinical significance of CD34 expression in response to therapy of patients with acute myeloid leukemia. An overview of 2483 patients from 22 studies. *Cancer*. 2000; 88(11):2529-2533.

Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*. 2005 Feb 15;19(4):489-501.

Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, Faderl S, Bueso-Ramos C, Ravandi F, Estrov Z, Ferrajoli A, Wierda W, Shan J, Davis J, Giles F, Saba HI, Issa JP. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):52-7.

Kasper D, Braunwald E, Fauci A. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th Ed. 2008 (McGraw Hill, Ed.).

- Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF. Identification of a membrane glycoprotein associated with hematopoietic progenitor cells. *Leuk Res* 1985;9:191-198.
- Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best practice & research. Clinical haematology*. 2010;23(3):379-90.
- Khalade A, Jaakkola MS, Pukkala E, Jaakkola JJK. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environmental health: a global access science source*. 2010;9:31.
- Kim D, Tucker PW. A regulated nucleocytoplasmic shuttle contributes to Bright's function as a transcriptional activator of immunoglobulin genes. *Mol Cell Biol*. 2006 Mar;26(6):2187-201.
- Kim D, Probst L, Das C, Tucker PW. REKLES is an ARID3-restricted multifunctional domain. *J Biol Chem*. 2007 May 25;282(21):15768-77.
- Kim DH, Lee NY, Sung WJ, Baek JH, Kim JG, Sohn SK, Suh JS, Lee KS, Lee KB. Multidrug Resistance as a potential prognostic indicator in acute myeloid leukemia with normal karyotypes. *Acta Haemat* 2005;114: 78-83.
- Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res*. 2003 Nov 1;63(21):7291-300.
- Kim MS, Probst DL, Das C, Tucker PW. Rekles is an arid3-restricted, multifunctional domain. *J. Biol. Chem*. 2007;282(21):15768-15777.
- Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98(5):1312-20.
- Kita K, Nakase K, Miwa H, Masuya M, Nishii K, Morita N, Takakura N, Otsuji A, Shirakawa S, Ueda T. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood*. 1992;80(2):470-7.
- Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):259-72. Review.
- Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood*. 1994;83:2451-2458.
- Kojima K et al, A role of SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2008;373:423-428.

Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, Wadleigh M, DeAngelo DJ, Stone RM, Sakamaki H, Appelbaum FR, Döhner H, Antin JH, Soiffer RJ, Cutler C. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2009;301(22):2349-61.

Kortschak RD, Reimann H, Zimmer M, Eyre HJ, Saint R, Jenne DE. The human dead ringer/bright homolog, DRIL1: cDNA cloning, gene structure, and mapping to D19S886, a marker on 19p13.3 that is strictly linked to the Peutz-Jeghers syndrome. *Genomics*. 1998 Jul 15;51(2):288-92.

Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 1999 Aug 6;98(3):285-94. Review.

Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Cl Oncol*. 2009;27(4):619-28.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705. Review.

Krauter J, Wagner K, Schäfer I, Marschalek R, Meyer C, Heil G, Schaich M, Ehninger G, Niederwieser D, Krahl R, Büchner T, Sauerland C, Schlegelberger B, Döhner K, Döhner H, Schlenk RF, Ganser A. Prognostic factors in adult patients up to 60 years old with acute myeloid leukemia and translocations of chromosome band 11q23: individual patient data-based meta-analysis of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Cl Oncol*. 2009;27(18):3000-6.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*. 2003 Apr;3(4):253-66. Review.

Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics*. 2009;41(7):838-42.

Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, Whitman SP, Paschka P, Mrózek K, Baldus CD, Vukosavljevic T, Liu CG, Ross ME, Powell BL, de la Chapelle A, Kolitz JE, Larson RA, Marcucci G, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B (CALGB). High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*. 2008 Jun 1;111(11):5371-9.

Langer C, Marcucci G, Holland KB, Radmacher MD, Maharry K, Paschka P, Whitman SP, Mrózek K, Baldus CD, Vij R, Powell BL, Carroll AJ, Kolitz JE, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic importance of MN1 transcripts levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*. 2009;27:3198-3204.

Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD56 (Leu11) and Leu19 (NKH-1) antigen expression of human peripheral blood NK cells and cytotoxic lymphocytes. *J Immunol*. 1986; 136: 2947-2951.

Lanier LL, Testi R, Bindi J, Phillips JH. Identify of Leu-11 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989; 169: 2233-2238.

Lapeyre JN, Becker FF. 5-Methylcytosine content of nuclear DNA during chemical hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979 Apr 13;87(3):698-705.

Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best practice & research. Clinical haematology*. 2007;20(1):29-37.

Le Beau MM, Espinosa R, Davis EM, Eisenbart JD, Larson RA, Green ED. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. *Blood*. 1996;88(6):1930-5.

Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. *Blood*. 1997;89:3323-3329.

Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Sep;1790(9):863-8.

Lewis RE, Cruse JM, Webb RN, Sanders CM, Beason K. Contrasting antigenic maturation patterns in M0-M2 versus M3 acute myeloid leukemias. *Experimental and molecular pathology*. 2007;83(2):269-73.

Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):707-19.

Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, Levin B, Juhl H, Arber N, Moinova H, Durkee K, Schmidt K, He Y, Diehl F, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW, Markowitz SD, Vogelstein B. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat. Biotechnol*. 2009;27:858-863.

Li Y, Zhu J, Tian G, Li N, Li Q, Ye M, Zheng H, Yu J, Wu H, Sun J, Zhang H, Chen Q, Luo R, Chen M, He Y, Jin X, Qinghui Zhang Q, Yu C, Zhou G, Sun J, Huang Y, Zheng H, Cao H, Zhou X, Guo S, Hu X, Li X, Kristiansen K, Bolund L, Xu J, Wang W, Yang H, Wang J, Li R, Beck S, Wang J, Zhang X. The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells. *PLoS Biol.* 2010;8:e1000533.

Lichtman MA. Cigarette smoking, cytogenetic abnormalities, and acute myelogenous leukemia. *Leukemia.* 2007;21(6):1137-40.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM, Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005 Feb 17;433(7027):769-73.

Lin L, Zhou Z, Zheng L, Alber S, Watkins S, Ray P, Kaminski N, Zhang Y, Morse D. Cross talk between Id1 and its interactive protein Dril1 mediate fibroblast responses to transforming growth factor-beta in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2008 Aug;173(2):337-46.

Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009;462:315-322.

Loh ML, Vattikuti S, Schubert S, Reynolds MG, Carlson E, Liew KH, Cheng JW, Lee CM, Stokoe D, Bonifas JM, Curtiss NP, Gotlib J, Meshinchi S, Le Beau MM, Emanuel PD, Shannon KM. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. *Blood.* 2004 Mar 15;103(6):2325-31.

Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* 1997 Nov 7;278(5340):1059-64. Review.

Lowenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology* 2003; 82-101.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997 Sep 18;389(6648):251-60.

Lück SC, Russ AC, Du J, Gaidzik V, Schlenk RF, Pollack JR, Döhner K, Döhner H, Bullinger L. KIT mutations confer a distinct gene expression signature in core binding factor leukaemia. *Br J Haematol.* 2010;148(6):925-37.

Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, Beverloo HB, Löwenberg B, Delwel R. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood.* 2008;111(8):4329-37.

Luk C, Tannock I. Flow cytometric analyses of doxorubicin accumulation in cells from human and rodent cell lines. *Reports J. Natl Cancer Inst.* 1989;81:55-59.

Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist.* 2007 Oct;12(10):1247-52.

Manuale operativo ditta Roche, *Principi fondamentali degli acidi nucleici*, 2005.

Manuscript A, Leukemia T-related M. NIH Public Access. *Cancer Research.* 2009;35(4):418-429.

Manuyakorn A, Paulus R, Farrell J, Dawson NA, Tze S, Cheung-Lau G, Hines OJ, Reber H, Seligson DB, Horvath S, Kurdistani SK, Guha C, Dawson DW. Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704. *J Clin Oncol.* 2010 Mar 10;28(8):1358-65.

Marcucci G, Mrózek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Current opinion in Hematology* 2005;12: 68-75.

Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, Mrózek K, Baldus CD, Carroll AJ, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B Study. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Cl Oncol.* 2007;25(22):3337-43.

Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrózek K, Ruppert AS, Paschka P, Vukosavljevic T, Whitman SP, Baldus CD, Langer C, Liu CG, Carroll AJ, Powell BL, Garzon R, Croce CM, Kolitz JE, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008 May 1;358(18):1919-28.

Marcucci G, Maharry K, Wu Y-Z, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Cl Oncol.* 2010;28(14):2348-55.

Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB,

Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361(11):1058-66.

Mariano AR, Colombo E, Luzi L, Martinelli P, Volorio S, Bernard L, Meani N, Bergomas R, Alcalay M, Pelicci PG. Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. *Oncogene*. 2006 Jul 20;25(31):4376-80.

Martín G, Barragán E, Bolufer P, Chillón C, García-Sanz R, Gómez T, Brunet S, González M, Sanz MA. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement. *Haematologica*. 2000;85(7):699-703.

Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Apr;15(2):163-76.

McCloskey P, Fridell YW, Attar E, Villa J, Jin Y, Varnum B, Liu ET. GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. *J Biol Chem*. 1997 Sep 12;272(37):23285-91.

Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, Tai LK, Jin ZG, Haendeler J, Berk BC. Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Oct;37(4):881-7.

Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC. Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Feb;8(2):361-7.

Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng JF, Nick AM, Deavers MT, Mourad-Zeidan A, Wang H, Mueller P, Lenburg ME, Gray JW, Mok S, Birrer MJ, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Bar-Eli M, Sood AK. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2008 Dec 18;359(25):2641-50.

Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T, Hummel M, Sauerland MC, Heinecke A, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Mansmann U, Braess J, Spiekermann K, Hiddemann W, Buske C, Bohlander SK. ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol*. 2009;27(30):5031-8.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):553-60.

Morris JF, Hromas R, Rauscher FJ 3rd. Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol Cell Biol*. 1994 Mar;14(3):1786-95.

Morris JF, Rauscher FJ 3rd, Davis B, Klemsz M, Xu D, Tenen D, Hromas R. The myeloid zinc finger gene, MZF-1, regulates the CD34 promoter in vitro. *Blood*. 1995 Nov 15;86(10):3640-7.

Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, *ALK*, to a nucleolar protein gene, *NPM*, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263:1281-1284.

Mosby. *Mosby's Medical, Nursing & Allied Health Dictionary*. Fourth Edi. Mosby-Year; 1994:903.

Moscòw JA, Cowan KH. Multidrug resistance. *J. Natl Cancer Inst*. 1988; 80: 14-20. Review.

Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004 Jun;18(2):115-36.

Mrózek K, Bloomfield CD, Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2006:169-177.

Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109(2):431-48.

Mrózek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, Marcucci G. Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Current opinion in hematology*. 2009;16(2):64-9.

Mu P, Han YC, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogradowski P, de Stanchina E, D'Andrea A, Sander C, Ventura A. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev*. 2009 Dec 15;23(24):2806-11.

Mudduluru G, Allgayer H. The human receptor tyrosine kinase Axl gene-promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and CpG methylation. *Bio Rep*. 2008 Jun;28(3):161-76.

Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M, Aggarwal BB. Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with downregulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*. 2002;21:8852-8861.

Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996 Nov 22;271(47):30022-7.

Nakano T, Tani M, Ishibashi Y, Kimura K, Park YB, Imaizumi N, Tsuda H, Aoyagi K, Sasaki H, Ohwada S, Yokota J. Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(7):665-74.

Nebbio A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P, Alvarez R, Schiavone EM, Ferrara F, Bresciani F, Weisz A, de Lera AR, Gronemeyer H, Altucci L. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat. Med*. 2005;11:77-84.

Neri G e Genuardi M, *Genetica umana e medica*, Seconda edizione 2010, Ed. Elsevier-Masson.

Neubauer A, Maharry K, Mrózek K, Thiede C, Marcucci G, Paschka P, Mayer RJ, Larson RA, Liu ET, Bloomfield CD. Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2008;26(28):4603-9.

Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, Thomas X, Rigal-Huguet F, Lioure B, Auvrignon A, Fièrè D, Reiffers J, Castaigne S, Leverger G, Harousseau JL, Socié G, Dombret H. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood*. 2002;99(10):3517-23.

Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, Boissel N, Renneville A, Philippe N, Dombret H, Dreyfus F, Quesnel B, Geffroy S, Quentin S, Roche-Lestienne C, Cayuela JM, Roumier C, Fenaux P, Vainchenker W, Bernard OA, Soulier J, Fontenay M, Preudhomme CN. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood*. 2010;116(7):1132-5.

Nixon JC, Rajaiya JB, Ayers N, Evetts S, Webb CF. The transcription factor, Bright, is not expressed in all human B lymphocyte subpopulations. *Cell Immunol*. 2004 Mar;228(1):42-53.

O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA, Yuen HA, Louie SG, Kim H, Nicholas S, Heinrich MC, Berdel WE, Bello C, Jacobs M, Scigalla P, Manning WC, Kelsey S, Cherrington JM.

An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukaemia patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:5465-5476.

Olney HJ, Mitelman F, Johansson B, Mrózek K, Berger R, Rowley JD. Unique Balanced Chromosome Abnormalities in Treatment-Related Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia? Report From an International Workshop. *Cancer*. 2002;423 Sep 2001:413-423.

Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Aug;42(8):1348-54.

Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES, Giovannucci EL, Fuchs CS. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Nat Cancer Inst*. 2008 Dec 3;100(23):1734-8.

Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Ouchi Y, Kaneki M. Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene*. 2006;25:176-185.

Paschka P. Core binding factor acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology*. 2008;35(4):410-7.

Pashka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrozek K, Maharry K, Langer C, Baldus CD, Zhao W, Powell BL, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD. Wilms tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2008;26:4595-4602.

Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, Späth D, Kayser S, Zucknick M, Götze K, Horst HA, Germing U, Döhner H, Döhner K. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Cl Oncol*. 2010;28(22):3636-43.

Peeper DS, Shvarts A, Brummelkamp T, Douma S, Koh EY, Daley GQ, Bernards R. A functional screen identifies hDRIL1 as an oncogene that rescues RAS-induced senescence. *Nat Cell Biol*. 2002 Feb;4(2):148-53.

Perrotti D, Melotti P, Skorski T, Casella I, Peschle C, Calabretta B. Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myb promoter activity. *Mol Cell Biol*. 1995 Nov;15(11):6075-87.

Peter ME. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle*. 2009 Mar 15;8(6):843-52. Review.

Peterson LF, Boyapati A, Ahn EY, Biggs JR, Okumura AJ, Lo MC, Yan M, Zhang DE. Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*. 2007;110(3):799-805.

Piekarz RL, Frye R, Turner M, Wright JJ, Allen SL, Kirschbaum MH, Zain J, Prince HM, Leonard JP, Geskin LJ, Reeder C, Joske D, Figg WD, Gardner ER, Steinberg SM, Jaffe ES, Stetler-Stevenson M, Lade S, Fojo AT, Bates SE. Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 10;27(32):5410-7.

Pitiot AS, Santamaría I, García-Suárez O, Centeno I, Astudillo A, Rayón C, Balbín M. A new type of NPM1 gene mutation in AML leading to a C-terminal truncated protein. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1564-6.

Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, Swirsky D, Peters R, Wheatley K, Walker H, Turker A, Goldstone AH, Burnett A. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). *Blood*. 1996; 87:1162–1169.

Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H; ALFA Group. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2717-23.

Prince HM, Bishton MJ, Harrison SJ. Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2009 Jun 15;15(12):3958-69.

Pritchard JK. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood*. 1998; 9:2961-2968.

Raspadori D, Damiani D, Lenoci M, Rondelli D, Testoni N, Nardi G, Sestigiani C, Mariotti C, Birtolo S, Tozzi M, Lauria F. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia*. 2001 Aug;15(8):1161-1164.

Rajaiya J, Nixon JC, Ayers N, Desgranges ZP, Roy AL, Webb CF. Induction of immunoglobulin heavy-chain transcription through the transcription factor Bright requires TFII-I. *Mol Cell Biol*. 2006 Jun;26(12):4758-68.

Ratain MJ, Rowley JD. Review Therapy-related acute myeloid leukemia secondary to inhibitors of topoisomerase II? From the bedside to the target genes. *Annals of Oncology*. 1992:107-111.

Read D, Nishigaki T, Manley JL. The Drosophila even-skipped promoter is transcribed in a stage-specific manner in vitro and contains multiple, overlapping factor-binding sites. *Mol Cell Biol*. 1990 Aug;10(8):4334-44.

Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*. 1996;87:882-886.

Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16) (p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol*. 2005;128(1):18-34.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.

Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*. 2006;107:3700-3707.

Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, Greif PA, Benthaus T, Argiropoulos B, Mellert G, Vempati S, Duyster J, Buske C, Bohlander SK, Humphries KR, Hiddemann W, Spiekermann K. CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clinical cancer research* 2009;15(7):2238-47.

Robertson KA, Hill DP, Kelley MR, Tritt R, Crum B, Van Epps S, Srour E, Rice S, Hromas R. The myeloid zinc finger gene (MZF-1) delays retinoic acid-induced apoptosis and differentiation in myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 1998 May;12(5):690-8.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005 Aug;6(8):597-610. Review.

Rochlitz C, Lohri A, Bacchi M, Schmidt M, Nagel S, Fopp M, Fey MF, Herrmann R, Neubauer A. Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia*. 1999 Sep;13(9):1352-8.

Rodriguez-Paredes e Esteller Manuel, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine* 2011;17(3):330-339.

Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet*. 1977;1(8010):549-50.

Rundlett SE, Carmen AA, Suka N, Turner BM, Grunstein M. Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature*. 1998 Apr 23;392(6678):831-5.

Rowley JD, Olney HJ. International Workshop on the Relationship of Prior Therapy to Balanced Chromosome Aberrations in Therapy-Related Myelodysplastic Syndromes and Acute Leukemia? Overview Report. *Cancer*. 2002;345:331-345.

Sachdeva MUS, Ahluwalia J, Das R, Varma N, Garewal G. Role of FAB classification of acute leukemias in era of immunophenotyping. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2006;49(4):524-7.

Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol*. 2005 Jul;204(1):36-44.

Santamaría C, Chillón MC, García-Sanz R, Pérez C, Caballero MD, Mateos MV, Ramos F, de Coca AG, Alonso JM, Giraldo P, Bernal T, Queizán JA, Rodríguez JN, Puig N, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M, Díaz-Mediavilla J, San Miguel J, González M. BAALC is an important predictor of refractoriness to chemotherapy and poor survival in intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol*. 2010 May;89(5):453-8.

Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T, Cañizo MC, Torrabadella M, García S, Irriguible D, San Miguel JF. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood*. 1989;74(1):395-408.

Sanz MA, Montesinos P. Open issues on bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukemia. *Thrombosis research*. 2010;125 Suppl:S51-4.

Savoia P, Fierro MT, Novelli M, Quaglino P, Verrone A, Geuna M, Bernengo MG. CD56-positive cutaneous lymphoma. A poorly recognized entity in the spectrum of primary cutaneous disease. *Br J Dermatol*. 1997;137:966-971.

Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death, *Oncogene*. 2008 Oct 6;27(45):5959-74. Review.

Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Tisljar K, Kusec R, Geissler K, Sillaber C, Laczika K, Mitterbauer M, Zöchbauer S, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jäger U, Gaiger A. Prognostic significance of

WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1997;1:639-643.

Schishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- κ B activation, induces G1/S arrest, suppressed proliferation and induce apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol*. 2005;70:700-713.

Schishodia S, Chaturvedi MM and Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr. Probl. Cancer*. 2007;31:243-305.

Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood*. 2005;106:3733-3739.

Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-18.

Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, Del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Fröhling S, Döhner H. German-Austrian AML Study Group (AMLSSG). Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSSG Trial AML HD98B. *Haematologica*. 2009;94(1):54-60.

Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*. 1988 Sep 9;54(6):787-93.

Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002;100:59-66.

Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood*. 2010;116(25):5486-96.

Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S, Wang Q, Chia D, Goodglick L, Kurdistani SK. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol*. 2009 May;174(5):1619-28.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004 Dec 29;119(7):941-53.

Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG, Chu YW, Lee HS, Wu CW. Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia*. 2005 Dec;7(12):1058-64.

Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:243-69.

Shivapurkar N, Gazdar AF. DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. *Curr Mol Med*. 2010 Mar;10(2):123-32. Review.

Shivdasani RA, Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4025-39. Review.

Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausers T, Allebach J, Small D. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:3669-3676.

Slovak M, Kopecky K, Cassileth P. Karyotype analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96:4075-4083.

Sperling C, Büchner T, Creutzig U, Ritter J, Harbott J, Fonatsch C, Sauerland C, Mielcarek M, Maschmeyer G, Löffler H. Clinical, morphologic, cytogenetic and prognostic implications of CD34 expression in childhood and adult de novo AML. *Leuk Lymphoma*. 1995;17:417-426.

Stein E, McMahan B, Kwaan H, Altman JK, Frankfurt O, Tallman MS. The coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia revisited. *Best practice & research. Clinical haematology*. 2009;22(1):153-63.

Stenhoff J, Dahlbäck B, Hafizi S. Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 2;319(3):871-8.

Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:650-665.

Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, Sheets KM, Pogossova-Agadjanyan E, Willman CL, Radich JP. Novel *FLT3* point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;124:481-484.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5.

Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105:54-60.

Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology, ASH EDU*. 2004:98-117.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Fourth Edi. 2008:127-129.

Sun Y, Jiang X, Chen S, Price BD. Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett*. 2006;580:4353-4356.

Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2854-61.

Suzuki M, Okuyama S, Okamoto S, Shirasuna K, Nakajima T, Hachiya T, Nojima H, Sekiya S, Oda K. A novel E2F binding protein with Myc-type HLH motif stimulates E2F-dependent transcription by forming a heterodimer. *Oncogene*. 1998 Aug 20;17(7):853-65.

Taby R and Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:376-392.

Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J*. 2008 Oct 22;27(20):2681-90.

Tallman MS. New strategies for the treatment of Acute Myeloid Leukemia including antibodies and other novel agents. *Hematology*. 2005; vol: 143-150.

Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005; 106 (4): 1154-1163.

Tamai H, Inokuchi K. 11q23/MLL acute leukemia? update of clinical aspects. *Journal of clinical and experimental hematopathology? JCEH*. 2010;50(2):91-8.

Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic disruption of polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev*. 2007;21:1050-1063.

Tang JL, Hou HA, Chen CY, Liu CY, Chou WC, Tseng MH, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Yao M, Huang SY, Ko BS, Hsu SC, Wu SJ, Tsay W, Chen YC, Lin LI, Tien HF. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009;114(26):5352-61.

Tanner SM, Austin JL, Leone G, Rush LJ, Plass C, Heinonen K, Mrózek K, Sill H, Knuutila S, Kolitz JE, Archer KJ, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de La Chapelle A. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Nov 20;98(24):13901-6.

Te Boekhorst PA, de Leeuw K, Schoester M, Wittebol S, Nooter K, Hagemeyer A, Löwenberg B, Sonneveld P. Predominance of functional multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34+ acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 1993; 82:3157-3162.

Thepot S, Itzykson R, Seegers V, Raffoux E, Quesnel B, Chait Y, Sorin L, Dreyfus F, Cluzeau T, Delaunay J, Sanhes L, Eclache V, Dartigeas C, Turlure P, Harel S, Salanoubat C, Kiladjian JJ, Fenaux P, Adès L; Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). Treatment of progression of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms to myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia by azacitidine: a report on 54 cases on the behalf of the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). *Blood*. 2010;116(19):3735-42.

Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326-35.

Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G. Prevalence and prognostic impact on NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107:4011-4020.

Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol*. 1999 Oct;9(5):349-57. Review.

Trinh BN, Long TI, Nickel AE, Shibata D, Laird PW. DNA methyltransferase deficiency modifies cancer susceptibility in mice lacking DNA mismatch repair. *Mol Cell Biol*. 2002 May;22(9):2906-17.

Tsou AP, Wu KM, Tsen TY, Chi CW, Chiu JH, Lui WY, Hu CP, Chang C, Chou CK, Tsai SF. Parallel hybridization analysis of multiple protein kinase genes: identification of gene expression patterns characteristic of human hepatocellular carcinoma. *Genomics*. 1998 Jun 15;50(3):331-40.

Tsuruo T. Mechanisms of multidrug resistance and implications of therapy. *Review Jpn. J. Cancer Res.* 1988;79:285-296.

Tura S, Baccarani M, Fanin R. Corso di Malattie del Sangue e degli Organi Emolinfopoietici. Quarta Edizione. Società Editrice Esculapio, ed. 2007:132-152.

Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays.* 2000 Sep;22(9):836-45. Review.

van Ginkel PR, Gee RL, Shearer RL, Subramanian L, Walker TM, Albert DM, Meisner LF, Varnum BC, Polans AS. Expression of the receptor tyrosine kinase Axl promotes ocular melanoma cell survival. *Cancer Res.* 2004 Jan 1;64(1):128-34.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937-51.

Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Stasi R, Bruno A, Aronica G, Maffei L, Suppo G, Simone MD, Forte L, Cordero V, Postorino M, Tuffilli V, Isacchi G, Masi M, Papa G, Amadori S. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): comparison of 25 cases with other French-American-British subtypes. *Blood.* 1997;89:621-629.

Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol.* 2005 Jun;83(3):344-53.

Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, Allen C, Green C, Quentmeier H, Drexler H, Burnett A, Linch D, Bonnet D, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Cl Oncol.* 2008;26(33):5429-35.

Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature.* 2000 Nov 23;408(6811):495-8.

Von Hoff DD, Slavik M, Muggia FM. 5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. *Ann Intern Med.* 1976 Aug;85(2):237-45. Review.

Wadleigh M, DeAngelo DJ, Griffin JD, Stone RM. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. *Blood* 2005;105:22-30.

Wagner K, Damm F, Göhring G, Görlich K, Heuser M, Schäfer I, Ottmann O, Lübbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar AA,

Fiedler W, Kirchner HH, Brugger W, Zucknick M, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Krauter J. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2356-64.

Wang X, Tian QB, Okano A, Sakagami H, Moon IS, Kondo H, Endo S, Suzuki T. BAALC 1-6-8 protein is targeted to postsynaptic lipid rafts by its N-terminal myristoylation and palmitoylation, and interacts with α , but not β , subunit of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem*. 2005;92:647-659.

Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, Thompson CB. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer cell*. 2010;17(3):225-34.

Webb C, Zong RT, Lin D, Wang Z, Kaplan M, Paulin Y, Smith E, Probst L, Bryant J, Goldstein A, Scheuermann R, Tucker P. Differential regulation of immunoglobulin gene transcription via nuclear matrix-associated regions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:109-18.

Webb CF, Bryant J, Popowski M, Allred L, Kim D, Harriss J, Schmidt C, Miner CA, Rose K, Cheng HL, Griffin C, Tucker PW. The ARID family transcription factor bright is required for both hematopoietic stem cell and B lineage development. *Mol Cell Biol*. 2011 Mar;31(5):1041-53.

Webb DKH. Optimizing therapy for myeloid disorders of Down syndrome. *Br J Haematol*. 2005;131(1):3-7.

Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Koltz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult *de novo* acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of *FLT3*: a Cancer and Leukemia Group B study. *Cancer Res*. 2001;61:7233-7239.

Wilsker D, Patsialou A, Dallas PB, Moran E. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. *Cell Growth Differ*. 2002 Mar;13(3):95-106. Review.

Wu CW, Li AF, Chi CW, Lai CH, Huang CL, Lo SS, Lui WY, Lin WC. Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2002 Mar-Apr;22(2B):1071-8.

Yao X, Hu JF, Daniels M, Shiran H, Zhou X, Yan H, Lu H, Zeng Z, Wang Q, Li T, Hoffman AR. A methylated oligonucleotide inhibits IGF2

expression and enhances survival in a model of hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest.* 2003 Jan;111(2):265-73.

Yin CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms-comments on the 2008 WHO classification. *Intern. J of lab. hem.* 2010;32(5):461-76.

Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol.* 2008 Apr;9(4):405-14.

Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 2007 Aug 13;26(37):5541-52. Review.

Zhao N, Stoffel A, Wang PW, Eisenbart JD, Espinosa R 3rd, Larson RA, Le Beau MM. Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(13):6948-53.

Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, Simpson RJ, Cerruti L, Curtis DJ, Patel DJ, Allis CD, Cunningham JM, Jane SM. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Mar;16(3):304-11.

Zheng R, Friedman AD, Levis M, Li L, Weir EG, Small D. Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through repression of C/EBP alpha expression. *Blood.* 2004;103:1883-1890.

Zuo Z, Polski JM, Kasyan A, Medeiros LJ. Acute erythroid leukemia. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2010;134(9):1261-70.

CAPITOLO 7 - APPENDICE

7. 1 Pubblicazioni inerenti l'argomento della tesi

1. Histone post-translational modifications associated to *BAALC* expression in leukemic cells.

Franzoni A, Passon N, Fabbro D, Tiribelli M, Damiani D, Damante G.

Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 13;417(2):721-5.

Epub 2011 Dec 14.

7.2 Pubblicazioni ottenute durante il dottorato e non inerenti l'argomento della tesi

1. Prohibitin is overexpressed in papillary thyroid carcinomas bearing the BRAF (V600E) mutation.

Franzoni A, Dima M, D'Agostino M, Puppini C, Fabbro D, Loreto CD, Pandolfi M, Puxeddu E, Moretti S, Celano M, Bruno R, Filetti S, Russo D, Damante G.

Thyroid. 2009 Mar;19(3):247-55.

2. Two novel NPM1 mutations in a therapy-responder AML patient.

Pianta A, Fabbro D, Damiani D, Tiribelli M, Fanin R, **Franzoni A**, Romanello M, Tell G, Di Loreto C, Damante G.

Hematol. Oncol. 2010 Sep;28(3):151-5.

3. Unexpected phenotype of a typical NPM1 mutant.

Pianta A, Fabbro D, Damiani D, Tiribelli M, Fanin R, **Franzoni A**, Romanello M, Tell G, Damante G.

Br J Haematol. 2009 Dec;147(5):760-3.

4. Nucleophosmin is overexpressed in thyroid tumors.

Pianta A, Puppini C, **Franzoni A**, Fabbro D, Di Loreto C, Bulotta S, Deganuto M, Paron I, Tell G, Puxeddu E, Filetti S, Russo D, Damante G.

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jul 2;397(3):499-504.

5. Histone deacetylase inhibitors control the transcription and alternative splicing of prohibitin in thyroid tumor cells.

Puppini C, Passon N, **Franzoni A**, Russo D, Damante G.

Oncol Rep. 2011 Feb;25(2):393-7.

6. Nucleophosmin delocalization in thyroid tumour cells.

Pianta A, Puppini C, Passon N, **Franzoni A**, Romanello M, Tell G, Di Loreto C, Bulotta S, Russo D, Damante G.

Endocr Pathol. 2011 Mar;22(1):18-23.

7. KRAS codon 12 and 13 mutation analysis: a comparative study between Direct Sequencing and a new sensitive Real-Time PCR Assay.

Marzinotto S, Sessa F, **Franzoni A**, Anselmi A, Gastaldo LR, Mason S, Damante G, Beltrami CA, Mariuzzi L.

Sequencing 2011, Hindawi Publishing Corporation, Volume 2011, Article ID 895709, doi:10.1155/2011/895709.

8. CREM inhibits promoter activity of NIS gene in thyroid cancer cells.

Passon N, Puppini C, Lavarone E, Bregant E, **Franzoni A**, Hershman JM, Fenton MS, D'Agostino M, Durante C, Russo D, Filetti S, Damante G.

Thyroid, 2012 in press.

Ringraziamenti

Ringrazio tutte le mie colleghe dell'Istituto di Genetica per il supporto e la disponibilità che mi dimostrano quotidianamente.

Un ringraziamento particolare va al Prof. Damante, senza il quale non avrei potuto crescere professionalmente, e a Dora, insostituibile amica e collega.

Ringrazio fortemente la mia famiglia, che si è sempre impegnata nel sostenermi durante tutti i miei studi.

Un grazie va a Kether, la mia metà migliore.