

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 I disordini mieloproliferativi	1
1.2 Classificazione delle leucemie mieloidi acute	1
1.2.1 Classificazione FAB	1
1.2.2 Classificazione WHO (<i>World Health Organization</i>)	5
1.3 Le aberrazioni cromosomiche delle leucemie mieloidi acute	7
1.3.1 Traslocazione t(8;21)(q22;q22)	8
1.3.2 Traslocazione t(15;17)(q22;q12)	10
1.3.3 Inversione del cromosoma 16	10
1.3.4 Gene Mixed Lineage Leucemia (<i>MLL</i>)	11
1.3.5 Traslocazione t(9;22)(q34;q11)	12
1.3.6 Traslocazione t(6;9)(p23;q34)	13
1.4 Mutazioni geniche delle leucemie mieloidi acute.....	13
1.4.1 Mutazione del gene <i>FLT3</i>	13
1.4.2 Mutazione del gene <i>NPM</i>	16
1.5 La nucleofosmina ed il cancro	21
2. Scopo della tesi	27
3. Materiali e metodi	28
3.1 Casistica.....	28
3.2 Preparazione dei campioni e analisi molecolare.....	29
3.2.1 Separazione degli elementi mononucleati mediante Gradiente di densità	30
3.2.2 Estrazione dell'RNA totale	30

3.2.3	Lettura allo spettrofotometro e corsa elettroforetica.....	31
3.2.4	RT-PCR ed elettroforesi capillare mediante lo strumento CEQ-8000	31
3.2.5	Sequenziamento	35
3.2.6	RT-ASP-PCR ed elettroforesi su gel d'agarosio	35
4.	Risultati	38
4.1	Analisi dei frammenti all'elettroforesi capillare	38
4.2	Sequenziamento.....	38
4.3	RT-ASO-PCR	41
4.3.1	Sensibilità della RT-ASO-PCR	42
5.	Discussione e Conclusioni	45
6.	Bibliografia	51

1. Introduzione

1.1 I disordini mieloproliferativi

I disordini mieloproliferativi costituiscono un gruppo di malattie ematologiche caratterizzate da un'anomala proliferazione di una o più linee cellulari emopoietiche della serie mieloide. La classificazione WHO (*World Health Organization*) divide i disordini mieloproliferativi in leucemia mieloide acuta (LMA), sindromi mielodisplastiche (SMD) e sindromi mieloproliferative croniche (SMPC) in relazione alle caratteristiche morfologiche, immunofenotipiche e citogenetiche delle cellule coinvolte (Vardiman JW. *et al.*, 2002). Le LMA sono caratterizzate da un difetto di maturazione che provoca uno squilibrio fra proliferazione e differenziazione causando una continua espansione e predominanza del clone leucemico. Le SMD rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie in cui predomina un difetto maturativo di una o più linee emopoietiche con conseguente emopoiesi inefficace di vario grado. Infine, le SMPC sono caratterizzate da un'espansione di cellule proliferanti che mantengono una capacità differenziativa fino alla maturazione completa delle cellule (Castoldi G., 2001).

1.2 Classificazione delle leucemie mieloidi acute

1.2.1 Classificazione FAB

Le leucemie costituiscono un ampio ed eterogeneo gruppo di neoplasie maligne del tessuto emolinfopoietico che hanno origine in una cellula staminale non ancora orientata o in precursori orientati in senso mieloide o linfoide (Figura 1.1). La trasformazione neoplastica

altera i meccanismi che regolano la proliferazione e la differenziazione della cellula staminale colpita (Cline MJ *et al.*, 1994). La conseguenza è l'origine di un clone neoplastico che si accumula primariamente nel midollo osseo e poi in altri organi e tessuti, caratterizzato da una proliferazione afinalistica e incontrollata tale da acquisire più o meno rapidamente una netta prevalenza numerica rispetto ai cloni normali (Mandelli F. *et al.*, 1991). In alcune forme (leucemie acute) si osserva una proliferazione di blasti altamente immaturi, mentre in altre (leucemie croniche) si ha soprattutto un aumento numerico di cellule che presentano caratteristiche morfologiche e maturative simili alle cellule normali (Rabbits TH. *et al.*, 1991). Da un punto di vista ontogenetico, le leucemie possono essere distinte in forme mieloidi e linfoidi a seconda dello stipe cellulare coinvolto. Esistono, inoltre, casi meno frequenti in cui l'espansione clonale leucemica presenta aspetti fenotipici promiscui, sia mieloidi che linfoidi, e si parla, pertanto, di leucemie ibride o bifenotipiche (Pui CH. *et al.*, 1984; Lo Coco F. *et al.*, 1991).

La classificazione delle LMA si basa su criteri morfologici mediante l'osservazione microscopica di strisci di sangue periferico e di midollo osseo, e su criteri citochimici mediante l'analisi di attività enzimatiche e/o presenza di particolari sostanze (mieloperossidasi, sudan nero, fosfatasi acida etc.) sui blasti leucemici.

Tali criteri furono stabiliti nel 1976 dal gruppo FAB (Gruppo Cooperatore Francese-Americano-Britannico) (Bennet JM. *et al.*, 1976). Tale sistema, che prevede indagini relativamente semplici e facilmente riproducibili, ha trovato largo impiego in tutto il mondo ed ha permesso di superare preesistenti divergenze classificative, poiché consente una certa omogeneità di interpretazione.

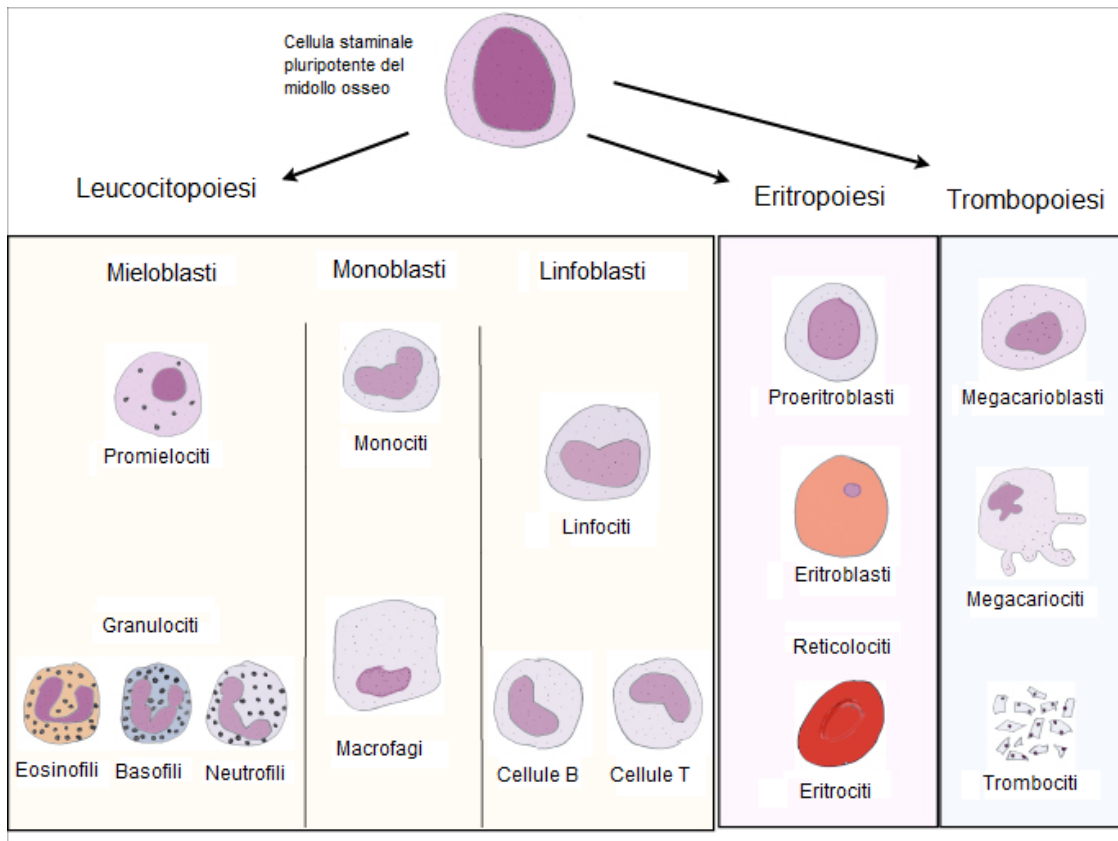


Figura 1.1 Emopoiesi: formazione e maturazione di tutti i tipi di cellule del sangue a partire dai loro precursori. Da una cellula staminale pluripotente presente nel midollo osseo, attraverso elementi intermedi, possibili bersagli degli eventi deregolativi leucemici, si arriva alla formazione di elementi maturi localizzati nel sangue periferico.

Nel gruppo della LMA vari tipi cellulari possono essere coinvolti, così da poter distinguere in questa categoria 8 differenti sottotipi:

- **M0** leucemia con minima differenziazione mieloide, meno del 3% dei blasti mostrano un'attività perossidasi (MPO 43%).
- **M1** leucemia mieloide senza maturazione, ovvero non si osserva una maturazione posteriore allo stadio di mieloblasto. Rappresenta il 15-20% delle LMA.

- **M2** leucemia mieloide acuta con maturazione fino allo stadio promielocitica o oltre. Rappresenta il 30% delle LMA.
- **M3** leucemia promielocitica acuta caratterizzata da blasti di tipo promielocitico con nucleo irregolare, abbondanti granulazioni azzurrofile.
- **M3V** (variante ipergranulare), si caratterizza per la scarsa o totale assenza di granuli osservati a livello ottico nella maggior parte delle cellule e per la presenza di un nucleo bilobato, plurilobato o reniforme. A differenza della M3 tipica, la M3V ha solitamente leucocitosi. La M3 e la M3V costituiscono il 5-10% dei casi di LMA, essendo di questi un 25% solo di M3V (Bain, 1990).
- **M4** leucemia mielomonocitica acuta con presenza contemporanea di blasti ad orientamento mieloide e monocitario; in questo ambito oggi viene anche distinto un sottotipo particolare denominato:
 - **M4eo** con proliferazione di elementi eosinofili, negativa alla perossidasi.
- **M5** leucemia monocitica acuta in cui la popolazione leucemica è rappresentata (prevalentemente) da elementi della linea monocitaria.
- **M6** eritroleucemia, varietà meno frequente caratterizzata dalla proliferazione di elementi leucemici appartenenti alle linee eritroblastica e granuloblastica.
- **M7** leucemia megacarioblastica, varietà abbastanza rara, in cui i blasti possono presentare un aspetto indifferenziato o talora di tipo linfoide, con contorni spesso irregolari per la presenza di estroflessioni citoplasmatiche.

Benché altamente riproducibile e assai semplice, la classificazione FAB della leucemia acuta non è di grande utilità da un punto di vista clinico-prognostico. Anche altre caratteristiche, come le anomalie cromosomiche, l'immunofenotipo, l'età e le condizioni generali del paziente sono importanti nella guida alla scelta terapeutica consentendo la suddivisione, ai fini prognostici e terapeutici, dei vari sottogruppi di leucemia acuta. Integrando le caratteristiche morfologiche con quelle biologiche è possibile tentare di identificare alcuni sottotipi citologici particolari delle LMA non specificatamente proposti dalla classificazione FAB.

1.2.2 Classificazione WHO (*World Health Organization*)

Nel 1998 è stata introdotta da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità una classificazione (WHO, *World Health Organization*), che distingue quattro principali categorie: LMA con anomalie genetiche ricorrenti, LMA con displasia multilineare, LMA e sindromi mielodisplastiche secondarie a chemioterapia, LMA non altrimenti classificabili (Harris NL. *et al.*, 1997) (Tabella 1.1). Per distinguere questi gruppi di neoplasie mieloidi, la classificazione WHO integra parametri morfologici, immunofenotipici, genetici e clinici. Successivamente la classificazione WHO è stata oggetto di modifiche che hanno permesso di introdurre nuovi sottotipi morfologici e di creare categorie definite da alterazioni non solo citogenetiche ma anche molecolari (Jaffe NL. *et al.*, 2001; Vardiman JW. *et al.*, 2008).

Tabella 1.1 Classificazione delle neoplasie mieloidi e delle leucemie mieloidi acute secondo la WHO.

MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS (MPN)

Chronic myelogenous leukemia, *BCR-ABL1* positive
 Chronic neutrophilic leukemia
 Polycythemia vera
 Primary myelofibrosis
 Essential thrombocythemia
 Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified
 Mastocytosis
 Myeloproliferative neoplasms, unclassifiable

MYELOID AND LYMPHOID NEOPLASMS ASSOCIATED WITH EOSINOPHILIA AND ABNORMALITIES OF *PDGFR-A*, *PDGFRB*, OR *FGFR1*

Myeloid and lymphoid neoplasms associated with *PDGFR-A* rearrangement
 Myeloid neoplasms associated with *PDGFRB* rearrangement
 Myeloid and lymphoid neoplasms associated with *FGFR1* abnormalities

MYELODYSPLASTIC/MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS (MDS/MPN)

Chronic myelomonocytic leukemia
 Atypical chronic myeloid leukemia, *BCR-ABL1* negative
 Juvenile myelomonocytic leukemia
 Myelodysplastic/Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable
Provisional entity: Refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis

MYELODYSPLASTIC SYNDROME (MDS)

Refractory cytopenia with unilineage dysplasia
 Refractory anemia
 Refractory neutropenia
 Refractory thrombocytopenia
 Refractory anemia with ring sideroblasts
 Refractory cytopenia with multilineage dysplasia
 Refractory anemia with excess blasts
 Myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)
 Myelodysplastic syndrome, unclassifiable
 Childhood myelodysplastic syndrome
Provisional entity: Refractory cytopenia of childhood

ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND RELATED NEOPLASMS

Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities
 AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
 AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
 APL with t(15;17)(q22;q12); *PML-RAR α*
 AML with t(9;11)(p22;q23); *MLL3-MLL*
 AML with t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
 AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVII*
 AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*
Provisional entity: AML with mutated NPM1
Provisional entity: AML with mutated CEBPA

ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND RELATED NEOPLASMS (cont.)

Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes
 Therapy-related myeloid neoplasms
 Acute myeloid leukemia, not otherwise specified
 AML with minimal differentiation
 AML without maturation
 AML with maturation
 Acute myelomonocytic leukemia
 Acute monoblastic/monocytic leukemia
 Acute erythroid leukemia
 Pure erythroid leukemia
 Erythroleukemia, erythroid/myeloid
 Acute megakaryoblastic leukemia
 Acute basophilic leukemia
 Acute panmyelosis with myelofibrosis
 Myeloid Sarcoma
 Myeloid Proliferations related to Down Syndrome
 Transient abnormal myelopoiesis
 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); *BCR-ABL1*
 Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); *MLL* rearranged
 Mixed phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS
 Mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS
Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

B LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA/LYMPHOMA

B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS
 B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities
 B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
 B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23); *MLL* rearranged
 B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*
 B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
 B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
 B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32) *IL3-IGH*
 B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

T LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA/LYMPHOMA

1.3 Le aberrazioni cromosomiche delle leucemie mieloidi acute

Benché non siano note le cause specifiche in ogni paziente che determinano l'insorgenza della LMA, negli ultimi anni le conoscenze circa le basi genetiche di tale patologia sono aumentate ed è ormai universalmente riconosciuto che la caratterizzazione citogenetica consente, assai meglio della morfologia o dell'immunofenotipo, di identificare parametri biologici clinicamente rilevanti (Cuneo A. *et al.*, 1998). Di fatto, la presenza o meno di determinate alterazioni del cariotipo, costituisce, insieme all'età e al valore dei globuli bianchi all'esordio, un principale fattore prognostico nei pazienti affetti da LMA (Keating MJ. *et al.* 1988, Mugneret F. *et al.*, 2003).

Le alterazioni molecolari presenti nelle neoplasie interessano geni che rivestono un ruolo chiave nella biologia della cellula, come nel controllo del ciclo cellulare o nei fenomeni di apoptosi. Tra i meccanismi alla base di tali alterazioni è possibile evidenziare:

- Mutazioni puntiformi, che rappresentano un meccanismo genetico di attivazione dei proto-oncogeni capaci di esercitare una regolazione positiva ad esempio sul ciclo cellulare. L'effetto fenotipico della mutazione è rappresentato da una proteina mutata con un'aumentata attività e per lo più svincolata dai fisiologici meccanismi di regolazione.

In alcuni pazienti con LMA è stata riscontrata una mutazione puntiforme al livello l'*activation loop* del *fms-related tyrosine kinase 3* del gene *FLT3*, con la sostituzione dell'acido aspartico in posizione 835 dell'esone 17, preferenzialmente con un residuo di tiroxina (Yamamoto Y. *et al.*, 2001).

- Delezioni, la cui perdita di materiale genetico, spesso a livello di geni oncosoppressori, ne causa alterazioni funzionali.
- Traslocazioni, mutazioni cromosomiche derivate da un errato scambio di parti di cromosomi non omologhi durante il riarrangiamento.

Alterazioni citogenetiche specifiche hanno una forte correlazione con la Le principali alterazioni citogenetiche ed i geni che maggiormente vengono coinvolti nella patogenesi delle leucemie acute mieloidi, sono riportati nella Tabella 1.2.

Alterazioni citogenetiche specifiche hanno una forte correlazione con la risposta terapeutica, per cui l'individuazione di una particolare lesione genetica permette di migliorare l'approccio terapeutico. L'identificazione dei meccanismi con cui queste alterazioni portano allo sviluppo della leucemia è essenziale per lo sviluppo di nuove terapie.

1.3.1 Traslocazione t(8;21)(q22;q22)

E' l'alterazione citogenetica più frequente delle leucemie acute mieloidi con un'incidenza del 5-10% (Nucifora G. *et al.*, 1995, Zhang T. *et al.*, 1994): il riarrangiamento cromosomico è strettamente correlato il citotipo FAB M2, presente nel 30-40 % di queste forme. Sul piano molecolare la t(8;21) determina il riarrangiamento tra il gene *AML1* ed il gene *ETO*, determinando sul cromosoma 8 lo sviluppo di un gene chimerico *AML1-ETO* cruciale per la patogenesi della leucemia attraverso un meccanismo di repressione della trascrizione. I pazienti con la traslocazione t(8-21) presentano prognosi favorevole con il raggiungimento della remissione completa (RC) nell' 80-90 % dei casi e sopravvivenza a 5 anni del 60-70%.

Tabella 1.2 Alterazioni citogenetiche più frequenti nelle LMA.

Alterazioni citogenetiche	Sottotipi FAB coinvolti	Geni coinvolti
t(8;21)(q22;q22)	M2, M1, M4	AML1/ETO
inv(16)(p13;q22) t(16;16)(p13;q22)	M4e, M4	CBFβ/MYH11
t(15;17)(q21;q11) t(11;17)(q23;q11)	M3, M3V	PML/RARα PLZF/RARα
11q23 t(9;11)(p22;q23) t(11;19)(q23;p13) t(6;11)(q27;q23)	M4, M5 M4 e M5	MLL(ALL1) MLL/AF9 MLL/ENL MLL/AF6
inv(3)(q21;q26) t(3;3)(q21;q26)	M1	EVI-1
t(6;9)(q21;q26)	M1, M2, M4, M5	DEK/CAN
t(1;22)(p13;q13)	M0	?
t(8;16)(p11;p13)	M4, M5	MOZ-CBP
t(8;22)(p11;p13)	M5	MOZ-p300
t(12;22)(p13;q13)	M4	TEL/NM1
t(12;15)(p13;q25)	M2	TEL/TRKC
t(1;12)(q25;p13)	M3	TEL/ABL2
-5 o de(5q)	AML-MDS	-
-7 o de(7q)	AML-MDS	-
+8	M2, M4 e M5	?
+11	M1, M2 e M4	MLL
+9	M2, M4 e M5	?

1.3.2 Traslocazione t(15;17)(q22;q12)

La traslocazione reciproca che coinvolge i cromosomi 15 e 17, t(15;17), è un aspetto caratteristico della leucemia promielocitica acuta (LPA) che rappresenta circa il 10-15 % delle leucemie mieloidi acute. I due geni fusi in seguito alla traslocazione t(15;17) sono il gene *PML*, localizzato sul cromosoma 15q22, e il gene codificante per il recettore α dell'acido retinico (*RAR α*) sul cromosoma 17q21. Il risultante gene di fusione codifica per la proteina chimerica PML-RARA che svolge attività di repressore trascrizionale.

Il gene di fusione *PML/RAR α* che si crea sul cromosoma 15 riarrangiato, svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo della LPA, poiché è responsabile sia del blocco differenziativo che della risposta al RA (Pandolfi PP. *et al.*, 1992). L'espressione di tali geni, viene ripristinata dalla somministrazione di alte dosi di acido retinoico, che rimuovendo il blocco trascrizionale, permettono al gene *RAR α* normale, di attivare la trascrizione di alcuni geni bersaglio, necessari per la differenziazione mieloide. Il triossido di arsenico, altro farmaco elettivo per il trattamento della LPA, agisce in parte attraverso lo stesso meccanismo.

1.3.3 Inversione del cromosoma 16

L'inversione del cromosoma 16 (inv (16)) si riscontra in circa il 10% delle leucemie mieloidi acute M4 con eosinofilia midollare (M4eo); tuttavia l'inv (16) è stata riscontrata anche nei sottotipi FAB M2, M5 e raramente nella forma M1 (Liu PP. *et al.*, 1995, Larson RA. *et al.*, 1986). In questi riarrangiamenti il gene 16q22, che codifica per il *core binding factor* (*CBF*), si fonde con il gene 16p13 codificante per la catena pesante della miosina del muscolo liscio (*MYH11*) (Liu P. *et al.*, 1993). La conseguenza di questa inversione è la formazione di un mRNA, *CBF-MYH11* ibrido, e di una proteina ibrida la cui sequenza

aminoacidica corrisponde a una parte del gene *CBF* nel tratto N-terminale e a una parte del gene *MYH11* nel tratto C-terminale.

Dal punto di vista clinico l'alterazione genetica è associata, come nel caso della t(8-21), a prognosi favorevole, con analoghe percentuali di risposte alla terapia e durata della sopravvivenza.

1.3.4 Gene Mixed Lineage Leucemia (*MLL*)

Alterazioni strutturali che interessano la banda q23 del cromosoma 11 si verificano nel 6-8 % delle AML primitive ed in oltre l'85% dei casi di AML che si sviluppano dopo esposizione agli inibitori della topoisomerasi II. Questa alterazione cromosomica si osserva nel 50-60% delle LMA dell'infanzia, nel 4-5 % delle LMA *de novo* dell'adulto e nell'80 % nelle forme secondarie dell'adulto, con maggiore frequenza in corso di M4 ed M5.

Il gene *MLL*, svolge un ruolo cruciale nella patogenesi della LMA, mentre il gene partner, coinvolto nella traslocazione, determina probabilmente le caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche della malattia. Benché oltre 30 diversi loci cromosomici possano partecipare alla traslocazione che interessa 11q23, la maggior parte coinvolge i siti 6q27, 9p22, 10p12, 17q21, 19p13.1. Il risultato di queste traslocazioni è rappresentato da una chimera derivante dalla fusione della porzione 5' del gene *MLL* con la porzione 3' di un gene codificato sul cromosoma reciproco. Questa fusione rende inattivo il gene *MLL* con perdita della sua funzione abituale di regolazione del livello di proteine associate alla cromatina, di regolazione della trascrizione e di attivazione della via delle chinasi.

1.3.5 Traslocazione t(9;22)(q34;q11)

La traslocazione t(9;22)(q34;q11) dà luogo a due geni ibridi, il gene *BCR/ABL* nel cromosoma 22q-, chiamato cromosoma Philadelphia (Ph), e il gene *ABL/BCR* sul cromosoma 9q-. Il gene *BCR/ABL* risulta frequente nelle LMC e in minor percentuale anche in alcuni casi occasionali di LMA (Melo JV. *et al.*, 1996, Saglio G. *et al.*, 1991).

Indipendentemente dalla localizzazione del punto di rottura in *ABL*, tutti i geni di fusione *BCR/ABL* hanno una porzione 5' derivata da *BCR* e una porzione 3' che include quasi tutto *ABL*, eccetto i primi codoni. Il punto di rottura del cromosoma 9 si produce un segmento di più di 300 kb nell'estremo 5' di *ABL*. Indipendentemente dalla localizzazione del punto di rottura in *ABL*, il processamento del trascritto primario da luogo abitualmente a due tipi di mRNA. In un mRNA il 2° esone di M-bcr (*major breakpoint cluster region*) si unisce al 2° esone di *ABL* (b2a2) e nell'altro il 3° esone di M-bcr si unisce all'esone di *ABL* (b3a2) (Fig. 3). I due mRNA chimerici risultanti codificano una proteina di 210 kDa (p210) con solo 25 aminoacidi di differenza (Melo JV. *et al.*, 1996). La rottura di *BCR* invece, si produce in un introne di 54.4 kb situato tra i due esoni alternativi e2' ed e2; questa zona è riconosciuta come m-bcr (*minor breakpoint cluster region*). In questi casi gli esoni e1' e e2' sono eliminati attraverso il meccanismo di splicing, dando luogo al trascritto e1a2. Questo mRNA si traduce in una proteina di 190 kDa (p190) (Melo JV. *et al.*, 1996). In alcuni pazienti nel punto di rottura M-bcr si trovano coespressi gli mRNA p210 e p190, dovuto forse al meccanismo di splicing alternativo (Saglio G. *et al.*, 1996). La fitta rete di segnali e di interconnessioni controllata dalla proteina Bcr-Abl è complessa ed il risultato finale è un aumento delle potenzialità mitotiche della cellula ed una riduzione della sensibilità agli stimoli apoptotici. La presenza del trascritto ibrido *BCR/ABL* nei pazienti con diagnosi di leucemia acuta si considera a prognosi sfavorevole.

1.3.6 Traslocazione t(6;9)(p23;q34)

Si osserva nell'1-2 % dei pazienti con LMA, i quali mostrano spesso una displasia trilineare che, in associazione all'osservazione della traslocazione anche in pazienti con mielodisplasia e mielofibrosi idiopatica, ha fatto ritenere che il riarrangiamento colpisca la cellula staminali mieloide. Numerosi pazienti con t(6;9) hanno subito l'esposizione a carcinogeni ambientali, o ad una precedente chemioterapia. I geni coinvolti nella traslocazione sono *DEK* (6p23) e *CAN* (9q34). Il gene *DEK* blocca i processi trascrizionali, mentre *CAN* codifica per una proteina che consente il trasporto degli mRNA e proteine tra nucleo e citoplasma; un'aumentata espressione di *CAN* con conseguente delocalizzazione di tali proteine, comporterebbe un arresto delle cellule in fase G₀.

1.4 Mutazioni geniche delle leucemie mieloidi acute

Come si evince dalla Figura 1.2, circa il 50 % circa dei pazienti con LMA presenta un cariotipo normale, sia all'esame citogenetico convenzionale che alla FISH. Tali pazienti possono tuttavia presentare mutazioni genetiche identificabili solamente con metodiche di biologia molecolare.

1.4.1 Mutazione del gene *FLT3*

FLT3 è un gene mappato sul cromosoma 13q21 che codifica per una proteina recettoriale ad attività tirosin-chinasica di classe III, di 993 aminoacidi (Figura 1.3). Essa è coinvolta nella proliferazione, differenziamento ed apoptosi delle cellule staminali ematopoietiche. *FLT3* è espresso nelle cellule ematopoietiche immature (precursori mieloidi e linfoidi), nella placenta, nelle gonadi e nel cervello. Nel midollo osseo essa è

normalmente espressa nei progenitori ematopoietici precoci comprese le cellule CD34+ con alta espressione di CD117. *FLT3* è espresso anche in molti tumori ematologici.

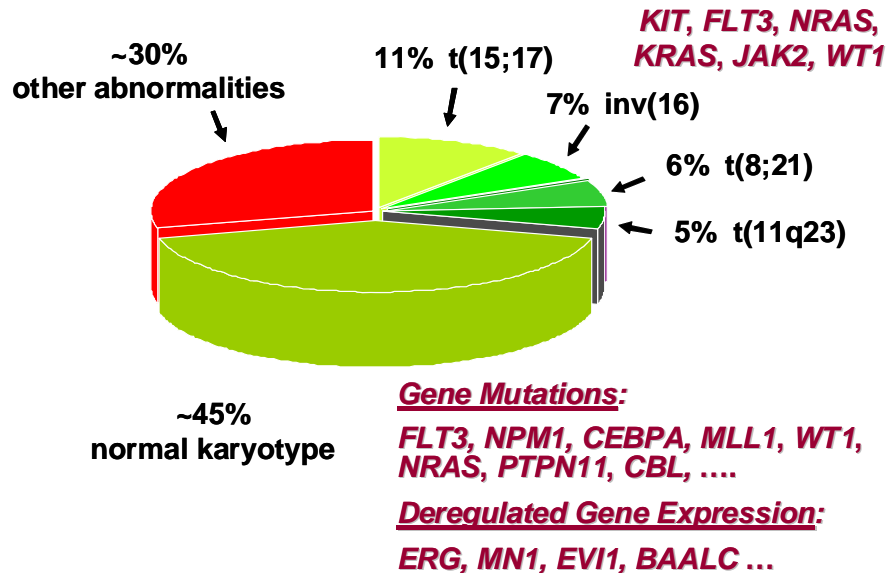


Figura 1.2 Alterazioni cariotipiche in corso di LMA.

La più frequente forma di mutazione è la ITD (*internal tandem duplication*) negli esoni 11 e 12, che si verifica nel 15-35% dei pazienti con LMA, con più bassa frequenza nella leucemia mieloide pediatrica, 10-15%. La mutazione ITD risulta da una duplicazione in direzione testa-coda di 3-400 nucleotidi negli esoni che codificano per il dominio JM (juxtamembrana) di *FLT3* (che comprende i residui 572-603); la posizione e la lunghezza variano da paziente a paziente. Essa può trovarsi in tutti i sottotipi FAB di LMA (dove rappresenta l'alterazione genica più frequente), con frequenza maggiore nel sottotipo M3. *FLT3-ITD* è presente anche nel 15% di tutte le LMA secondarie (Horiike S. *et al.*, 1997), mentre non è mai stata riscontrata nelle normali cellule ematopoietiche e in altri tumori ematologici.

La presenza di *FLT3-ITD* si associa inoltre ad una prognosi sfavorevole. Uno studio, effettuato su 100 pazienti con LMA *de novo*, ha tuttavia mostrato come tale mutazione

abbia un valore prognostico negativo solo in pazienti con cariotipo normale, mentre in pazienti con anomalie genetiche a prognosi favorevole, come la t(15;17), non risulta essere un *marker* predittivo (Noguera N. *et al.*, 2002).

Alcuni studi indicano che *FLT3-ITD* promuove la dimerizzazione, autofosforilazione e attivazione costitutiva del recettore (Zhaom M. *et al.*, 2000; Kiyoi H. *et al.*, 2002). L'espressione di *FLT3-ITD* in cellule ematopoietiche murine primarie conduce ad un fenotipo LMC-*like*, ma non è sufficiente a indurre la LMA. L'espressione di *FLT3-ITD* nel midollo osseo di topo che esprime la proteina di fusione PML/RAR α , esibisce una trasformazione maligna accelerata (Kelly LM. *et al.*, 2002). Questi studi indicano come l'espressione di *FLT3-ITD* si associ a mutazioni secondarie per lo sviluppo di LMA. A supportare questa ipotesi vi sono evidenze in cui *FLT3-ITD* sia presente in pazienti con altri riarrangiamenti genici quali t(8;21), inv(16) e t(15;17). Nessuna di queste traslocazioni è sufficiente da sola a causare LMA in modelli murini e potrebbero quindi cooperare con mutazioni attivanti in *FLT3* nello sviluppo della leucemia. In base a queste osservazioni, nel 2001 Gilliland, per spiegare la patogenesi della LMA, ha ipotizzato la presenza di due classi di mutazioni implicate nel suo sviluppo: mutazioni di classe I esemplificate da *BCR/ABL*, *TEL/PDGFR β* , mutazioni *N-ras*, *K-ras* e *FLT3*, che conferiscono un vantaggio proliferativo e/o di sopravvivenza alla cellula attraverso un guadagno di funzione, e mutazioni di classe II esemplificate dai riarrangiamenti genici t(8;21), inv(16) e t(15;17) e da mutazioni puntiformi nel gene *AML1*, che interferiscono con il differenziamento e quindi con la maturazione cellulare, attraverso la perdita di funzione nei fattori di trascrizione importanti per lo sviluppo delle cellule ematopoietiche come il *CBF*. Alcuni studi recentemente pubblicati sono in linea con questo modello (Matsuno N. *et al.*, 2003).

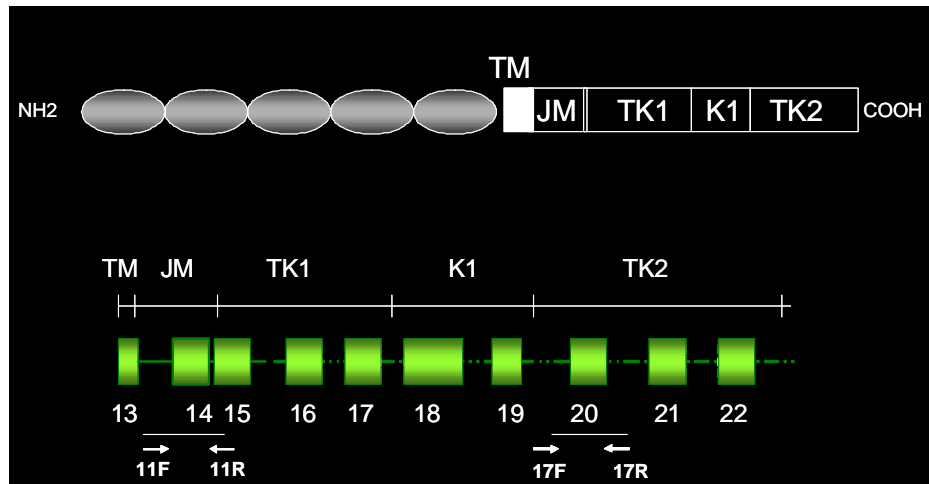


Figura 1.3 Rappresentazione schematica del gene *FLT3*. TM: dominio transmembrana; JM: dominio giustamembrana; TK: dominio tirosin kinasi).

1.4.2 Mutazione del gene *NPM*

Le proteine NPM appartengono alla famiglia delle nucleoplasmine (Np), categoria di ciaperoni nucleari che condividono un motivo conservato amino-terminale. Localizzato sul cromosoma 5q35, il gene *NPM* contiene al suo interno 12 esoni che per il fenomeno dello splicing alternativo codificano per tre differenti isoforme: *NPM1* (NM_002520.5, NP_002511.1), *NPM2* (NM_199185.2, NP_954654.1) e *NPM3* (NM_001037738.1, NP_001032827.1) (Figura 1.4).

NPM1 fu la prima isoforma ad essere clonata nel 1989 (Chan WY. *et al.*, 1989): lo splicing alternativo durante la trascrizione causa l'eliminazione dell'esone 10 ma non altera il segnale di stop presente sul codone 12. Ne risulta una fosfoproteina di 294 aminoacidi ad espressione tipicamente nucleolare, la forma più diffusa in tutti i tessuti (Wang W. *et al.*, 1993).

L'isoforma *NPM2* invece, clonata per la prima volta nel 2002 (Dalenc F. *et al.*, 2002), reintegra l'esone 10 ma presenta un differente codone di stop all'estremità carbossi-

terminale, tale da escludere gli ultimi due esoni e produrre una proteina di 259 aminoacidi ad espressione molto rara in tutti i tipi di tessuti.

Infine l'isoforma *NPM3*, meno conosciuta ed isolata per la prima volta nel 1997 (MacArthur AC. *et al.*,1997), presenta anch'essa lo stesso troncamento dell'isoforma *NPM2*, ma difetta altresì del più interno esone 8.

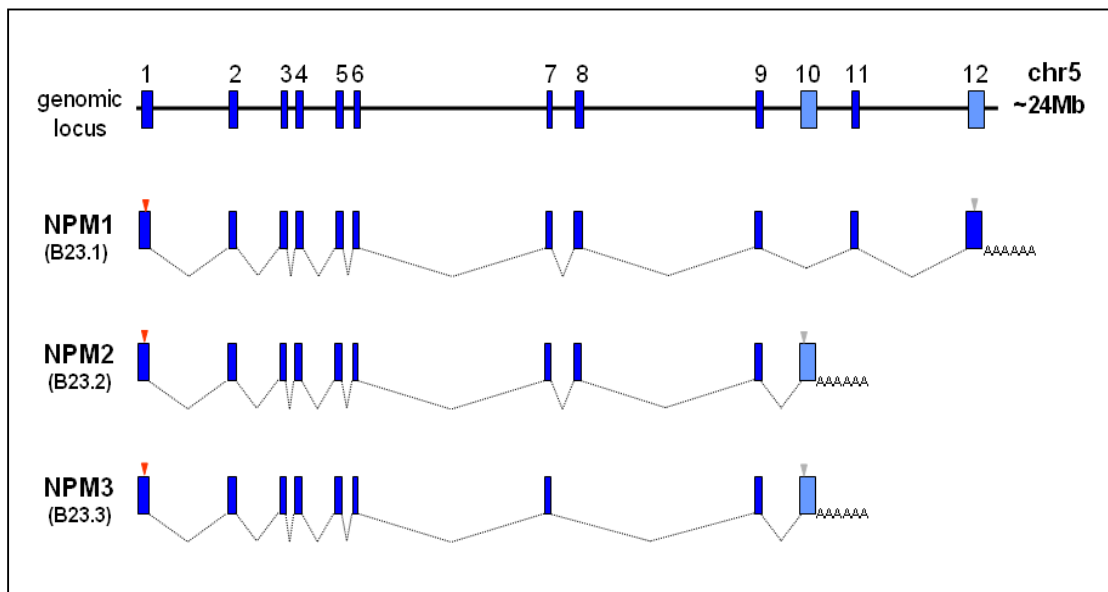


Figura 1.4 Locus genomico della nucleofosmina e isoforme alternative.

In condizioni fisiologiche *NPM1* esiste sottoforma di oligomeri (Herrera JE. *et al.*, 1996), e recentemente si è scoperto possa formare pentameri e decameri (Namboodiri VM. *et al.*, 2004), ma è altresì presente, seppure in minor percentuale, in forma monomerica.

La proteina ha una struttura modulare con importanti domini funzionali (Figura 1.5). Partendo dall'estremità amino-terminale essa contiene una porzione idrofobica necessaria per svolgere la propria attività di ciaperone (Okuwaki M. *et al.*, 2001; Szebeni A. *et al.*, 1999) nonché per promuovere l'oligomerizzazione (Yung BY, *et al.*, 1987). La nucleofosmina presenta inoltre due domini acidi per il legame con gli istoni (Okuwaki M. *et al.*, 2001) separati da una regione con funzioni ribonucleasiche (Hingorani K. *et al.*,

2000). In questa sono contenute regioni basiche implicate nel legame con l'acido nucleico (Hingorani K. *et al.*, 2000) seguite da regioni ricche in residui aromatici.

Oltre a questi domini, sono presenti all'interno della molecola, anche degli importanti segnali di localizzazione subcellulare, in particolare due segnali di esportazione nucleare (NES) (Hingorani K. *et al.*, 2000; Wang W. *et al.*, 2005; Yu Y. *et al.*, 2006), un segnale di localizzazione nucleare (NLS) che è bipartito (Hingorani K. *et al.*, 2000) e presente in entrambe le isoforme NPM1 ed NPM2, ed un segnale di localizzazione nucleolare (NoLS) presente al carbossi-terminale della sola isoforma NPM1 (Nishimura Y. *et al.*, 2002).

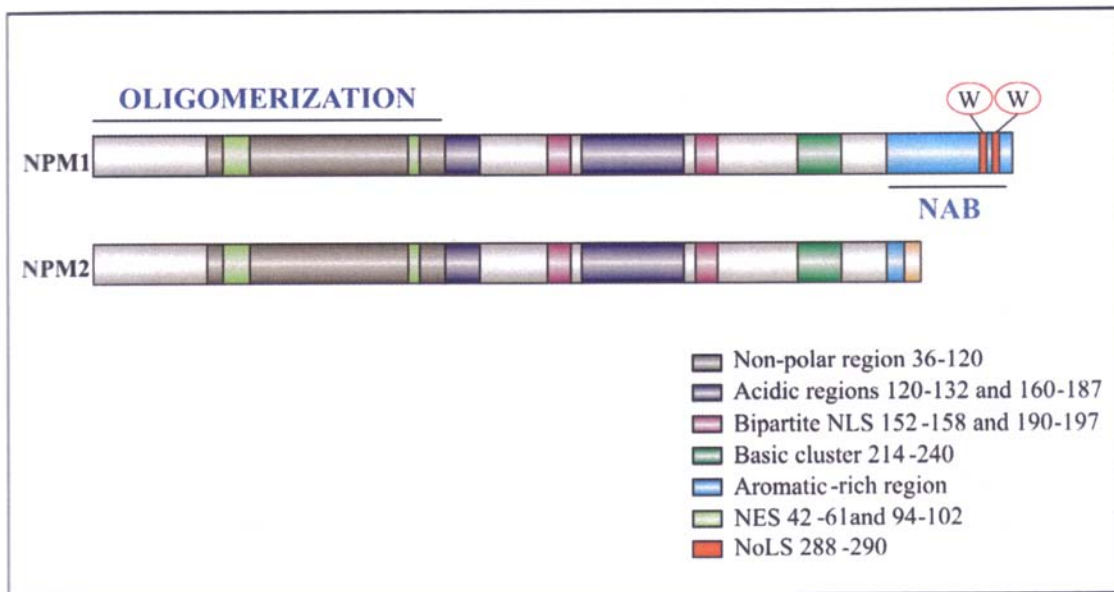


Figura 1.5 Domini funzionali di NPM1 ed NPM2.

I siti NLS e NES conferiscono alla proteina la capacità di poter migrare continuamente tra nucleo e citoplasma (Borer RA. *et al.*, 1989; Yun JP. *et al.*, 2003), benché presenti una localizza principalmente nucleare. In particolare l'isoforma NPM1, per la presenza del W288 e del W290 nel sito NoLS dell'esone 12, è ubicata principalmente

nei nucleoli (Nishimura Y. *et al.*, 2002), mentre l'isoforma NPM2 mancante dell'esone 12 ha localizzazione sia nucleare che nucleolare, quest'ultima si suppone dovuta all'oligomerizzazione con l'isoforma NPM1.

NPM1 è coinvolta, come la stessa struttura suggerisce, in numerose funzioni cellulari:

- Controllo della biosintesi dei ribosomi: NPM1 ha l'abilità di legare gli acidi nucleici, possiede un'attività RNasica, è capace di processare le molecole di pre-rRNA in ITS32 (internal transcriber space) nonché di fare da shuttle tra nucleo e citoplasma, ed inoltre è stato dimostrato che l'overespressione di *NPM1* è correlata con la proliferazione cellulare (Feuerstein N. *et al.*, 1988; Feuerstein N. *et al.*, 1991). Le cellule ad alta proliferazione e cellule cancerose, infatti, mostrano livelli di NPM1 più elevati se rapportati a cellule quiescenti (Dergunova NN. *et al.*, 2002): NPM1 potrebbe promuovere la crescita aberrante aumentando l'attività dei ribosomi, e infatti tali cellule sono caratterizzate da grandi nucleoli. In modo conforme, il silenziamento dell'mRNA di *NPM1* si risolve nell'inibizione del processamento dei pre-rRNA (Itahana K. *et al.*, 2003), mentre modelli murini knock-down per il gene di *NPM* mostrano un'alterazione del profilo ribosomiale (Grisendi S. *et al.*, 2005). Infine, l'inibizione dello shuttling nonché la perdita totale di NPM1 in modelli murini *knock-out* produce l'arresto del trasporto proteico tra nucleo e citoplasma e quindi l'arresto cellulare.
- Mantenimento della stabilità genomica: questa proprietà viene esplicita mediante due funzioni di NPM1: quella di regolare la duplicazione del centrosoma e quella riparare il DNA. Durante la mitosi il nucleolo va incontro ad un reversibile disgregamento e molte proteine nucleolari, tra cui NPM1, vanno a localizzarsi nel citoplasma (Hernandez D. *et al.*, 1994). NPM1 si associa specificatamente al

centrosoma ancora non duplicatosi. In particolare la fosforilazione della T234 e della T237 mediata dal complesso CDK1/ciclina- B causa l'associazione di NPM1 al centrosoma (Cha H. *et al.*, 2004), mentre la fosforilazione della T199 mediata dal complesso CDK2-ciclina-E ne comporta la dissociazione, iniziando il processo di duplicazione del centrosoma (Okuda M. *et al.*, 2000; Tokujama Y. *et al.*, 2001). NPM1 sembra avere un ruolo anche nella riparazione del DNA, ma i meccanismi implicati devono ancora essere chiariti. *In vitro* NPM1 è parte di un complesso multiproteico che promuove la rinaturazione di singoli filamenti di DNA e genera la formazione del D-loop (Borggreffe T. *et al.*, 1998), suggerendo che potrebbe partecipare ai primi eventi della reazione di ricombinazione.

- Regolazione della trascrizione: la capacità di NPM1 di modulare la trascrizione è funzione della sua attività di condensare e decondensare la cromatina, facilitando o meno l'espressione genica (Tamada H. *et al.*, 2006). NPM1 interagisce con gli istoni H3, H2B ed H4, aumentando la trascrizione dipendente dallo stato di acetilazione e diventando, sia *in vitro* che *in vivo*, acetilato (Swaminathan V. *et al.*, 2005).
- Modulazione dei fattori di trascrizione per gli oncosoppressori: l'oncosoppressore p53 è una proteina cruciale per la prevenzione contro la sopravvivenza e la proliferazione di quelle cellule con danni irreparabili o con alterazioni secondarie del DNA tali da renderlo instabile (Levine AJ. *et al.*, 1997). Tale proteina è strettamente regolata da HDM2 (MDM2 nel modello murino), la quale agisce come fattore di trascrizione per un controllo a feedback negativo del gene di p53 (Momand J. *et al.*, 1997), ma risulta inibito in condizioni di stress (Oren M. *et al.*, 1999). MDM2 agisce come una E3 ubiquitina ligasi che segnala la degradazione di p53 mediata dal proteasoma (Haupt Y. *et al.*, 1997; Honda R. *et al.*, 1997; Kubbutat

MH. *et al.*, 1997), e nel contempo ne accelera l'esportazione dal nucleo impedendone di fatto l'azione (Freedman AD. *et al.*, 1998; Roth J. *et al.*, 1998; Tao W. *et al.*, 1999). In questo equilibrio si inserisce anche NPM1, che lega HDM2/MDM2 e ne impedisce la funzione, con conseguente attivazione di p53 di fronte a vari tipi di stress (Kurki S. *et al.*, 2004).

1.5 La nucleofosmina ed il cancro

Mutazioni a carico del gene della nucleofosmina sono coinvolte in numerosi tumori umani (carcinoma gastrico, ovarico, prostatico e del colon) in cui risulta overespressa .

Il gene *NPM1* è inoltre un partner nelle traslocazioni cromosomiche di leucemie e linfomi e le proteine di fusione risultanti contengono solamente la regione n-terminale del NPM1 come nei seguenti geni di fusione (Bischof D. *et al.*, 1997):

- *NPM-ALK* (NPM-anaplastic-lymphoma kinase): nei i linfomi non Hodgkin.
- *NPM-RAR α* (NPM-retinoic acid receptor α): nella leucemia acuta promielocitica.
- *NPM-MLF1* (NPM-myeloid leukemia factor 1): in alcuni casi di sindrome mielodisplastica o leucemia acuta con displasia trilineare.

Nel 2005, gli studi svolti dal gruppo italiano coordinato dal prof. Falini (Falini B. *et al.*, 2005), hanno permesso in parte di far luce sul grande mistero delle LMA che nel 50% dei casi mostrava, all'esame citogenetico, una mappa cromosomica assolutamente normale. Era probabile che, anche in questi casi, un qualche danno genetico dovesse esserci, ma riuscire ad orientarsi in questa situazione in cui i cromosomi apparivano indenni, sembrava un ostacolo quasi insormontabile. I ricercatori hanno dimostrato come nel 60% circa delle LMA con cariotipo normale fosse presente una mutazione genetica estremamente specifica

che colpisce il tratto distale del gene della nucleofosmina. A causa di questa anomalia, la nucleofosmina mutata si localizza in maniera atipica all'interno delle cellule leucemiche; infatti, il gruppo del prof. B. Falini, ha permesso di identificare su strisci di biopsie ossee, tramite immunistochemica, la localizzazione della proteina NPM1 mutata nel citoplasma (NPMc+), a differenza della proteina wild-type (w/t) che oltre a trovarsi sulla membrana nucleare, ha una localizzazione principalmente nucleolare (Figura 1.6.).

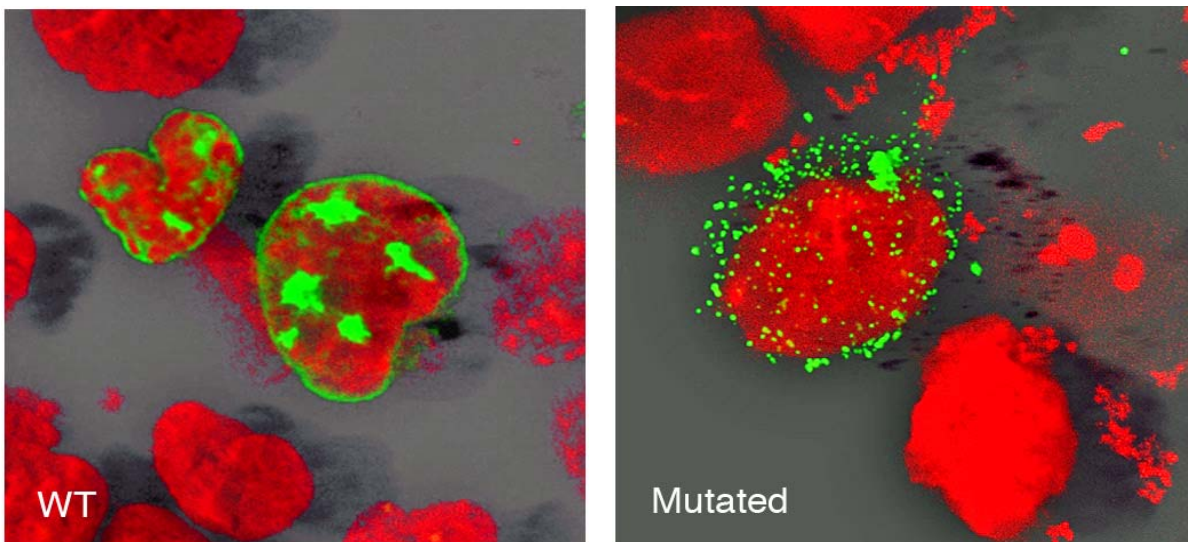


Figura 1.6 Localizzazione nucleolare di NPM1wt a sinistra, e citoplasmatica di NPMc⁺ a destra.

L'alta frequenza delle mutazioni di *NPM1* nelle LMA e la scoperta che topi *knock out* per un allele di *NPM1* sviluppano una malattia simile alla MDS (Colombo et al., 2005), suggeriscono chiaramente che le mutazioni di *NPM1* sono coinvolte nella genesi della leucemia. Inoltre, in considerazione del possibile ruolo di NPM1 nella soppressione tumorale, il cambiamento della sua localizzazione dal nucleo al citoplasma rappresenta un tassello critico per la trasformazione maligna (Cordell JL. et al., 1999; Arber DA. et al.,

2003; Colombo E. *et al.*, 2002; MacArthur AC. *et al.*, 1997.). Ciò fa pensare che la proteina mutante agisca come dominante negativa causando la dislocazione nel citoplasma anche della proteina w/t, con meccanismi di eterodimerizzazione. I molteplici e complessi ruoli che la NPM1 svolge contribuiscono quindi a rendere difficile i meccanismi che conducono allo sviluppo della LMA.

L'analisi molecolare del gene della nucleofosmina, localizzata a livello del cromosoma 5, ha permesso di evidenziare, tramite sequenziamento, mutazioni in corrispondenza dell'esone 12. Le mutazioni osservate sono varie e sono state classificate tramite le lettere dell'alfabeto (Falini B. *et al.*, 2005; Schnittger S. *et al.*, 2005). La maggior parte delle mutazioni sono caratterizzate dall'inserzione di 4 o 10 bp tra la posizione 956 e 971 dell'esone 12 causando quindi uno slittamento di sequenza (*frameshift*) nella regione codificante la porzione C-terminale della proteina. Di conseguenza, rispetto alla sequenza amminoacidica w/t (WQWRKSL), viene codificata una sequenza con 11 differenti residui amminoacidici di cui gli ultimi 5 (VSLRK) sono sempre presenti in tutti i tipi di mutazione (Tabella 1.3).

Tabella 1.3 Varianti delle mutazioni di NPMc⁺.

mutaz	Sequenza nucleotidica					Sequenza aminoacidica	%
WT	c t c t	g	g c a g	t	g g a g g a a	286-D L W Q W R K S L	
A	c t c t	g TCTG	g c a g	t	g g a g g a a	286-D L C L A V E E V S L R K	80,5
B	c t c t	g CATG	g c a g	t	g g a g g a a	286-D L C M A V E E V S L R K	7,5
C	c t c t	g CGTG	g c a g	t	g g a g g a a	286-D L C V A V E E V S L R K	<1
D	c t c t	g CCTG	g c a g	t	g g a g g a a	286-D L C L A V E E V S L R K	5,5
E	c t c t	g	g c a g	t CTCTTGCCC	a a	286-D L W Q S L A Q V S L R K	<1
F	c t c t	g	g c a g	t CCCTGGAGA	a a	286-D L W Q S L E K V S L R K	<1
J	c t c t	g	g c a g	t CTCTTTCTA	a a	286-D L W Q S L S K V S L R K	<1
L	c t c t CCCG	g	g c a g	t	a a	286-D L S R A V E E V S L R K	<1
K	c t c t	g	g c a g	t CCCTTTCCA	a a	286-D L W Q S L S K V S L R K	<1
M	c t c t	g TAGC	g c a g	t	g g a g g a a	286-D L C T A V E E V S L R K	<1
N	c t c t	g CCAC	g c a g	t	g g a g g a a	286-D L C H A V E E V S L R K	<1
O	c t c t	g	g c a g CGTTTCC		a g g a a	286-D L W Q R F Q E V S L R K	<1
P	c t c t	g TACCTTCC		t	g g a g g a a	286-D L C T F L E E V S L R K	<1
Q	c t c t	g	g c a g AGGA	t	g g a g g a a	286-D L W Q R M E E V S L R K	<1

Lo studio del gruppo italiano riporta con maggiore frequenza il tipo A (80.5%), seguito dalla B (7.5%) e dalla D (5.5%), le altre mutazioni sono state osservate solo sporadicamente. In tale lavoro, in un gruppo di 591 campioni di pazienti con LMA, 208 pari al 35,2% sono risultati NPMc⁺; tale positività è stata riscontrata in tutte le cellule leucemiche eccetto che nel sottotipo M3 (leucemia acuta promielocitica), M4eo (leucemia acuta mielomonocitica eosinofila) ed M7 (leucemia acuta megacariocitica). La mutazione variava dal 13.6 % nelle forme M0, all' 87.5% nelle forme M5b.

La distribuzione della mutazione aveva, seppure in percentuale variabile, carattere di multi linearità, essendo stata osservata anche in precursori eritroidi e megacariocitari. Per valutare la “staminalità” della mutazione, è stata pertanto ricercata la percentuale di positività agli antigeni CD34 e CD133: solo 12 di 159 campioni NPMc⁺ (7.5%) aveva più del 20% di cellule CD34⁺ contro 227 di 317 campioni NPM w/t (71.6%, p <0.001). Una bassa espressione di CD34 e CD133 sono anche riportati da altri studi (Schnittger et al. 2005; Verhaak et al. 2005).

Nello studio del prof. B. Falini i dati citogenetici hanno evidenziato che il 61.7% dei 230 pazienti con cariotipo normale erano NPMc⁺ mentre dei 263 con cariotipo complesso solo il 9.13% presentava la traslocazione citoplasmatica della proteina. In nessun caso alterazioni genetiche specifiche erano associate a NPMc⁺. Una stretta correlazione tra cariotipo e mutazione di *NPM1* è anche riportata da uno studio in cui si prende in esame un gruppo di 275 pazienti affetti da LMA all'esordio della malattia (Verhaak RG. et al. 2005). Schnittger et al. osservano la mutazione del gene *NPM1* nel 52.9% di 401 pazienti con LMA a cariotipo normale, mentre la frequenza della mutazione osservata dal gruppo tedesco (Dohner E. et al., 2005) in un gruppo di 300 pazienti con LMA a cariotipo normale è del 48%.

Nello studio italiano del 2005, il pattern NPMc⁺ è stato riscontrato soltanto in pazienti con LMA *de novo*; infatti 135 pazienti con LMA secondaria sono risultati negativi alla localizzazione citoplasmatica della proteina, mentre esiste prova nello studio tedesco di 14 pazienti su 145 con LMA secondaria a cariotipo normale e NPMc⁺.

La leucemia mieloide acuta con espressione citoplasmatica della nucleofosmina e la neoplasia a cellule plasmacitoidi dendritiche sono state recentemente incluse nella quarta revisione della classificazione WHO delle neoplasie mieloidi (Facchetti F. *et al.*, 2009). Queste malattie possono mostrare caratteristiche cliniche e patologiche sovrapponibili (coinvolgimento leucemico e cutaneo ed espressione dei marcatori dei macrofagi). I ricercatori italiani (Facchetti F. *et al.*, 2009) hanno fornito in questo studio evidenza dell'utilità dell'analisi dell'espressione di nucleofosmina mutata per poter distinguere le due patologie. La nucleofosmina è infatti costantemente osservata nel citoplasma nella LMA NPMc⁺ (per la presenza di mutazioni *NPM1*), mentre è limitata al nucleo (per la presenza di un gene *NPM1* w/t) nelle neoplasie delle cellule plasmacitoidi dendritiche. I risultati dello studio indicano la nucleofosmina citoplasmatica (fattore predittivo delle mutazioni *NPM1*) quale nuovo marcatore per distinguere tra la LMA NPMc⁺ e la neoplasia a cellule plasmacitoidi dendritiche, chiarendo ulteriormente la derivazione delle cellule nella LMA NPMc⁺ e giustificando l'inclusione di queste condizioni patologiche come entità separate nella nuova classificazione WHO.

2. Scopo della tesi

In questo studio ci proponiamo di analizzare lo stato mutazionale della nucleofosmina in un numero consistente di campioni leucemici ottenuti da pazienti affetti da LMA, con i seguenti obiettivi:

- Mettere a punto un saggio di biologia molecolare per lo *screening* mutazionale della nucleofosmina, basato sull'elettroforesi capillare.
- Sviluppare una metodica di PCR allele specifica (ASO-PCR, *Allele Specific Oligonucleotide Polymerase Chain Reaction*) veloce, sensibile ed affidabile per individuare la mutazione di tipo A della nucleofosmina per la diagnosi e per il monitoraggio della malattia minima residua (MMR).
- Determinare l'applicabilità e la sensibilità di tali metodiche al fine di offrire alla diagnostica molecolare oncoematologica un ulteriore strumento di indagine per la diagnosi ed il monitoraggio delle LMA a cariotipo normale.

3. Materiali e metodi

3.1 Casistica

Lo studio è stato condotto su 107 pazienti affetti da LMA all'esordio, afferenti alla Divisione di Ematologia dell'Università di Tor Vergata e consenzienti al trattamento del materiale biologico a scopo di ricerca. Le caratteristiche dei pazienti sono illustrati nella tabella 3.1.

Tutti i pazienti erano affetti da LMA all'esordio della malattia; l'età mediana è di 61 (range 1-86) anni, il rapporto maschi femmine è 55 vs 52.

La frequenza dei sottogruppi in base alla classificazione FAB è riportata nella Figura 3.1.

Lo studio citogenetico era disponibile per 99 pazienti sui 107 diagnosticati presso il nostro laboratorio.

Tabella 3.1 Caratteristiche della popolazione.

Pazienti	107
Età mediana (range)	61 (1-86)
Maschi	55
Femmine	52
Cariotipo disponibile	99

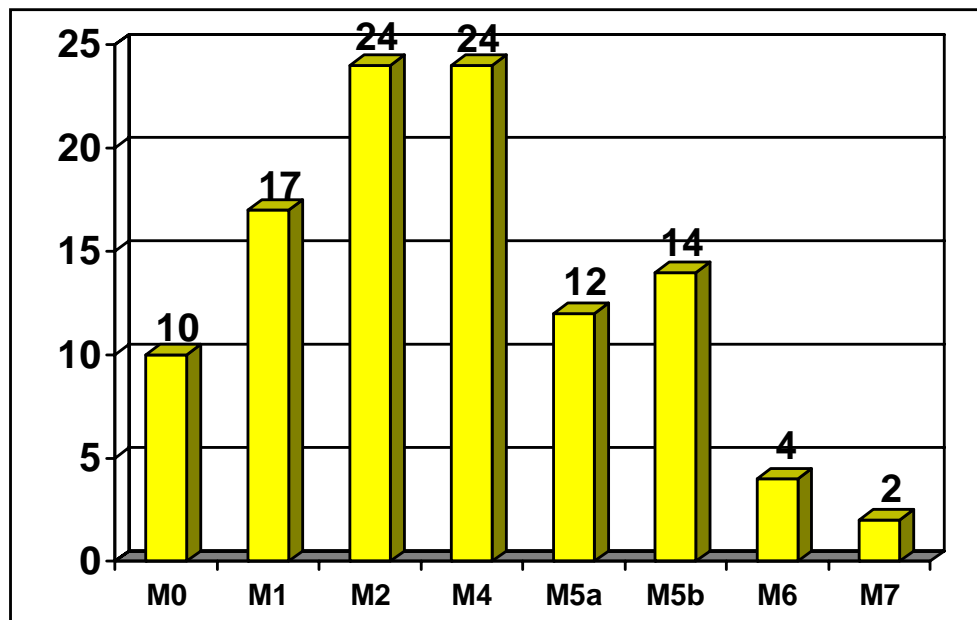


Figura 3.1 Caratteristiche FAB della popolazione studiata.

Oltre al materiale biologico proveniente dai 107 pazienti è stata usata in questo lavoro la linea cellulare OCI-AML3, che mostra tutte le caratteristiche della LMA NPMc+ (Quentmeier et al., 2005).

3.2 Preparazione dei campioni e analisi molecolare

Per la preparazione dei campioni da analizzare mediante la nostra metodica di RT-PCR, sono previste le seguenti fasi:

- separazione degli elementi mononucleati mediante gradiente di densità.
- estrazione di RNA totale.
- lettura allo spettrofotometro e corsa elettroforetica dell'RNA.

- RT-PCR multiplex ed elettroforesi capillare mediante lo strumento CEQ-8000.
- Sequenziamento genico mediante lo strumento CEQ-8000.
- RT-ASO-PCR ed elettroforesi su gel d'agarosio.

3.2.1 Separazione degli elementi mononucleati mediante gradiente di densità

La frazione mononucleata da BM (sangue midollare) e da PB (sangue periferico) è stata isolata mediante separazione su gradiente di densità con Ficoll-Hypaque. Dopo centrifugazione a 2000rpm, per 20 minuti, la frazione mononucleata si separa sottoforma di anello biancastro che separa i globuli rossi, i granulociti ed il ficoll dal siero (Figura 3.2). Le cellule separate, state lavate in PBS, contate e risospese in una soluzione di guanidina isotiocianato (GITC) 4M. Tali cellule sono state successivamente utilizzate per l'estrazione dell'RNA totale. Dopo centrifugazione su gradiente di densità, in tutti i campioni è stato recuperato un numero di cellule superiore a 5×10^6 , quantità minima per l'estrazione di acidi nucleici (DNA, RNA).

3.2.2 Estrazione dell' RNA totale

La sospensione è stata omogeneizzata con una siringa attraverso un ago sottile (22G) allo scopo di rompere il DNA. E' stato poi aggiunto sodio acetato 2M pH4 alla concentrazione di 0.2 M finale, un ugual volume (rispetto al GTC iniziale) di fenolo acido saturato in acqua e 0.4 ml di cloroformio per ogni ml iniziale di GTC. La soluzione così ottenuta è stata agitata e tenuta in ghiaccio per 15 minuti. Dopo centrifugazione per 15 minuti a 13000rpm a 4°C per separare la fase acquosa contenente RNA, questa è stata trasferita in una provetta sterile e una volta aggiunto un ugual volume (rispetto al GTC

iniziale) di isopropanolo, è stata incubata per almeno 2 ore o over-night a -20°C (Figura 3.3). Dopo centrifugazione per 30 minuti a 13000rpm, l'RNA è stato lavato in etanolo 70%. Il sedimento ottenuto dopo ulteriore centrifugazione è stato essiccato ed infine risospeso in 10-25 µl di acqua distillata sterile (Chomczynski and Sacchi, 1987).

3.2.3 Lettura allo spettrofotometro e corsa elettroforetica

Per la lettura dell'acido ribonucleico si prepara una diluizione 1:50 del campione (2µl di campione + 98 µl di acqua distillata). Per valutare la concentrazione ed il grado di purezza rispetto ad eventuali proteine e DNA genomico contaminanti l'RNA estratto, si ricorre alla lettura spettrofotometrica a 260nm e 280nm (1 O.D.₂₆₀ = 40µg/ml RNA). La purezza è espressa dal rapporto tra i valori di assorbanza misurati a 260nm e 280nm ed è di norma un valore corrispondente a 2.0 ± 0.2 ; mentre la concentrazione viene calcolata moltiplicando l'assorbanza a 260nm per 40 (1 O.D.₂₆₀ = 40µg/ml) per il fattore di diluizione (50). Per verificare la qualità ed il grado di purezza dell'RNA è stata effettuata una elettroforesi su gel di agarosio (2% p/v). Ciò ha permesso di visualizzare su gel attraverso raggi ultravioletti (UV) l'integrità delle bande di rRNA di 28s, 18s e 5s e la possibile presenza di DNA contaminante.

3.2.4 RT-PCR ed elettroforesi capillare mediante lo strumento CEQ-8000

Per la reazione di retrotrascrizione viene impiegato lo strumento Thermal Cycler 2400 (Perkin Elmer), dotato di coperchio riscaldato. L'RNA totale viene retrotrascritto in cDNA mediante il kit (Perkin Elmer) che utilizza come enzima la Trascrittasi Inversa (Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase - RT). In breve, 1µg di RNA è retrotrascritto utilizzando 2µl di PCR buffer II 10x, 4µl di MgCl₂ 25mM, 1µl di Trascrittasi

Inversa 50U/μl, 0,2μl di ogni nucleotide trifosfato 100mM, 1μl di inibitore della RNAsi 20U/μl, 10μl di random esameri 50μM. Alla miscela viene quindi aggiunto 1 μg di RNA ed H₂O per arrivare ad un volume finale di 20 μl. La miscela viene poi incubata per 45' a 42°C ed infine 3' a 99°C per inattivare l'enzima. Una volta terminata l'RT i cDNA vengono conservati a -20°C. L'analisi molecolare dei 107 pazienti è stata eseguita su questi cDNA, valutata mediante una reazione di RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) secondo il protocollo dalla *European Biomed Concerted Action* (Van Dongen et al., 1999), e utilizzando come controllo positivo il cDNA relativo alla linea cellulare OCI-Aml3. In funzione dell'elettroforesi capillare il primer NMP-REV6 è coniugato al terminale 5' con un fluorocromo D4 WellRED (WellRED fluorescent dyes Beckman Coulter). Le condizioni di RT-PCR sono riportate nella Tabella 3.2 e 3.3.

Tabella 3.2 Condizioni della RT-PCR.

RT	Profilo termico
volume finale 20 μl 1 μg RNA 2 μl PCR buffer 10X 4 μl MgCl ₂ 5 mM 8 μl dNTPs 200 mM 1 μl Random Hexamers 0,25 nM 1 μl RNase Inibitor 1U/μl 1 μl MuLV ReverseT 2,5 U/μl	42°C per 45 minuti 99°C per 4 minuti 4°C per 4 minuti
PCR	Profilo termico
volume finale 25 μl 1 μl c-DNA 2,5 μl Buffer 10X 2,5 μl MgCl ₂ dNTPS 2,5 mM ciascuno (D4)NPM-Rev6 (10 pmols/ μl) 1,0 μl NM-F2 (10 pmols/ μl) 1,0 μl TAQ Gold 0,125 μl (0,7 U)	Taq attivazione: 95°C per 5 minuti 35 cicli di: 94°C per 30 secondi 58°C per 45 secondi 72°C per 45 secondi 72°C per 7 minuti

Tabella 3.3 Primers utilizzati per la RT-PCR.

Primers per la RT-PCR
Npm PCR primers:
NPM-Rev6: 5'-ACCATTTCCATGTCTGAGCACC-3'
NM-F2: 5'-ATCAATTATGTGAAGAATTGCTTAC-3'

L'analisi dei frammenti viene eseguita attraverso l'elettroforesi capillare utilizzando lo strumento CEQTM 8000 *Genetic Analysis Sistem* (Beckman Coulter). L'elettroforesi capillare è una tecnica analitica relativamente recente. Se i primi sviluppi sono stati realizzati nei laboratori di ricerca, viene oggi adottata anche nei laboratori clinici grazie alla sua maggiore capacità di risoluzione, rapidità, ampie potenzialità applicative e facile automazione.

Le principali mutazioni di *NPM1* tutt'oggi conosciute sono localizzate all'interno dell'esone 12, in una piccola regione che si estende dal nucleotide 956, all'estremità 3' dell'esone. Questa regione è fortemente omologa a quella di 7 pseudogeni di *NPM1*, pertanto allo scopo di escludere l'amplificazione di tali pseudogeni, è stato utilizzato un appropriato primer reverse (NPM-Rev6).

Per la migrazione elettroforetica, 0.5 µl di prodotto di PCR, è stato diluito in 19.5 µl di SLS (CEQTMSLA p/n 608082, Beckman Coulter) e 0.5 µl di CEQ 400 size standard mixture (CEQTM DNA size standard Kit -400 p/n608109 Beckman Coulter). Il campione così preparato è stato posizionato nella piastra da 96 pozzetti ed è stato analizzato mediante il metodo standard FRAG-4 (Temperatura del capillare 50°C, Temperatura di denaturazione 90°C per 120'', Tensione di iniezione 2kV per 30'', Tensione di Separazione 4,8 kV per 60'') del CEQ8000. Il campione viene fatto migrare nel capillare dopo aver subito una denaturazione a 90°C in quanto solo un primer è legato ad un

fluorocromo; si rileva quindi il DNA a singolo filamento. Alla fine dei capillari un laser eccita il fluorocromo ed un lettore ottico rileva l'intensità di fluorescenza. I dati così ottenuti vengono elaborati dal computer collegato con lo strumento che mostra i risultati in forma grafica.

Un prodotto di PCR viene definito positivo per la mutazione di *NPM1* quando, oltre alla presenza di un picco a 349 bp, si osserva la presenza di un secondo picco che i dati sperimentali confermano trovarsi spostato, rispetto al w/t, di 4 bp ; viene invece definito negativo (w/t) quando risulta un solo picco a circa 349 bp.

3.2.5 Sequenziamento

Allo scopo di validare i risultati ottenuti mediante sequenziamento genico, 17 e 10 campioni risultati rispettivamente mutati e w/t per *NPM1* sono stati amplificati usando procedure standard (Tabella 3.4). Come primers sono stati utilizzati di nuovo NPM-Rev6, stavolta non marcato, e NM-F2, e le condizioni del Quick Start Kit Sequencing sono indicate in tabella 3.4.

Tabella 3.4 Condizioni utilizzate per il sequenziamento.

PCR Quinck Start Kit Sequencing	
PCR Quinck Start Kit Sequencing	Profilo termico
DTCS Quinck Start master mix 8 µl	30 cicli:
Primer (1,6 pmols/µl) 2 µl	96°C per 20 secondi
Templato + H ₂ O = 10 µl	58°C per 20 secondi
	64°C per 4 minuti

Il campione così preparato viene analizzato tramite elettroforesi capillare utilizzando il metodo standard LFR1 (Temperatura del capillare 50°C, Temperatura di

denaturazione 90°C per 120'', Tensione di iniezione 2kV per 15'', Tensione di Separazione 4kV per 110'') del CEQ8000. Le sequenze ottenute vengono poi analizzate tramite il computer per ottenere un elettroferogramma (Figura 3.6).

3.2.6 RT-ASO-PCR ed elettroforesi su gel d'agarosio

La metodica della RT-ASO-PCR (Ottone T. *et al.*, 2008), progettata per lo screening mutazionale della mutazione di tipo della nucleofosmina (NPM mut-A), è stata applicata sugli stessi campioni *NPM1* mutati e w/t, nonché sulla linea cellulare OCI-Aml3 usata come controllo positivo. Il primer forward specifico NPM-A, contenente un *mismatch* alla terza base dall'estremità 3', è stato disegnato per amplificare in modo specifico parte dell'esone 12 solo in presenza della mutazione di tipo A (Tabella 3.5 e Figura 3.6).

Tabella 3.5 Primers per la RT-ASO-PCR.

Primers per la RT-ASO-PCR
Npm PCR primers:
NPM-Rev6: 5'-ACCATTTCATGTCTGAGCACC-3'
NPM-A: 5'-CCAAGAGGCTATTCAAGATCTCTC-3'
Abl PCR primers:
ABL-A2B-5': 5'-GCATCTGACTTTGAGCCCTCAG-3'
ABL-A3E-3': 5'-TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT-3'

Nella regione di inserzione, *NPM1* contiene sette pseudogeni omologhi tra loro e, per evitarne l'amplificazione, è stato usato il primer reverse NPM-Rev6. Il frammento amplificato avrà una lunghezza di 320 pb.

Come controllo interno è stata effettuata l'amplificazione del gene *house-keeping* *ABL* mediante i primer ABL-A2B-5' e ABL-A3E-3' (258pb).

Le condizioni della RT-ASO-PCR sono riportate nelle Tabella 3.6 e 3.7.

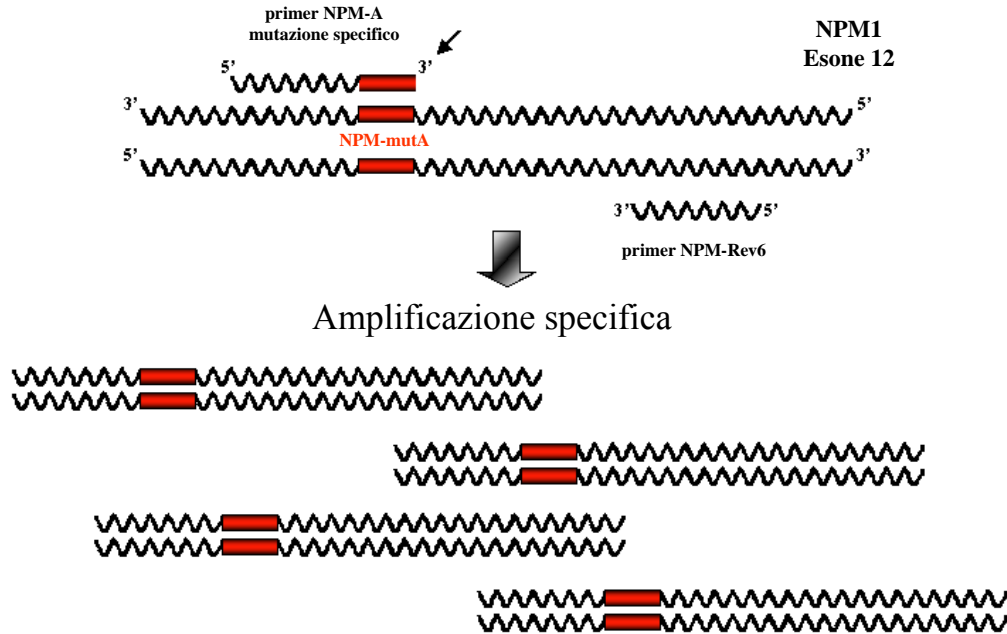


Figura 3.6 Rappresentazione schematica della RT-ASO-PCR per un campione *NPM* mut-A.

Tabella 3.6 Condizioni della RT-ASO-PCR per l'amplificazione di *NPM1*.

PCR	Profilo termico
volume finale 25 µl 1 µl c-DNA 2,5 µl Buffer 10X 2,5 µl MgCl ₂ dNTPS 2,5 mM ciascuno (D4)NPM-Rev6 (10 pmols/ µl) 1,0 µl NPM-A (10 pmols/ µl) 1,0 µl TAQ Gold 0,125 µl (0,7 U)	Taq attivazione: 95°C per 7 minuti 35 cicli di: 95°C per 30 secondi 67°C per 45 secondi 72°C per 45 secondi 72°C per 7 minuti

Tabella 3.7 Condizioni della RT-PCR per l'amplificazione di *ABL*.

PCR	Profilo termico
volume finale 25 μ l 1 μ l c-DNA 2,5 μ l Buffer 10X 2,5 μ l MgCl ₂ dNTPS 2,5 mM ciascuno ABL-A2B-5' (10 pmols/ μ l) 1,0 μ l ABL-A3E-3' (10 pmols/ μ l) 1,0 μ l TAQ Gold 0,125 μ l (0,7 U)	Taq attivazione: 95°C per 7 minuti 35 cicli di: 95°C per 30 secondi 65°C per 45 secondi 72°C per 45 secondi 72°C per 7 minuti

I prodotti della PCR sono poi stati visualizzati mediante corsa su gel di agarosio al 2% (p/v).

Per determinare la sensibilità della metodica sono state eseguite diluizioni seriali usando RNA di un paziente affetto LMA il cui midollo conteneva più del 95% di cellule leucemiche portatrici di *NPM1* mut-A e l'RNA di un paziente affetto da LMA ma con *NPM1* w/t. Sono così state ottenute diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁶.

Per il monitoraggio della malattia minima residua è stata messa a punto una semi-nested ASO-PCR utilizzando un nuovo primer forward (NPM-AN) che in combinazione con il primer reverse NPM-Rev6 amplifica un frammento di 319 pb, visualizzato mediante corsa su gel di agarosio al 2% (p/v) (Tabella 3.8)

Tabella 3.8 Primers utilizzati per la semi-nested ASO-PCR.

Primers per la Semi-Nested ASO-PCR
Npm PCR primers: NPM-Rev6: 5'-ACCATTTCATGTCTGAGCACC-3' NPM-AN: 5'-CAAGAGGCTATTCAAGATCTCTGTCTG-3'

4. Risultati

4.1 Analisi dei frammenti all'elettroforesi capillare

L'analisi dei frammenti, utilizzata per individuare la mutazione di *NPM1*, è stata eseguita attraverso lo strumento CEQ-8000; i relativi elettroferogrammi hanno permesso di verificare la presenza di uno o due picchi di amplificazione (Figura 4.1 e Figura 4.2).

Dei 107 campioni di LMA analizzati, 17 risultavano mutati in eterozigosi per la mutazione di *NPM1* (*NPM1* mut) mostrando quindi un doppio picco rispettivamente alla posizione 349 (picco w/t) e 353 (picco *NPM1* mut). I restanti 90 campioni presentavano solamente il picco relativo a 349 pb, risultando quindi w/t.

Per valutare la sensibilità del metodo di analisi dei frammenti adottato dal nostro laboratorio, sono stati eseguiti degli esperimenti di diluizione con RNA di *NPM1* mut ed *NPM1* w/t alle concentrazioni scalari (rapporto mutato / w/t) di 0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00. In base ai risultati ottenuti, la sensibilità del metodo adottato ci ha permesso di rilevare le mutazioni di *NPM1* con una sensibilità fino a 10^{-2} .

4.2 Sequenziamento

Per confermare lo stato mutazionale della nucleofosmina e discriminare il tipo di mutazione, i 17 campioni *NPM1* mut sono stati sottoposti all'analisi di sequenziamento diretto. Analogamente, la sequenza non mutata è stata confermata mediante sequenziamento in 10 campioni dei 90 w/t scelti a caso.

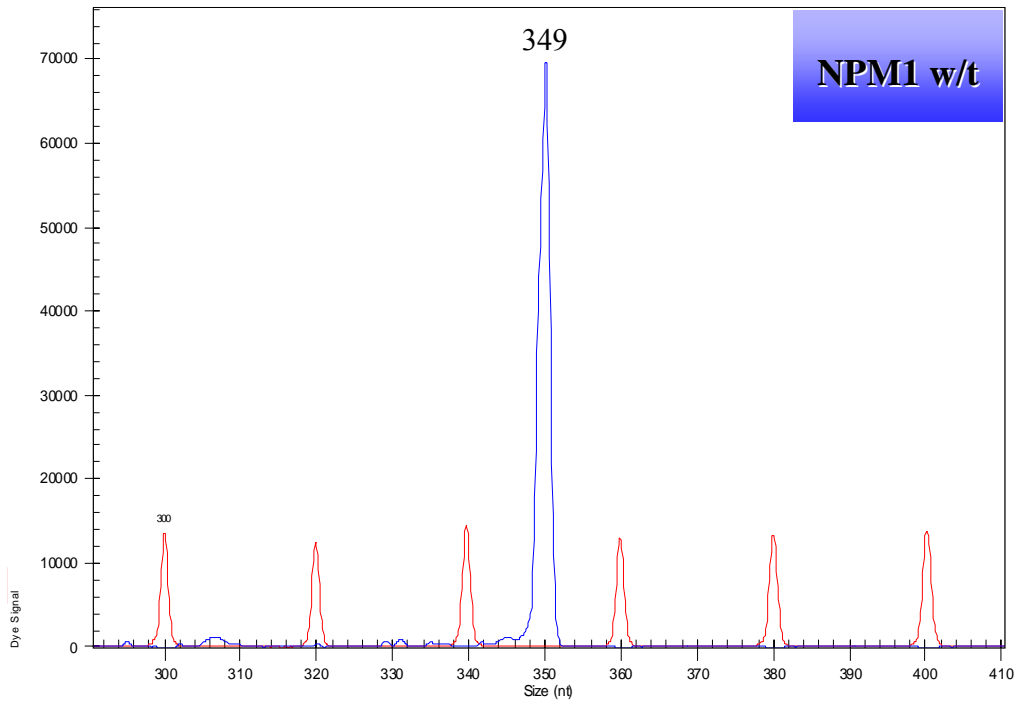


Figura 4.1 Elettroferogramma di un campione *NPM1* wt. Amplificazione dell'allele w/t (picco a 349 bp).

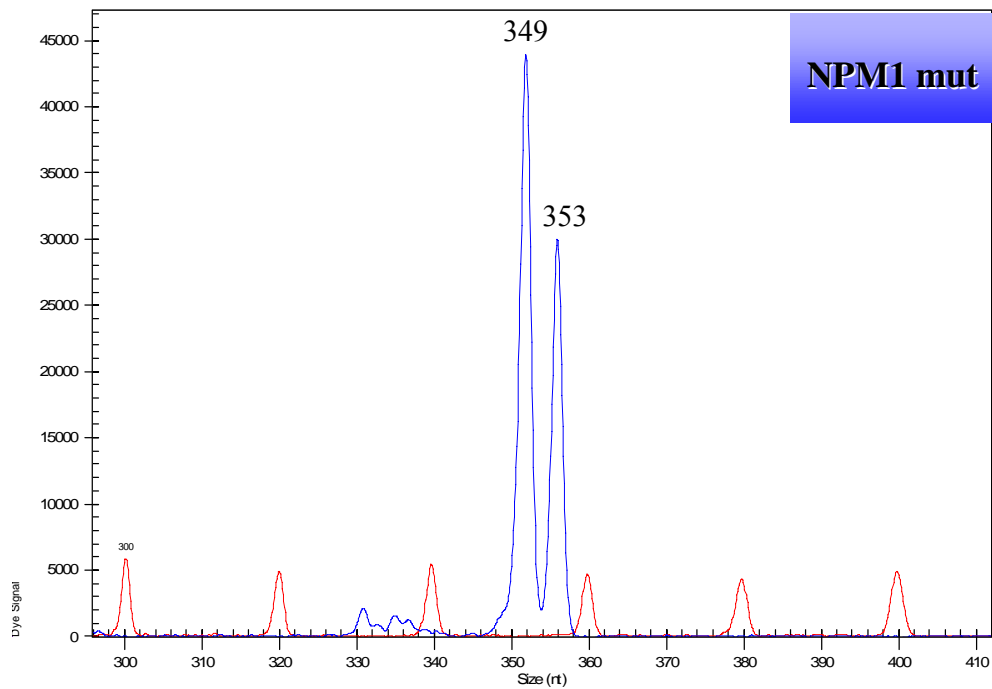


Figura 4.2 Elettroferogramma di un campione *NPM1* mut. Amplificazione dell'allele w/t (picco a 349 bp) e dell'allele mutato (picco a 353 bp).

In 12 pazienti *NPM1* mutati è stata riscontrata la mutazione più frequente, ovvero la duplicazione del tetranucleotide TCTG tra la posizione 959 - 960 della sequenza di riferimento (NM_002520) (Figura 4.3). In 3 casi è stata rilevata la mutazione di tipo B (CATG), in 1 caso la mutazione di tipo D (CCTG), nell'ultimo la mutazione di tipo K. Il sequenziamento dei 10 campioni *NPM1* w/t ha confermato i risultati dell'elettroforesi capillare (Figura 4.4).

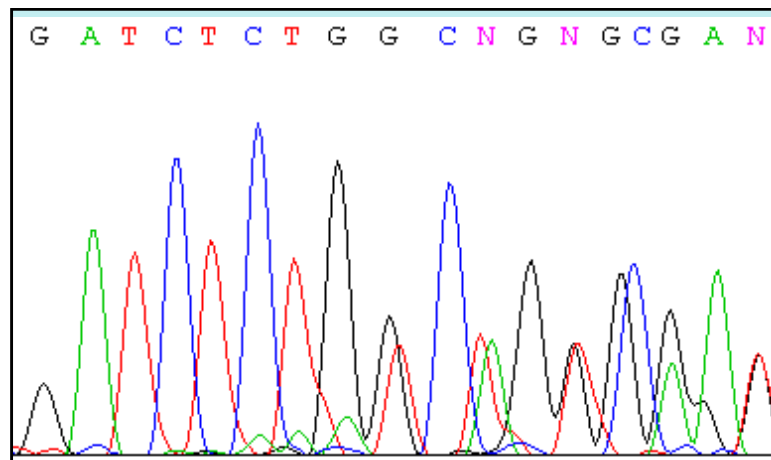


Figura 4.3 Sequenziamento diretto di un campione *NPM1*mut-A.

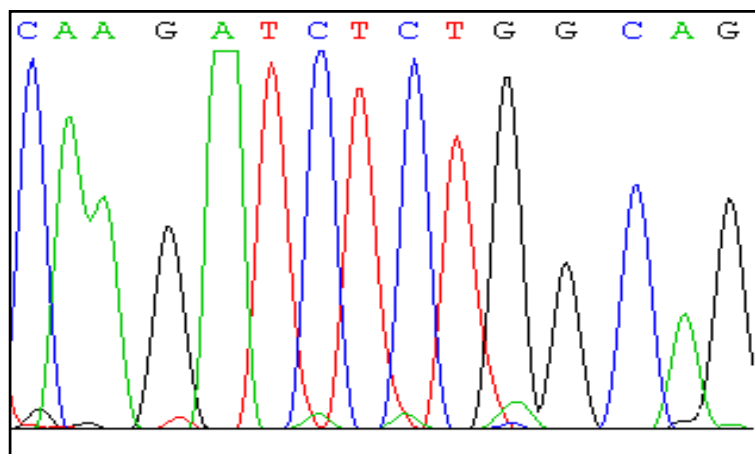


Figura 4.4 Sequenziamento diretto di un campione *NPM1*wt.

4.3 RT-ASO-PCR

Gli stessi campioni sono stati analizzati mediante RT-ASO-PCR, utilizzando sempre come controllo positivo la linea cellulare Oci-Aml3.

Al fine di escludere problemi legati all'integrità dell'acido nucleico, per ciascun paziente è stata effettuata un'amplificazione del gene di controllo interno *ABL*. Inoltre per verificare l'assenza di contaminazioni è stato amplificato un controllo negativo contenente tutti i reagenti tranne l'acido nucleico.

La migrazione elettroforetica dei prodotti di RT-ASO-PCR su gel di agarosio al 2% (p/v) ha confermato i risultati ottenuti con le altre metodiche. Nei 12 campioni risultati positivi per la mutazione di tipo A di *NPM1* mediante sequenziamento diretto è stata confermata su gel la presenza di banda di 320 pb relativa all'amplificazione con i primers NPM-Rev6 e NPM-A (Figura 4.5). Il controllo positivo della linea cellulare Oci-Aml3 ha confermato la presenza della mutazione, contrariamente ai 5 campioni in cui non si è evidenziato alcun frammento di amplificazione, a dimostrazione del fatto che la mutazione di *NPM1* non era di tipo A (Figura 4.5).

Allo stesso modo il frammento di 320 pb era assente nei 10 campioni risultati negativi all'analisi dei frammenti e all'analisi di sequenziamento (Figura 4.5).

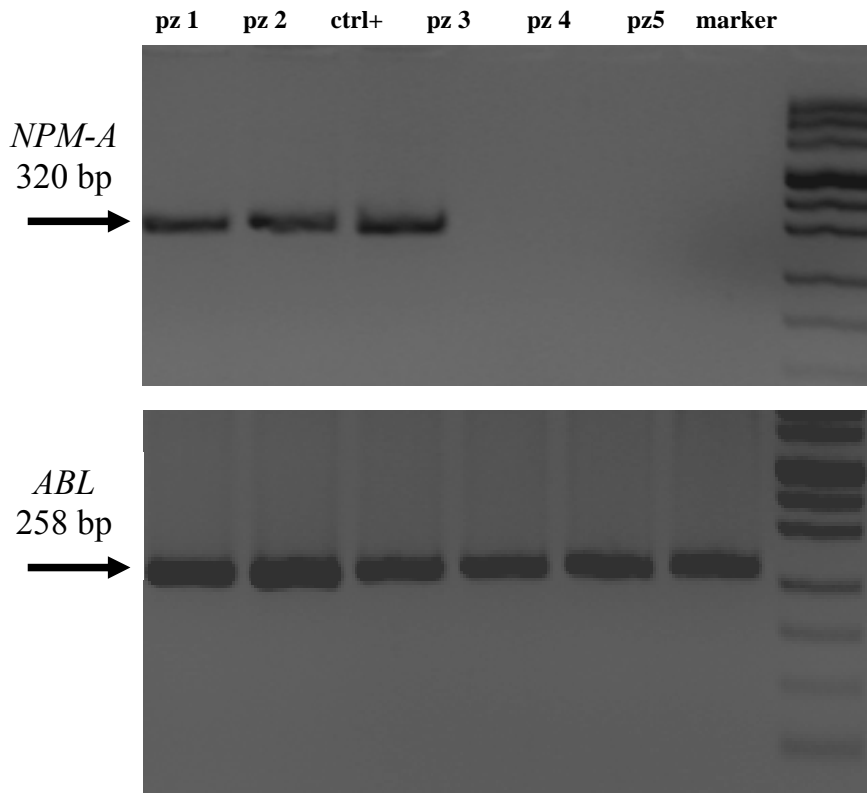
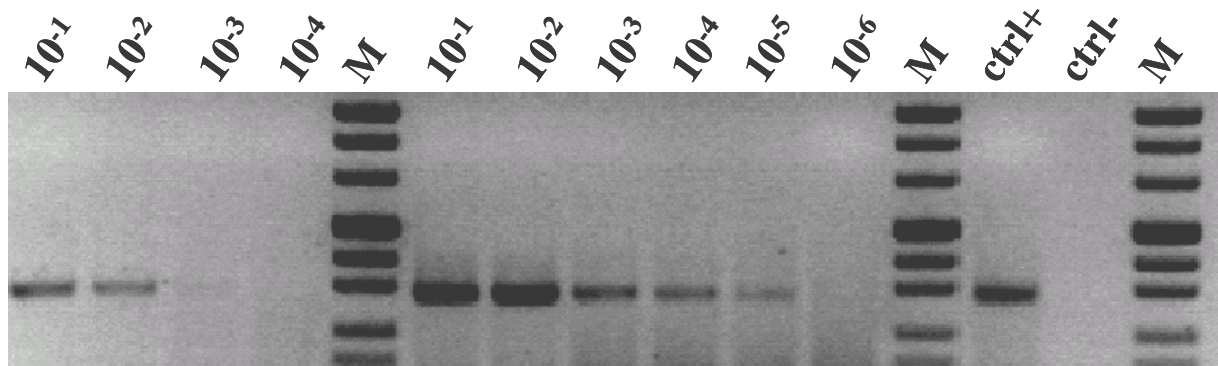


Figura 4.5 Elettroforesi su gel di agarosio 2% (p/v) del prodotto PCR per lo screening mutazionale della nucleofosmina. (pz 1, pz 2 = *NPM1* mut-A; ctrl+ = Oci-Aml3; pz 3, pz4 = *NPM1*mut; pz 5 = *NPM1*w/t).

4.3.1 Sensibilità della RT-ASO-PCR

Per stabilire la sensibilità della metodica ASO-RT-PCR ai fini diagnostici, nonché di quella semi-nested ASO-RT-PCR finalizzata allo studio della MMR, è stato eseguito un saggio di diluizione. Per entrambe le metodiche è stato utilizzato il cDNA di un paziente positivo *NPM1* mut-A diluito serialmente da 10^{-1} a 10^{-6} con il cDNA di un paziente w/t per la nucleofosmina (sono stati scelti campioni con una percentuale di blasti nel sangue midollare superiore all' 80%).

La sensibilità della ASO-RT-PCR si è attestata su un valore di 1:100, mentre quella della semi-nested ASO-RT-PCR è arrivata ad un valore di 1:100.000 (Figura 4.6).



ASO-RT-PCR

semi-nested ASO-RT-PCR

Figura 4.6 Elettroforesi su gel di agarosio 2% (p/v) della diluizione seriale. Test di sensibilità effettuato da 10⁻¹ a 10⁻⁴ per la ASO-RT-PCR e da 10⁻¹ a 10⁻⁶ per la semi-nested ASO-RT-PCR.

La mutazione di *NPM1* è stata osservata in tutti i sottotipi FAB (Figura 4.7), ad esclusione del sottotipo M6 ed M7 (il sottotipo M3 era stato in precedenza escluso dalla casistica studiata). La frequenza maggiore è stata osservata nelle forme M5b (40%), M4 (26%) ed M5a (26%).

I dati citogenetici erano disponibili in 99 pazienti (15 *NPM1* mut, 84 *NPM1* w/t); di questi, 27 (27%) presentavano un cariotipo normale, gli altri 82 presentavano le alterazioni più frequentemente riscontrate nelle LMA (Figura 1.2).

Il cariotipo è risultato normale in 13 dei 15 pazienti con *NPM1* mut (87%), ed in 14 degli 84 w/t per *NPM1* (17%). Pertanto 13 dei 27 pazienti con cariotipo normale (48%), presentavano la mutazione di *NPM1* (Figura 4.8).

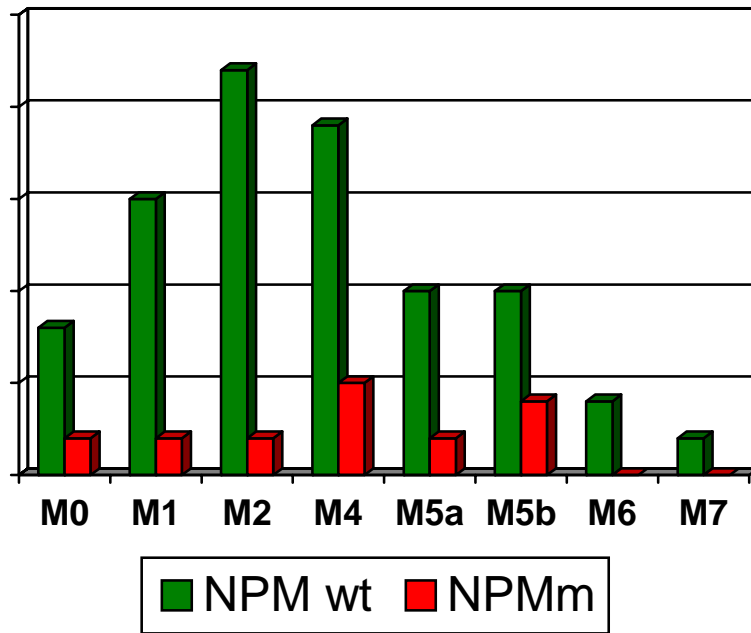


Figura 4.7 Incidenza di *NPM1* mut nei sottotipi FAB.

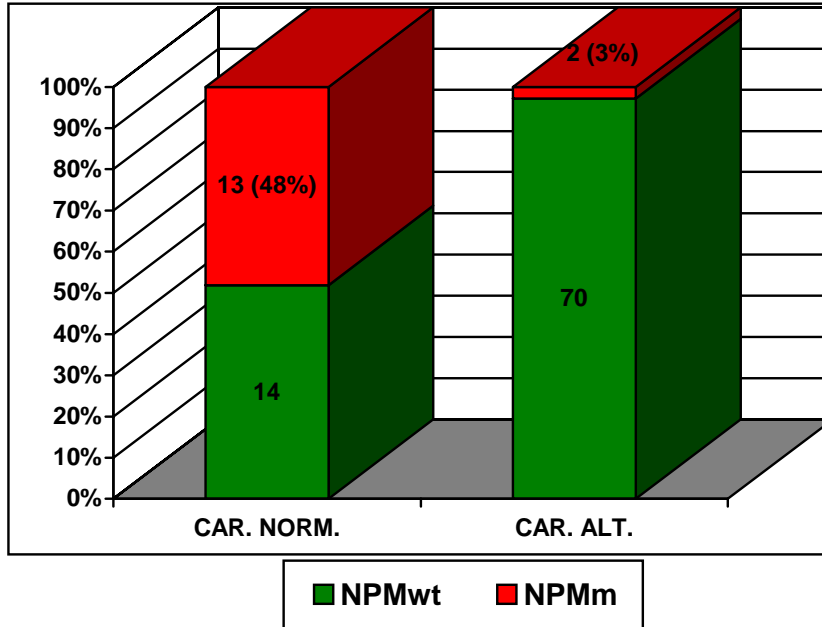


Figura 4.8 Frequenza di *NPM1* mut nelle LMA a cariotipo normale ed alterato.

5. Discussione e conclusioni

Le alterazioni genetiche che causano la trasformazione in senso mieloproliferativo risultano da alterazioni cromosomiche o da mutazioni geniche submicroscopiche. Quelle rilevabili allo studio del cariotipo possono essere di tipo numerico (trisomie, monosomie) o strutturale (traslocazioni, inserzioni, delezioni) e sono evidenziabili non soltanto con metodiche di citogenetica convenzionale, ma anche attraverso tecniche di ibridazione *in situ* (FISH) che offrono fra l'altro il vantaggio di poter analizzare cellule in interfase.

Negli ultimi tempi, la ricerca delle aberrazioni molecolari nelle sindromi mieloproliferative ha acquisito una notevole valenza clinico-terapeutica (Frohling S. *et al.*, 2005). In particolare, l'avvento della biologia molecolare ha permesso d'identificare con precisione le alterazioni geniche relative ai riarrangiamenti citogenetici attraverso un'analisi diretta dell' mRNA o del DNA mediante, rispettivamente, metodiche di RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) o PCR (*polymerase chain reaction*). L'utilizzo di tali tecniche consente da un lato di identificare alterazioni a livello genico nei casi in cui il cariotipo è difficilmente valutabile o apparentemente normale, dall'altro di individuare le alterazioni criptiche o sub-microscopiche non identificabili all'analisi cariotipica convenzionale.

L'indagine molecolare ci permette quindi una diagnosi spesso più precisa, e rappresenta un complemento fondamentale per la corretta impostazione terapeutica. Inoltre, l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare ed in particolare di metodiche molto sensibili quali la RT-PCR consente di valutare la risposta alla terapia e la presenza della malattia minima residua.

La leucemia acuta mieloide è la forma più frequente di leucemia acuta nell'uomo e circa la metà dei casi sono caratterizzati da peculiari traslocazioni cromosomiche che producono delle proteine chimeriche in grado di interferire con le funzioni vitali della cellula (moltiplicazione, differenziamento, apoptosi, etc.). Tra i principali fattori prognostici della LMA si riconoscono:

- (I) età (prognosi sfavorevole con età superiore ai 60 anni)
- (II) alterazioni citogenetiche che consentono di definire dei gruppi prognostici in base all'anomalia citogenetica osservata alla diagnosi con gruppi considerati a prognosi favorevole (t(8;21), inv(16), t(15;17)) e gruppi a prognosi sfavorevole (t(6;9), 11q23, monosomie dei cromosomi 7 o 5 e anomalie cariotipiche complesse)
- (III) alterazioni molecolari caratteristiche, come *FLT3* e *NPM1* che si associano ad una prognosi rispettivamente infausta o favorevole. *FLT3* correla spesso con un alto rischio di recidive precoci, mentre *NPM1* si associa a cariotipi normali e ad una buona prognosi, con alti tassi di risposte complete alla chemioterapia d'induzione.
- (IV) alto numero di globuli bianchi all'esordio: associati a riduzione della percentuale di risposte complete all'induzione e ad alta frequenza di recidive.

La nucleofosmina è una fosfo-proteina (Hingorani K. *et al.*, 2003) multifunzionale che, localizzata prevalentemente nelle regioni granulari del nucleolo, svolge un'azione di trasporto fra il nucleo e il citoplasma.

Risale al gennaio 2005 la pubblicazione nella prestigiosa rivista *New England Journal of Medicine* della scoperta da parte del gruppo di ricerca coordinato dal prof. B. Falini, che il gene *NPM1* è mutato in circa un terzo dei pazienti con leucemia acuta

mieloide. Tale mutazione, che causa un'aberrante delocalizzazione citoplasmatica della proteina, sembra essere un evento critico per la trasformazione leucemica. La ricerca del gruppo italiano ha dimostrato che in pazienti con LMA a cariotipo normale, la presenza della mutazione della nucleofosmina, in assenza della mutazione a livello del gene *FLT3-ITD*, predice una maggiore probabilità di guarire dalla malattia rispetto ad altri pazienti leucemici senza la mutazione.

Altri studi recenti hanno evidenziato come nella LMA la presenza di *NPM1* mut correli con una buona prognosi della malattia, attenuando il fenotipo associato a marcatori tipicamente a cattiva prognosi (*FLT3*) (Döhner E. *et al.*, 2005; Schnittger S. *et al.*, 2005; Thiede C. *et al.*, 2006; Verhaak RG. *et al.*, 2005).

L'identificazione della mutazione della nucleofosmina ha cambiato in maniera radicale l'approccio sia alla diagnosi che alla terapia della leucemia acuta mieloide. Infatti uno studio pubblicato nel 2008 (Schlenk RF. *et al.*, 2008) nello stesso *New England Journal of Medicine*, conferma l'importanza del valore della mutazione di *NPM1* e di altri geni (*FLT3* e *CEBPA*) nel predire l'andamento clinico della LMA e condizionare le scelte terapeutiche. Lo stesso lavoro riporta un'importante novità e cioè che i pazienti leucemici con mutazione di *NPM1* (in assenza di *FLT3-ITD*) hanno una buona probabilità di guarire con la sola chemioterapia, senza bisogno di una terapia più aggressiva, come un trapianto di cellule emopoietiche staminali da donatore che, in certi casi, rappresenta l'unica procedura in grado di guarire la malattia. Tuttavia il trapianto da donatore è penalizzato da una significativa mortalità ed è quindi fondamentale che esso venga riservato ai soli casi che molto probabilmente non risponderanno bene alla sola chemioterapia. Ad oggi sembra quindi che il modo più semplice per distinguere pazienti a buona e cattiva prognosi, sia proprio l'analisi delle alterazioni molecolari delle cellule leucemiche. Tra queste, come dimostra lo studio tedesco, la ricerca della mutazione a carico del gene della nucleofosmina

riveste un ruolo chiave, dal momento che aiuta a decidere se il paziente debba essere sottoposto o meno a trapianto da donatore. Questo studio avvalorava l'importanza di personalizzare la terapia sulla base delle alterazioni genetiche delle cellule leucemiche in modo da ottenere il massimo dei risultati con il minimo di rischio per il paziente.

Considerando il valore della mutazione di *NPM1* nel predire il decorso della leucemia, diventa fondamentale identificare in modo rapido e preciso i pazienti leucemici con questa alterazione genetica.

L'approccio diagnostico messo a punto dal gruppo del professore B. Falini utilizza tecniche di immunocitochimica, successivamente confermate e caratterizzate tramite sequenziamento genico. Tale tecnica è ristretta a campioni di biopsia ossea e comporta quindi conseguenze organizzative e psicologiche derivanti da tale prelievo.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare nuove metodiche molecolari più semplici e più rapide rispetto all'immunocitochimica e al sequenziamento genico per consentire così lo *screening* diagnostico ed il monitoraggio di una popolazione più numerosa di pazienti.

Il saggio di PCR seguito da elettroforesi su capillare, messo a punto dal nostro laboratorio, si è dimostrato veloce, altamente riproducibile e facilmente applicabile per la diagnosi della mutazione del gene *NPM1*; in particolare l'elettroforesi capillare del prodotto PCR marcato con fluorocromo si è dimostrata estremamente efficace per differenziare frammenti di dimensioni diverse, e discriminare la differenza anche di una sola coppia di basi.

La mutazione di *NPM1* è stata osservata nel 16% dei pazienti studiati (17 su 107), mentre la frequenza di pazienti *NPM1* mutati a cariotipo normale riscontrata nella nostra casistica raggiunge un valore pari al 48% (13 su 27). Diversamente, nell'ambito dei pazienti *NPM1m*, la mutazione di tipo A della nucleofosmina è stata osservata con

un'incidenza del 70% (12 su 17). Tali frequenze, che si discostano da quanto riportato in letteratura, 30-60-80% rispettivamente, riteniamo debbano essere valutate alla luce della bassa frequenza di pazienti con cariotipo normale presenti nella nostra casistica (27%).

Alla luce della grande importanza che la mutazione nel gene della nucleofosmina riveste nel 60% delle LMA a cariotipo normale dell'adulto, il nostro laboratorio ha inoltre messo a punto un test diagnostico molecolare (RT-ASO-PCR) estremamente sensibile e specifico per rilevare la mutazione più frequentemente associata alla nucleofosmina (mutazione di tipo A dell'isoforma 1).

Tale saggio, confermato tramite tecniche di elettroforesi capillare e sequenziamento genico, si è dimostrato altamente specifico e sensibile permettendo di discriminare una cellula leucemica su 100.

L'importanza di questa metodica risiede nella possibilità di classificare i pazienti per lo stato mutazionale di *NPM1* mut-A allo scopo di valutarne le caratteristiche cliniche e la risposta alla terapia in funzione della stabilità di questo nuovo marcatore molecolare (Thiede C. *et al.*, 2006; Palmisano M. *et al.*, 2007).

NPM1m rappresenta quindi un nuovo ed importante marcatore molecolare utile non solo per la diagnosi di LMA ma anche per il monitoraggio della MMR. Sebbene il significato clinico sulla presenza o assenza del trascritto specifico durante la remissione clinica non sia ancora chiarito, la presenza della nucleofosmina mutata in un paziente trattato con chemioterapia permette di rilevare un residuo minimo di malattia che non ha risposto alle cure, oppure una ricaduta, intervenendo quindi con terapie più aggressive. A tal proposito nel nostro laboratorio è stata messa a punto una metodica di semi-nested-ASO-PCR, che, analizzando il prodotto PCR della RT-ASO-PCR, permette la discriminazione di una cellula mutata su 100.000, dimostrandosi quindi utile per lo studio della MMR dopo il raggiungimento della remissione clinica ed ematologia.

Siamo così di fronte ad uno straordinario esempio di come i risultati della medicina molecolare si siano tradotti, in un periodo di tempo relativamente breve, in informazioni rilevanti sul piano clinico-diagnostico. Il monitoraggio di un più ampio gruppo di pazienti in diversi stadi della malattia potrebbe contribuire all'identificazione di ulteriori ruoli prognostici di *NPM1* nella LMA.

6. Bibliografia

- Arber, DA., Chang, KL., Lyda, MH., Bedell, V., Spielberger, R., Slovak, ML. (2003). Detection of NPM/MLF1 fusion in t(3;5)-positive acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Hum Pathol* 34, 809-813.
- Bain, BJ. (1990). Leukemia diagnosis. A guide to the FAB classification. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, eds.
- Bennet, JM., Catovsky, D., Daniel, MT., Flandrin, G., Galton, DA., Gralnick, HR., Sultan, C. (1976). Proposal for the classification of acute leukemias. French-American-British (FAB) cooperative group. *Br J Haemat* 33, 451-458.
- Bischof, D., Pulford, K., Mason, DY., Morris, SW. (1997). Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 2312-2325.
- Borer, RA., Lehner, CF., Eppenberger, HM., Nigg, EA. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390.
- Borggreffe, T., Wabl, M., Akhmedov, AT., Jessberger, R. (1998). A B-cell-specific DNA recombination complex. *J Biol Chem* 273, 17025-17035.
- Castoldi G., Liso V., (2001). *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*. Ed. McGRAW-HILL 3° edizione.
- Cha, H., Hancock, C., Dangi, S., Maignel, D., Carrier, F., Shapiro, P. (2004). Phosphorylation regulates nucleophosmin targeting to the centrosome during mitosis as detected by cross-reactive phosphorylation-specific MKK1/MKK2 antibodies. *Biochem J* 378, 857-865.
- Chan, WY., Liu, QR., Borjigin, J., Busch, H., Renert, OM., Tease, La., Chan, PK. (1989). Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 28, 1033-1039.
- Cline, MJ. (1994). The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med* 330, 228-236.
- Colombo, E., Marine, JC., Danovi, D., Falini, B., Pelicci, PG. (2002) Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4, 529-533.
- Cordell, JL., Pulford, KA., Bigerna, B., Roncador, G., Banham, A., Colombo, E., Pelicci, PG., Mason, DY., Falini, B. (1999). Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. *Blood* 93, 632-642.
- Cuneo, A., Mecucci, C., Hagemeijer, A. (1998). Cytogenetic of myeloid neoplasias. *Textbook of malignant haematology*. Martin Dunitz Publisher, eds.
- Dalenc, F., Drouet, J., Ader, I., Delmas, C., Rochaix, P., Favre, G., Cohen-Jonathan, E., Toulas, C. (2002). Increased expression of COOH- truncated nucleophosmin resulting

from alternative splicing is associated with cellular resistance to ionizing radiation in HeLa cells. *Int J Cancer* 100, 662-668.

Dergunova, NN., Bulycheva, TI., Artemenko, EG., Shpakova, AP., Pegova, AN., Gemjian, EG., Dudnik, OA., Zatsepina, OV., Malashenko, OS. (2002). A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. *Immunol Lett* 83, 67-72.

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

Facchetti F, Pileri SA, Agostinelli C, Martelli MP, Paulli M, Venditti A, Martelli MF, Falini B. (2009). Cytoplasmic nucleophosmin is not detected in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica*. 94, 285-8. Epub 2008 Dec 9.

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. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352, 254-266.

Frohling S, Scholl C, Gilliland GD, Levine RL. (2005). Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 23, 6285-6295

Harris, NL., Jaffe, ES., Dieblod, J., Flandrin, G., Muller, HK., Vardiman, J., Lister, TA., Bloomfield, CD. (1997). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, 1997. *Journal of Clin Onc* 17, 3835-3849.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997). MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 378, 296-299.

Hernandez-Verdum, D., Gautier, T. (1994). The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* 16, 179-185.

Herrera, JE., Correia, JJ., Jones, AE., Olsen, MO. (1996). Sedimentation analyses of the salt- and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23. *Biochemistry* 35, 2668-2673.

Hingorani, K., Szebeni, A., Olson, MO. (2000). Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 275, 24451-24457.

Honda, R., Tanaka, H., Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25-27.

Horiike S, Yokota S, Nakao M, Iwai T, Sasai Y, Kaneko H, Taniwaki M, Kashima K, Fujii H, Abe T, Misawa S. (1997). Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia*. 11:1442-6.

Jaffe, ES., Harris, NL., Stein, H., Vardiman, J. (2001) Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organisation Classification of Tumours. *Ann Oncol* 13, 490-491.

Itahana, K., Bhat, KP., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., Zhang, Y. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 12, 1151-1164.

Keating, MJ., Smith, TL., Kantarjian, H., Cork, A., Walters, R., Trujillo, JM., McCredie, KB., Gehan, EA., Freireich, EJ. (1988). Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome. *Leukemia* 2, 403-412.

Kelly, LM., Kutok, JL., Williams, IR., Boulton, CL., Amaral, SM., Curley, DP., Ley, TJ., Gilliland, DG. (2002). PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8283-8288.

Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. (2002). Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*. 2, 2555-63.

Kubbutat, MH., Jones, SN., Vousden, KH. (1997). Regulation of p53 stability by MDM2. *Nature* 387, 299-303.

Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharji, TM., Ojala, PM., Meek, D., Laiho, M. (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 5, 465-475.

Larson, RA., Williams, SF., Le Beau, MM., Bitter, MA., Vardiman, JW., Rowley, JD. (1986). Acute myelomonocytic Leukemia with abnormal eosinophils and (inv)16 or t(16;16) has a favorable prognosis. *Blood* 68, 1242-1249.

Levine, AJ. (1997). P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

Liu, P., Tarlé, SA., Hajra, A., Claxton, DF., Marlton, P., Freedman, M., Siciliano, MJ., Collins, FS. (1993). Fusion between transcription factor CBF β /PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid Leukemia. *Science* 261, 1041-1044.

Lo Coco, F. (1991). Hybrid phenotypes and lineage promiscuity in acute leukemia. *Haematologica* 5, 637-644.

MacArthur, AC., Shackelford, GM. (1997) NPM3: A Novel, Widely Expressed Gene Encoding a Protein Related to the Molecular Chaperones Nucleoplasmin and Nucleophosmin. *Genomics* 42, 137-140.

Mandelli, F. (1991). *Ematologia: fisiopatologia, clinica, terapia*. Antonio Delfino, eds.

Matsuno, N., Osato, M., Yamashita, N., Yanagida, M., Nanri, T., Fukushima, T., Motoji, T., Kusumoto, S., Towatari, M., Suzuki, R., Naoe, T., Nishii, K., Shigesada, K., Ohno, R., Mitsuya, H., Ito, Y., Asou, N. (2003). Dual mutations in the AML1 and FLT3

genes are associated with leukemogenesis in acute myeloblastic leukemia of the M0 subtype. *Leukemia* 17, 2492-2499.

Melo, JV. (1996). Diversity of BCR/ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88, 2375-2384.

Momand, J., Zambetti, GP. (1997). Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem* 64, 343-352.

Mugneret, F., Callier, P., Favre-Audry, B. (2003). Chromosomal abnormalities in acute myeloid leukemias. *Phatol Biol* 31, 314-328.

Namboodiri, VM., Aket, IV., Schmidt-Zachmann, MS., Head, JF., Akey, CW. (2004). The structure and function of Xenopus NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus. *Structure* 12, 2149-2160.

Nishimura, Y., Ohkubo, T., Furuichi, Y., Umekawa, H. (2002), Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 2239-2242.

Noguera, NI., Breccia, M., Divona, M., Diverio, D., Costa, V., De Santis, S., Avvisati, G., Pinazzi, MB., Petti, MC., Mandelli, F., Lo Coco, F. (2002). Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia* 16, 2185-2189.

Okuda, M., Horn, HF., Tarapone, P., Tokuyama, Y., Smulian, AG., Chan, PK., Knudsen, ES., Hofmann, IA., Snyder, JD., Bove, KE., Fukasawa, K. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127-140.

Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, S., Nagata, K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 362, 857-860.

Oren, M. (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 274, 36031-36034.

Ottone T., Ammatuna E., Lavorgna S., Noguera NI., Buccisano F., Venditti A., Gianni L., Postorino M., Federici G., Amadori S., Lo-Coco F. (2008). *J Mol Diagn.* 10, 212-6. Epub 2008 Apr 10.

Palmisano, M., Grafone, T., Ottaviani, E., Testoni, N., Baccarani, M., Martinelli, G. (2007). NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 92, 1268-1269.

Pandolfi, PP., Alcalay, M., Fagioli, M., Zangrilli, D., Mencarelli, A., Diverio, D., Biondi, A., Lo Coco, F., Rambaldi, A., Grignani, F. (1992). Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR α transcripts that encode aberrant PML

proteins and PML/RAR α isoforms in acute promyelocytic leukemia. *EMBO J* 11, 1397-1407.

Pui, CH., Dahl, GV., Melvin, S., Williams, DL., Peiper, S., Mirro, J., Murphy, SB., Stass, S. (1984). Acute leukemias with mixed lymphoid and myeloid phenotype. *Br J Haemat* 56, 121-130.

Rabbitts, TH. (1994). Chromosomal translocation in human cancer. *Nature* 372, 143-49.

Rabbitts, TH. (1991). Translocation, master genes and differences between the origin of acute and chronic leukemias. *Cell* 67, 641-644.

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. (2008). Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 358,1909-18.

Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, DA., Shenk, T., Levine, AJ. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling of the HDM2 oncoprotein regulate the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J* 17, 554-564.

Saglio, G., Pane, F., Gottardi, E., Frigeri, F., Buonaiuto, MR., Guerrasio, A., De Micheli, D., Parziale, A., Fornaci, MN., Martinelli, G., Salvatore, F. (1996). Consistent amounts of acute leukemia-associated p190 BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. *Blood* 87, 1075-1080.

Saglio, G., Guerrasio, A., Rosso, C., Lo Coco, F., Frontani, M., Annino, L., Mandelli, F. (1991). Detection of Ph1-positive acute lymphoblastic leukaemia by PCR. GIMEMA Cooperative Study Group. *Lancet* 338, 958.

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

Szebeni A. and Olson MO. (1999) Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 8, 905-12.

Swaminathan, V., Kishore, AH., Febitha, KK., Kundu TK. (2005). Human histone chaperone nucleoplasm enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* 25, 7534-7545.

Szebeni, A., Olson, MO. (1999). Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 8, 905-912.

Tamada, H., Van Thuan, N., Reed, P., Nelson, D., Katoku-Kikyo, N., Wudel, J., Wakayama, T., Kikyo, N. (2006). Chromatin decondensation and nuclear reprogramming by nucleoplasm. *Mol Cell Biol* 26, 1259-1271.

Tao, W., Levine, AJ. (1999). Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein HDM2 is required for HDM2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 3077-3080.

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

Tokuyama, Y., Horn, HF., Kawamura, K., Tarapore, P., Fukasawa, K. (2001). Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* *276*, 21529-21537.

Van Dongen, JJ., Macintyre, EA., Gabert, JA., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., Díaz, MG., Malec, M., Langerak, AW., San Miguel, JF., Biondi A. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the bioMED-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* *13*, 1901-1928.

Vardiman, JW., Harris, NL., Brunning, RD. (2002). The World Health Organization classification of myeloid neoplasms. *Blood* *100*, 2292-2302.

Vardiman JW., Thiele J., Arber DA., Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A., Harris NL, Le Beau MM., Hellstrom-Lindberg E., Tefferi A. and Bloomfield CD. (2009). The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. Apr 8. [Epub ahead of print]

Verhaak, RG., Goudswaard, CS., Van Putten, W., Bijl, MA., Sanders, MA., Hagens, W., Uitterlinden, AG., Erpelinck, CA., Delwel, R., Lowenberg, B., Valk, PJ. (2005). Mutations in nucleophosmin NPM1 in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* *106*, 3747-3754.

Wang, D., Umekawa, H., Olson, MO. (1993). Expression and subcellular location of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res* *39*, 33-42.

Wang, W., Budhu, A., Forgues, M., Wang, XW. (2005). Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol* *7*, 823-830.

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Nishimura, M., Motoji, T., Shinagawa, K., Takeshita, A., Saito, H., Ueda, R., Ohno, R., Naoe, T. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* *97*, 2434-2439.

Yu, Y., Maggi, LB., Bradi, SN., Apicelli, AJ., Dai, MS., Lu, H., Weber, JD. (2006). Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol* *26*, 3798-3809.

Yun, JP., Chew, EC., Liew, CT., Chan, JY., Jin, ML., Ding, MX., Fai, YH., Li, HK., Liang, XM., Wu, QL. (2003). Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem* 90, 1140-1148.

Yung, BY., Chan, PK. (1987). Identification and Characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. *Biochim Biophys Acta* 925, 74-82.

Zhang, T., Hillon, J., Tong, JH., Cao, Q., Chen, SJ., Berger, R., Chen, Z. (1994). AML1 gene rearrangement and AML1/ETO gene expression as molecular markers of acute myeloblastic leukemia with t(8;21). *Leukemia* 8, 729-734.