



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA TRASLAZIONALE
XXXII CICLO**

Direttore Prof. Alberto Ballestrero

**“VALUTAZIONE D’ESPRESSIONE DI MICRO-RNA IN PAZIENTI AFFETTI DA
MIELODISPLASIA. UN POSSIBILE STRUMENTO UTILE PER LA COMPRESIONE
DELLA PATOGENESI E DEI MECCANISMI DI PROGRESSIONE DI MALATTIA”**

RELATORE

Chiar.mo Prof. Maurizio Miglino

**CANDIDATO Dott. Daniele Avenoso
ANNO ACCADEMICO 2019 - 2020**

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 3
2. SCOPO DELLA TESI	pag. 49
3. MATERIALE E METODI	pag. 50
4. RISULTATI	pag. 67
5. DISCUSSIONE & CONCLUSIONI	pag. 79
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 83

1 INTRODUZIONE

1.1 Le sindromi mielodisplastiche

Le Sindromi Mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo eterogeneo di disordini delle cellule staminali emopoietiche caratterizzati da emopoiesi inefficace e da un rischio variabile di trasformazione leucemica. Tale disfunzione midollare si manifesta con citopenia periferica uni o multilineare ed alterazioni morfologiche displastiche midollari in una o più delle linee cellulari mieloidi oltre che pancitopenia prolungata e ricorrenti anomalie citogenetiche.

Nelle MDS la cellula staminale emopoietica anormale occupa tutto il midollo osseo dando origine a una popolazione monoclonale che non perde la potenzialità di differenziarsi in elementi maturi nella prima fase della malattia.

In questi soggetti l'emopoiesi risulta inefficace poiché, nonostante sia presente un midollo ipercellulare, la maturazione dei precursori emopoietici risulta compromessa in maniera variabile a causa dell'incremento dei meccanismi apoptotici che potrebbero essere una delle spiegazioni dell'emopoiesi inefficace. A ciò corrispondono aspetti morfologici che caratterizzano la displasia midollare e che si ritrovano in ognuna delle linee emopoietiche.

Un certo numero di pazienti affetti da MDS mostra progressivo aumento della quota blastica, fino alla possibile trasformazione in leucemia acuta. In questi soggetti vengono meno i meccanismi di incremento dell'apoptosi e prendono il sopravvento meccanismi di disregolazione del ciclo cellulare, con conseguente incremento dell'indice mitotico, vantaggio proliferativo del clone displastico ed accumulo di blasti. La disfunzione cellulare causa aumentato rischio infettivo e necessità trasfusionale nella maggioranza dei pazienti.

Anche se è ben nota la naturale evoluzione delle sindromi mielodisplastiche, i motivi che consentono alla cellula staminale emopoietica di acquisire capacità clonale sono ancora sconosciuti.

La patologia mielodisplastica può insorgere “de novo” (primitiva o idiopatica) o essere secondaria all’ esposizione a sostanze tossiche quali il benzene, radiazioni ionizzanti, sostanze tossiche ambientali legati ad esposizione lavorativa o precedenti trattamenti con radioterapia o chemioterapia antineoplastica specialmente in pazienti trattati con agenti alchilanti o inibitori della topoisomerasi II. In questo caso si parla di sindromi mielodisplastiche “terapia-correlate”. Inoltre è stato evidenziato un ruolo dell’esposizione al tabacco, abuso d’alcool, infezioni virali o disordini autoimmuni come fattori di rischio.

Il decorso clinico dei pazienti affetti da MDS è caratterizzato dalle complicanze conseguenti le citopenie del sangue periferico unitamente a un rischio intrinseco per la trasformazione leucemica che si riscontra nel 30% dei pazienti affetti da MDS. La prognosi è estremamente variabile con una sopravvivenza media da oltre 5 anni a meno di 6 mesi.

Pertanto, nel corso degli anni, sono stati sviluppati molti sistemi di punteggio prognostico per consentire un'accurata suddivisione del rischio di questi pazienti. Inoltre, con la recente scoperta di geni ricorrentemente mutati coinvolti nella regolazione epigenetica, nella modificazione della cromatina, nei meccanismi di splicing e nei meccanismi di riparazione del DNA, è stata acquisita una conoscenza approfondita della patogenesi molecolare di questa malattia.

Queste aberrazioni genetiche sono utili come nuovi target terapeutici, infatti attualmente esistono solo tre farmaci approvati dalla FDA per il trattamento delle MDS nessuno dei quali è curativo.

Il trapianto allogenico di cellule staminali (ASCT) è l'unica terapia curativa, ma la morbilità e la mortalità associate a questo ne precludono l'utilizzo nella maggior parte dei pazienti con MDS con un'età media alla diagnosi tra i 70 e i 75 anni.

1.2 Epidemiologia

Negli Stati Uniti l'incidenza delle MDS è di circa 3-4 casi ogni 100.000 abitanti ogni anno, aumentando con l'età e arrivando a circa 30 casi ogni 100.000 abitanti all'anno tra i pazienti con età superiore a 70 anni. La stima è comunque difficile e questo è in parte dovuto al fatto che i registri dei tumori come ad esempio Surveillance, Epidemiology, and End Results registry of the National Cancer Institute hanno cominciato a classificare le MDS come neoplasie e a raccogliere i dati solo a partire dal 2001 infatti, il mancato riconoscimento delle MDS come disordini preleucemici, e quindi neoplastici, ha precluso per molti anni il loro inserimento in tutti i registri nazionali e nei programmi di sorveglianza epidemiologica delle malattie tumorali sia negli Stati Uniti d'America

sia in numerosi altri paesi occidentali, compreso il nostro. Inoltre, molti pazienti anziani con lieve ed inspiegabile citopenia che potrebbero essere affetti da MDS, sono valutati in modo incompleto ad esempio evitando il prelievo di sangue midollare senza il quale la diagnosi di MDS non può essere fatta con certezza. Di conseguenza, allo stato attuale, l'accuratezza della diagnosi e la corretta descrizione dei casi di MDS sembrano confinate a registri specializzati di casistica oncologica locale o a statistiche su base ospedaliera. Considerando queste limitazioni si può stimare che ci siano all'anno tra i 30000 e i 40000 nuovi casi negli Stati Uniti mentre in Europa il numero di nuovi casi è forse il doppio. Si hanno invece informazioni meno sicure per quanto riguarda altre regioni del pianeta. [6,18]

In Cina e in Asia meridionale i pazienti con MDS sono diagnosticati in età giovanile, alcuni tipi di MDS come ad esempio l'anemia refrattaria con sideroblasti ad anello sono riscontrate meno frequentemente e la monosomia 7 potrebbe essere più comune che in Occidente; le ragioni di queste differenze non sono chiare, ma potrebbero essere collegate a fattori genetici o ambientali.

L'epidemiologia delle MDS è inoltre differente in Giappone e nell'Europa dell'Est e comprende un aumento del rischio di MDS nei sopravvissuti alle esplosioni di bombe atomiche a Hiroshima e Nagasaki nel 1945 i cui effetti persistono tutt'oggi.

Le MDS risultano malattie relativamente comuni soprattutto nell'età media e avanzata, inoltre la loro incidenza appare in rapida evoluzione, da un lato a causa del progressivo aumento dell'età media della popolazione, e dall'altro in virtù dell'affinamento delle tecniche diagnostiche.

1.3 Patogenesi e diagnosi

La diagnosi di MDS è generalmente sospettata nei pazienti che presentano citopenia nel sangue periferico di eziologia poco chiara. Si pensa che l'accumulo di danno genetico correlato all'età determini mutazioni in numerosi pathways cellulari principalmente coinvolti nella regolazione epigenetica TET2, IDH1e 2, DNMT3, ASXL1 & EZH2, nel meccanismo di splicing dell'RNA—SF3B1, SRSF2, U2AF35, ZRSR2, nella risposta al danno al DNA—TP53, e (tyrosine kinase signaling- JAK2, RUNX1, KRAS, NRAS, BRAF, FLT3). L'esposizione ambientale a sostanze chimiche come il benzene, insetticidi e pesticidi potrebbe contribuire allo sviluppo di MDS. Inoltre nei pazienti con MDS correlata alla terapia (circa il 15–20% dei casi) il danno genetico è sorto in seguito a una precedente esposizione a radioterapia e/o chemioterapia. Tra i pazienti con MDS di età inferiore a 40 anni, dovrebbe essere considerata una predisposizione genetica passando per una sindrome congenita come ad esempio l'anemia di Fanconi, discheratosi congenita, sindrome di Down e altre sindromi congenite di insufficienze midollare.

Attualmente la diagnosi è stabilita in base alla presenza di persistenti (della durata >6 mesi) e significative citopenie: emoglobina <10 g/dL, conta assoluta dei neutrofili <1.8 3 10⁹/L, conta delle piastrine <100 3

109/L, significativa displasia del midollo osseo, o eccesso di blasti o tipiche anomalie citogenetiche. Nel sangue periferico si riscontrano: anemia macrocitica, reticolocitopenia, neutropenia con neutrofili iposegmentati, cellule mieloidi immature circolanti, mieloblasti e trombocitopenia.

1.4 Classificazione

Data l'eterogenità delle MDS nel corso degli anni sono stati creati diversi sistemi classificativi volti a migliorare la caratterizzazione delle patologie mielodisplastiche.

Per la valutazione del paziente, sia al momento della diagnosi sia nel corso della malattia e della terapia, si è dimostrato necessario l'introduzione di sistemi classificativi prognostici al fine di guidare le decisioni cliniche.

Per questi motivi nei primi anni 2000 la *World Health Organisation (WHO)* propose uno schema classificativo delle neoplasie ematopoietiche identificando all'interno delle sindromi mielodisplastiche le seguenti categorie: [18]

•Anemia refrattaria

i pazienti in questa categoria sono affetti da anemia non responsiva (refrattaria) alla terapia vitaminica o con ferro. L'anemia può essere accompagnata neutropenia e/o trombocitopenia.

•Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello

• Citopenia refrattaria (con o senza sideroblasti ad anello) con displasia multilineare (RCMD, RCMD-RD)

Questa categoria comprende pazienti con citopenia refrattaria, minima displasia, meno del 5% di blasti e meno del 15% di sideroblasti ad anello (RCMD) o pazienti con più del 15% di sideroblasti ad anello (RCMD-RD)

• *Anemia refrattaria con eccesso di blasti (RAEB1, RAEB2)*

Comprende due sottotipi, distinti dal numero di blasti presenti nel midollo osseo. Per i pazienti con percentuale di blasti compreso tra 5-9% nel midollo e <5% nel sangue periferico si parla di RAEB1, invece per i pazienti che presentano percentuali tra 10-19% di blasti midollari e il 10-19% di blasti nel sangue periferico si parla di RAEB2.

• *Sindrome 5q-(5q)*

La sindrome 5q- fu descritta per la prima volta nel 1974 da Van den Berghe con caratteristiche morfologiche distinte che includono trombocitosi, anemia macrocitica e megacariociti ipolobati insieme a una displasia minima nelle linee granulomonocitica ed eritroide.

Il nome di questa sindrome fa riferimento al cromosoma 5 e precisamente ad una delezione del braccio lungo di tale cromosoma in assenza di eccesso di blasti. I pazienti con questa sindrome presentano anemia refrattaria che necessita cure di supporto.

Tra i pazienti con MDS con delezione 5q, la presenza di un'ulteriore anomalia citogenetica non ad alto rischio non ha mostrato di avere un impatto negativo sulla prognosi altrimenti favorevole.

D'altra parte, alcuni studi hanno confermato che la presenza della mutazione TP53 conferisce prognosi sfavorevole ai pazienti con delezione 5q.

Quindi con la classificazione WHO viene ridotta al 20% la percentuale di blasti necessari per la diagnosi di leucemia mieloblastica acuta, sindrome 5q- e è stato escluso il sottotipo LMMC collocato in un gruppo di patologie con caratteristiche sia delle sindromi mielodisplastiche sia delle malattie mieloproliferative.

Successivamente nel 2008 le MDS sono state classificate in:

- Citopenia refrattaria con displasia unilineare (include anemia refrattaria, neutropenia refrattaria e piastrinopenia refrattaria)
- Citopenia refrattaria con displasia multilineare
- Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello
- Anemia refrattaria con eccesso di blasti I (blasti <5%)
- Anemia refrattaria con eccesso di blasti II (blasti 10-19%)
- MDS associata a del(5q) isolata
- MDS non classificabile.

Più recentemente il considerevole afflusso di informazioni molecolari ha indotto alla formulazione della nuova classificazione WHO 2016 che include:

- MDS con displasia unilineare (la displasia coinvolge solo la linea dei globuli rossi, o dei globuli bianchi o delle piastrine)
- MDS con displasia multilineare (tutte le linee cellulari sono displastiche)
- MDS con sideroblasti ad anello con displasia unilineare
- MDS con sideroblasti ad anello con displasia multilineare
- MDS con eccesso di blasti I e II (nel tipo I i blasti midollari sono <10%, nel tipo II sono <20%)
- MDS associata a del(5q) isolata
- MDS non classificabile

Per la MDS con blasti midollari al di sotto del 5%, definite a basso rischio di trasformazione leucemica, è stata introdotta la distinzione fra MDS con displasia di una sola linea (MDS-SLD) o multi-lineage (MDS-MLD); nella prima categoria vengono incluse le più frequenti anemie refrattarie e le più rare neutropenie refrattarie e piastrinopenie refrattarie, nella seconda sono invece presenti due o tre citopenie. Qualora siano presenti sideroblasti ad anello (MDSRS), viene introdotta anche in questo

sottogruppo la distinzione che si basa sulla presenza di displasia su una sola o su più linee. In entrambi i casi è quasi sempre presente la mutazione di un gene importante nello splicing noto come SF3B1. E' stata mantenuta una categoria specifica per le MDS con l'alterazione citogenetica che comporta la delezione del braccio lungo del cromosoma 5, quando questa è isolata o in associazione ad una singola ulteriore alterazione cromosomica con l'importante eccezione della monosomia del cromosoma 7 (-7) o la delezione 7q. Le MDS con eccesso di blasti (MDS-EB) ad alto rischio di trasformazione vengono suddivise in due gruppi, rispettivamente con blasti tra il 5 ed il 9% (MDSEB-1) e con blasti tra il 10 e il 19% (MDSEB-2). Al di sopra del 20% di blasti si parla di leucemia mieloide acuta (AML). MDS che non rientrano in questi gruppi vengono definite come non classificabili (MDS-U). [1]

La ragione di questa revisione è dovuta al fatto che la classificazione WHO del 2008 enfatizza la displasia unilineare versus quella multilineare mentre in pratica spesso la displasia non è coerente con le citopenie del sangue periferico rilevate nei pazienti con RCUD. I pazienti affetti da MDS con displasia unilineare e citopenia o blasti periferici pari all'1% in almeno due occasioni devono essere considerati come MDS-U. Inoltre include l'aggiunta di un'anomalia citogenetica non ad alto rischio e un test per la mutazione TP53 nella valutazione dei pazienti con delezione 5q. [53]

alterazioni che si riscontrano comportano guadagno o perdita di materiale genetico (monosomie, trisomie, delezioni). Vengono invece riscontrate meno frequentemente alterazioni della struttura come ad esempio inversioni di segmenti cromosomici o traslocazioni.

Le anomalie citogenetiche vengono identificate nel 30-70% dei casi di mielodisplasie *de novo*, nelle forme ad alto rischio e in quelle secondarie si arriva all'80%.

E' stato dimostrato che i pazienti che presentano anomalie citogenetiche hanno una sopravvivenza inferiore ai pazienti con cariotipo normale.

Le più frequenti anomalie delle MDS sono la delezione 5q seguita dalla trisomia 8, dalla delezione 20q, -Y, dalla monosomia 7, e dalla delezione 12p.

Queste anomalie non sono tuttavia specifiche per la MDS e spesso sono presenti anche in altre neoplasie mieloidi, inoltre la perdita del cromosoma Y è associata anche ad altre neoplasie maligne e può essere riscontrata in uomini anziani sani.

Sebbene non siano alterazioni specifiche per le MDS, alcune di queste sono correlate strettamente con la morfologia e la clinica; è il caso ad esempio della delezione del braccio lungo (q) del cromosoma 5 (5q-), la più frequente (15% dei casi) che definisce un sottotipo di MDS ovvero la "sindrome del 5q-".

Le indagini citogenetiche hanno riscontrato due regioni frequentemente delete: 5q33, associata alla sindrome 5q- e quindi a prognosi favorevole, e la 5q31 associata a MDS secondaria a terapia da cui ne deriva una prognosi sfavorevole.

Il braccio *q* del cromosoma 5 contiene molti geni che risultano essere coinvolti nella patogenesi delle MDS. La proteina RPS14, necessaria per la maturazione della subunità ribosomiale 40S, è correlata alla sindrome 5q- in cui si riscontra un deficit della funzione ribosomiale. Tale deficit sembra essere rafforzato dalla perdita dei geni che codificano per due microRNA, miR-145 e miR-146a anch'essi codificati in questa regione cromosomica.

[7,18,27]



Figura 3. Delezione del cromosoma 5

Con l'avvento del sequenziamento di nuova generazione, sono state osservate mutazioni somatiche ricorrenti nel 90% dei pazienti con MDS con il numero di mutazioni driver avente un impatto prognostico indipendente. Tuttavia, si deve notare che queste mutazioni possono verificarsi in circa il 10% dei soggetti sani. I geni ricorrentemente mutati sono coinvolti nella regolazione epigenetica (TET2, ASXL1, EZH2, DNMT3A, IDH1, IDH2), nello splicing dell'RNA (SF3B1, SRSF2, U2AF35, ZRSR2), nella riparazione del DNA (TP53), nella regolazione trascrizionale (RUNX1, BCOR, ETV6) e nella trasduzione del segnale (CBL, NRAS, JAK2). [18,27]

1.6 Cariotipo nelle MDS

il cariotipo SNP-A

I microarray SNP sono stati largamente utilizzati per i tumori maligni ematologici per la loro alta risoluzione e capacità di rilevare disomie uniparentali (UPD) e microdelezioni, consentendo la scoperta di mutazioni omozigoti in JAK2, TET2, CBL, CEBPA, FLT3 e EZH2.

L'avvento degli SNP-array ha quindi consentito la scoperta di geni prognostici. I primi studi che hanno utilizzato gli SNP nelle MDS a basso rischio con cariotipo normale hanno evidenziato aberrazioni genomiche ricorrenti con un'alta prevalenza di UPD che sono state poi confermate in più studi indipendenti. (Fitzgibbon et al, Makishima et al, Walker et al)

Un ampio studio condotto su 430 pazienti con tumori mieloidi, ha utilizzato un approccio combinato di SNP-A e citogenetica in metafase e ha dimostrato che gli SNP-A identificano aberrazioni occulte in pazienti a basso rischio. I pazienti con aberrazioni SNP-A sono stati suddivisi in 4 gruppi a rischio prognostico definito dal numero di aberrazioni genomiche e hanno avuto un risultato peggiore quando sono stati riclassificati utilizzando parametri tradizionali, come la morfologia, e i parametri di rischio della WHO e dell'IPSS. L'utilità clinica degli SNP-A dovrebbe migliorare la classificazione della malattia e la stratificazione prognostica in questa malattia così eterogenea. Uno studio condotto nel 2012 da Jerez e colleghi ha dimostrato che l'estensione della regione interessata su 5q determina caratteristiche cliniche, come ad esempio delezioni maggiori che coinvolgono i segmenti centromerici e telomerici di 5q, associate ad un fenotipo di malattia più aggressivo ed ulteriori anomalie come 17p.

1.7 Anomalie genetiche nelle MDS

I geni che si riscontrano essere mutati con maggiore frequenza nelle MDS codificano per proteine di trasduzione del segnale, fattori di trascrizione,

soppressori tumorali, regolatori epigenetici e spliceosoma

Alterazioni nella trasduzione del segnale e dei recettori di superficie cellulare

A differenza di altre neoplasie mieloidi, nelle MDS sono rare le mutazioni nelle vie di segnalazione delle tirosin chinasi. Le mutazioni di FLT3, comunemente osservate nelle AML de novo, sono poco frequenti nella MDS, tranne nella malattia più avanzata e nelle AML secondarie. Sebbene mutazioni della proteina RAS, siano presenti nel 6-17% delle MDS, altri membri del pathway RAS / RAF / MEK (BRAF, PTPN11, CBL) risultano raramente mutati nella MDS de novo.

Alterazioni dei fattori di trascrizione e dei regolatori del ciclo cellulare

RUNX1. RUNX1 (anche denominato AML1 o CBFA2), situato in 21q22, codifica per una delle due subunità che formano un fattore di trascrizione eterodimerico, lo human corebinding factor (CBF). La proteina RUNX1 contiene un dominio N-terminale altamente conservato dal punto di vista evolutivo (dominio Runt), responsabile sia dell'eterodimerizzazione con la subunità b di CBF che del legame col DNA. La transattivazione distale del dominio C-terminale recluta i cofattori trascrizionali. RUNX1 è frequentemente deregolato nella leucemia attraverso diversi meccanismi come la traslocazione, la mutazione e l'amplificazione. Le mutazioni di RUNX1 sono rilevate

nel 10-20% delle MDS [7]. Le mutazioni sono di solito monoalleliche, e si verificano a livello del residuo C-terminale della proteina con conseguente aploinsufficienza del gene. Mutazioni di RUNX1 si riscontrano più comunemente nelle MDS correlate alla terapia, nelle MDS a più alto rischio (Harada et al, 2004), in quelle correlate con -7 / 7q- e sono associate a prognosi sfavorevole. Le mutazioni germinali di RUNX1 causano una rara forma di trombocitopenia congenita familiare con una

suscettibilità intrinseca a sviluppare la leucemia acuta, suggerendo che il gene potrebbe agire come soppressore tumorale. Sebbene l'eliminazione di RUNX1 sia letale negli embrioni di topo, la delezione condizionata nel compartimento ematopoietico porta ad un aumento di progenitori mieloidi, a difetti linfoidi ed a megacariopoiesi inefficace nei topi adulti. Traslocazioni di RUNX1 si verificano in diversi sottotipi di leucemia, e portano alla formazione di geni di fusione che codificano per proteine chimeriche che includono RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) in (t (8; 21) AML, ETV6-RUNX1 (t (12; 21)) nella leucemia linfoblastica infantile acuta (ALL) e meno spesso EVI1-RUNX1 (t (3; 21)) nella MDS e nella leucemia mieloide cronica (LMC). La traslocazione di EVI1-RUNX1 genera una proteina di fusione che sembra deregolare la normale emopoiesi. L'amplificazione del gene RUNX1 può avvenire attraverso la polisomia del cromosoma 21 o attraverso l'effettiva amplificazione di alto livello. Le conseguenze funzionali dell'amplificazione RUNX1 nella MDS e il suo ruolo nell'insorgenza di leucemia non sono ancora conosciute. [27]

ETV6. ETV6 codifica per un fattore di trascrizione necessario per il mantenimento delle cellule staminali ematopoietiche e si trova su 12p13. Riarrangiamenti in ETV6 sono stati ampiamente studiati nella leucemia linfoblastica acuta e sono associati a prognosi favorevole. Mutazioni somatiche (3%) e delezioni eterozigoti (<1%) si verificano raramente nei pazienti con MDS. Anche se la delezione (12p) è collocata nel sottogruppo di rischio basso secondo IPSS-R, le mutazioni ETV6 sembrano predire prognosi sfavorevole. E' stata suggerita una cooperazione funzionale tra ETV6 e le anomalie del cromosoma 7 poiché è stata osservata una possibile co-occorrenza di queste due lesioni. Le mutazioni di ETV6 sono eterozigoti e coinvolgono sia i domini di omodimerizzazione che di legame al DNA, e danno origine a una proteina tronca o alterata che non è in grado di reprimere la trascrizione e mostra effetti negativi dominanti. [10,27]

TP53. La MDS con anomalie cromosomiche al (17p) è associata alla presenza di cellule pseudo-Pelger-Huet contenenti piccoli vacuoli, delezione di TP53 e rischio relativamente alto di trasformazione leucemica. Le mutazioni di TP53 nelle MDS sono state descritte prevalentemente nei sottotipi ad alto rischio, e sono associate a cariotipo complesso e malattia correlata alla terapia. Le mutazioni di TP53 sono associate nelle MDS a prognosi sfavorevole. Alterazioni nel gene TP53 si verificano in circa il 10% delle MDS, anche se quasi un terzo o la metà dei pazienti con citogenetica complessa hanno mutazioni TP53. TP53 è un soppressore tumorale ed anche un fattore di trascrizione che risponde allo stress cellulare attivando vari pathways protettivi come l'induzione dell'apoptosi, arresto del ciclo cellulare e riparazione del DNA. La perdita di TP53 conferisce resistenza all'apoptosi e ad altri segnali di morte cellulare. [27]

Un lavoro recente (Barlow et al) in un modello di topo ha dimostrato che la normale funzione di TP53 è necessaria perché avvenga l'apoptosi degli eritrociti promossa da aploinsufficienza di RPS14 nei pazienti con del (5q). L'aploinsufficienza di RPS14 nella del (5q) interrompe l'assemblamento del ribosoma e stabilizza TP53. La presenza di mutazioni TP53 nel 18% delle MDS con del (5q) e una percentuale di blasti <5% rappresentano una recente descrizione. Queste mutazioni erano presenti a basso livello al momento della diagnosi ed i pazienti hanno mostrato resistenza o risposta sub-ottimale alla terapia (Jadersten et al). Mutazioni di TP53 sono fortemente correlate con le aberrazioni del numero di copie che coinvolgono il cromosoma 5. Inoltre, i pazienti con TP53 mutante avevano poche altre mutazioni in altri geni implicati nelle neoplasie mieloidi. È anche importante notare la sensibilità immunohistochimica di TP53 nel predire la presenza di mutazioni TP53. In contrasto con l'alta incidenza delle mutazioni NPM1 e CEBPA nell'AML de novo, tali mutazioni sono molto rare nella MDS. WT1, GATA1 e SPI1 sono altri fattori di trascrizione che mostrano deregolazione nella MDS. La predisposizione familiare a

sviluppare AML e MDS è stata attribuita a mutazioni germinali in due fattori chiave di trascrizione ematopoietica ovvero RUNX1 e CEBPA, entrambi con specifiche anomalie ematologiche. [18,27]

Alterazioni epigenetiche

TET2. La famiglia TET (Ten-Eleven-Translocation) è formata da tre proteine (TET1, TET2 e TET3). La sua funzione è quella di ossidare la 5-metilcitosina a 5-idrossimetilcitosina in una reazione enzimatica dipendente dall' α -chetoglutarato. La perdita della funzione di TET2 a causa di mutazioni compromette la sua attività catalitica che porta all'accumulo di 5-metilcitosina.

Ci sono opinioni contrastanti sul fatto che le mutazioni di TET2 producano ipermetilazione del

DNA. Tuttavia, le mutazioni di TET2 hanno dimostrato di prevedere la risposta alla terapia con inibitori DNMT nelle MDS.

TET2, localizzato sul cromosoma 4q24, è frequentemente affetto da disomie uniparentali e da microdelezioni ed è mutato nelle neoplasie mieloidi, tra cui MDS. La frequenza di mutazione varia tra il 15 e il 27% nelle MDS e fino al 44% nella leucemia mielomonocitica cronica (LMMC). Sono state identificate mutazioni (missenso e frameshift) con conseguente perdita di funzione in tutto il gene TET2, su più clustering nei due domini conservati. Le mutazioni TET2 nelle MDS sono associate ad età avanzata e cariotipo normale (Smith et al). In contrasto con la prognosi infausta attribuita alle mutazioni TET2 nella AML, le mutazioni nelle MDS non hanno valore prognostico e non sono in grado di predire un aumento del rischio di trasformazione nella AML. I livelli di 5-idrossimetilcitosina sono ridotti nei pazienti con mutazione TET2 con un aumento complessivo di 5-metilcitosina; ciò è anche supportato da esperimenti su modelli murini, in cui l'inattivazione di TET2 porta alla perdita di 5-idrossimetilcitosina con un'espansione concomitante di cellule staminali

ematopoietiche pluripotenti con blocco della maturazione che mostrano un fenotipo simile a quello della CMML progredito a leucemia mieloide (Moran-Crusio et al). La conseguenza della presenza di 5-idrossimetilcitosina non è stata ancora completamente chiarita, tuttavia potrebbe funzionare come repressore della metilazione delle CpG. Inoltre la 5-idrossimetilcitosina è stata implicata nella regolazione della trascrizione mediante la sua distribuzione preferenziale nei siti di inizio della trascrizione e lungo esoni altamente espressi e corrisponde ad un aumento concomitante dell'espressione genica (Pastor et al). L'attività ridotta di TET2 nelle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche contribuisce alla dominanza clonale ed aumenta anche la trasformazione in AML. In particolare, si osserva una ridotta espressione di TET2 anche nei precursori eritroidi e granulociti di soggetti affetti da MDS senza mutazioni rilevabili, che suggeriscono un meccanismo alternativo di deregolamentazione ed evidenziano l'importanza fisiologica di TET2 e la funzione di soppressore tumorale svolta da questa proteina. L'identificazione di mutazioni somatiche di TET2 in individui anziani normali con emopoiesi clonale aggiunge una maggiore complessità. [7,27]

ASXL1. ASXL1(Additional Sex Combs Like 1) appartiene ad una famiglia di tre membri di proteine (ASXL1, 2, 3) che sono coinvolte nel mantenimento dell'attivazione e nel silenziamento dei geni legati allo sviluppo attraverso il rimodellamento della cromatina. Il gene ASXL1 è localizzato nella regione 20q del cromosoma 11 e aiuta a reclutare complessi polycomb e trithorax su specifiche regioni della cromatina utilizzando un omeodominio (PHD) conservato e un dominio di legame al DNA codificato principalmente dall'esone 12. Delezioni del suo omologo in Drosophila, Asx, portano allo sviluppo di un fenotipo simile ai modelli di delezione dei geni polycomb e trithorax suggerendo una funzione sovrapposta. È interessante notare che i topi knockout Asxl1 hanno alterata ematopoiesi, ma nessun effetto sulla pluripotenza delle cellule staminali.

Inoltre nel modello non è stata osservata nessuna evidenza di fenotipo MDS probabilmente a causa della ridondanza dell'omologo. E' plausibile che le mutazioni in ASXL1 causino la formazione di una proteina tronca. Mutazioni in ASXL1 sono riscontrate nel 10-21% delle MDS, nel 40% di CMML e nel 5-25% di AML. In confronto ad altri geni frequentemente mutati nella MDS, il locus del gene ASXL1 non ha un'alta frequenza di aberrazioni genomiche e sembra essere escluso dalla regione comunemente deleta 20q. Le mutazioni ASXL1 sono correlate con rischio intermedio IPSS, eccesso di blasti, minore sopravvivenza globale e un tempo più breve per la progressione leucemica. Le mutazioni sono prevalentemente localizzate nelle regioni esoniche ricche in glicina, che portano al troncamento della proteina e alla perdita del C-terminale di PHD finger. PHD finger è un motivo strutturale trovato nelle proteine nucleari coinvolte nelle modificazioni della cromatina. La proteina tronca ASXL1 non è in grado di legare l'istone metilato o di interagire con altri modificatori della cromatina. Una mutazione frameshift comune (Gly646Trp) per ASXL1 che rappresenta più del 50% delle mutazioni trovate nella MDS, è stato suggerito essere in realtà un artefatto tecnico; tuttavia, analisi del DNA e su una grande coorte di individui sani hanno confermato questa variante come somatica. Il profilo dell'espressione genica ha rivelato che il pathway di attivazione del recettore dell'acido retinoico risulta essere significativamente deregolato nei pazienti con mutazioni ASXL1. [7,27]

IDH. IDH (isocitrato deidrogenasi) si presenta nelle isoforme IDH1 (citosol) e IDH2 (mitocondriale). Sono enzimi chiave dipendenti dal NADP nel ciclo di Krebs che catalizzano la decarbossilazione dell'isocitrato in α -KG. La mutazione IDH1, originariamente descritta nei gliomi, è stata successivamente rilevata in un paziente AML mediante sequenziamento dell'intero genoma. Ulteriori studi hanno rivelato che mutazioni di IDH1 e IDH2 si verificano anche nelle MDS con una frequenza intorno al 4-12%. IDH1 e IDH2 sono sempre mutazioni missenso eterozigoti, si escludono a

vicenda e si manifestano più frequentemente sull'arginina conservata 132 in IDH1 e sull'arginina 140 e 172 nell'IDH2, dando luogo a interruzioni del sito attivo legante l'isocitrato, con conseguente incapacità nel formare a-KG ma invece ridurre a-KG al suo omologo 2-HG (Ward et al). I cambiamenti nel profilo epigenetico causato dalle mutazioni nelle proteine IDH sono simili all'effetto dovuto alle mutazioni TET2. È interessante notare che le mutazioni TET2 raramente coesistono con le mutazioni di IDH1 e IDH2. [7,27]

EZH2. EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) è un componente del polycomb repressive complex-2 (PRC2) che include anche EED, SUZ12 ed EZH1. EZH2 codifica una istone metiltransferasi che costituisce la subunità catalitica di PRC2. Questo complesso inizia la di- o la tri- metilazione della lisina 27 dell'istone 3 (H3K27), causando il silenziamento genico attraverso un "dominio SET"

conservato. EZH2 interagisce anche con DNMT3A, influenzando la metilazione del DNA.

Mutazioni somatiche di EZH2 sono state identificate nella MDS e nella malattia mieloproliferativa / MDS da due gruppi di ricerca indipendenti (Ernst et al; Nikoloski et al). Le mutazioni di EZH2 sono presenti in circa il 6-8% dei pazienti affetti da MDS. Queste mutazioni erano associate con UPD7q e meno frequentemente con del (7q). Mutazioni che portano a troncamento sono state identificate lungo tutto il gene mentre le mutazioni missenso comunemente si raggruppano nel dominio SET C-terminale e in un dominio ricco di cisteina che influenza il legame degli altri componenti del complesso PRC2. L'interruzione del dominio SET ha un effetto globale nel ridurre i livelli di H3K27me2 / me3.

È interessante notare che le mutazioni dell'altro componente del complesso PRC2 (SUZ12 ed EED) si verificano a bassa frequenza, ma comunque riducono l'attività della metiltransferasi dimostrando l'importanza dell'attività della PRC2 nelle neoplasie mieloidi

L'inattivazione di EZH2 dovuta a mutazioni, specialmente nelle MDS a

basso rischio, è stata correlata con l'assenza di H3K27me3 con mutazioni omozigoti che hanno un esito significativamente peggiore in un modello multivariato indipendente da altri indicatori prognostici conosciuti. Il verificarsi delle mutazioni nei casi di anemia refrattaria indicano la loro acquisizione nelle prime fasi della MDS, il che è in contrasto con la loro bassa frequenza nella AML de novo.

In effetti, in analisi di sequenziamento, le mutazioni di EZH2 sono state rilevate prima della trasformazione in AML. Questo è supportato dall'analisi clonale in vitro che lo ha dimostrato che le mutazioni di EZH2 si sono verificate prima dell'acquisizione della mutazione doppia TET2, suggerendo che le mutazioni in EZH2 possono non essere delle mutazioni driver. [7,27]

DNMT3A. Mutazioni DNMT3A sono state scoperte per la prima volta in un paziente affetto da AML da Ley et al (2010) i quali sequenziarono l'intero genoma e si verificano in tutta la regione codificante come mutazioni missenso o non-senso eterozigoti. A differenza dell'alta frequenza con cui vengono riscontrate nei soggetti affetti da AML, le mutazioni in DNMT3A si verificano nel 3-13% delle MDS senza associazione con alcun sottogruppo citogenetico, ma con una prognosi negativa rappresentata da un aumento del rischio di trasformazione leucemica.

Modelli murini knockout con delezione diretta di DNMT3A dimostrano l'accumulo di cellule staminali emopoietiche fenotipicamente normali, ma con una diminuzione a lungo termine nella loro capacità di differenziamento, senza differenze nei livelli di 5-metilcitosina rispetto agli animali di tipo selvatico.

Mutazioni degli spliceosomi

Una funzione essenziale in tutti gli eucarioti è un processo chiamato RNA splicing, che rimuove gli introni dal pre-mRNA per generare un RNA

messaggero maturo (mRNA) ed è mediato da un grande complesso formato da piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNP) e da proteine associate chiamate spliceosomi. L'impiego del sequenziamento ha rivelato in modo inaspettato mutazioni somatiche acquisite nelle componenti degli spliceosomi non solo nelle MDS ma anche nella leucemia cronica linfocitica (LLC). Le mutazioni che riguardano i fattori di splicing (SF3B1, U2AF1, SRSF2, ZRSR2, PRPF40B, SF1, SF3A1 e U2AF2) sono risultate essere una classe estremamente comune (45-85%) di geni mutati nelle MDS e sono prevalentemente mutazioni missenso eterozigoti e in gran parte situate in ristrette regioni proteiche. Le mutazioni di solito interessano le componenti del complesso di splicing responsabile del riconoscimento del sito di splicing al 3' durante lo splicing degli RNA o nel reclutamento di U2 snRNP, che porta alla produzione di specie di RNA non impaccate. Sebbene tutti i componenti spliceosomici mutati siano coinvolti nelle prime fasi dello splicing dell'RNA, sembrano avere differente impatto sulle funzioni cellulari, manifestandosi come fenotipi di MDS unici. L'identificazione delle mutazioni in geni multipli dello splicing dell'RNA in un pattern mutuamente esclusivo implica chiaramente che nelle MDS sono presenti alterazioni nei meccanismi di splicing cellulare. Le mutazioni dello spliceosoma possono alterare i confini tra esone ed introne inserendo in modo inappropriato introni o esoni nell'RNA e questo effetto errato potrebbe alterare la capacità della cellula di differenziarsi in globuli rossi completamente maturi dando luogo a un fenotipo displastico degli stessi. Potrebbe anche essere possibile che i lineage ematopoietici abbiano un'alta espressione delle proteine dello spliceosoma. Il ruolo delle componenti spliceosomiche nell'elaborazione di pre-RNA in pathway coinvolti nella patogenesi cancerosa, che includono il controllo del ciclo cellulare, la regolazione epigenetica, la stabilità del DNA e altri processi chiave, devono essere ulteriormente approfonditi per comprendere la patogenesi delle MDS.

SF3B1. Le mutazioni di SF3B1 (fattore di splicing 3B subunità 1) sono

presenti nel 10-20% dei pazienti con MDS e la frequenza di mutazione è estremamente alta (60-83%) nell' anemia refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS). Il rapporto tra i sideroblasti ad anello e le mutazioni di SF3B1 è evidenziato anche dalla diretta correlazione positiva tra la percentuale di sideroblasti ad anello e la frequenza di alleli mutanti. Una frequenza relativamente alta (81%) di mutazioni di SF3B1 sono state riportate anche nella RARS con trombocitosi (RARS-T), sebbene la frequenza mutazionale è estremamente bassa in altri sottogruppi di MDS. Il fenotipo clinico delle mutazioni SF3B1 oltre alla presenza di sideroblasti ad anello è rappresentato da un aumentato conteggio di piastrine e bassa emoglobina associate a una migliore sopravvivenza globale.

È possibile che la prognosi favorevole nei pazienti con MDS aventi mutazione SF3B1 sia dovuta alla presenza di sideroblasti ad anello. Le mutazioni di SF3B1 sono anche identificate con una frequenza più bassa (<5%) in altri tumori maligni, anche se con una frequenza più alta (17%) sono state osservate nella leucemia linfatica cronica refrattaria alla fludarabina ed è stato evidenziato un esito sfavorevole. Quasi la metà dei mutanti DNMT3A presentano anche mutazioni di SF3B1, suggerendo una sinergia biologica tra due pathway coinvolti nella patogenesi della MDS, un fattore dello splicing e un regolatore epigenetico.

SF3B1 è il componente chiave di U2 snRNP, che riconosce il sito di splicing alla giunzione introne-esone. Le mutazioni erano sempre alterazioni di missenso eterozigoti, raggruppate negli esoni 12-15 nei domini HEAT, con K700E come alterazione più ricorrente. La specificità e l'alta frequenza delle mutazioni SF3B1 nelle anemie refrattarie con eccesso di blasti lo rendono un candidato forte nella patogenesi di RARS e RARS-T. È possibile che queste mutazioni possano influenzare lo splicing di trascritti che codificano per proteine associate alla direzione del ferro nei precursori eritroidi, portando alla localizzazione anormale della ferritina nei mitocondri. [27]

U2AF1. U2AF1 (U2 piccolo fattore ausiliario dell'RNA nucleare 1, U2AF35)

è una piccola subunità (35-kDa) di U2AF, che interagisce con il dinucleotide AG altamente conservato dell'introne al 3'; forma un eterodimero con U2AF2 (65-kDa), che è di rado mutato nelle MDS. Le mutazioni di U2AF1 sono state rilevate nel 5-12% delle MDS, con un'incidenza lievemente maggiore nella MDS a rischio elevato. Le mutazioni di U2AF1 sono maggiormente presenti nei pazienti con anomalie nel cromosoma 20q e mutazione di ASXL1. La prova di un aumentato rischio di progressione leucemica è stata l'osservazione di una sopravvivenza generale più breve nei mutanti U2AF1 e questo ha necessitato quindi di una validazione più ampia e nel contesto di altre mutazioni coesistenti. Le mutazioni di U2AF1 sembrano essere precoci e sembra diano inizio agli eventi genetici tipici della patogenesi delle MDS, inoltre sembra che persistano nella trasformazione in AML. Le mutazioni in U2AF1 sono altamente specifiche e modificano solo due residui amminoacidici altamente conservati, Ser34 o Gln157, che risiedono nei domini zinc finger 1 (ZF1) e ZF2, rispettivamente. L'espressione di mutanti U2AF1 nelle linee cellulari hanno conferito un aumento della produzione di trascritti con sequenze introniche non tagliate e un aumento della soppressione della proliferazione cellulare piuttosto che conferire un vantaggio nella crescita clonale, implicando una mutazione con perdita della funzione. Il sequenziamento dell'mRNA delle cellule ematopoietiche con mutazione U2AF1 ha dimostrato l'accumulo di trascritti non processati ed anche uno splicing difettoso dell'introne 5 di TET2.

SRSF2. SRSF2 (fattore di splicing 2 ricco di arginina / serina), codifica per un membro della famiglia serina / arginina (RS) coinvolto nello splicing costitutivo ed alternativo ed è frequentemente (28-47%) mutato nella CMML e meno comunemente (10-13%) nella MDS de novo. Le mutazioni sono eterozigoti e si verificano quasi esclusivamente nella posizione P95 che è essenziale per il legame di SRSF2 al suo RNA bersaglio. Le mutazioni SRSF2 si correlano all'età avanzata e al genere maschile e sono associate

a mutazioni di altri geni, specialmente RUNX1, IDH2 e ASXL1.

Utilizzando la tecnologia di sequenziamento dell'RNA, è stato dimostrato che il midollo osseo dei pazienti con mutazione SRSF2 possiede un'anomalia nello splicing di RUNX1, che ha funzionalmente lo stesso effetto delle mutazioni RUNX1.

Uno studio recente (Wu et al) ha inoltre dimostrato la stabilità delle mutazioni SRSF2 durante l'evoluzione a AML, ma con l'acquisizione di altre mutazioni aggiuntive, suggerendo un ruolo di SRSF2 nella biogenesi della MDS piuttosto che nella sua progressione. Il significato prognostico della mutazione SRSF2 è ancora controverso, con suggerimento di scarsa sopravvivenza complessiva soprattutto nelle MDS a basso rischio. [7]

ZRSR2. Le mutazioni a ZRSR2 (una piccola ribonucleoproteina nucleare ausiliaria, subunità piccola 2) sono state trovate in modo variabile nel 3-11% dei pazienti con MDS con un'incidenza maggiore nei soggetti di sesso maschile che spesso mostrano neutropenia isolata. A differenza degli altri componenti spliceosomici, le mutazioni di ZRSR2 sono ampiamente distribuite lungo l'intera regione codificante e portano alla perdita della funzione delle proteine.

Anche le mutazioni TET2 sono risultate preferenzialmente presenti nei pazienti con mutazione ZRSF2.

PRPF40B, SF1, SF3A1, U2AF2, LUC7L2 e PRPF8 sono altri componenti dello spliceosoma mutati con una frequenza estremamente bassa (<2%) nei pazienti con MDS e il loro ruolo preciso nella patogenesi della MDS deve essere chiarito studiando gruppi di pazienti più estesi.

SETBP1. Il gene SETBP1, è localizzato sul cromosoma 18q21 e codifica per una proteina legante SET 1. E' stato recentemente identificato per essere frequentemente mutato nella leucemia mieloide cronica atipica (aCML). Ulteriori studi hanno identificato mutazioni SETBP1 nel 2% delle MDS e nella AML de novo, ma una frequenza superiore (4-7%) è stata rilevata nella leucemia mielomonocitica cronica (CMML) e in MDS /MPN-non

classificati (12%). Le mutazioni hanno interessato principalmente i residui 8 -874 ed erano prevalentemente mutazioni missenso eterozigoti. Le mutazioni SETBP1 si verificano spesso contemporaneamente con le mutazioni ad ASXL1 e CBL, correlate alla monosomia 7 e all'isocromosoma 17 (q) e si verificano nelle ultime fasi della malattia, influenzando il suo decorso clinico.

SETBP1 aumenta l'espressione di HOXA9 e HOXA10 legandosi direttamente ai promotori di questi geni e inoltre la sovraespressione di SETBP1 causa la stabilizzazione proteica di SET e l'inibizione di PP2A (fosfatasi proteica), portando alla proliferazione cellulare. [18,27]

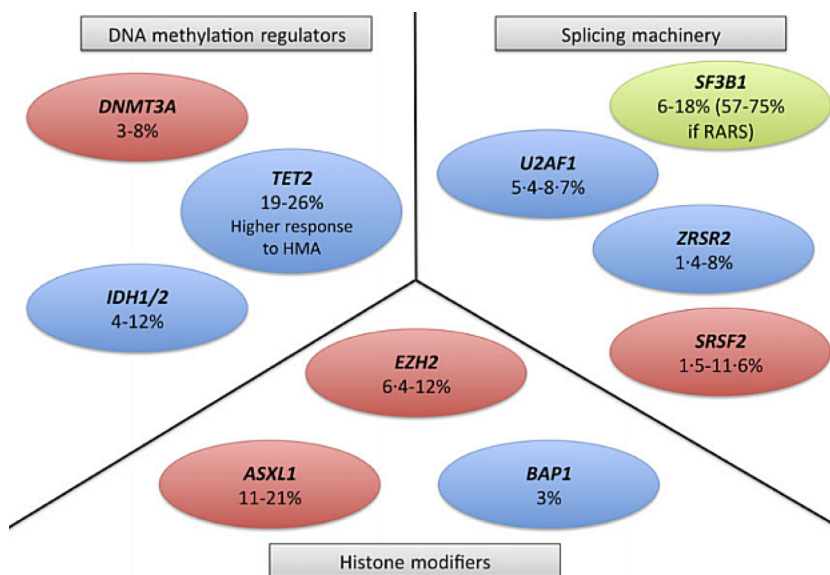


Figura 4. Regolatori epigenetici mutati nelle MDS. In rosso sono indicati i geni associati a prognosi sfavorevole, in verde quelli associati a prognosi favorevole e in blu quelli di cui non si conosce l'impatto prognostico. (Bravo GM et al. [9])

Gene	Frequency (%)
<i>SF3B1</i>	25-30
<i>TET2</i>	20-25
<i>RUNX1</i>	10-20
<i>ASXL1</i>	10-15
<i>SRSF2</i>	10-15
<i>TP53</i>	5-10
<i>U2AF1</i>	5-10
<i>NRAS/KRAS</i>	5-10
<i>DNMT3A</i>	5
<i>ZRSR2</i>	5
<i>EZH2</i>	5
<i>IDH1, IDH2</i>	2-3
<i>ETV6</i>	2
<i>CBL</i>	1-2
<i>NPM1</i>	1-2
<i>JAK2</i>	1-2
<i>SETBP1</i>	1-2
<i>SF3A1</i>	1-2
<i>SF1</i>	1-2
<i>U2AF65</i>	1-2
<i>PRPF40B</i>	1-2

Figura 5. Geni ricorrentemente mutati nelle MDS e relativa frequenza (Malcovati L. et al. [36])

1.8 Approccio terapeutico

La terapia delle MDS è si è di gran lunga evoluta negli ultimi anni, anche se il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche rimane l'unico vero trattamento curativo esistente.

I farmaci consentono di rallentare la malattia e quindi di migliorare la vita dei pazienti non idonei al trapianto.

Ci sono differenti fattori che rendono difficile l'identificazione di una linea terapeutica univoca per la maggior parte dei casi; questo è dovuto in gran parte all'eterogeneità della malattia e alla complessità delle anomalie molecolari e citogenetiche. Va inoltre ricordato che le MDS sono malattie tipiche dell'anziano pertanto terapie aggressive come il trapianto sono generalmente poco utilizzabili.

Le problematiche cliniche frequentemente riscontrate durante il trattamento dei pazienti con MDS includono: anemia con dipendenza dalle trasfusioni, sovraccarico di ferro dovuto alle trasfusioni (emosiderosi), trombocitemia e disordini qualitativi delle piastrine, difetti qualitativi e quantitativi dei neutrofili con conseguenti infezioni ricorrenti e trasformazione leucemica.

Terapia di supporto: gestione dell'anemia

L'anemia è la citopenia più frequentemente riscontrata nei pazienti affetti da MDS e si verifica in oltre il 90% dei casi sia alla diagnosi sia nel corso della malattia e spesso richiede supporto trasfusionale. L'obiettivo principale della terapia di supporto è la correzione dell'anemia e il miglioramento dei sintomi ad essa correlata.

Molti pazienti sviluppano una dipendenza da trasfusioni che è associata a prognosi negativa come documentato anche all'interno dei singoli score IPSS. Le conseguenze delle trasfusioni ripetute sono soprattutto legate a danni che si verificano a livello degli organi in particolare de muscolo cardiaco dovuti alle oscillazioni dei livelli dell'emoglobina; il rischio di infezioni e di allo-immunizzazione sono invece oggi ridotti al minimo.

Gli agenti stimolanti l'eritropoiesi (ESA) sono da considerare la terapia di prima linea nei pazienti a rischio IPSS basso o intermedio-1 e sono indicati per i pazienti con emoglobina <10g/dL e livelli di eritropoietina <500; hanno un tasso di risposta del 40-50% con una durata media di risposta approssimativamente di due anni contribuendo a innalzare i livelli di emoglobina, inducendo un miglioramento della qualità della vita dei pazienti trasfusione-indipendenti e anche per alcuni casi trasfusione-dipendenti.

I dati attualmente disponibili non permettono di poter dimostrare la superiorità di una delle molecole di ESAs sulle altre; allo stesso modo, un recente studio ha dimostrato che non ci sono differenze rilevanti tra il trattamento con ESAs da soli e il trattamento con ESAs associato a fattori

di crescita mieloidi quali G-CSF o GM-CSF.

La presenza di una bassa percentuale di blasti a livello del midollo (IPSS score basso o intermedio-1) e una scarsa necessità trasfusionale sono fattori che favoriscono la risposta agli ESAs.

La durata della risposta, anche a seguito di opportuno mantenimento, è variabile e si stima che circa il 70% delle recidive non sia dovuta a trasformazione leucemica quanto piuttosto alla perdita di sensibilità dei progenitori eritroblastici agli stessi ESAs; inoltre è stato evidenziato che nei pazienti con sindrome del 5q- a basso rischio la percentuale e la durata della risposta al trattamento sono inferiori rispetto agli altri sottogruppi di MDS a basso rischio

Musto et al. hanno rilevato una sopravvivenza migliore nei pazienti che rispondono rispetto a coloro che non rispondono anche in un ristretto gruppo di pazienti tutti trasfusione-dipendenti.

Sovraccarico di ferro dovuto alle trasfusioni: ferrochelazione

Il sovraccarico di ferro si verifica in quei pazienti con MDS trasfusione-dipendenti che ricevono 4 unità o più di globuli rossi per una durata che supera le 8 settimane. Ciascuna unità di globuli rossi contiene 200-250 mg di ferro e poiché non esiste un meccanismo efficace di eliminazione, il ferro in eccesso si accumula a livello tissutale; inoltre va ricordato che i pazienti con MDS tendono ad avere un aumento dell'assorbimento di ferro secondario a eritropoiesi inefficace. Di conseguenza nel tempo si verifica accumulo di ferro nel fegato, organi endocrini e cuore. Sebbene rara, il deposito di ferro a livello cardiaco può predisporre a cardiomiopatia, aritmia e morte improvvisa. Si pensa che i danni cardiaci possano incidere nel peggiorare la prognosi dei pazienti anziani che necessitano di supporto trasfusionale cronico.

In termini di terapia ferro-chelante il deferasirox è stato studiato in un gruppo di 152 pazienti a basso rischio e dipendenti da trasfusioni i quali hanno ricevuto un minimo di 20 unità di trasfusioni di globuli rossi. 84 di questi pazienti (55%) hanno interrotto prematuramente l'assunzione del farmaco e il 28% hanno avuto una progressione; è stato riscontrato una diminuzione significativa dei livelli di ferritina serica e una minore necessità di trasfusioni.

Tuttavia sono stati evidenziati diversi effetti collaterali dovuti a questo farmaco come ad esempio tossicità renale che lo rendono inadatto a pazienti con innalzamento della creatinina e disturbi gastroenterici. Per questi motivi non viene consigliato l'uso routinario della ferro-chelazione nelle MDS. [18,32]

Terapia immunomodulante

Questi farmaci vengono utilizzati in quanto portano ad effetti anti-citochinici, anti-angiogenetici e a un miglioramento dell'ematopoiesi che diventa più efficace.

Inizialmente veniva utilizzata la talidomide come singolo agente, che riduceva o aboliva la trasfusione-dipendenza in molti pazienti, ma al tempo stesso il suo utilizzo a lungo termine aveva effetti neurotossici significativi.

La lenalidomide, un analogo più potente e meno tossico della talidomide, ha rivelato un'inattesa efficacia nelle MDS in particolare nei pazienti con delezione 5q in cui è stata ottenuta una risposta globale dell'83%.

List et al. hanno studiato un gruppo di 43 pazienti trasfusione-dipendenti o con anemia sintomatica trattati con lenalidomide a 25 o 10 mg al giorno per 21 giorni; 24 pazienti hanno risposto e 20 hanno ottenuto una sostanziale indipendenza dalle trasfusioni e il grado di risposta è stato più alto

proprio tra i pazienti con del 5q e nelle categorie IPSS a basso rischio.

In tutti gli studi la tossicità maggiore è stata quella ematologica

(neutropenia, trombocitopenia, anche se il rischio di trombosi venose profonde non è risultato totalmente irrilevante.

Sulla base dei risultati attuali le linee guida raccomandano l'uso della lenalidomide nei pazienti con anomalia 5q- a rischio IPSS basso/intermedio-1 trasfusione dipendenti.

Terapia ipometilante

Gli agenti ipometilanti 5-azacitidina (AZA) e decitabina rappresentano l'unico strumento farmacologico per la terapia delle MDS.

Le terapie convenzionali come la polichemioterapia aventi come scopo la distruzione del clone mutato hanno poca probabilità di ottenere remissioni durature nel tempo senza ricorrere al trapianto allogenico; la chemioterapia è infatti poco efficace a causa della resistenza del clone mielodisplastico e ha una tossicità inaccettabile se utilizzata in pazienti anziani.

Al contrario gli agenti ipometilanti hanno un profilo di tollerabilità migliore rispetto alla chemioterapia convenzionale; tali farmaci permettono la differenziazione con conseguente miglioramento del quadro ematologico periferico e midollare e minor necessità di supporto trasfusionale. Sono indicati nelle MDS a rischio intermedio-2 o alto secondo l'IPSS. [50]

AZA: meccanismo d'azione

Si ritiene che azacitidina eserciti i suoi effetti antineoplastici tramite meccanismi multipli, che comprendono la citotossicità nei confronti delle cellule emopoietiche anomali del midollo osseo e l'ipometilazione del DNA. Gli effetti citotossici di azacitidina possono essere dovuti a

meccanismi multipli, che comprendono l'inibizione del DNA, dell'RNA e della sintesi proteica, l'incorporazione nell'RNA e nel DNA e l'attivazione delle vie di danneggiamento del DNA. Le cellule non proliferanti sono relativamente insensibili ad azacitidina. L'incorporazione di azacitidina nel DNA porta all'inattivazione della DNA metiltransferasi, che a sua volta causa l'ipometilazione del DNA. L'ipometilazione del DNA di geni colpiti da metilazione aberrante, coinvolti nella regolazione del normale ciclo cellulare, nella differenziazione e nei meccanismi di morte cellulare, possono risultare nella riespressione genica e nel ripristino di funzioni cancro-inibenti delle cellule del cancro. L'importanza relativa dell'ipometilazione del DNA nei confronti della citotossicità o di altre attività di azacitidina per gli esiti clinici non è stata stabilita. [36]

Il Cancer and Leukemia Group B (CALG-B) ha condotto il primo studio randomizzato di 5-azacitidina alla dose di 75mg/mq per 7 giorni ogni 28 contro terapia di supporto su MDS con differenti rischi secondo l'IPSS. Fu osservato un aumento della remissione parziale o totale nei pazienti trattati con azacitidina rispetto a quelli trattati con terapia di supporto (60% vs 5%), la durata della risposta è stata di 15 mesi e la trasformazione leucemica fu più frequente nei pazienti trattati con terapia di supporto rispetto a quelli trattati con AZA suggerendo quindi che l'azacitidina fa sì che non si verifichi trasformazione a AML.

Un successivo studio internazionale multicentrico ha paragonato AZA con il trattamento convenzionale in MDS a rischio intermedio 2 e alto ed ha evidenziato un vantaggio di AZA sia in termini di risposta e leucemizzazione sia per quanto riguarda la mediana di sopravvivenza a due anni con valori di 50% vs 26% [36,50].

Grazie agli studi clinici e alla pratica clinica è stato evidenziato che:

- Per valutare il beneficio è consigliato attendere 3-4 cicli
- Il miglioramento ematologico indotto dalla terapia è utile a prolungare la sopravvivenza
- I pazienti in cui viene riscontrata resistenza hanno in genere prognosi

sfavorevole

- L'interruzione del trattamento porta a recidiva in quasi tutti i casi.

La maggior parte delle linee guida raccomandano l'uso di AZA come terapia di elezione nei pazienti a rischio intermedio-2 o alto secondo IPSS non idonei a trapianto allogenico per età e comorbidità.

E' tuttora in fase di studio l'impiego dei demetilanti come terapia preparatoria al trapianto o come mantenimento nelle fasi post-trapianto oltre che del loro utilizzo in associazione ad altri farmaci come la lenalidomide. [19,45]

Trapianto di cellule staminali

Il trapianto allogenico è considerato l'unico approccio terapeutico utile a guarire i pazienti affetti da MDS. L'ostacolo principale deriva dalla mortalità correlata al trapianto e dalla difficoltà nell'essere utilizzato senza tossicità in una popolazione prevalentemente anziana. [19]

Un recente studio europeo ha comparato in modo non randomizzato nei pazienti in remissione dopo

trattamento con chemioterapia la progressione di coloro che avevano a disposizione un donatore all'interno della famiglia con chi era stato invece consolidato con chemioterapia o trapianto autologo. E' stato dimostrato che la sopravvivenza è considerevolmente superiore per i pazienti che disponevano di un donatore, anche se con un vantaggio limitato ai casi con score IPSS intermedio-

2 o alto e assenza di vantaggio nei casi con score basso o intermedio-1.

Tra i pazienti che non

potevano essere sottoposti al trapianto allogenico non è stata evidenziata nessuna differenza tra chemioterapia convenzionale e autotrapianto.

Il ruolo e le modalità di gestione del trapianto allogenico nelle SMD sono oggi oggetto di ampio dibattito. Uno studio condotto retrospettivamente indica che trattare i pazienti ad alto rischio tra i 60 e i 70 anni di età con

trapianto allogenico porta ad una sopravvivenza più lunga rispetto a una terapia con azacitidina [46].

Questa procedura è oggi applicabile anche oltre i 60 anni di età grazie al progresso delle tecniche di trapianto, al controllo della graft versus host disease (GVHD), all'impiego di cellule staminali periferiche e alla ridotta tossicità del trapianto e conseguente disponibilità maggiore di donatori.

Restano comunque aperti diversi quesiti:

- In quale fase della malattia il paziente possa essere dichiarato idoneo al trapianto allogenico
- Se sia appropriato indurre una remissione prima di avviare il paziente a trapianto;
- Se sia utile una terapia di mantenimento dopo il trapianto.

Non ci sono risposte certe a queste domande.

Per quanto riguarda il secondo punto, è risaputo che una persistenza di blasti midollari al momento del trapianto è un indice molto sfavorevole, ma è necessario considerare anche il rischio della chemioterapia pre-trapianto che ha scarsa efficacia e può compromettere le condizioni dei pazienti in età avanzata ai fini del successivo trapianto. In vari studi è stata dimostrata l'affidabilità e l'efficacia degli agenti demetilanti nell'indurre miglioramenti ematologici e remissioni totali con scarsa tossicità e queste evidenze rendono possibile l'ipotesi di un loro utilizzo al posto della chemioterapia convenzionale nella fase pre-trapianto.

Questa strategia si è dimostrata realizzabile e sicura in diverse esperienze prospettiche e retrospettiche. Inoltre la risposta preventiva agli agenti demetilanti sembra essere un fattore positivo per il successo del trapianto allogenico. [25]

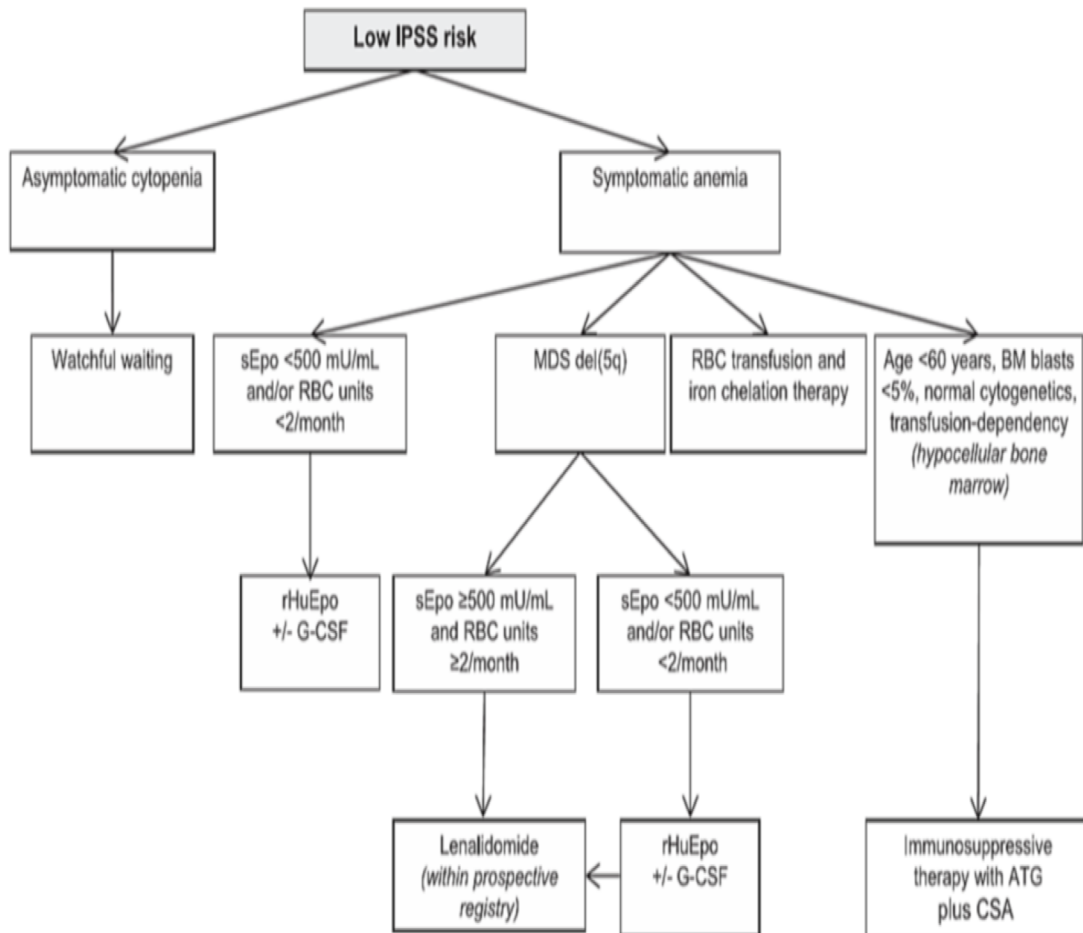


Figura 6. Algoritmo terapeutico per pazienti con MDS a basso rischio secondo l'IPSS (Malcovati et al. [36])

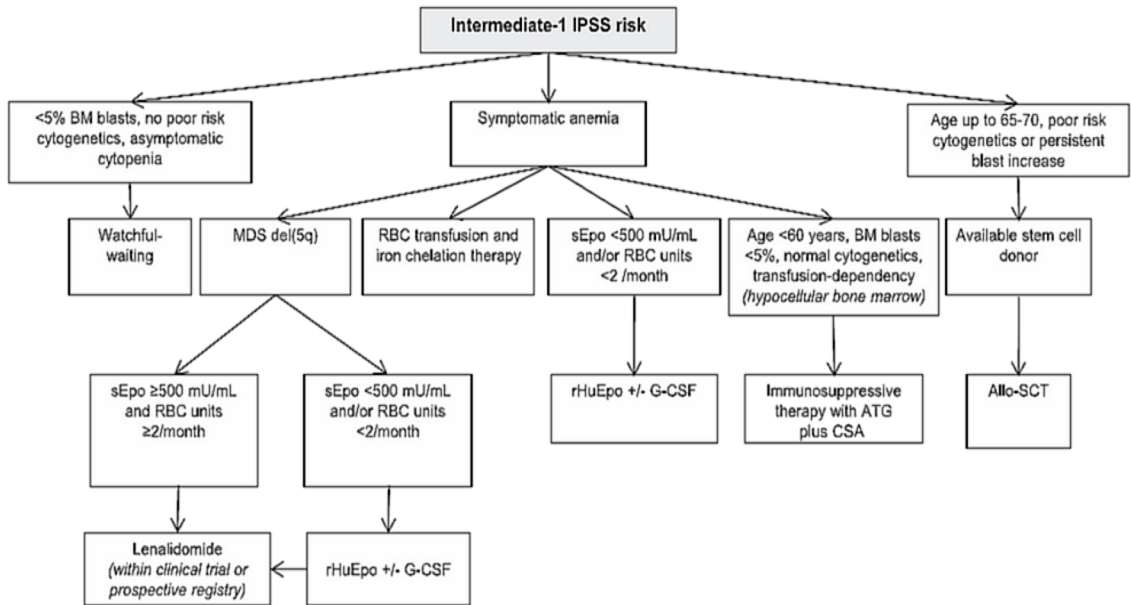


Figura 7. Algoritmo terapeutico per pazienti con MDS a rischio intermedio 1 secondo IPSS (Malcovati et al. [36])

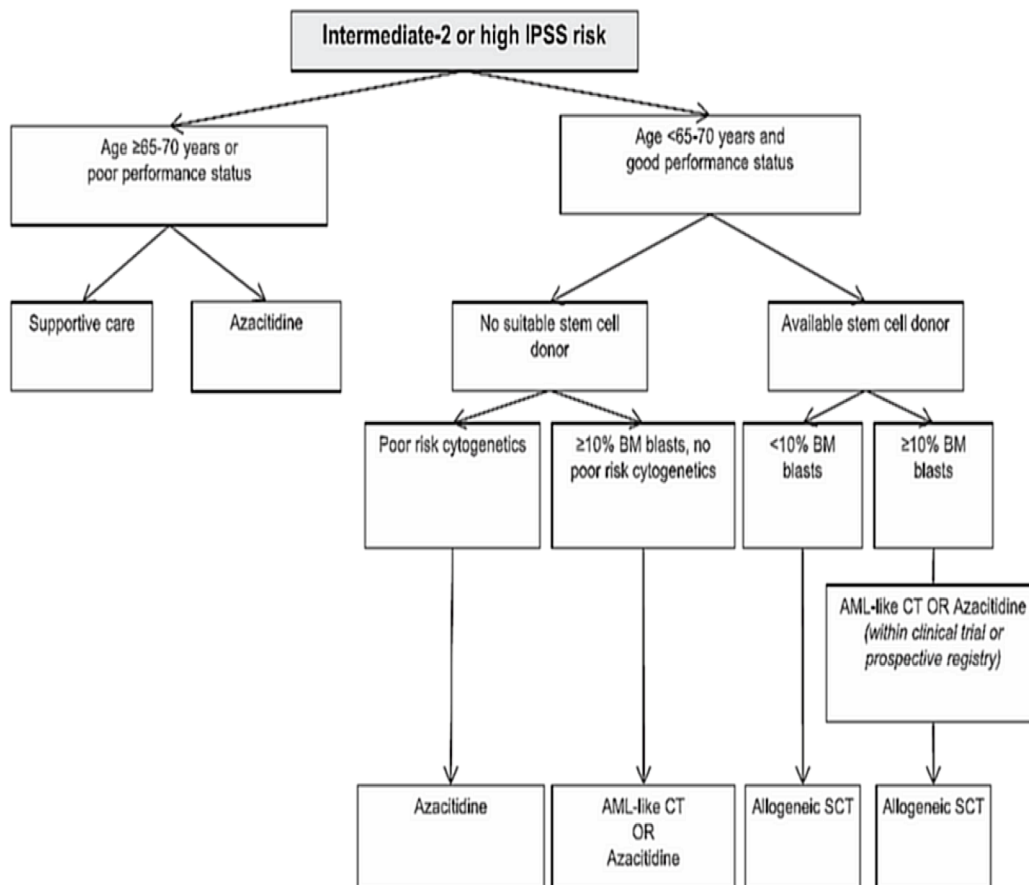


Figura 8. Algoritmo terapeutico per pazienti con MDS a rischio intermedio-2 o alto secondo IPSS (Malcovati et al. [36])

1.9 I microRNA

Il primo miRNA fu scoperto nei primi anni 90 del secolo scorso da Victor Ambros, Rhonda Feinbaum e Rosalind Lee durante uno studio condotto su lin-4, un gene deputato al controllo sulle tempistiche dello sviluppo larvale del nematode "C. elegans".

Una volta isolato il gene il gruppo di ricercatori notò che non codificava per una proteina, ma produceva piccoli frammenti di RNA e uno di questi era lungo 22 nucleotidi e simile anche se in modo parziale a sequenze multiple presenti nella regione 3'UTR dell'mRNA del gene lin-14 [31]. Si pensò che queste molecole appena scoperte avessero un ruolo nel silenziamento dell'espressione genica di lin-14 credendo fosse un prodotto genico caratteristico di "C. elegans" [37]. Nel 2000 venne scoperta un'altra piccola molecola di RNA codificata dal gene lin-7 avente azione repressiva nei confronti dell'mRNA del gene lin-41.

Negli anni successivi furono individuati altri composti simili in numerose specie. [44,48]

Nel 2001 si scoprì che gli RNA lin-4 e lin-7 fanno parte di una grande classe di piccole molecole di RNA presenti nelle cellule di C.elegans, Drosophila e dell'uomo. In un primo momento si pensava che queste molecole fossero coinvolte in processi cellulari specifici riguardanti la regolazione dello sviluppo, ma ne vennero scoperti nuovi tipi.

Queste piccole molecole di RNA furono denominate microRNA e con la loro scoperta si aprì una nuova era nella comprensione dei processi regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica. [29,30]

I miRNA costituiscono una famiglia di piccoli RNA endogeni, non codificanti, a singolo filamento (ss), di lunghezza compresa tra i 18 e i 25 nucleotidi, il cui ruolo fondamentale è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale negli animali e nelle piante. In particolare, i miRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA targets al fine di determinare la degradazione o la repressione della traduzione. [51]

Da un punto di vista funzionale è stato dimostrato che esistono numerosi miRNA in grado di riconoscere più *targets* e che molti di questi possono essere regolati da diversi miRNA. Si possono quindi considerare i singoli miRNA come piccoli elementi di controllo di pathways regolatrici più complesse, che sono alla base di numerose e fondamentali funzioni che vanno da quelle prettamente cellulari, tra cui la regolazione del ciclo cellulare, il differenziamento e l'apoptosi, a processi che riguardano l'intero organismo come lo sviluppo embrionale e la risposta immunitaria. Inoltre alcuni studi hanno evidenziato il ruolo fondamentale dei miRNA nell'auto-rinnovamento e nel differenziamento delle cellule staminali.

I miRNA svolgono le loro funzioni in modo fisiologico, poiché presentano degli specifici *patterns* di espressione temporale e spaziale. Tuttavia è stato dimostrato che nel caso in cui la loro espressione risulti essere alterata, i miRNA possono essere coinvolti in diverse malattie complesse. Pertanto, l'azione ad ampio spettro dei miRNA costituisce un nuovo ed altamente regolato livello di controllo dell'espressione genica, indispensabile nella normale fisiologia delle cellule animali e vegetali. [56,58]

ORGANIZZAZIONE NEL GENOMA UMANO DEI MICRORNA

Sono stati identificati sino ad oggi centinaia di miRNA sia mediante analisi computazionale sia mediante un approccio sperimentale.

Tutti i miRNA scoperti vengono depositati nel *Sanger centre miRBase database*, che rappresenta un vero e proprio registro dei miRNA, in cui vengono annotate tutte le loro caratteristiche. In questo *database* sono inoltre presenti informazioni riguardanti la genomica dei miRNA, ossia il modo in cui i loro geni sono organizzati sui cromosomi umani. I geni codificanti i miRNA sono distribuiti su tutti i cromosomi, eccetto il cromosoma Y, e nel 50% dei casi geni per differenti miRNA sono localizzati in loci adiacenti, organizzandosi in veri e propri *clusters*. Ciò comporta il fatto che tali

geni vengano trascritti simultaneamente generando un trascritto primario policistronico.

I miRNA in *clusters* spesso sono correlati funzionalmente. Inoltre, si ritiene che la similarità di sequenza tra i diversi miRNA in *cluster* si dovuta a fenomeni di duplicazione genica simile a quella che avviene per i geni codificanti proteine. [20,56]

Per quanto riguarda la localizzazione genomica dei miRNA, essi sono distinti in:

- miRNA intergenici
- miRNA intronici in trascritti codificanti
- miRNA intronici in trascritti non codificanti
- miRNA esonici in trascritti non codificanti.

SINTESI E FUNZIONI DEI miRNA

Il processo mediante il quale si arriva alla formazione dei miRNA maturi è alquanto complesso e si svolge attraverso numerose tappe: esso ha origine nel nucleo e giunge a terminazione nel citoplasma.

I miRNA sono prodotti mediante due reazioni di taglio dell'RNA a partire da un trascritto più lungo (chiamato pri-miRNA) con una struttura secondaria a forcina. Il primo taglio libera la forcina, chiamata pri-miRNA; il secondo produce il miRNA maturo derivato dal pre-miRNA.

Uno dei primi miRNA identificati e meglio caratterizzati è *let-7*, che nel verme *C.elegans* regola lo sviluppo e la transizione da larva ad adulto.

Inizialmente si pensava che un "braccio" della struttura a forcina del pre-miRNA fosse il miRNA regolatore. Recentemente, però, è stato dimostrato che entrambe le "braccia" della struttura originano dei miRNA funzionali, ciascuno con la propria serie di geni bersaglio. Attualmente sembra che la produzione dei miRNA a partire da entrambe le braccia sia comune.

I pre-miRNA possono essere codificati da ogni parte del trascritto ossia possono ritrovarsi nelle regioni codificanti, nelle regioni leader o negli

introni.

La struttura secondaria tipica del trascritto primario che porta un miRNA (pri-miRNA) ha reso possibile prevedere la loro presenza in funzione del previsto ripiegamento della struttura secondaria della sequenza di RNA. Inoltre, in molti casi i candidati di geni bersaglio regolati possono anche essere previsti perché il silenziamento dipende dalla complementarità tra il bersaglio e il miRNA maturo.

L'appaiamento tra il miRNA e l'RNA bersaglio inizia con l'interazione dei così detti "residui seme", che è in genere una sequenza tra le basi 2 e 9 dei 22 nucleotidi del miRNA. Questa è la regione con la maggiore complementarità e per tale motivo è la regione più utile per l'identificazione di un candidato di un gene bersaglio. Naturalmente per dimostrare la reale esistenza di un miRNA è fondamentale osservarne la presenza nelle cellule e riscontrare che l'espressione del gene dell'mRNA bersaglio è influenzata dalla sua presenza.

Per processare il trascritto pri-miRNA iniziale (contenente la struttura a forcina) per produrre un miRNA maturo sono necessari due enzimi specializzati a tagliare l'RNA.

Il primo enzima è Drosha, membro della famiglia di enzimi RNasi III che produce due tagli che eliminano dall'RNA trascritto primario la regione a forcina dell'RNA (pre-miRNA). Questo enzima opera insieme a una subunità proteica essenziale per la specificità (denominata Pasha), e insieme queste due proteine formano un complesso microprocessore attivo.

Il pre-miRNA prodotto da Drosha generalmente è lungo da 65 a 70 nucleotidi. Drosha è localizzato nel nucleo della cellula e il taglio che catalizza avviene a livello di questo distretto.

Nel pri-miRNA lo stelo formato dall'appaiamento delle basi è generalmente lungo 33bp e in esso sono presenti solo pochi appaiamenti scorretti.

Sulla “sommità” dello stelo è presente un'ansa che presenta dimensioni variabili (circa 10 nucleotidi)

Per il processamento da parte di Drosha è necessaria la presenza, ad ogni lato della struttura a forcina (5' e 3'), di RNA a singolo filamento privo di strutture secondarie rilevanti. Sono le giunzioni ssRNA-dsRNA le principali responsabili della produzione della specificità di taglio di Drosha.

Possiamo dividere la regione a stelo in due segmenti funzionali: una porzione inferiore di circa 11bp e una superiore di circa 22bp. L'enzima Drosha taglia a livello di 11bp dalla giunzione dsRNA-ssRNA quindi tra la porzione inferiore e quella superiore dello stelo nel pri-miRNA.

I due tagli quindi portano alla formazione del pre-miRNA di 65 nucleotidi costituito dalle 22bp del

dsRNA e dall'ansa superiore. Dopo l'iniziale taglio da parte di Drosha il pre-miR viene portato dal nucleo al citoplasma dall'Esportina 5, un trasportatore nucleocitoplasmatico. Il trasporto del trascritto è attivo e usa come fonte di energia il GTP legato alla proteina Ran.

Gli enzimi della famiglia RNasi III sono specifici per il dsRNA e lo tagliano in modo da lasciare una sporgenza di due nucleotidi alle estremità 3' del prodotto del dsRNA. Tale sporgenza è molto importante per il riconoscimento della molecola di RNA da parte di Dicer, l'enzima successivo in questo percorso molecolare. [56]

Il pri-miRNA liberato da Drosha viene portato nel citoplasma, dove ha luogo una seconda reazione di taglio dell'RNA da parte di Dicer. Come succede nel caso di Drosha, anche Dicer riconosce il suo sito di taglio attraverso un meccanismo che si basa sulle dimensioni e non sulla specificità della sequenza.

Dicer è costituito da tre moduli: due domini RNasi III e un dominio di legame del dsRNA chiamato dominio PAZ il cui nome deriva da tre proteine che contengono questo dominio ossia Piwi, Argonauta e Zwiille.

La struttura della proteina ha la forma di un'accetta; il dominio PAZ si trova alla base del manico, dove forma un sito di legame per l'estremità 3' del dsRNA substrato. Il manico della struttura è formato dal dominio

linker e contiene una superficie di legame per la molecola di RNA carica positivamente. Nella porzione superiore di Dicer sono presenti i due domini RNasi, disposti come un dimero simmetrico. Ciascun dominio RNasi presenta un sito attivo ed è responsabile del taglio di uno dei due filamenti dell'RNA substrato. Pertanto Dicer lavora su qualunque dsRNA a prescindere dalla sequenza e taglia questa molecola 22 nucleotidi partendo dalla sua estremità.

Il dominio PAZ àncora l'estremità 3' dell'RNA substrato, in modo tale da collocare i siti attivi dell'enzima a una distanza di circa 22 nucleotidi. La presenza di domini PAZ aventi diverse dimensioni è correlato con le dimensioni diverse dei prodotti di Dicer riscontrati nei diversi organismi. [56,58]

L'azione di Drosha e poi di Dicer dà origine alla molecola di RNA della lunghezza di 21-25 nucleotidi che guiderà la regolazione dell'espressione genica. La forma attiva del miRNA regolatore è quella a singolo filamento denominata RNA "guida", incorporata nel complesso proteico RISC (RNA Induced Silencing Complex); in questo complesso il filamento dell'RNA guida porta RISC sull'RNA bersaglio. [26]

Si pensa che una lunghezza di circa 22 nucleotidi sia la minima necessaria per identificare in modo

univoco, con un appaiamento di basi tra RNA e RNA, un unico gene bersaglio all'interno dei genomi degli eucarioti complessi.

RISC è un complesso costituito da diversi componenti, tra cui il miRNA guida. Quest'ultimo si appaia con l'mRNA bersaglio inducendo come conseguenza il silenziamento dell'espressione genica. Il componente centrale di questo complesso regolatore è una proteina che prende il nome di Argonata, un enzima che taglia l'RNA.

Il meccanismo di silenziamento genico meglio compreso è il taglio dell'mRNA bersaglio ad opera di RISC, detto anche *splicing*. Negli organismi sono presenti più membri della famiglia Argonata; nell'uomo, ad esempio, ci sono otto differenti membri anche se solo alcuni

possiedono l'attività di taglio quando vengono incorporati nel complesso RISC. I RISC che includono diversi Argonata silenziano l'espressione genica con meccanismi quali la repressione della traduzione.

La formazione e il taglio di un complesso RISC attivo avviene nel modo di seguito spiegato.

Il dsRNA prodotto da parte di Dicer è incorporato in RISC e viene denaturato in modo tale da creare il filamento guida e il filamento passeggero. Il filamento passeggero viene tagliato da Argonata e successivamente espulso dal complesso oppure, secondo un'altra teoria, il filamento passeggero viene eliminato presumibilmente da parte di una RNA elicasi senza essere prima tagliato.

Il complesso RISC così formato è chiamato RISC maturo e con l'RNA guida a singolo filamento è in grado di riconoscere e tagliare l'mRNA bersaglio.

La struttura della proteina Argonata offre uno schema per comprendere meglio il meccanismo di riconoscimento e di taglio dell'RNA bersaglio da parte di RISC.

Argonata possiede un dominio PAZ e un dominio RNasi. Il primo riconosce in maniera specifica l'estremità 3' dell'RNA guida. L'RNA guida legato è appaiato all'RNA bersaglio e l'architettura del complesso è tale che questo legame posiziona il dominio del sito attivo dell'RNasi in modo appropriato per tagliare il filamento dell'RNA bersaglio.

Il taglio avviene nel centro del duplex RNA guida-RNA bersaglio, tra il decimo e l'undicesimo nucleotide a partire dall'estremità 5' dell'RNA guida. A volte il complesso RISC maturo può inibire la traduzione del segnale invece di tagliare l'mRNA.

E' ancora oggetto di studio il meccanismo alla base della repressione traduzionale, ma pare che alcune volte il miRNA induca il sequestro dell'mRNA nei così detti corpi di processamento nel citoplasma, dove la traduzione è repressa.

Il legame del miRNA può inoltre destabilizzare la coda poli-A dell'mRNA bersaglio, bloccando l'inizio della traduzione. [20,30,56]

Quindi il miRNA all'interno di RISC si lega a sequenze specifiche degli RNA messaggeri target (3'UTR) e a questo punto il meccanismo d'azione del miRNA dipende soprattutto dalla complementarità esistente tra il miRNA stesso e il messaggero target: una perfetta complementarità tra le due sequenze (più frequente nelle piante) determina una degradazione dell'mRNA mediante un taglio endonucleotidico, mentre un'imperfetta complementarità (tipica degli animali) ha come conseguenza più probabile il blocco del processo di traduzione con conseguente diminuzione dell'espressione genica senza degradazione dell'mRNA. Recenti studi sul genoma hanno mostrato l'esistenza di due siti aggiuntivi di legame del miRNA presente nel complesso RISC oltre alla regione 3'UTR. Questi siti potrebbero essere presenti nella regione codificante o nella regione 5'UTR. Tuttavia il legame esclusivo a questi siti è caratterizzato da una minore soppressione della trascrizione dell'mRNA. [30,56]

I miRNA pertanto giocano un importante ruolo nel regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale.

Un singolo miRNA può avere differenti mRNA bersaglio e ognuno di essi può essere regolato da miRNA distinti; si ipotizza che il 30% dei geni umani sia regolato dai miRNA. Quindi ogni microRNA è in grado di modulare l'espressione genica di svariati pathways molecolari e quindi di regolare le funzioni della cellula.

1.10 MiRNA e patologia neoplastica

Le alterazioni del normale pathway di espressione dei miRNA può avere conseguenze sulla normale fisiologia cellulare e portare a diversi tipi di patologie, incluso lo sviluppo di neoplasie.

Così come per i geni codificanti proteine coinvolti nel cancro, i miRNA possono comportarsi come oncogeni, nel caso in cui un aumento della loro espressione porti al cancro, o soppressori tumorali nel caso in cui la loro assenza aumenti lo sviluppo di tumori. I primi sono situati in regioni amplificate e sono sovraespressi nel tumore e ciò determina un aumento

della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi e della riduzione dell'apoptosi; i secondi si trovano invece in regioni silenziate o delete e hanno un effetto biologico opposto.

Inoltre lo stesso miRNA può comportarsi sia da oncogene che da oncosoppressore a seconda del tipo di alterazione e del tipo cellulare; infatti alcuni miRNA sono stati ritrovati sia in regioni delete sia in regioni amplificate a seconda del tipo di neoplasia analizzata. [56]

Di tutti i miRNA che sono stati identificati nell'uomo, più della metà si trovano in regioni del genoma generalmente alterate nei tumori e perciò in molte neoplasie i geni per questi miRNA sono deleti o amplificati, a seconda della natura del riarrangiamento cromosomico.

I bersagli dei miRNA tendono ad essere geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare (proliferazione) o apoptosi; quando le cellule mostrano una crescita anormale e la perdita della funzione di apoptosi questo porta solitamente alla formazione del cancro. [49]

Ogni miRNA regola l'espressione genica di centinaia di geni bersaglio perciò se il miRNA viene espresso in maniera alterata questo porterà alla deregolazione di diversi pathway molecolari dando origine a un fenotipo cellulare di natura maligna.

Il riconoscimento di miRNA differenzialmente espressi tra tessuti tumorali e tessuti normali può aiutare a identificare miRNA specifici coinvolti nell'insorgenza di tumori nell'uomo e a stabilire il loro ruolo patogeno nella cancerogenesi.

Diversi gruppi di ricerca hanno evidenziato il coinvolgimento dei miRNA in diversi tumori solidi.

Il cancro ai polmoni è uno dei tumori più frequenti negli adulti. E' anche la principale causa di decessi correlati al cancro in molti paesi economicamente sviluppati. Evidenze emergenti suggeriscono che il miRNA let-7, localizzato in una regione del cromosoma che nel cancro subisce quasi sempre una delezione, può controllare lo sviluppo del cancro del polmone, o almeno svolgere un ruolo critico nella patogenesi di questa malattia. Takamizawa e colleghi nel 2004

osservarono che i livelli di espressione di let-7 erano frequentemente ridotti negli studi effettuati sia in vivo che in vitro sul tumore al polmone; il gruppo ha inoltre evidenziato che la ridotta espressione di let-7 è significativamente associata a un accorciamento della prospettiva di sopravvivenza, indipendentemente dallo stadio della malattia.

In una regione diversa dal cromosoma 13 (13q31) si trova miR-17-92, un miRNA oncogenico. Al

contrario di let-7, l'espressione del cluster miR-17-92 è notevolmente aumentata nel cancro al polmone, specialmente nella forma più aggressiva, il tumore polmonare a piccole cellule e il linfoma delle cellule B.

Non è ancora noto se il cluster miR-17-92 sia direttamente coinvolto nello sviluppo del cancro al polmone o se lo controlli bersagliando i geni oncosoppressori. Tra i molti bersagli ipotizzati ci sono due geni che svolgono attività di oncosoppressore, PTEN e RB2.

Il cancro alla mammella è uno dei tumori più importanti nelle donne adulte. Iorio e colleghi nel 2005 dopo aver valutato centinaia di profili di espressione di miRNA in 10 tessuti mammari normali e 76 neoplastici hanno trovato pattern di espressione di miRNA significativamente differenti tra i due tipi di tessuti; inoltre hanno osservato che l'espressione dei miRNA era correlata con specifiche caratteristiche biopatologiche del cancro alla mammella come stadio della malattia, indice di proliferazione, espressione dei recettori di estrogeni e progesterone e invasione vascolare.[15]

Altre neoplasie associate a un'errata espressione dei miRNA sono: il carcinoma del colon retto, il glioblastoma multiforme, il carcinoma papillare della tiroide e il carcinoma epatocellulare.

Diversi studi hanno dimostrato che un'espressione anormale dei miRNA è presente anche in diverse neoplasie ematologiche. [20]

Le prime dimostrazione del coinvolgimento dei miRNA nei tumori provengono proprio da uno studio molecolare il quale ha caratterizzato la delezione 13q14 nella leucemia linfocitica cronica (CLL), la forma più

comune di leucemia nell'emisfero occidentale. Questa regione del genoma contiene i miRNA *miR-15a* e *miR16a*; l'analisi dettagliata della delezione ha indicato che questi due miRNA sono gli unici due geni compresi nella delezione più piccola associata con la CLL. Inoltre l'analisi dell'espressione ha evidenziato che miR15 e miR16 erano assenti o down-regolati nella maggior parte dei pazienti affetti da CLL. Questi risultati portarono ad ipotizzare che questi miRNA avessero un ruolo oncosoppressorio e che la loro perdita contribuisse alla patogenesi della malattia, infatti quando questi due geni sono deleti, l'apoptosi è ridotta e i tumori possono insorgere e svilupparsi più facilmente.

Rispetto agli studi eseguiti sulle leucemie, sfortunatamente sono stati effettuati molti meno lavori sullo studio dei miRNA nelle MDS [54]. Comunque considerando che i microRNA agiscono da regolatori post-trascrizionali di diverse proteine il loro ruolo nella regolazione patologica epigenetica delle MDS sta diventando progressivamente rilevante [51,53], infatti sono stati trovati molti miRNA coinvolti nel controllo di specifiche fasi dell'eritopoiesi che sono deregolati nelle sindromi mielodisplastiche [52]. L'ipotesi che la deregolazione dei miRNA possa contribuire allo sviluppo delle MDS è supportata dall'analisi globale della loro espressione su grandi coorti di pazienti affetti da MDS. [54]

E' inoltre importante notare che differenti miRNA caratterizzati nelle LAM e MDS consentono l'identificazione di categorie di rischio prognostico che sono indipendenti dal sistema di punteggio prognostico internazionale rivisto (R-IPSS). [10,52]

Quindi il riconoscimento di miRNA differenzialmente espressi tra tessuti tumorali e tessuti normali può aiutare a identificare miRNA specifici coinvolti nell'insorgenza di tumori nell'uomo e a stabilire il loro ruolo patogeno nella cancerogenesi. [56]

2. SCOPO DELLA TESI

Al momento della diagnosi forse solo la valutazione in next generation sequencing (NGS) è in grado di fornire un dato biologico che caratterizzi l'andamento della malattia e che abbia anche un potere diagnostico nei casi dubbi (es. citopenia idiopatica di potenziale ignoto versus MDS); ad eccezione dei casi di MDS con delezione del cromosoma 5 o con mutazione del gene SF3B1, al momento non ci sono altri studi in biologia molecolare in grado di sostenere e/o sostituire la diagnosi morfologica.

Per questi motivi, essendo noto che i miRNA sono implicati nella patogenesi delle MDS, analizzando l'espressione dei miRNA al tempo della diagnosi, lo scopo del presente lavoro effettuato era quello di valutare:

- Differenze d'espressione di miRNA tra i diversi tipi di MDS
- La possibile esistenza di una specifica espressione di miRNA diversa per ogni tipo di MDS
- Il grado di alterazione di espressione genica
- identificare vie geniche di interesse al fine di delucidare i meccanismi di progressione di malattia

3 MATERIALI E METODI

3.1 Selezione dei pazienti ed analisi dei campioni di midollo osseo

Ventotto pazienti sono stati considerati idonei per questo studio perché soddisfacevano i nostri criteri di inclusione: (i) disponibilità del campione di midollo osseo alla diagnosi, (ii) IR-PSS e (iii) follow-up clinico.

I pazienti sono stati assegnati a diversi tipi di MDS secondo la classificazione WHO 2008.

11 pazienti erano affetti da RAEB, 9 da RA, 5 da RCMD e 3 da CMML. L'età media era di 66 anni (48-85). Otto pazienti si sono evoluti in leucemia mieloide acuta.

Il follow-up mediano è di 36 mesi (intervallo 2 - 120).

Sei pazienti erano vivi, 17 sono morti a seguito della progressione della malattia, 6 sono stati persi per il follow-up.

Anche la popolazione è stata stratificata secondo R-IPSS alla diagnosi come segue: 6 bassi, 3 intermedi-1, 6 intermedi-2, 13 alti.

L'analisi NGS è stata eseguita sull'aspirato midollare alla diagnosi con Myeloid Oncomine Panel Thermo fisher; L'espressione di miRNA è stata quantificata sull'aspirato di midollo osseo con TaqMan Advanced miRNA Card.

Isolamento di cellule mononucleate

Il sangue midollare prelevato in provette contenenti anticoagulante viene diluito 1:2 con PBS (Phosphate buffered saline) e i due liquidi vengono mescolati delicatamente con l'aiuto di una pipetta Pasteur. In un tubo Falcon da 15 ml vengono dispensati 5ml di Ficoll a temperatura ambiente. Il Ficoll è un copolimero sintetico ramificato ad alto peso molecolare che ha una densità maggiore dei linfociti ma minore dei globuli rossi e dei granulociti che quindi durante la centrifugazione verranno spinti sul fondo del tubo.

Il sangue viene stratificato lentamente sulla superficie del Ficoll avendo

cura che le due fasi rimangano separate. Per fare questo si appoggia la punta della pipetta sul lato interno del tubo stesso facendo scivolare il sangue lungo la parete del tubo per rallentare la caduta sul Ficoll. Nel caso in cui il sangue venisse fatto scorrere troppo velocemente dalla pipetta si mescolerebbe con il Ficoll e non sarebbe più possibile recuperarlo.

A questo punto i campioni sono stati posti in centrifuga per 15 minuti a 1800 rpm in assenza di freno.

La centrifugazione porta alla formazione di 4 fasi: una di plasma e PBS, un anello di colore biancastro contenente i linfociti, il Ficoll e un grande pellet contenente globuli rossi e granulociti. Con una pipetta Pasteur sterile è stato prelevato l'anello delle cellule mononucleate, aspirando con un movimento circolare lungo l'anello e trasferito il contenuto in una nuova provetta Falcon da 15ml che viene riempita di PBS per il lavaggio eseguito a 1800 rpm per 5 minuti. Viene quindi eliminato il surnatante e risospeso il pellet.

Estrazione dell'RNA

Alle cellule isolate con il suddetto procedimento viene aggiunto 1ml di Trizol.

Trizol mantiene l'integrità degli acidi nucleici e allo stesso tempo lisa le cellule e ne distrugge i componenti. È costituito da una miscela di fenolo e di guanidina isotiocinato. Quest'ultima è sia un potente inibitore di RNasi e Dnasi, sia un agente caotropico importante per la denaturazione delle proteine.

Il contenuto della Falcon viene quindi trasferito in una provetta eppendorf da 1,5 ml.

Successivamente sono stati aggiunti 260 µl di cloroformio per permettere, dopo centrifugazione a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C, la formazione di 3 fasi:

1. Una fase superiore acquosa e incolore contenente la soluzione di acidi nucleici

2.Un'interfase contenente proteine denaturate

3.Una fase organica inferiore contenente proteine solubili e DNA

La fase acquosa è stata prelevata e posta in una nuova eppendorf da 1,5 ml e ad essa sono stati aggiunti 560 µl di Isopropanolo.

Si procede quindi con un secondo step di centrifugazione a 10000 rpm per 10 minuti a 4° C.

Il surnatante ottenuto viene eliminato e il pellet, formato dall'RNA precipitato viene lavato con Etanolo al 70% e si effettua l'ultima centrifugazione con le stesse condizioni della precedente.

Infine si rimuove il surnatante e si lascia evaporare l'etanolo residuo, dopodiché si risospende il pellet di RNA in un volume appropriato di acqua "Nuclease free" e si conserva il campione così ottenuto a -20°C.

Sintesi del cDNA

Ai campioni di RNA estratto è stato aggiunto il controllo endogeno *Ath-mir 159a*.

Il DNA complementare (cDNA) è stato sintetizzato a partire da una concentrazione di RNA di 5ng utilizzando il kit *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis kit* che prevede le reazioni seguenti:

-Reazione di Poliadenilazione

In una provetta da 1,5 ml si prepara la Mix per il numero di reazioni da eseguire seguendo la tabella sottostante:

Component	1 Reaction	4 Reactions	10 Reactions
10X Poly(A) Buffer	0,5µl	2,2µl	5,5µl
ATP	0,5µl	2,2µl	5,5µl
Poly A Enzyme	0,3µl	1,3µl	3,3µl
RNase-free	1,7µl	7,5µl	18,7µl

water			
Total	3 μ l	13,2 μ l	33 μ l

La Mix così ottenuta deve essere vortexata e centrifugata brevemente affinché precipiti verso il basso e vengano eliminate eventuali bolle d'aria.

Si pongono 3 μ l di Mix in ciascuna eppendorf e si aggiungono 2 μ l di campione in modo tale che il volume finale sia 5 μ l.

A questo punto si chiudono le provette, si vortexano e si centrifugano nuovamente e si pongono nel termociclatore secondo il profilo termico descritto di seguito:

Step	Temperatura	Duration
Polyadenylation	37°C	45 min
Stop reaction	65°C	10 min
Hold	4°C	Hold

-Reazione di legame dell'adattatore

In una provetta da 1,5ml si una quantità sufficiente di Mix per il numero delle reazioni da eseguire secondo la tabella sottostante:

Component	1 Reaction	4 Reactions	10 Reactions
5X DNA Ligase Buffer	3µl	13,2µl	33µl
50% PEG 8000	4,5µl	19,8µl	49,5µl
25X Ligation Adaptor	0,6µl	2,6µl	6,6µl
RNA Ligase	1,5µl	6,6µl	16,5µl
RNase-free water	0,4µl	1,8µl	4,4µl
Total	10µl	44µl	110µl

50% PEG 8000 deve essere utilizzato a temperatura ambiente; al momento del suo utilizzo è necessario prestare attenzione in quanto il composto è molto viscoso, pertanto bisogna aspirare molto lentamente.

Si vortexa e si centrifuga brevemente la Mix

Si trasferiscono 10 µl di Mix in ciascuna provetta contenente il prodotto della reazione di poliadenilazione; il volume totale per ogni provetta deve essere 15 µl.

Si chiudono le provette e si vortexano brevemente per mescolare i componenti, si centrifugano per far scendere verso il basso tutto il contenuto e infine si pongono nel termociclatore secondo il seguente profilo termico:

Step	Temperature	Duration
Ligation	16°C	60 min
Hold	4°C	Hold

-Reazione di retrotrascrizione

In una provetta da 1,5ml si una quantità sufficiente di Mix per il numero delle reazioni da eseguire secondo la tabella sottostante:

Component	1 Reaction	4 Reactions	10 Reactions
5 RT buffer	6µl	26,4µl	66µl
dNTP mix (25mM each)	1,2µl	5,3µl	13,2µl
20X Universal RT primer	1,5µl	6,6µl	16,5µl
10X RT Enzyme Mix	3µl	13,2µl	33µl
RNase-free water	3,3µl	14,5µl	36,3µl
Total	15µl	66µl	165µl

Si vortexa e centrifugata la Mix.

Successivamente si trasferiscono 15µl di Mix in ciascuna provetta contenente il prodotto della reazione di legame dell'adattatore per un volume totale di 30µl per ciascuna provetta.

Dopo aver chiuso le provette, queste si vortexano e si centrifugano brevemente e si dispongono nel termociclatore secondo il seguente profilo termico:

Step	Temperatura	Duration
Reverse Transcription	42°C	15 min
Stop reaction	85°C	5 min
Hold	4°C	Hold

A questo punto è possibile conservare i prodotti ottenuti a -20°C per due

mesi oppure proseguire con la reazione successiva.

-Reazione di amplificazione

Come per le precedenti reazioni si prepara la Mix in una provetta da 1,5ml con le quantità indicate di seguito a seconda del numero di reazioni da eseguire:

Component	1 Reaction	4 Reactions	10 Reactions
2X miR-Amp Master Mix	25 μ l	110 μ l	275 μ l
20X miR-Amp Primer Mix	2,5 μ l	11 μ l	27,5 μ l
RNase-free water	17,5 μ l	77 μ l	192,5 μ l
Total	45 μ l	198 μ l	495 μ l

Si vortexa e centrifuga brevemente la Mix, quindi si trasferiscono 45 μ l della stessa in nuove provette.

Si aggiungono 5 μ l del prodotto della reazione di retrotrascrizione raggiungendo quindi un volume totale di 50 μ l.

Dopo averle chiuse si vortexano le provette per mescolare i componenti, si centrifugano brevemente e si dispongono nel termociclatore incubandole secondo il seguente profilo termico:

Step	Temperatura	Duration	Cycles
Enzyme activation	95°C	5 min	1
Denature	95°C	3 sec	14
Anneal/Extens ion	60°C	30 sec	14
Stop reaction	99°C	10 min	1

Hold	4°C	Hold	1
------	-----	------	---

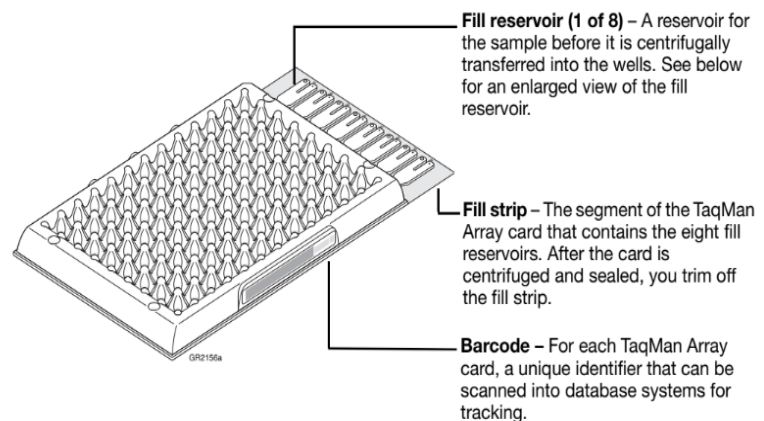
Il prodotto di questa reazione può essere conservato per due mesi a -20°C.

Analisi di espressione dei miRNA

Per l'analisi dei miRNA abbiamo utilizzato la tecnologia delle *TaqMan*[®] *Array Micro Fluidic Cards*, delle *cards* da 384 pozzetti che permettono di effettuare fino a 384 reazioni simultanee di Real Time PCR.

I miRNA sono distribuiti in due tipi di *cards*: le *cards* del pannello A contengono 377 microRNA ad ampio interesse scientifico in quanto hanno funzione nota e/o espressi; le *cards* del pannello B contengono 288 microRNA rari e meno studiati poiché aventi funzione sconosciuta e/o poco espressi.

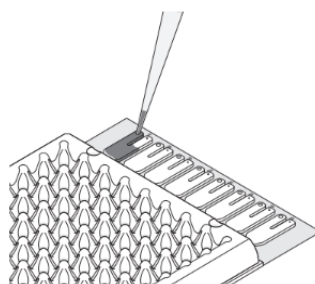
Ogni *card* è costituita da 8 *lanes* con i rispettivi canali di caricamento, ognuno dei quali connesso a 48 pozzetti.



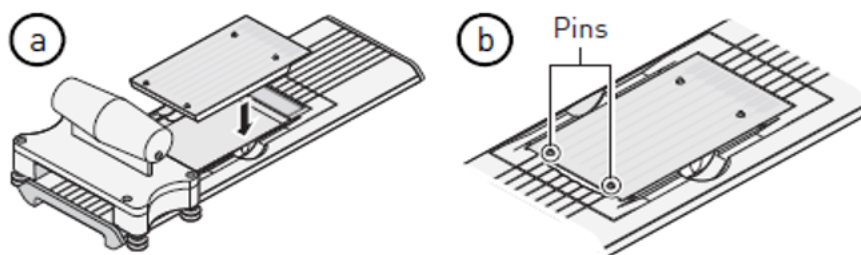
Component	1 Reaction	8 reactions (900µls to account for pipetting overage)
2X TaqMan Fast Advanced Master Mix	50µl	450µl
1:10 diluted miR-Amp reaction	25µl	225µl
Nuclease free water	25µl	225µl
Total	100µl	900µl

Dopo aver diluito i campioni di cDNA precedentemente sintetizzati con TE buffer 0,1X si prepara una Mix seguendo la tabella sottostante:

Vengono quindi caricati 100µl di Mix in ciascuna delle otto porte appoggiandovi delicatamente il puntale della pipetta, formando un angolo di 45°.



Si procede centrifugando le *cards* per 1 minuto a 1200 rpm e ripetendo l'operazione due volte, quindi si sigillano utilizzando lo strumento *Array Card Staker/Sealer*.



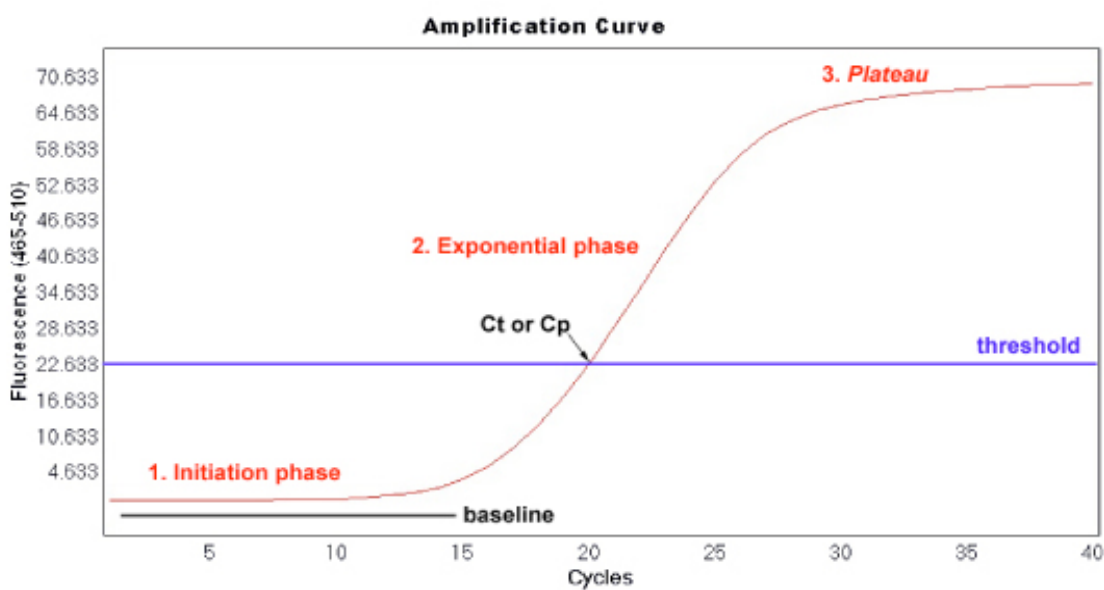
Real Time PCR

La reazione è stata condotta in una *7900HT Fast Real-Time PCR System* secondo il seguente profilo termico:

Step	Temperature	Duration	Cycles
Enzyme Activation	92°C	10 mins	1
Denature	95°C	1 sec	40
Anneal/Extend	60°C	20 sec	40

La Real Time PCR, chiamata anche PCR quantitativa, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA. Essa misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR cioè quando l'efficienza dell'amplificazione non è influenzata se non in modo

minimo dalle variabili di reazione. Piuttosto che rilevare l'ammontare totale del prodotto amplificato alla fine dei cicli di PCR, i prodotti della reazione sono determinati a partire dal ciclo in cui l'amplificato diventa rilevabile, definito ciclo soglia (Ct), permettendo in tal modo di ottenere risultati più accurati rispetto alla PCR tradizionale.



La figura mostra una tipica curva di amplificazione di una PCR. Il ciclo soglia (Ct) è rappresentato dall'intersezione della linea di threshold con la curva di amplificazione. Più elevato è il numero di copie iniziale della sequenza da amplificare, più basso sarà il valore del Ct.

La Real Time PCR include due metodi di quantificazione del prodotto amplificato: una quantificazione assoluta e una quantificazione relativa. Per la quantificazione assoluta è necessario l'utilizzo di campioni di cui sia nota la concentrazione assoluta e il numero di copie di DNA o RNA presenti, che vengono utilizzati per la costruzione di una curva standard. Interpolando i

valori di Ct del campione sulla curva standard è possibile ottenere un valore quantitativo preciso in termini di numero di copie.

La quantificazione relativa viene utilizzata per analizzare cambiamenti nell'espressione di un gene in un campione; in questo caso non è indispensabile la costruzione di una curva standard: i campioni da analizzare vengono quantificati paragonando il loro ΔCt con quello di un campione di riferimento.

La quantificazione dell'amplificato è resa possibile dalla rilevazione della fluorescenza prodotta durante la PCR per effetto di diverse reazioni chimiche; le principali sono basate sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica del DNA o sull'ibridazione di sonde specifiche.

Selezione dei miRNA WHO specifici

Per identificare quali geni sono influenzati dall'espressione dei miRNA, abbiamo proceduto all'identificazione dei miRNA espressi. È stata calcolata l'espressione media di ciascun miRNA; il valore dell'espressione di ciascun miRNA in ciascun paziente è stato confrontato con la sua espressione media: quei miRNA con valori di espressione superiori alla media sono stati considerati espressi mentre i rimanenti sono stati considerati non espressi. Dopo questa fase, sono stati selezionati i miRNA espressi nella maggior parte dei pazienti in ogni singola classe WHO.

Poiché il numero dei pazienti non è distribuito uniformemente tra le quattro classi WHO, abbiamo applicato le soglie indicate nella Tabella 1.

WHO	% occur.	# subjects
RAEB	$\geq 75\%$	12
RA	$\geq 75\%$	9
CMML	100%	3
RMCD	$\geq 80\%$	5

Tabella 1

3.2 Analisi statistiche e arricchimento di miRNA

Analisi Statistica Multivariata

Lo scopo dell'analisi statistica supervisionata e multivariata è quello di modellare la relazione tra i dati in input (i campioni) e le corrispondenti etichette (ad esempio soggetti trattati e non trattati e/o le differenti classi WHO di MDS) cercando una funzione che dipende da molte variabili (in questo caso i miRNAs). Le caratteristiche di questa funzione sono le seguenti: (1) avere una buona performance di predizione sui dati forniti in input; (2) essere generalizzabile su dati nuovi; (3) descrivere in modo efficace le relazioni tra le variabili misurate.

L'obiettivo ultimo di un classificatore è quello di predire le etichette associate a un set di esempi fornito in input. Per valutare la performance di predizione è necessario definire una metrica appropriata, come ad esempio lo score di accuratezza: l'accuratezza rappresenta il rapporto tra le etichette predette correttamente sul totale di campioni analizzati.

In questo contesto, nel mondo del machine learning, i metodi di regolarizzazione rappresentano una classe di tecniche molto usate. Lo scopo di queste tecniche è quello di minimizzare il problema di una funzione di perdita V che misura l'aderenza della funzione in oggetto ai dati e una o più penalità di regolarizzazione R che introducono altre informazioni sul tipo di problema da risolvere: $\min_f V(f(X), y) + \lambda R(f)$.

Scelte differenti sia di V che di R portano a differenti algoritmi. Il parametro λ controlla il compromesso tra l'aderenza del modello ai dati e la regolarità della funzione f . Scegliere in modo appropriato questo parametro porta ad ottenere modelli statistici "unbiased", ovvero imparziali [2]. Nelle due sezioni successive è illustrato il metodo di regolarizzazione scelto in questo lavoro e il framework di machine learning che abbiamo scelto per eseguire le nostre analisi.

Selezione di variabili tramite regolarizzazione sparsa

Come metodo multivariato di selezione di variabili, abbiamo scelto l1l2, un metodo di regolarizzazione embedded che combina due termini di penalità, uno che rafforza la sparsità (norma l1) e l'altra che si occupa di trattenere le variabili correlate (norma l2). L'algoritmo può essere regolato in modo tale da ottenere un set di variabili minimale oppure più esteso, includendo più variabili correlate. Descrizioni più dettagliate del funzionale e del metodo di ottimizzazione vanno oltre lo scopo di questo lavoro e possono essere ottenute leggendo questi lavori [12,21].

Per spiegare l1l2 è necessario assumere che si è partiti un insieme di n campioni, ciascuno rappresentato da un vettore d -dimensionale x di misurazioni (e.g., il vettore di espressione di diversi miRNAs). Inoltre ciascun campione è associato a un'etichetta y , assegnandolo così ad una classe. Si definisce binario quel problema di classificazione nel quale si hanno solo due classi (e.g., trattato o non trattato), mentre si definisce multiclasse, quel problema nel quale si hanno da 3 a più classi (e.g., le cinque classi definite da WHO).

Il dataset è rappresentato da una matrice X $n \times d$ e da un vettore y n -dimensionale delle etichette. Utilizzando solo un sottoinsieme dei dati forniti (learning set), l1l2 cerca un modello lineare $f(x) = \beta^*x$, il cui segno fornisca quella regola di classificazione che può essere usata per associare un campione ad una classe. La performance di classificazione della funzione $f(x)$ viene valutata in seguito sui campioni rimasti (test set); quelli che non sono stati utilizzati per costruire il modello nella fase precedente di training. E' necessario sottolineare che il vettore dei pesi β^* viene forzato ad essere un vettore sparso, nel quale alcune variabili hanno valore 0: quindi queste variabili non parteciperanno alla costruzione della funzione $f(x)$. Il vettore dei pesi β^* viene ottenuto nella fase definita di selezione del modello, che consiste nel selezionare i valori ottimali per i parametri di regolarizzazione. Al fine di ottenere sempre risultati imparziali, la selezione del modello e la valutazione dell'accuratezza della classificazione avvengono all'interno di

due loop innestati di cross-validazione [4]. Come conseguenza del loop esterno di cross-validazione, l1l2 fornisce un set di $B=3$ liste di variabili discriminanti, quindi è necessario scegliere un criterio appropriato [4] per ottenere una lista comune di variabili discriminanti. Il criterio usato si basa sulla frequenza assoluta, i.e., come variabili rilevanti è stato deciso di promuovere i geni più stabili su tutte le liste. Il threshold utilizzato in questo lavoro per selezionare le liste finali (i.e., 75%) è stato scelto in base alla variazione di pendenza del numero di geni selezionati vs. la frequenza. In questo modo si è scelto di escludere quelle variabili che non erano stabili tra le liste di cross-validazione.

PALLADIO

E' stato utilizzato il metodo l1l2 all'interno di PALLADIO [3], che è un framework di metodi di machine learning implementato in Python basato su metodi di regolarizzazione. In particolare lo scopo di PALLADIO è quello di fornire, insieme alle variabili rilevanti, una stima della performance predittiva del modello che consideri solo quelle variabili. L'affidabilità del risultato viene valutata sulla base dei risultati ottenuti da due set di esperimenti: uno definito *batch regolare* e uno definito *batch di permutazione*. Nel batch regolare gli esperimenti vengono eseguiti sul dataset così come viene fornito, mentre nel batch di permutazione gli esperimenti vengono eseguiti su un dataset dove la relazione tra input e output è distrutta mischiando le etichette nel training set. Per ciascun esperimento, PALLADIO ricampiona un alto numero di volte differenti sets di learning e di test. Questa procedura ha lo scopo di stimare la distribuzione dei valori di performance per entrambi i batch. In questo lavoro è stato scelto di ricampionare in totale 100 volte, eseguendo 50 esperimenti regolari e 50 esperimenti di permutazione. Le due distribuzioni, quella regolare e quella di permutazione, sono quindi confrontate testando l'ipotesi nulla H_0 , che assume che non ci siano differenze, utilizzando il test non-parametrico Wilcoxon signed-rank. Questo rappresenta il modo

migliore per misurare la robustezza statistica dei risultati ottenuti. E' necessario rigettare l'ipotesi nulla quando il p-value calcolato è più piccolo del livello di confidenza che è stato scelto. Rigettare H0 implica che c'è un'evidente differenza tra le due distribuzioni e che il numero di campioni è grande abbastanza per descrivere la relazione che sussiste tra input e output.

Caratterizzazione funzionale della signature (o firma)

Per la caratterizzazione funzionale della signature di miRNAs è stato utilizzato WebGestalt 2013 [55]. Lo strumento esegue questo tipo di analisi tramite la tecnica di arricchimento di set di geni presenti in diversi tipi di database, tra i quali ci sono Disease (nel quale le associazioni liste di geni e malattie provengono dalle inferenze dello strumento GLAD4U [22]) e The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG) [23]. Dato un pathway di KEGG e un set di riferimento (e.g., l'intero genoma umano), l'arricchimento è basato sul rapporto tra il numero di geni della signature in quel pathway e il numero di geni del riferimento che sono coinvolti nel medesimo pathway.

In questo lavoro per eseguire l'analisi di arricchimento sia in Disease che in KEGG sono stati scelti i seguenti parametri: il genoma umano come set di riferimento, un p-value $\leq 1e-6$ come livello di significatività, 10 come numero minimo di geni della signature, il metodo di Benjamini-Hochberg per correggere per l'ipotesi multipla e il test ipergeometrico come test statistico.

Strumenti di predizione di geni target

Diversi algoritmi pubblicati di predizione di geni target sono stati e vengono usati per predire le molecole target dei miRNAs. Generalmente questi softwares usano principalmente la complementarità tra le sequenze, la conservazione evolutiva tra le differenti specie e criteri di termodinamica per valutare la probabilità di una formazione di un duplex miRNA: mRNA.

Per ottenere maggiori informazioni, si raccomanda la lettura della review di Bartel pubblicata nel 2009 [5].

Per la predizione dei geni target, abbiamo considerati i seguenti tool di predizione: miRanda (<http://www.microrna.org>, [8]), mirDB (<http://mirdb.org/miRDB/index.html>, [57]), Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>, [26]), PITA (<http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07>, [24]), TargetScan (<http://targetscan.org>, [16]), ElMMo (<http://www.mirz.unibas.ch/ElMMo2>, [17]).

Per quanto riguarda TargetScan, sono stati usati i target predetti (predizione di default) del file della versione 7.0. Per il tool PITA abbiamo considerato il file "PITA_sites_hg18_0_0_ALL) dell'ultima versione del software, che è la 6. Per PicTar sono stati scaricati e utilizzati tutti i targets dal database doRiNA [9] come suggerito nella home page di questo strumento. Per quanto riguarda miRanda, si sono considerate le predizioni della versione dell'agosto del 2010. In particolare si è scelto di utilizzare il file più complete, che include "Non-good mirSVR Score and Non-conserved miRNAs". Per mirDB è stata considerata l'ultima versione, la 5.0. Infine per Elmmo la versione numero 3, che è l'ultima aggiornata a gennaio 2009. (*)

(*) Per la suddetta analisi statistica ci siamo avvalsi delle competenze di un gruppo di biostatistici e bioinformatici del Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi dell'Università degli Studi di Genova (DIBRIS).

4 Risultati

4.1 Espressione miRNA globale e nei vari sottotipi di MDS

Ciascun paziente è risultato portatore di una signature di miRNA unica e specifica; ogni miRNA signature è composta da una media di 650 miRNA, identificati come descritto nella sezione materiale e metodi.

L'analisi dei miRNA ha permesso di identificare 23 miRNA, elencati in tabella 1, potenzialmente in grado di discriminare le diverse classi WHO di MDS con accuratezza del 62% (p-value << 0.001). Inoltre è stato possibile quali miRNA sono espressi con maggior frequenza in determinati sottotipi di MDS (figura 1).

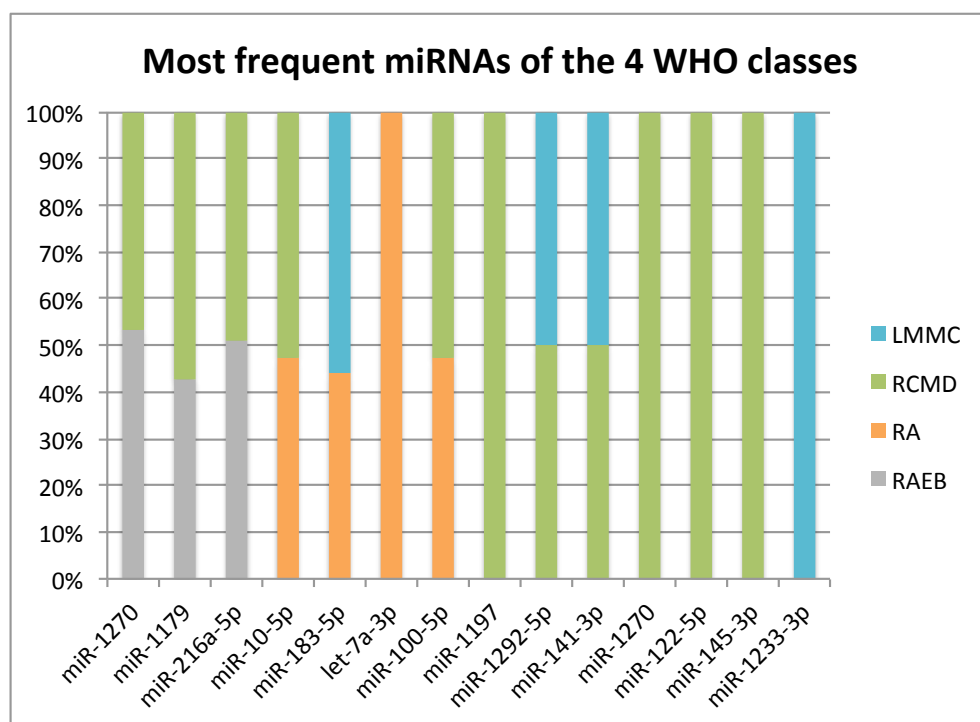


Figura 1 Grafico a dei miRNA più frequenti, per ciascuna categoria di MDS secondo la classificazione WHO, selezionato dalla firma identificata dei miRNA. LMMC = leucemia mielomonocitica cronica, RCMD = citopenia refrattaria con displasia multilineare, RA = anemia refrattaria, RAEB = anemia refrattaria con eccesso di blasti.

Tabella 1 Signature of twenty-three more frequent miRNA. Freq is the Frequency that indicates the number of times each miRNAs was selected over the number of repetitions of regular and permutation experiments (see Materials and Methods).

Freq	miRNAs
96.0	miR-1203
95.0	miR-1292-5p
95.0	miR-183-5p
95.0	miR-1197
92.0	miR-1270
92.0	miR-1178-3p
91.0	miR-141-3p
90.0	miR-100-5p
90.0	let-7a-3p
90.0	miR-10b-5p
89.0	miR-1224-3p
86.0	miR-10a-3p
84.0	miR-222-5p
84.0	miR-1233-3p
84.0	miR-1179
83.0	miR-23a-5p
82.0	miR-1236-3p
80.0	miR-122-5p
79.0	miR-129-2-3p
79.0	miR-145-3p
79.0	miR-216a-5p
79.0	miR-1302
77.0	miR-141-5p
75.0	miR-1183

4.2 Risultati dell'analisi NGS su campioni di midollo osseo alla diagnosi

Lo studio NGS ha identificato mutazioni nel 43% dei pazienti affetti da RAEB, RCMD e CMML. Tali mutazioni coinvolgono geni noti nella patogenesi e con valore prognostico come: TET2, IKZF1, WT1, SH2B3, NF1, ASXL1, RUNX1, BCOR, U2A1F, ABL1, PRPF8, SETBP1, ZRSR2, SH2B3, MFSD11, CSDE1 (figura 2 riassume la loro frequenza all'interno della popolazione in studio.)

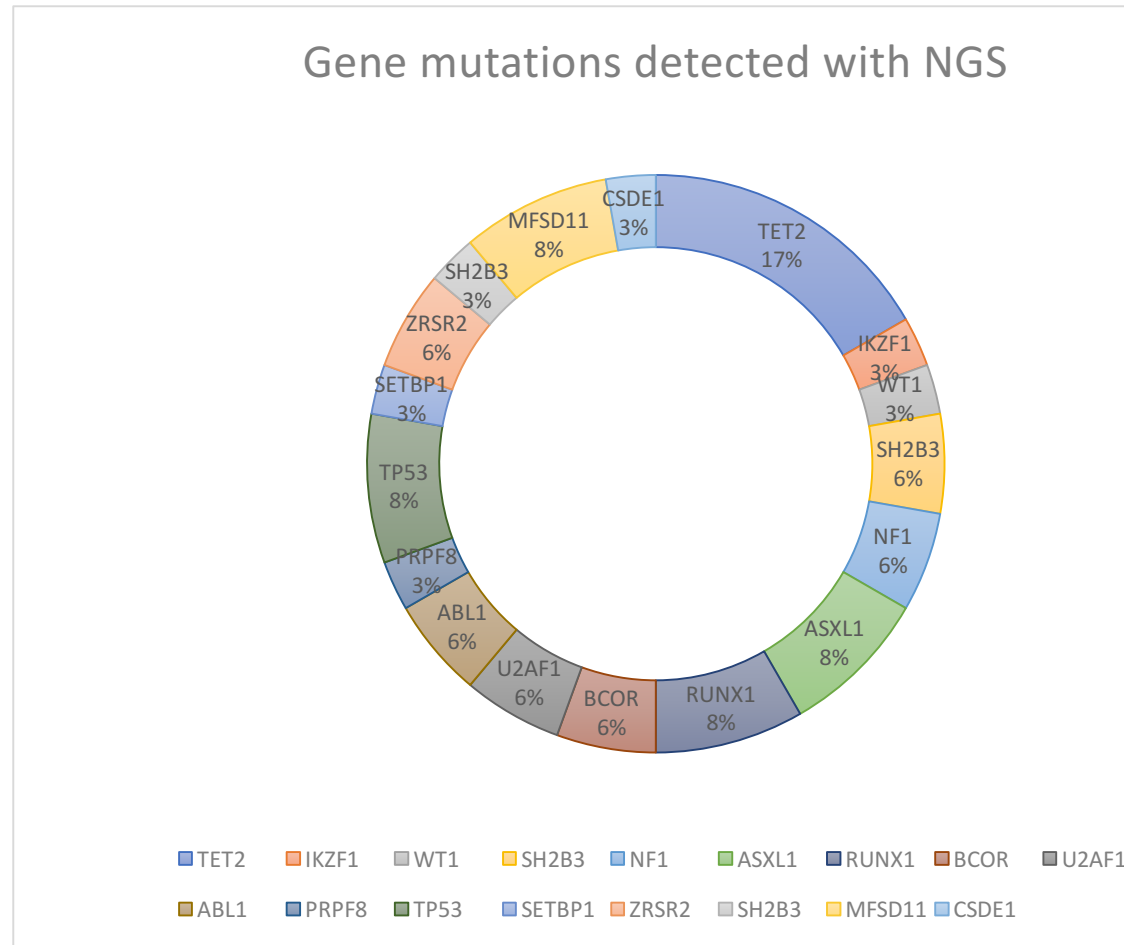


Figura 2 Frequenza delle mutazioni geniche riscontrate con metodica NGS nella popolazione in studio.

4.3 Predizione dei geni bersagli dei miRNA identificati

L'analisi di predizione dei geni bersagli dei miRNA ha generato una lista di geni che è stata confrontata con la lista completa dei geni noti nella patogenesi della MDS estrapolata dall' Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM).

Tale lista è composta da 3 gruppi:

1. Geni caratterizzati da mutazione somatica (TET2, SF3B1, ASXL1 and GNB1)
2. Geni con mutazione germinale che predispongono i soggetti portatori allo sviluppo di neoplasie mieloidi (GATA2, TERC and TERT)
3. Geni caratterizzati da mutazioni somatiche in eterozigosi (DNMT3A, U2AF1 and JAK2)

La lista dei geni bersaglio identificata dalla miRNA signature del presente studio ha permesso di mostrare che i soggetti arruolati hanno verosimilmente alterazioni nell'espressione di geni appartenenti al primo ed al terzo gruppo della lista OMIM.

La nostra miRNA signature non ha permesso di identificare nessuna verosimile alterazione di espressione dei geni con mutazione germinale.

4.4 Caratterizzazione funzionale della lista dei geni bersaglio dei miRNA

Al fine di identificare quali percorsi genici sono stati coinvolti (per lo più silenziati) dalla signature di miRNA rilevata, è stata utilizzata un'analisi funzionale utilizzando il webtoolkit WebGestalt 2017 (Zhang J. et al. 2017). All'interno di questo strumento, abbiamo considerato KEGG come database di vie geniche (Kanehisa e Goto 2000).

L'analisi di arricchimento del miRNA ha permesso di identificare i geni coinvolti in (i) vie geniche (alcune in comune ed alcune specifiche per un determinato sottotipo di MDS) probabilmente coinvolti nell'insorgenza della patologia, (ii) in geni reputati fondamentali per l'insorgenza di MDS e per evoluzione in la leucemia mieloide acuta, come riassunto nella figura 3.

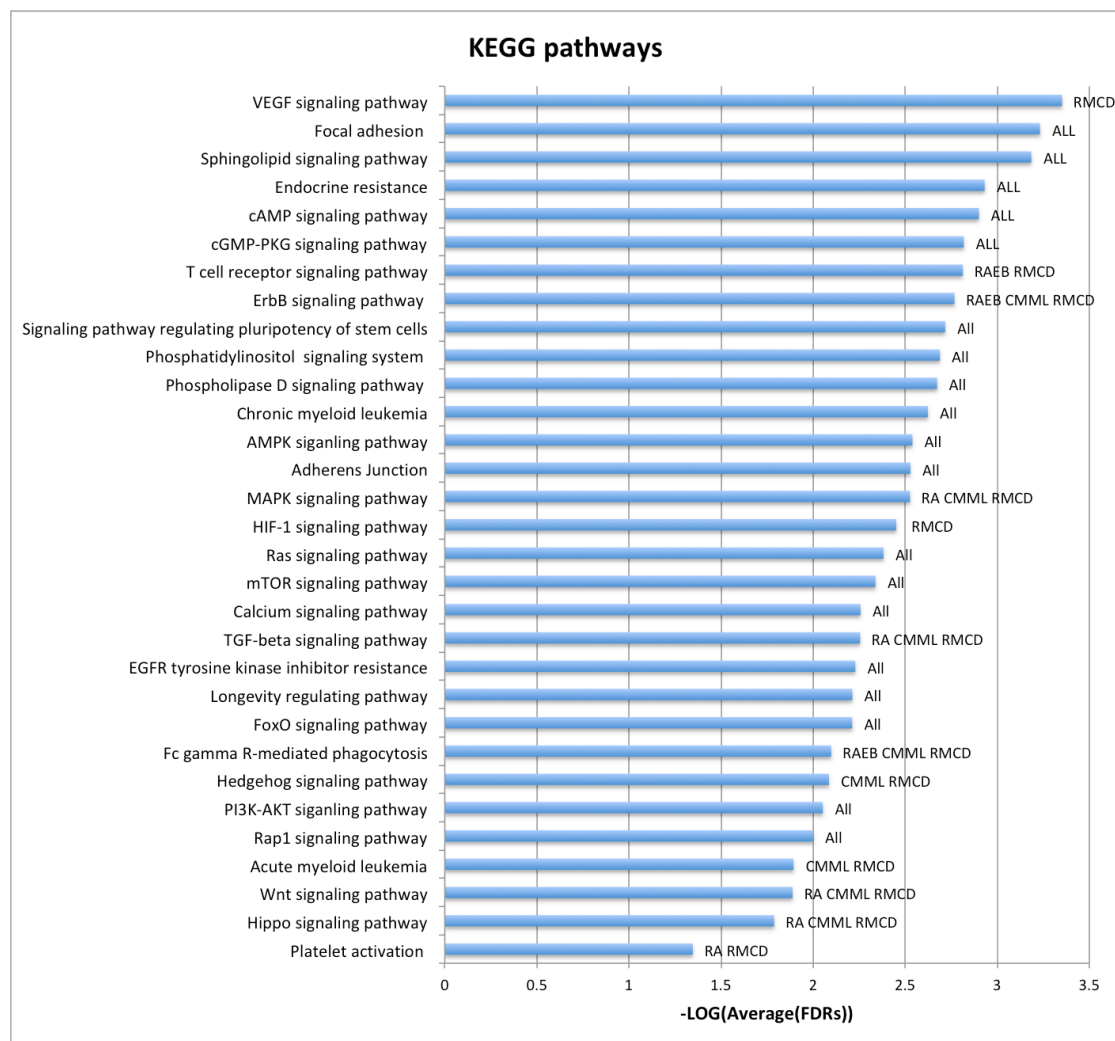


Figura 3 Vie geniche alterate nella nostra popolazione di MDS, rilevate attraverso l'arricchimento di miRNA.

Attraverso la signature miRNA ed il suo arricchimento, è stato possibile rilevare il coinvolgimento di alcune note vie di riferimento di coinvolte nella patogenesi e nella progressione della malattia come: segnalazione cAMP, mTOR, hedgehog, TGF-beta, fattore inducibile da ipossia (HIF) e fosfolipasi D. È stato anche possibile identificare altri percorsi genici che potrebbero contribuire ad alcuni dei sintomi riportati dai pazienti affetti da MDS; la signature miRNA suggerisce probabilmente il silenziamento di diversi geni coinvolti nella segnalazione del recettore delle cellule T (es. AKT serina / treonina chinasi 1-2-3, CD3e, CD4, CD8a, CD20 e CD40 ligando), recettore gamma FC e CD46.

4.4 Caratterizzazione funzionale dei pazienti affetti da anemia refrattaria con eccesso di blasti (RAEB)

Un'attenzione specifica è stata rivolta ai pazienti affetti da RAEB in quanto vi è la presenza di cellule blastiche; la quantità di cellule blastiche riflette verosimilmente una patologia con una quantità maggiore di danno genomico.

Tra i miRNA espressi nella maggior parte dei pazienti appartenenti alla classe RAEB, miR-1270 e miR-1179 sono emersi perché la caratterizzazione funzionale dei loro geni target ha ottenuto risultati interessanti di arricchimento. Entrambi influenzano TET2, probabilmente come soppressori della sua espressione.

L'arricchimento in KEGG ha dato un'associazione statisticamente rilevante di 16 percorsi di geni influenzati da miR-1270 mentre miR1179 può influenzare 19 percorsi di geni (la tabella 3 e la tabella 4 mostrano quali percorsi di geni sono controllati).

KEGG ID	Name	#Genes	FDR
hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	85	2.35e-05
hsa04012	ErbB signaling pathway	57	3.47e-05
hsa05205	Proteoglycans in cancer	112	8.59e-05
hsa04072	Phospholipase D signaling pathway	82	1.52e-04
hsa04014	Ras signaling pathway	121	1.52e-04
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	51	1.52e-04
hsa04152	AMPK signaling pathway	72	1.52e-04
hsa04071	Sphingolipid signaling pathway	69	2.91e-04
hsa04510	Focal adhesion	107	3.13e-04
hsa04068	FoxO signaling pathway	75	3.52e-04
hsa05231	Choline metabolism in cancer	59	4.52e-04
hsa04015	Rap1 signaling pathway	110	4.90e-04
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway	58	8.59e-04
hsa04150	mTOR signaling pathway	82	1.24e-03
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	59	1.54e-03
hsa04020	Calcium signaling pathway	92	4.09e-03

Tabella 2 Risultato dell'analisi di arricchimento in KEGG dell'elenco dei geni target di miR-1270.

KEGG ID	Name	#Genes	FDR
hsa05205	Proteoglycans in cancer	100	2.25e-04
hsa04152	AMPK signaling pathway	65	4.12e-04
Hsa04211	Longevity regulating pathway	52	4.12e-04
hsa05231	Choline metabolism in cancer	82	8.56e-04
hsa04071	Sphingolipid signaling pathway	62	8.56e-04
hsa04115	P53 signaling pathway	39	1.3e-03
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	44	1.55e-03
hsa04150	mTOR signaling pathway	74	1.77e-03
hsa04120	Ubiquitin mediated proteolysis	66	2.72e-03
hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	68	2.72e-03
hsa04070	Phosphatidylinositol signaling system	50	3.47e-03
hsa04014	Ras signaling pathway	101	4.38e-03
hsa04151	PI3K-AKT signaling pathway	143	4.67e-03
hsa04015	Rap1 signaling pathway	94	4.84e-03
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	81	6.48e-03
hsa04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	46	8.21e-03
hsa04520	Adherens junction	38	8.77e-03
hsa05230	Central carbon metabolism in cancer	35	8.77e-03
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway	49	8.77e-03

Tabella 3 Risultato dell'analisi di arricchimento in KEGG dell'elenco dei geni target di miR-1270.

Tra questi 16 percorsi genici, NF1, ABL1 e TP53 sono stati rilevati anche con la nostra analisi NGS (non in tutti i pazienti con RAEB).

Poiché il gene TET2 è essenziale nella patogenesi dell'MDS e può essere prognostico in termini di terapia, sono state valutate le possibili interazioni di questo gene con quelle appartenenti ad alcuni interessanti percorsi KEGG elencati nella Tabella 3 e 4 utilizzando lo strumento web STRING.

È stato possibile rilevare 85 interazioni proteina-proteina tra TET2 e geni dei "Percorsi di segnalazione che regolano la pluripotenza delle cellule staminali" (influenzato da miR1270 e miR1179) (Figura 4).

Questa rete mostra che l'interazione tra TET2 e TCF3 è conosciuta sperimentalmente (bordo rosa), mentre le interazioni tra TET2 e altre tre proteine, che sono JARID2 KRAS e JAK2, derivano da esperimenti di co-

espressione di proteine omologhe in altre specie.

JARID2 codifica per un repressore trascrizionale che interagisce con il complesso repressivo Polycomb 2 (PRC2), che svolge un ruolo essenziale nella regolazione dell'espressione genica durante lo sviluppo embrionale. Questa proteina facilita il reclutamento del complesso PRC2 nei geni bersaglio. Le mutazioni di questo gene sono associate allo sviluppo di neoplasie mieloidi.

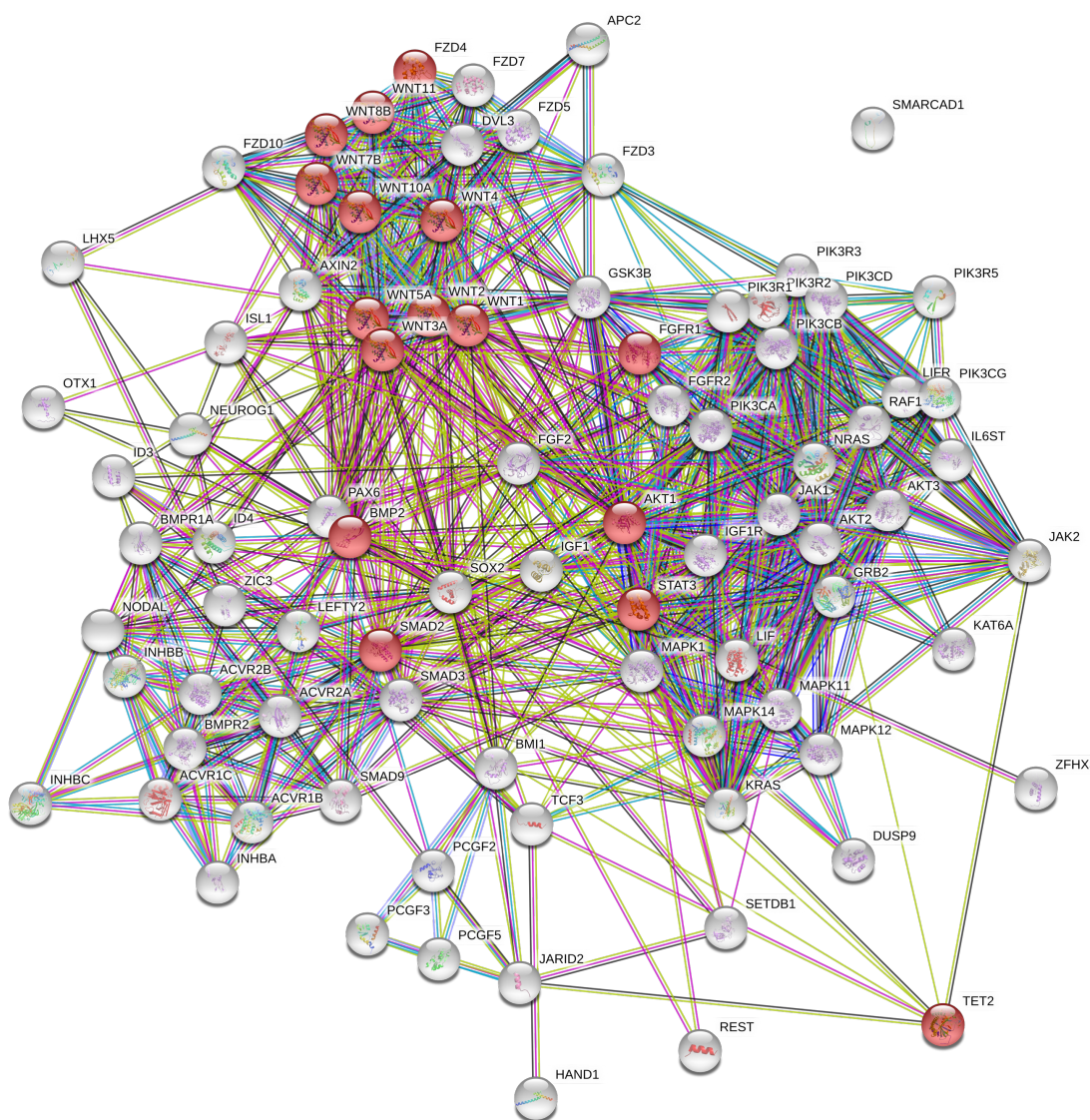


Figura 4 Abbiamo ottenuto questa rete utilizzando il database STRING. In questo contesto TET2 interagisce con le proteine TCF3, JARID2, KRAS e JAK2. L'interazione con TCF3 è determinata sperimentalmente (bordo rosa), mentre le interazioni di TET2 con JARID2, KRAS e JAK2 sono co-espressioni di proteine omologhe (bordo nero) determinate in altre specie. In rosso sono evidenziate quelle proteine che sono citate insieme in un articolo (PMID: 23675967) incentrato sul potenziale terapeutico del meccanismo alla base dell'abilità di auto-rinnovamento dell'HSC che potrebbe essere mirata a prevenire l'auto-rinnovamento delle cellule staminali leucemiche nelle neoplasie mieloidi.

4.5 miRNA condivisi e lesioni geniche coinvolte nella patogenesi delle sindromi mielodisplastiche

La signature miRNA riscontrata ed il suo arricchimento hanno permesso anche di rilevare percorsi genetici comuni tra le diverse classi WHO di pazienti affetti da MDS.

Sono stati identificati otto miRNA: miR-10B5P, miR-105, miR1835p, miR-1179p, miR-1270, miR-1413p, miR12292-5p, miR1197 (valore p <1,0e-16).

Questi miRNA influenzano i seguenti percorsi genetici in tutti i pazienti: AMPK, EGFR, RAS, longevità, RAP1.

Questo risultato suggerisce che diversi geni in diverse vie genetiche possono essere influenzati dai miRNA sopra menzionati. Le tabelle 3 e 4 sintetizzano quali processi biologici sono influenzati.

Network Stats

number of nodes: 31	expected number of edges: 19
number of edges: 116	PPI enrichment p-value: < 1.0e-16
average node degree: 7.48	<i>your network has significantly more interactions than expected (what does that mean?)</i>
avg. local clustering coefficient: 0.619	

Functional enrichments in your network

Biological Process (GO)

GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0048534	hematopoietic or lymphoid organ development	10 of 573	2.56e-05
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	13 of 1427	6.26e-05
GO:0030097	hemopoiesis	9 of 526	6.26e-05
GO:0035556	intracellular signal transduction	13 of 1528	9.07e-05
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	23 of 5982	0.00025

(more ...)

Molecular Function (GO)

GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0036002	pre-mRNA binding	4 of 36	0.00012
GO:1901363	heterocyclic compound binding	21 of 5305	0.00040
GO:0097159	organic cyclic compound binding	21 of 5382	0.00040
GO:0051219	phosphoprotein binding	4 of 80	0.00063
GO:0003676	nucleic acid binding	16 of 3332	0.00063

(more ...)

Cellular Component (GO)

GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0016604	nuclear body	9 of 742	0.00036
GO:0005654	nucleoplasm	17 of 3446	0.00036
GO:0031981	nuclear lumen	18 of 4030	0.00042
GO:0032991	protein-containing complex	19 of 4792	0.00084
GO:0089701	U2AF	2 of 7	0.0028

Tabella 3

Reference publications			
<i>publication</i>	<i>(year) title</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
PMID:29326119	(2018) Association of mutations with morphological dyspla...	13 of 33	8.30e-23
PMID:28560052	(2017) Genomic profile of a patient with triple negative ess...	14 of 48	8.30e-23
PMID:28495918	(2017) Bone marrow morphology is a strong discriminator ...	14 of 48	8.30e-23
PMID:28487787	(2017) EBV-Negative Monomorphic B-Cell Posttransplant L...	15 of 72	8.30e-23
PMID:26796102	(2016) Clinical evaluation of panel testing by next-generatio...	14 of 51	8.30e-23
<i>(more ...)</i>			
KEGG Pathways			
<i>pathway</i>	<i>description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
hsa04014	Ras signaling pathway	12 of 228	1.65e-13
hsa05214	Glioma	6 of 68	1.34e-07
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	6 of 78	1.93e-07
hsa04015	Rap1 signaling pathway	7 of 203	1.29e-06
hsa05220	Chronic myeloid leukemia	5 of 76	4.28e-06
<i>(more ...)</i>			
Reactome Pathways			
<i>pathway</i>	<i>description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
HSA-162582	Signal Transduction	16 of 2605	0.00013
HSA-6802949	Signaling by RAS mutants	4 of 52	0.00026
HSA-5673001	RAF/MAP kinase cascade	6 of 229	0.00026
HSA-5663202	Diseases of signal transduction	6 of 360	0.00093
HSA-74160	Gene expression (Transcription)	10 of 1366	0.0013
<i>(more ...)</i>			
UniProt Keywords			
<i>keyword</i>	<i>description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
KW-0597	Phosphoprotein	26 of 8066	0.00017
KW-0156	Chromatin regulator	6 of 287	0.00035
KW-9995	Disease	17 of 3799	0.00040
KW-0043	Tumor suppressor	5 of 180	0.00040
KW-0418	Kinase	7 of 631	0.0012

Tabella 4

I miRNA sopra menzionati sono presenti in tutti i pazienti; è ragionevole suggerire che questi possono alterati all'inizio della malattia.

Inoltre, probabilmente agiscono come soppressori post-trascrizionali nei percorsi genetici che sono stati descritti come fondamentali per la normale emopoiesi.

L'analisi STRING ha permesso di rilevare le interazioni proteina-proteina tra i geni controllati dalla signature miRNA rilevata e i geni mutati rilevati in NGS (figura 5).

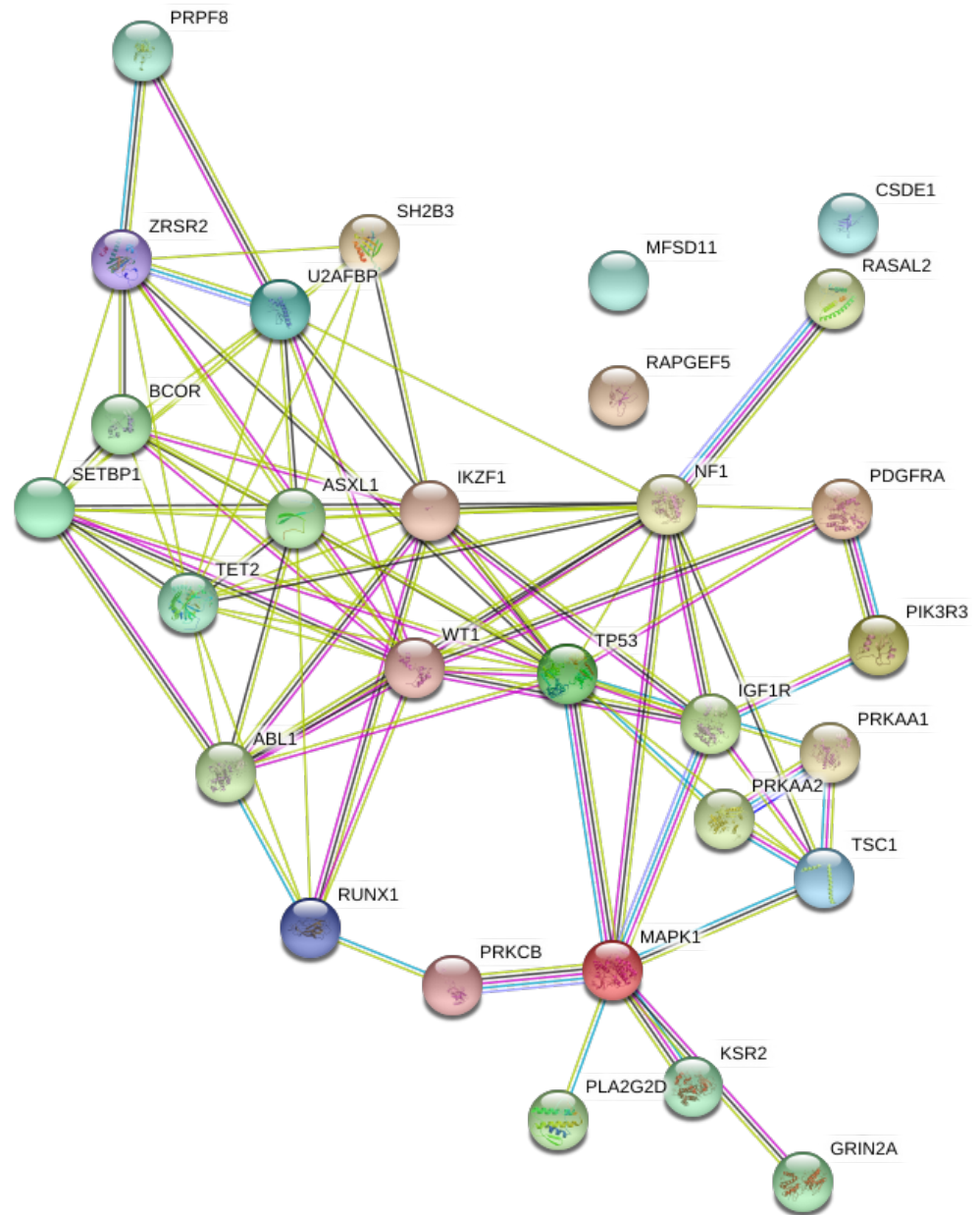


Figura 5 Analisi STRING tra i geni influenzati dagli 8 miRNA comuni e i geni mutati riscontrati con metodica NGS. Le linee azzurre indicano una forte interazione proteina-proteina. Da notare 3 outlier: MFSD11, CSDE1 e RAPGEF5. Questi verosimilmente non hanno nessun ruolo nell'insorgenza e nella progressione delle sindromi mielodisplastiche.

Tre geni non hanno nessuna interazione in STRING: RAPGEF5, CSDE1, MFSD11. Questo risultato suggerisce che anche se la signature miRNA può influenzare negativamente l'espressione di questi geni, essi non sono coinvolti né nella patogenesi dell'MDS né nella sua progressione in leucemia mieloide acuta.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le MDS sono un gruppo di malattie con diversi aspetti clinici derivanti da una patogenesi complessa.

Numerosi meccanismi di danno al DNA possono essere rilevati mediante SNP array, valutazione NGS e miRNA.

Il presente studio ha valutato retrospettivamente la presenza dell'espressione di miRNA in una coorte di pazienti affetti da MDS.

Come descritto da altri gruppi, abbiamo identificato diverse mutazioni tramite NGS in geni noti coinvolti nella patogenesi e nella progressione della malattia; comunque, un tasso del 43% di mutazioni genetiche è una sottovalutazione del tasso reale di mutazione in corso di MDS come dimostrato da casistiche più ampie. Il nostro risultato forse è una conseguenza di vecchi campioni testati per NGS; infatti, la degradazione del DNA è un meccanismo ben noto per il fallimento dell'analisi NGS.

Abbiamo deciso di concentrarci sull'analisi dei miRNA per diversi motivi: (i) l'RNA non si degrada nel tempo, (ii) i miRNA sono ben noti meccanismi di regolazione post-trascrizionale, (iii) alcuni miRNA sono stati associati ad alcuni tipi specifici di MDS.

La nostra analisi potrebbe identificare una signature di miRNA specifica per ogni paziente; è stato anche in grado di discriminare diversi tipi di MDS in base alla classificazione WHO (valore $p \ll 0,001$).

Vale la pena sottolineare che il sistema di classificazione delle MDS si basa sulla morfologia delle cellule, sul grado di pancitopenia e sul cariotipo.

Ad eccezione di SF3B1 e del cromosoma di delezione 5q, che sono risultati che definiscono un sottogruppo specifico di MDS, non esiste alcun test in biologia molecolare che possa sostenere la diagnosi di un tipo specifico di MDS. Questa analisi offre un contributo diverso nella definizione di tipi specifici di MDS.

Inoltre, l'arricchimento dei miRNA ha permesso un'analisi più approfondita dell'alterazione dei miRNA nella nostra popolazione: la previsione del target genetico della nostra signature di miRNA è stata in grado di rilevare verosimili alterazione di espressione di geni coinvolti nello splicing dell'RNA e nel

controllo epigenetico, ma non quelli coinvolti nella predisposizione germinale alle neoplasie mieloidi.

Questo risultato suggerisce che le MDS insorte in pazienti con mutazioni di TERT, TERC e GATA2 possono avere una patogenesi diversa anche se alcuni meccanismi di insorgenza e progressione della malattia sono condivisi con i casi de novo (come quelli della nostra popolazione).

Inoltre, l'arricchimento di miRNA è stato in grado di identificare nella nostra popolazione geni coinvolti nella patogenesi delle MDS e nella progressione leucemica.

È interessante notare che la signature dei miRNA in questo studio influenza i geni coinvolti nel sistema immunitario; questo risultato può essere il punto di partenza per speculare sul rischio infettivo, sul tasso di infezioni opportunistiche e sugli eventi autoimmuni in corso di MDS. Comunque, questo aspetto non è stato esplorato a causa della mancanza di dati clinici sugli eventi infettivi e perché la nostra popolazione di studio è relativamente limitata.

La caratterizzazione funzionale di pazienti affetti da RAEB ha suggerito un'espressione genetica fortemente alterata. Abbiamo rilevato un tasso più elevato di mutazioni con metodica NGS in tale gruppo, ma abbiamo identificato due miRNA (mir-1270 e mir-1179) con un arricchimento interessante: ciò suggerisce una possibile ampia lesione genetica come suggerito nella figura 3.

L'analisi STRING ha mostrato diverse interazioni proteina-proteina probabilmente influenzate dai miRNA identificati dal presente studio.

Anche se non vi è alcuna mutazione, tutti i geni illustrati nella figura 3 sono probabilmente "silenziati" dai miRNA identificati nel nostro studio e ciò potrebbe contribuire all'insorgenza di RAEB.

È noto che la mutazione in TET2 abbia come conseguenza una perdita di funzione di questo gene; questo studio ha mostrato che TET2 è un bersaglio di miRNA1270 e miR-1179 causandone probabilmente la perdita di funzione. È ragionevole suggerire che questa espressione di miRNA e le mutazioni genetiche contribuiscono insieme all'aspetto clinico/morfologico della

malattia.

La disponibilità di un'ampia signature di miRNA ha permesso anche un diverso punto di vista sulla patogenesi della malattia: è stato possibile identificare 8 miRNA che influenzano vie geniche comuni a tutti i pazienti.

Il coinvolgimento delle vie geniche di AMPK, EGFR, RAS, longevity, RAP1 è in geni specifici (tabella 7) ma che sono comuni alle vie geniche sopracitate.

AMPK	RAS	EGFR	Longevity	RAP1
IGF1R	GRIN2A	IGF1R	IGF1R	IGF1R
PRKAA2	IGF1R	NF1	PRKAA2	PDGFRA
TSC1	KSR2		TSC1	RAPGEF5
	MAPK1			
	NF1			
	PDGFRA			
	PIK3R3			
	PLA2G2D			
	PRKCB			
	RAPGEF5			
	RASAL2			

Tabella 5 – geni influenzati dagli 8 miRNA comuni in tutti i pazienti. I miRNA influenzano gli stessi geni e altri specifici percorsi, suggerendo un meccanismo ridondante di progressione della malattia. I diversi colori evidenziano lo stesso gene essere presente in diverse vie geniche.

Questo suggerisce un meccanismo ridondante di progressione della malattia, che è in linea con il noto effetto di un singolo miRNA su diverse vie geniche.

Inoltre, queste vie geniche sono state precedentemente descritte come fondamentali per la normale emopoiesi e la maturazione cellulare [59]; è plausibile che questi 8 miRNA siano quelli coinvolti nella fase iniziale della malattia e siano probabilmente il primo meccanismo di alterazione cellulare / progressione della malattia. Ad ogni modo, i nostri risultati non riescono a chiarire se gli 8 miRNA sono la causa dell'alterata epigenetica nell'MDS o ne sono la conseguenza.

È ragionevole pensare che questi primi miRNA influenzino i geni fondamentali nei normali processi cellulari e nella regolazione di altri miRNA;

ciò giustificherebbe un effetto domino nei pazienti con MDS, in cui vi sono dei miRNA comuni alterati precocemente che diventano specifici per ogni singolo paziente con la progressione della malattia a causa del coinvolgimento di altri geni e di altri miRNA. Questa è una teoria interessante che necessita di ulteriori convalide in vitro, ma un meccanismo analogo era già stato descritto nella leucemia linfoblastica acuta pediatrica [60].

Ad ogni modo, questo studio ha diversi limiti: casistica piccola, analisi retrospettiva e non selezione di cellule CD34 +.

Considerando la presenza di cloni cellulari diversi in corso di MDS, la nostra signature di miRNA potrebbe non essere l'espressione di un solo clone. Quello dominante può influenzare il risultato della signature riscontrata nascondendo quella di cloni minori o questi possono "contaminare" il risultato miRNA riscontrato.

Inoltre, la piccola popolazione non consente l'identificazione di altri miRNA specifici per ogni sottotipo WHO e non è possibile determinare una signature che può essere prognostica in termini di trasformazione in leucemia mieloide acuta o di sensibilità a terapia ipometilante.

In conclusione, la signature miRNA e il suo arricchimento possono diventare potenziali strumenti per definire la diagnosi di ciascun sottotipo MDS; l'integrazione di questa strategia con NGS necessita di una popolazione più ampia e omogenea per definire ulteriormente quali percorsi genetici sono coinvolti e quali miRNA possono essere utili per comprendere ulteriormente la patogenesi dell'MDS e predire la risposta al trattamento ipometilante.

Inoltre, questo studio suggerisce che la regolazione epigenetica nell'MDS non è solo una conseguenza dell'alterata metilazione del DNA, ma è anche una conseguenza di una disregolazione dei miRNA che causa un ampio danno genetico che si va ad espandere/propagare in concomitanza della progressione di malattia.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Arber D.A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016. 127(20): p. 2391-405
2. C. Ambrose and G. J. McLachlan. Selection bias in gene extraction on the basis of microarray *America*, 99(10):6562–6, may 2002.
3. M. Barbieri, S. Fiorini, F. Tomasi, and A. Barla. PALLADIO: a parallel framework for robust variable selection in high-dimensional data. *Proceedings of the 6th Workshop on Python for High-Performance and Scientific Computing*, pages 19–26, 2016.
4. A. Barla, S. Mosci, L. Rosasco, and A. Verri. A method for robust variable selection with significance assessment. *Proceedings of ESANN*. 2008.
5. David P. Bartel. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2):215–233, jan 2009.
6. Bayeva M, Khechaduri A, Puig S, et al. MTOR regulates cellular iron homeostasis through tristetraproline. *Cell Metab.* 2012;16(5):645-657. doi:10.1016/j.cmet. 2012.10.001.
7. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014;124(18):2793-2803. doi:10.1182/blood-2014-04-522136.
8. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*, 36:D149-53
9. K. Blin, C. Dieterich, R. Wurmus, N. Rajewsky, M. Landthaler, and A. Akalin. DoRiNA 2.0 upgrading the doRiNA database of RNA interactions in post-transcriptional regulation. *Nucleic Acids Research*, 43(D1):D160–D167, jan 2015.

- 10.** Bravo GM, Lee E, Merchan B, Kantarjian HM, García-Manero G. Integrating genetics and epigenetics in myelodysplastic syndromes: advances in pathogenesis and disease evolution. *Br J Haematol.* 2014;166(5):646-659. doi:10.1111/bjh.12957
- 11.** George A. Calin and Carlo M. Croce MicroRNA signatures in human cancers
- 12.** C. De Mol, E. De Vito, and L. Rosasco. Elastic-Net Regularization in Learning Theory. jul 2008
- 13.** Fazi, F., Racanicchi, S., Zardo, G., Starnes, L.M., Mancini, M., Travaglini L., Diverio, D., Ammatuna, E., Cimino, G., Lo-Coco, F., Grignani, F., and Nervi, C. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell*, 12: 457-466, 2007.
- 14.** Fenaux P, Adès L. How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013;121 (21):4280-4286.
- 15.** Fenaux P, Mufti G, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomized, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 2009;10(3):223-232.
- 16.** R. C. Friedman, K. K. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1):92–105, oct 2008.
- 17.** D. Gaidatzis, E. van Nimwegen, J. Hausser, and M. Zavolan. Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC bioinformatics*, 8(1):69, mar 2007.
- 18.** Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol.* 2016;91(1):76-89. doi:10.1002/ajh.24253.

- 19.**Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2015;90(9):831-841. doi:10.1002/ajh.24102
- 20.**Gordon JEA, Wong JJ-L, Rasko JEJ. MicroRNAs in myeloid malignancies. *Br J Haematol.* 2013;162(2):162-176. doi:10.1111/bjh.12364.
- 21.**T. Hastie, R. Tibshirani, and M. Wainwright. *Statistical learning with Sparsity: the lasso and generalizations.* CRC Press. 2015.
- 22.** J. Jourquin, D. Duncan, Z. Shi and B. Zhang. GLAD4U: deriving and prioritizing gene lists from PubMed literature. *BMC genomics*, 13 Suppl 8:S20, 2012.
- 23.** M. Kanehisa and S. Goto. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(1):29–34, 1999.
- 24.**M. Kertesz, N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul, and E. Segal. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics*, 39(10):1278–1284, oct 2007.
- 25.**Kim DY, Lee JH, Park YH, Kim SD, Choi Y, Lee SB et al. Feasibility of hypomethylating agents followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2012;47 (3):374-379.
- 26.** A. Krek, D. Grün, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel, and N. Rajewsky. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5):495–500,
- 27.**Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes.

Br J Haematol. 2013;162(5):587-605. doi:10.1111/bjh.12435.

28.Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs , in Science, vol. 294, n° 5543, Ottobre 2001.

29.Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in C.elegans, in Science, vol. 294, n° 5543 Ottobre 2001.

30.Lawrie CH. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. Br J Haematol. 2007;137(6):503-512. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06611.x.

31.Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14, in Cell, vol. 75, n° 75, December 1993.

32.Leitch HA, Vickars LM. Supportive care and chelation therapy in MDS: are we saving lives or just lowering iron? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. January 2009:664-672. doi:10.1182/asheducation-2009.1.664.

33.List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic Syndromes. N Engl J Med 2005;352(6):549-557.

34.Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. Science, 2004303, 95–98.

35.Malcovati L, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino

E et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* 2005;(23):7594-7603.

36. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the Europe LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943-2964. doi:10.1182/blood2013-03-492884.

37. Moss EG. MicroRNAs: hidden in the genome. *Curr Biol*. 2002;12(4):R138-R140. 6.

38. Mundle S, Lefebvre P, Vekeman F, Duh S, Rastogi R, Moyo V. An assessment of erythroid response to epoetin alpha as a single agent versus in combination with granulocyte-or granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in myelodysplastic syndromes using a meta-analysis approach. *Cancer* 2009;115(4):706-715.

39. Musto P, Villani O, Martorelli MC, Pietrantonio G, Guariglia R, Mansueto G et al. Response to recombinant erythropoietin alpha, without the adjunction of granulocyte-colony stimulating factor, is associated with a longer survival in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2010;34:(8)981-985.

40. O'Connell RM, Zhao JL, Rao DS. MicroRNA function in myeloid biology. *Blood*. 2011;118(11):2960-2969. doi:10.1182/blood-2011-03-291971.

41. Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemic cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci*. 2009;100(5):970-977. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01131.x.

42.Oliva EN, Dimitrov BD, Benedetto F, D'Angelo A, Nobile F. Hemoglobin level threshold for cardiac remodeling and quality of life in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2005;(29):1217-1219.

43.Oliva EN, Ronco F, Marino A, Alati C, Praticò G, Nobile F. Iron chelation therapy associated with improvement of hematopoiesis in transfusion-dependent patients. *Transfusion*. 2010;50(7):1568-1570.
doi:10.1111/j.15372995.2010.02617.x.

44.Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA, in *Nature*; vol 408, n° 6808.

45.Platzbacker U, Germing U. Combination of azacitidine and lenalidomide in myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia – a wise liaison. *Leukemia* 2013;27(9):1813-1819.

46.Platzbecker U, Schetelig J, Finke J, Trenscher R, Scott BL, Kobbe G et al. Allogenic hematopoietic cell transplantation in patients age 60-70 years with de novo high-risk myelodysplastic syndrome or secondary acute myelogenous leukemia: comparison with patients lacking donors who received azacitidine. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18 (9):1415-1421.

47.Rafael Bejar¹ Bejar R. Prognostic models in myelodysplastic syndromes. Moores Cancer Center, Division of Hematology and Oncology, University of California, San Diego, La Jolla, CA.

48.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*, in *Nature*, vol 403, n° 6772, Febbraio 2000.

49.Santini V. Treatment of low risk myelodysplastic syndrome: hematopoietic growth factors erythropoietins and thrombopoietins. *Semin Hematol* 2012;49(4):295-303.

50.Sauntharajah Y. Key clinical observations after 5-azacytidine and decitabine treatment of myelodysplastic syndromes suggest practical solutions for better outcomes. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:511-521.

51.Song SJ, Pandolfi PP. MicroRNAs in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes and myeloid leukaemia. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(4):276-282. doi:10.1097/MOH.0000000000000054.

52.Sokol L, Caceres G, Volinia S, et al. Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2011;153(1):24-32. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08581.x.

53.Vardinam J..The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond.

54.Varney M, Fang J, Starczynsky DT. Implication of miRNA in pathogenesis of MDS. *Curr Pharm Des*. 2012;18(22):3170-3179.

55.J. Wang, D. Duncan, Z. Shi, and B. Zhang. WEB- based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic acids research*, 41(Web Server issue):77–83, 2013.

56.Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of The Gene*. Zanichelli 2013.

57.N. Wong and X. Wang. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research*, 43(Database issue):D146–52, jan 2015.

58.Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.028.

59. Wang L, Di L, Noguchi CT. AMPK is involved in mediation of erythropoietin influence on metabolic activity and reactive oxygen species production in white adipocytes. [Int J Biochem Cell Biol.](#) 2014 Sep;54:1-9

60. Cazzaniga G, van Delft FW, Lo Nigro L, Ford AM, Score J, Iacobucci I, Mirabile E, Taj M, Colman SM, Biondi A, Greaves M. Developmental origins and impact of BCR-ABL1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph+ acute lymphoblastic leukemia. [Blood.](#) 2011 Nov 17;118(20):5559-64.