

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**SCIENZE FARMACOLOGICHE E  
TOSSICOLOGICHE, DELLO SVILUPPO E DEL  
MOVIMENTO UMANO**

Ciclo XXX

Settore Concorsuale: 5/G1

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/14

**ALTERAZIONE DI PATHWAY EPIGENETICI  
COME MECCANISMO DI RESISTENZA AD  
IMATINIB IN UNA LINEA CELLULARE DI CML**

Presentata da:

**SAMMARINI GIULIA**

**Coordinatore Dottorato**

**Chiar.ma Prof.ssa HRELIA PATRIZIA**

**Supervisore**

**Chiar.ma Prof.ssa ANGELINI SABRINA**

**Esame finale anno 2018**

# INDICE

ABSTRACT .....	III
INTRODUZIONE .....	1
1 - EMOPOIESI .....	1
2 - LEUCEMIE .....	3
2.1 LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA .....	4
2.2 LEUCEMIA LINFATICA CRONICA .....	5
2.3 LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA .....	5
2.4 LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA .....	6
LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA .....	8
1 - BACKGROUND .....	8
1.1 I GENI <i>BCR</i> E <i>ABL</i> : STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE .....	10
1.2 IL GENE CHIMERICO BCR-ABL .....	12
1.3 Jak/STAT .....	13
1.4 PI3K/Akt .....	14
1.5 Ras/MAPK .....	15
2 - TRATTAMENTO DELLA CML .....	15
2.1 IMATINIB .....	16
2.2 NILOTINIB .....	18
2.3 DASATINIB .....	19
3 - FARMACO-RESISTENZA .....	21
3.1 RESISTENZA DIPENDENTE DA BCR-ABL .....	23
3.2 GENI DEL PROCESSO ADME .....	25
3.3 RESISTENZA INDIPENDENTE DA BCR-ABL .....	29
FARMACOGENETICA, FARMACOGENOMICA ED EPIGENETICA .....	31
1 - METILAZIONE DEL DNA .....	34
2 - MODIFICAZIONI DELLE CODE ISTONICHE .....	36
3 - MOLECOLE DI RNA NON CODIFICANTE .....	36
3.1 ORIGINI E FUNZIONI .....	37
3.2 BIOGENESI E MATURAZIONE .....	38
3.3 MIRNA E CANCRO .....	40
3.4 MIRNA E CML .....	42
3.5 APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEI MIRNA .....	43
4 - FARMACI EPIGENETICI .....	45
OBIETTIVO .....	47
MATERIALI E METODI .....	49
1 - CREAZIONE DI SUB-COLTURE RESISTENTI AD IMATINIB .....	49

2 - VITALITÀ CELLULARE.....	49
3 - ESTRAZIONE del DNA.....	50
3.1 SEQUENZIAMENTO .....	51
4 - ANALISI dell'mRNA .....	54
4.1 ESTRAZIONE dell'mRNA .....	54
4.2 QUANTIFICAZIONE .....	55
4.3 RETROTRASCRIZIONE.....	56
4.4 ANALISI DI ESPRESSIONE MEDIANTE ABC TRANSPORTER ARRAY.....	56
5 - ANALISI dei MIRNA.....	60
5.1 ESTRAZIONE.....	60
5.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE .....	61
6 - ANALISI della METILAZIONE del DNA .....	63
6.1 QUANTIFICAZIONE E DETERMINAZIONE dello STATO DI DEGRADAZIONE	63
6.2 TRATTAMENTO CON BISOLFITO.....	64
6.3 PROTOCOLLO PER LA PREPARAZIONE DI ILLUMINA® INFINIUM® HD METHYLATION ASSAY .....	66
7 - ANALISI STATISTICA .....	68
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	70
1 - ANALISI dell'ESPRESSIONE degli mRNA.....	71
1.1 TAQMAN® HUMAN ABC TRANSPORTER ARRAY .....	71
2 - ANALISI del PROFILO di ESPRESSIONE dei MIRNA .....	74
2.1 TAQMAN® LOW DENSITY ARRAY POOL A .....	74
3 - ANALISI DEI LIVELLI DI METILAZIONE DEL DNA .....	79
CONCLUSIONI.....	90
BIBLIOGRAFIA.....	95

## ABSTRACT

**Introduzione** - La Leucemia Mieloide Cronica (CML) è una patologia mieloproliferativa risultante dall'espansione policlonale di cellule staminali pluripotenti. È caratterizzata dall'attivazione costitutiva di un recettore tirosin-chinasico (BCR-ABL) che comporta una stimolazione ligando-indipendente del pathway di segnali a valle del recettore. La CML è stata associata ad una traslocazione reciproca fra i cromosomi 9 e 22 t(9;22)(q34;q11), che dà origine al cromosoma Philadelphia (Ph), e che si traduce in un oncogene di fusione che codifica per la proteina tirosin-chinasica (TK) BCR-ABL. Il trattamento d'elezione per la CML è imatinib mesilato (IM), un inibitore TK, che interagisce con la tasca di legame dell'ATP del dominio chinasico del recettore, impedendo il cambiamento conformazionale verso lo stato attivo e conducendo all'apoptosi le cellule tumorali. IM è stato il primo farmaco ad azione diretta specificatamente verso un bersaglio - un recettore mutato - peculiare delle cellule neoplastiche ma, nonostante il successo nel trattamento, nel giro di 18-24 mesi, circa il 30% dei pazienti sviluppa una resistenza secondaria. Questo può essere in parte dovuto a mutazioni geniche puntiformi o aberrazioni cromosomiche, ad anomalie citogenetiche secondarie o traslocazioni reciproche, e, infine, può dipendere da complessi processi di adattamento cellulare nei quali rientra l'espressione genica individuale. Lo scopo del mio progetto di ricerca è stato quello di indagare i possibili meccanismi genetici ed epigenetici, per determinare in che modo possano contribuire all'insorgenza di resistenza. Alla prima categoria appartiene l'alterata espressione dei geni dei trasportatori dei farmaci, mentre della seconda fanno parte, in particolare, la deregolazione dei microRNA (miRNA) e l'aberrante metilazione del DNA,

**Materiali e metodi** - Sono state allestite sub-culture cellulari di CML K562 resistenti al farmaco d'elezione con cui viene trattata ordinariamente la CML, imatinib mesilato (IM), incrementando progressivamente la dose IM somministrato, partendo da una concentrazione iniziale di 0,05  $\mu\text{M}$  fino ad una finale di 3  $\mu\text{M}$ . Ad ogni cambio di concentrazione sono stati estratti miRNA, RNA e DNA. I miRNA sono stati analizzati con un tool preformato per identificare un *profiling* caratteristico del processo di resistenza, mentre per gli mRNA sono state ricercate in particolare alterazioni nell'espressione dei geni addetti al trasporto dei farmaci. Per quanto riguarda il DNA, è stato valutato come variano i livelli di metilazione durante il processo di acquisizione della resistenza utilizzando l'Infinium methylationepic beadchip, un panel che consente di analizzare i livelli di metilazione di oltre 850.000 siti CpG contemporaneamente.

**Risultati** - Dall'analisi dell'espressione dei trasportatori dei farmaci, è emerso che molti geni della superfamiglia dei trasportatori ABC sono sovraespressi nelle cellule che hanno acquisito








resistenza. Fra questi, degni di nota sono ABCG2, ABCA3 e ABCC1. Confrontando le espressioni dei miRNA alle diverse concentrazioni con quelli delle cellule non trattate è emerso che 6 miRNA sono significativamente deregolati: miR-193b-3p, miR-486-5p, miR-512-3p, miR-517a-3p, miR-365a-3p, miR-372-3p. I primi 3 sono sottoespressi, mentre gli ultimi sono iperespressi nelle cellule resistenti alle concentrazioni maggiori confrontate con le cellule non trattate. Questi miRNA modulano diversi geni appartenenti al pathway di segnalazione di ErbB e PI3K/Akt, importanti poiché coinvolti nei processi di modulazione della vitalità cellulare, dell'apoptosi, del metabolismo e coinvolti nel meccanismo di tumorigenesi. Per quanto riguarda la metilazione è stato osservato che, con l'incremento della dose somministrata, il numero di geni metilati incrementa notevolmente e, ad eccezione dei geni HARS e CTNNA3 che sono ipometilati, i geni PTPRF, TP73, ARHGEF10, FHDC1, DUSP6, PLD6 e MIR548H4 risultano significativamente ipermetilati nelle cellule resistenti.

**Conclusioni** - Nonostante IM sia stato inserito nella clinica della CML dal 2001, ancora non sono stati trovati dosi idonee o formulazioni alternative che superino al 100% la resistenza che si instaura nei pazienti in trattamento. Data la recente attenzione rivolta verso il ruolo dei meccanismi epigenetici nell'insorgenza di resistenza, è possibile che un *profiling* genetico ed epigenetico, che tenga conto di come interagiscono fra loro i trasportatori di efflusso, i miRNA e la metilazione del DNA, possa rappresentare una svolta per lo sviluppo di una terapia mirata.

# INTRODUZIONE

## 1 - EMOPOIESI

Il sistema emopoietico è formato dagli organi responsabili dell'emopoiesi, cioè della produzione e maturazione degli elementi cellulari (o figurati) del sangue: i globuli rossi (eritrociti), i globuli bianchi (leucociti) e le piastrine (Fig. 1). Durante lo sviluppo embrionale questa funzione è svolta principalmente dalla milza, dal fegato e dal midollo osseo, mentre dopo la nascita i responsabili principali sono soprattutto il midollo osseo e i linfonodi [1].

Componenti	Eritrociti (globuli rossi)	Leucociti (globuli bianchi)					Piastrine (frammenti cellulari)
		Basofilo	Eosinofilo	Neutrofilo	Linfocita	Monocita	
							
Numero per $\mu\text{L}$ di sangue	4-6 milioni	4000-10 000					150 000 - 400 000

**Figura 1** - Composizione della parte corpuscolata del sangue

Gli elementi corpuscolati hanno un ciclo di vita ridotto: eccetto alcuni tipi di linfociti che possono sopravvivere per anni, la maggior parte si rinnova nel breve periodo. Nel midollo osseo sono presenti cellule staminali multipotenti, chiamate emocitoblasti, in grado di generare tutti gli elementi figurati del sangue, a seconda delle esigenze dell'organismo. Il processo di sviluppo e maturazione degli elementi del sangue procede per stadi. Si ha la proliferazione, che inizia quando la cellula madre si divide in due cellule figlie morfo-funzionalmente differenti da essa, la differenziazione, in cui si ha restrizione della potenzialità del genoma ad opera della stimolazione microambientale, e il commissionamento, quando la cellula segue il programma di differenziamento cui è stata destinata dal microambiente. Segue questa fase la maturazione, lenta e costante, in cui la cellula acquista le caratteristiche proprie del suo sottotipo, sotto la stimolazione di numerosi fattori di sviluppo, fra cui eritropoietina, interleuchina-3, G-CSF (fattore stimolante le colonie di granulociti) e GM-CSF (fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi) (Fig. 2), e che termina infine con l'amplificazione, che permette la divisione delle cellule mature mediante mitosi. Al termine di questo processo, le cellule sono trasferite dal midollo al sangue [2].

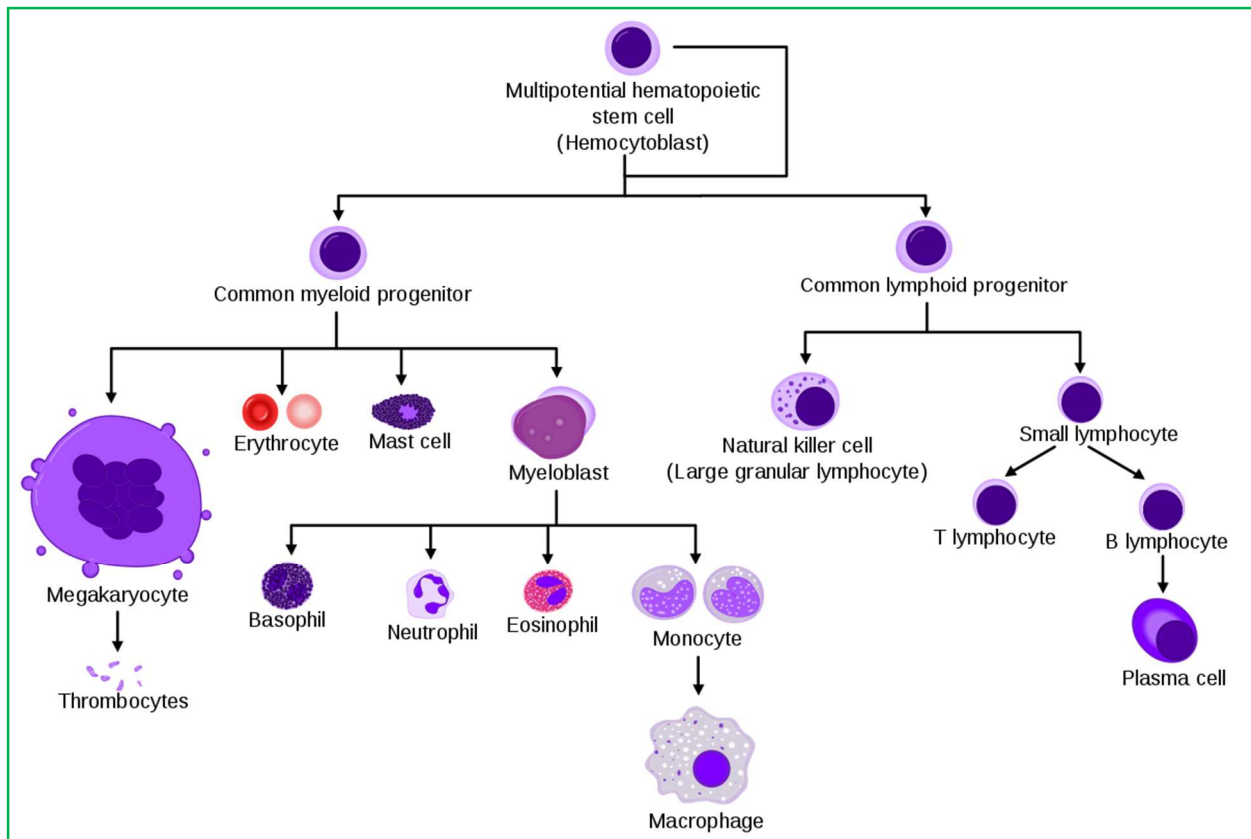


Figura 2 - Processo emopoietico

L'emocitoblasto può dare origine a due diverse serie di staminali: le cellule linfoidi e le mieloidi. Le prime producono i linfociti e danno origine ai linfociti B, che maturano nel midollo osseo e vengono poi trasferiti al sistema linfatico, e ai linfociti T che si sviluppano e diventano funzionali nel timo. Le staminali mieloidi, invece, producono gli eritrociti, le piastrine, i monociti e i granulociti. Inizialmente, gli eritrociti immaturi sono nucleati, producono emoglobina e si dividono molte volte. Quando il contenuto di emoglobina di un eritrocita si avvicina al 30% circa, il nucleo, il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi e i mitocondri della cellula cominciano a degradarsi. Al termine di questo processo, l'eritrocita si insinua tra le cellule endoteliali dei vasi sanguigni nel midollo osseo ed entra nella circolazione. Dalle staminali mieloidi derivano anche i megacariociti: grosse cellule che rimangono nel midollo osseo e da cui si dividono continuamente frammenti cellulari che vengono rivestiti da una membrana, dando così origine alle piastrine [3]. Gli eritrociti, sono gli elementi più abbondanti nel sangue (ne vengono prodotti  $2 \times 10^6/s$ ) e sono cellule definite anucleate in quanto perdono il nucleo durante il processo di differenziamento. Il loro citoplasma contiene quasi esclusivamente molecole di emoglobina, una proteina capace di legarsi all'ossigeno in prossimità dei polmoni e di rilasciarlo nei tessuti. Gli eritrociti hanno la forma di dischi biconcavi e sono molto flessibili, caratteristica che li rende dotati di ampia superficie disponibile per gli scambi gassosi mantenendo la capacità di transitare anche attraverso

i capillari più stretti. Il numero di eritrociti è variabile ma molto elevato: un individuo sano possiede circa 4-6 milioni di eritrociti per  $\text{mm}^3$  di sangue [4].

I leucociti possiedono un nucleo e appaiono incolori, sono più grandi e meno numerosi dei globuli rossi: ce ne sono circa  $7 \times 10^3/\text{mm}^3$  di sangue, ma il loro numero può variare in un intervallo considerevole a seconda dello stato di salute dell'individuo. Hanno funzioni difensive, possono infatti attaccare virus, batteri o altri organismi estranei e, in molti casi, sono anche in grado di riconoscere e neutralizzare cellule tumorali. Tutti i leucociti possono abbandonare l'apparato circolatorio ed entrare negli spazi intercellulari, richiamati da segnali chimici emessi dalle cellule dei tessuti in presenza di organismi o sostanze estranei, i quali inducono anche la proliferazione dei leucociti. I globuli bianchi si suddividono in 3 macro categorie: i granulociti, i linfociti e i monociti. I primi sono costituiti da neutrofilo, eosinofilo e basofilo; i secondi, che comprendono linfociti T, linfociti B e cellule natural killer, partecipano alle difese specifiche: riconoscendo un agente patogeno e poi attaccandolo in maniera specifica (con produzione di proteine circolanti, gli anticorpi), mentre i monociti, in caso di infezione, si trasformano in macrofagi, cellule di grandi dimensioni che possono fagocitare gli xenobiotici [3,4].

Le piastrine, la cui concentrazione ematica è pari a circa  $4 \times 10^5/\text{mm}^3$ , sono piccoli frammenti cellulari privi di organuli e pieni di enzimi e altre sostanze necessarie per svolgere la specifica funzione di sigillare le fessure nei vasi sanguigni e dare inizio alla coagulazione sanguigna [5].

## 2 - LEUCEMIE

Le leucemie sono una famiglia di malattie ematiche maligne che originano dalla proliferazione tumorale di una cellula ematopoietica. Negli individui affetti da leucemia, il midollo osseo perde la capacità fisiologica di generare cellule funzionali acquisendo quella patologica di produrre cellule tumorali. Queste ultime, sfuggendo ai regolari meccanismi di controllo, tendono ad accumularsi nel midollo stesso e, invadendolo, ne alterano progressivamente la funzione [5]. Talvolta può accadere che questo accumulo di cellule tumorali nel midollo si estenda anche al sangue, determinando un anomalo aumento del numero dei globuli bianchi leucemici. Sulla base della rapidità del decorso, si riconoscono leucemie acute (a rapida evoluzione) o croniche (a lenta evoluzione), e, a seconda del sottotipo di cellula ematopoietica coinvolta, si riconoscono leucemie linfoide o mieloidi. I tumori che colpiscono le cellule del sangue sono molto più frequenti nell'età infantile rispetto a quella adulta, e le leucemie acute, in particolare, rappresentano oltre il 25% di tutti i tumori dei bambini. Più in dettaglio, la leucemia linfoblastica acuta rappresenta l'80% di tutte le leucemie diagnosticate nei bambini fino a 14 anni, mentre quella mieloide acuta rappresenta il 13%. Le croniche sono più caratteristiche dell'età adulta e rare in età pediatrica. In Italia vengono



diagnosticati circa 15 nuovi casi ogni 100.000 persone all'anno (16,9 casi ogni 100.000 uomini e 12,8 ogni 100.000 donne), che si traducono in un numero stimato di 4.700 nuovi casi ogni anno tra gli uomini e poco meno di 3.400 tra le donne. In base ai dati AIRTUM (Associazione Italiana Registri Tumori), nel nostro paese le forme più frequenti di leucemia sono la linfatica cronica (33,5% del totale delle leucemie), la mieloide acuta (26,4%), la mieloide cronica (14,1%) e la linfatica acuta (9,5%) [6]. In generale, è possibile suddividere le leucemie in base alle peculiarità citologiche e/o molecolari delle loro cellule neoplastiche raggruppandole in mieloidi, o mieloproliferative, se presentano caratteristiche tipiche delle cellule mieloidi (granulazioni citoplasmatiche e antigeni cellulari) e originano da cellule staminali mieloidi; leucemie linfoide o linfo proliferative, se originano da cellule tumorali linfoide e hanno carattere linfoide (riarrangiamento monoclonale dei geni delle IgG) [7]. I grandi sottogruppi di leucemia sono quindi 4: linfoblastica acuta, linfocitica cronica, mieloide acuta, e mieloide cronica.

## 2.1 LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

La leucemia linfoblastica acuta (ALL) è un tumore ematologico, raro e a rapida progressione, che origina dai linfociti nel midollo osseo ed è caratterizzata da un accumulo di queste cellule nel sangue, nel midollo osseo e in altri organi. Il termine "acuta" indica il fatto che la malattia progredisce velocemente. L'eccesso di produzione di linfoblasti inficia la produzione delle normali cellule ematiche, provocando una riduzione del numero di globuli rossi e bianchi, e di piastrine [8]. Nella ALL un linfocita B o T va incontro ad una trasformazione tumorale: i processi di maturazione che permettono la formazione del linfocita adulto si bloccano e la cellula comincia a riprodursi più velocemente, invadendo il sangue e raggiungendo anche i linfonodi, la milza, il fegato e il sistema nervoso centrale [9]. Circa il 25% degli adulti con ALL acquisiscono un'anomalia cromosomica derivata dalla traslocazione reciproca fra i cromosomi 9 e 22 (patologia Ph+). La presenza del cromosoma Philadelphia negli adulti aumenta con l'incremento dell'età [9-11] e i soggetti con ALL Ph+ normalmente hanno una prognosi peggiore rispetto a coloro che non sono affetti da questa anomalia [12]. La ALL è una patologia relativamente rara: in Italia si registrano circa 1,6 casi ogni 100.000 uomini e 1,2 casi ogni 100.000 donne, cioè circa 450 nuovi casi ogni anno tra gli uomini e 320 tra le donne [5]. La ALL è però il tumore più frequente in età pediatrica, infatti rappresenta l'80% delle leucemie e circa il 25% di tutti i tumori diagnosticati tra 0 e 14 anni. L'incidenza raggiunge il picco tra i 2 e i 5 anni e poi diminuisce con l'aumentare dell'età, fino ad essere minima dopo i 29 anni (il 50% di tutti i casi viene diagnosticato entro i 29 anni) [9-11].

## 2.2 LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

La leucemia linfatica cronica (CLL) è una neoplasia ematologica causata da un accumulo di linfociti nel sangue, nel midollo osseo e negli organi linfatici (linfonodi e milza). Nella CLL, alcuni linfociti (per lo più di tipo B) subiscono una trasformazione maligna producendo un clone linfocitario, cioè un insieme di un gran numero di cellule uguali tra loro che non rispondono più agli stimoli fisiologici e diventano immortali [13]. Continuano così a riprodursi e ad accumularsi nel sangue, nel midollo osseo, negli organi linfatici (linfonodi e milza) e, talvolta, anche in altri organi. È la leucemia più comune nel mondo occidentale (con un rapporto uomo:donna di 2:1) ed è tipica nell'anziano, infatti, l'età media alla diagnosi è intorno ai 65 anni e meno del 15% dei casi viene diagnosticato prima dei 60 anni [14]. Colpisce ogni anno circa 5 persone su 100.000 e l'incidenza aumenta con l'aumentare dell'età. In Italia le stime parlano di circa 1.600 nuovi casi ogni anno tra gli uomini e 1.150 tra le donne. Nonostante possieda una morfologia omogenea e un fenotipo di tipo immunologico, la CLL mostra un comportamento clinico estremamente variabile. Da un lato, i pazienti con CLL hanno un decorso molto indolente e possono sopravvivere per decenni senza richiedere la terapia, mentre nel caso opposto, i pazienti presentano una malattia molto aggressiva alla diagnosi e muoiono entro pochi anni nonostante il trattamento [15]. Tuttavia, poiché la maggior parte dei pazienti è asintomatica alla diagnosi e classificabile come a basso stadio (80%), i principali sistemi di diagnosi (Rai e Binet, sviluppati oltre 30 anni fa) non riescono a discriminare i casi aggressivi da quelli indolenti nella fase iniziale della malattia [16]. Pertanto, ci sono stati importanti sforzi per perfezionare la stratificazione del rischio della CLL, che sono sfociati con l'identificazione di una moltitudine di marcatori molecolari proposti negli ultimi 20 anni con un impatto prognostico e/o predittivo [17].

## 2.3 LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

La leucemia mieloide acuta (AML) è una malattia che si sviluppa a partire dal midollo osseo (mieloide) e che progredisce velocemente (acuta). Si verifica nel momento in cui, durante lo sviluppo, alcuni precursori pluripotenti presenti nel midollo osseo si alterano e maturano come cellule tumorali. L'AML è una delle neoplasie ematologiche più comuni negli adulti [18] ed è associata con una scarsa sopravvivenza nella maggior parte dei sottotipi: il tasso di sopravvivenza a 5 anni dell'AML è del 28% per i pazienti sotto i 40 anni [19] e inferiore al 10% per i pazienti più anziani [20]. In base ai dati della AIRTUM, si possono stimare poco più di 2.000 nuovi casi di leucemia mieloide acuta ogni anno in Italia: 1.200 tra gli uomini e 900 tra le donne. La malattia è più comune negli uomini rispetto alle donne e negli adulti con più di 60 anni. È poco frequente

prima dei 45 anni e nel nostro paese rappresenta il 13% delle leucemie tra i bambini di età compresa tra 0 e 14 anni.

La AML è un tumore maligno aggressivo caratterizzato da un blocco nella differenziazione mieloide (il processo normalmente responsabile della generazione di globuli maturi da cellule staminali emopoietiche) e dalla proliferazione incontrollata di progenitori mieloidi anomali che si accumulano nel midollo osseo e nel sangue. Alcuni casi si sviluppano da altri disturbi ematopoietici o insorgono in seguito all'utilizzo di una terapia genotossica rivolta verso altri tumori non correlati, ma la maggior parte si origina *de novo* [21]. Sono stati identificati diversi marcatori genetici utili per stratificare i pazienti in gruppi prognostici, usati per guidare le strategie terapeutiche. Sebbene la chemioterapia abbia come risultato tassi elevati di remissione, la maggior parte dei pazienti va incontro a recidiva e la sopravvivenza complessiva a 5 anni è solo del 40-45% nei giovani e inferiore al 10% negli anziani [22,23].

#### 2.4 LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

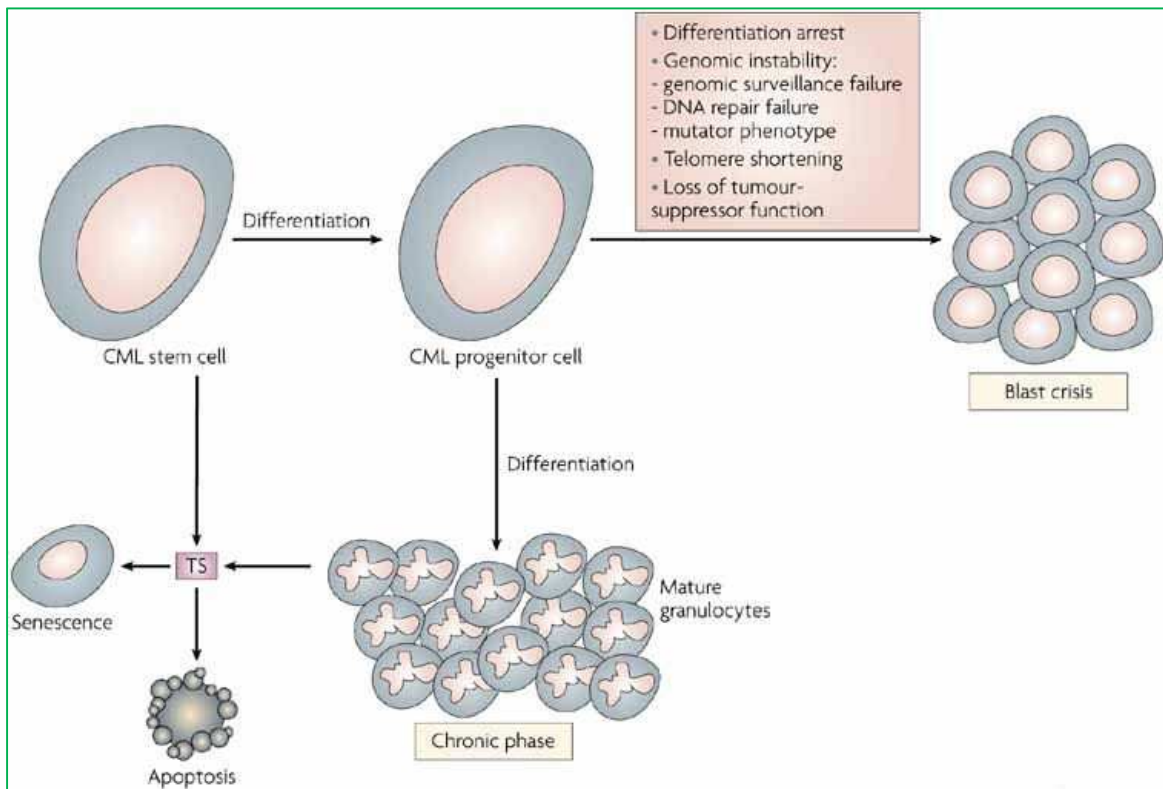
La leucemia mieloide cronica (CML) ha origine nel midollo osseo dai precursori delle cellule del sangue (piastrine, globuli rossi e globuli bianchi tranne i linfociti). Nella leucemia, queste cellule immature non riescono a completare il processo di trasformazione che le porta a diventare adulte e si accumulano in forma immatura (blasti) nell'organismo. Il termine "cronica" indica che la malattia ha una progressione lenta nel tempo e può rimanere asintomatica anche per anni nella sua fase iniziale. La CML in Italia colpisce circa 2 persone (2,4 per gli uomini e 1,8 per le donne) ogni 100.000, e si stimano ogni anno circa 650 nuovi casi tra gli uomini e 500 tra le donne [24]. È una malattia che colpisce soprattutto in età avanzata, come dimostra il fatto che meno del 30% dei casi viene diagnosticato prima dei 60 anni. Nel 2017, si stima che saranno diagnosticati negli Stati Uniti circa 9.000 nuovi casi di CML e moriranno approssimativamente 1.000 pazienti. Dall'introduzione di imatinib nel 2000, la mortalità annua della CML è diminuita dal 10-20% all'1-2%. Circa il 50% dei pazienti con CML diagnosticata negli Stati Uniti è asintomatica e viene spesso diagnosticato durante un esame fisico di routine o esami del sangue. I segni e i sintomi comuni della CML al momento della diagnosi, quando presenti, derivano da anemia e splenomegalia. Questi includono affaticamento, perdita di peso, malessere, sazietà facile e pienezza o dolore del quadrante superiore sinistro [25]. Le manifestazioni rare comprendono sanguinamento (associato a basso numero di piastrine e/o disfunzione piastrinica), trombosi (associata a trombocitosi e/o marcata leucocitosi), artrite gottosa (da elevati livelli di acido urico), priapismo (di solito con marcata leucocitosi o trombocitosi), emorragie retiniche e ulcere e sanguinamento gastrointestinale superiore (da elevati livelli di istamina a causa di basofilia) [26].

Le cause che provocano le leucemie non sono ancora state del tutto chiarite: molte di queste forme si associano alla comparsa, nelle cellule leucemiche, di alterazioni cromosomiche e genetiche, ma gli eventi biologici che portano allo sviluppo di tali alterazioni non sempre sono noti. Le anomalie cromosomiche e/o genetiche non vengono ereditate dai genitori né trasmesse alla prole, sono quindi acquisite con la malattia stessa. Esistono, però, delle condizioni molto rare in cui la leucemia ha delle caratteristiche familiari per la frequenza con cui alcuni individui di un medesimo nucleo familiare si ammalano, e si parla, perciò, di predisposizione genetica come elemento critico [5]. Al contrario, sono stati identificati alcuni fattori di rischio, alla cui esposizione si associa una maggiore probabilità di sviluppare leucemie. Tra questi, sono presenti il contatto prolungato con agenti chimici mutageni o alchilanti quali il benzene e suoi derivati, e l'esposizione a dosi eccessive di radiazioni ionizzanti [27]. Anche terapie antitumorali, come radioterapia e/o chemioterapia, nei casi in cui sia presente una predisposizione geneticamente determinata, possono provocare l'insorgenza di leucemie acute di tipo secondario. Questo fenomeno è stato riportato in circa il 3-5% dei pazienti trattati con radio-chemioterapia. Tra gli agenti che potrebbero concorrere all'insorgenza di alcune forme di leucemia sono presenti anche il fumo di sigaretta e alcuni tipi di virus, fra cui i membri della famiglia HTLV (Virus T-linfotropico umano). L'essere affetti da alcune malattie ematologiche come le "sindromi mielodisplastiche", in cui si ha un'alterazione delle cellule ematopoietiche, costituisce un altro fattore di rischio per lo sviluppo futuro di leucemie. Va infine ricordato che anche alcune malattie ereditarie (per esempio la sindrome di Down) si associano ad un aumentato rischio di contrarre leucemia (da 10 a 20 volte superiore) [5,6].

# LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

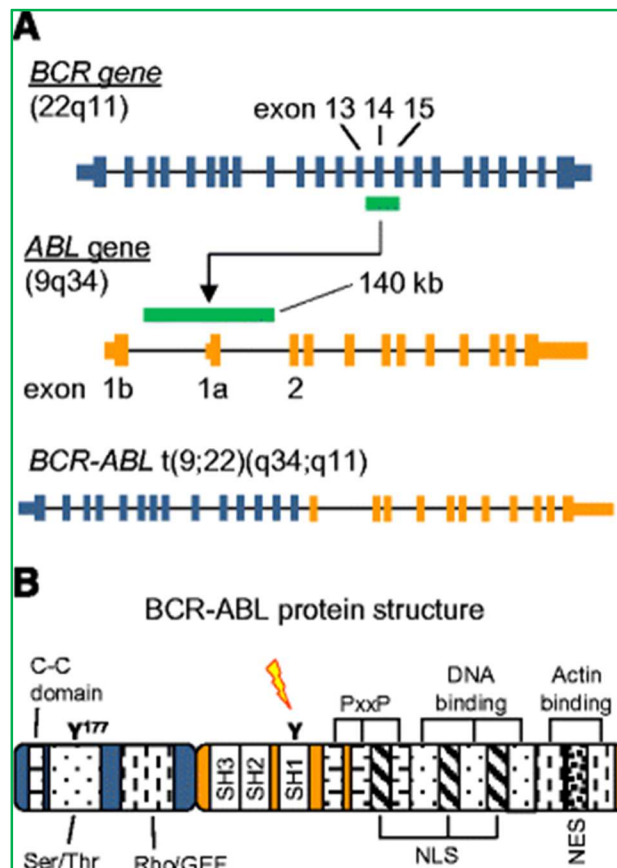
## 1 - BACKGROUND

La CML è una malattia mieloproliferativa caratterizzata dall'espansione incontrollata delle cellule staminali pluripotenti presenti nel midollo osseo. Normalmente viene diagnosticata nella fase cronica (CP); i sintomi principali sono fatica, anemia, splenomegalia, fastidio addominale ed episodi di infezione [28], anche se una significativa percentuale di pazienti non mostra sintomi, per cui la diagnosi avviene in concomitanza con lo svolgersi di altri esami. La percentuale maschile è leggermente superiore a quella femminile con un rapporto di 1,3-1,5:1 [29]. L'età media in cui si sviluppa varia molto a seconda della regione in cui si sviluppa: per esempio, in Africa e in America Latina, la CML viene diagnosticata in pazienti che hanno almeno 15 anni in meno rispetto a quelli australiani (età media di 55 anni), europei ed americani [29]. Lo stadio della patologia è la caratteristica prognostica più importante; la maggior parte dei pazienti in CP-CML raggiunge una stabilizzazione della malattia a lungo termine e il trapianto di cellule staminali diventa necessario solo per una piccola percentuale di questi [30]. Se non si interviene farmacologicamente, la CML progredisce dalla CP alla fase di crisi blastica (BC) dopo circa 3-5 anni, di solito passando attraverso una fase accelerata (AP) (Fig. 3) [31]. Tale degenerazione si definisce tramite conta dei blasti, che sono il 10-20% nella AP e >20% nella BC [31]. Le cellule leucemiche in stadio avanzato perdono la capacità di giungere fino alla completa maturazione, provocando quindi una situazione in cui si ha espansione delle cellule primitive a discapito dei granulociti maturi. Il meccanismo di progressione non è stato ancora del tutto chiarito, anche se sono state riscontrate mutazioni in altri geni diversi da *BCR-ABL*, che suggeriscono sia necessario un secondo evento per la trasformazione verso la fase di leucemia acuta. La BC-CML conduce inevitabilmente verso la morte, mediante trombosi, infezioni o anemie - una conseguenza del fallimento del midollo osseo a causa della mancanza di differenziazione cellulare e di un'infiltrazione massiccia di blasti [32]. Prima che avvenisse l'introduzione di una terapia di successo, la sopravvivenza media dei pazienti affetti da CML era di 3 anni circa [28,32].



**Figura 3** - Possibili destini di una cellula staminale leucemica nella CML

La peculiarità di questa patologia è rappresentata dalla presenza di una traslocazione reciproca fra il braccio lungo dei cromosomi 9 e 22  $t(9;22)(q34;q11.2)$ , risultante in un derivato 9q+ e un piccolo 22q- [33]. Il prodotto, noto come cromosoma Philadelphia (Ph), produce un gene ibrido *BCR-ABL*, unione del 3' del gene *Abelson Murine Leukemia (ABL)* posto sul cromosoma 9 e il 5' della regione di raggruppamento dei punti di rottura (*BCR, Major-Breakpoint Cluster Region*) sul cromosoma 22 [34]. Il gene *BCR-ABL* è stato osservato in tutti i casi di CML e il rilevamento di questo gene, insieme al cariotipo per identificare il cromosoma Ph, è utilizzato per confermare la diagnosi [28]. Il sito in cui avviene la rottura fra *BCR* e *ABL* è altamente variabile, ma la ricombinazione di solito coinvolge la fusione dell'introne 13 o 14 di *BCR* con una regione di 140kb di *ABL* compresa fra gli esoni 1b e 2 (Fig. 4) [35].



**Figura 4** - Struttura del gene e della proteina BCR-ABL. **4a** Il gene ibrido BCR-ABL formatosi dall'unione del 5' terminale di BCR e del 3' terminale di ABL1; **4b** Proteina di fusione

Per quanto riguarda la rottura sul gene *ABL1*, lo splicing dell'mRNA favorisce il trascritto maggiore con e13a2 (esone 13 di *BCR* e 2 di *ABL1*) o la giunzione 14a2. Entrambi i trascritti codificano per l'espressione di una proteina di 210 kDa (p210) [36]. Durante questi anni si è spesso dibattuto sulle conseguenze dell'espressione di entrambi i trascritti; la diversa posizione della regione di rottura è stata correlata con la prognosi del paziente, con la conta piastrinica e con la risposta alla terapia, ma ci sono state altre pubblicazioni che invece hanno negato qualunque relazione [36-38]. Anche se questo è il trascritto che si forma maggiormente, in alcuni rari casi si possono ottenere breakpoint alternativi, che portano alla formazione di trascritti da 230 kDa o da 190 kDa (che deriva dall'arrangiamento e1a2, ed è riscontrabile soprattutto nella leucemia Philadelphia acuta) [39].

### 1.1 I GENI *BCR* E *ABL*: STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE

Il gene *BCR* (cromosoma 22; 130kb suddivise in 25 esoni) codifica per una proteina citoplasmatica di 160 kDa (p160<sup>BCR</sup>). L'N- terminale contiene 426 amminoacidi conservati in tutte le isoforme della proteina chimerica BCR-ABL, e in questa porzione è presentato il dominio con attività serina/treonina chinasi necessaria per l'attività del gene mutato. Tale sito ha il compito di legare

i domini Src Homology (SH2) di altre proteine come ABL, coinvolti nell'attivazione della superfamiglia delle RAS. È inoltre presente un dominio Coiled-Coil (DD) cruciale per la dimerizzazione di BCR-ABL, per la funzionalità chinasica e per l'oncogenicità di questo dimero. La porzione C-terminale ha invece funzione GTPasica nei confronti di RAC (p21<sup>RAC</sup>), una proteina appartenente alle RAS che attiva le NADPH-ossidasi nei neutrofilo (Fig. 5) [40].

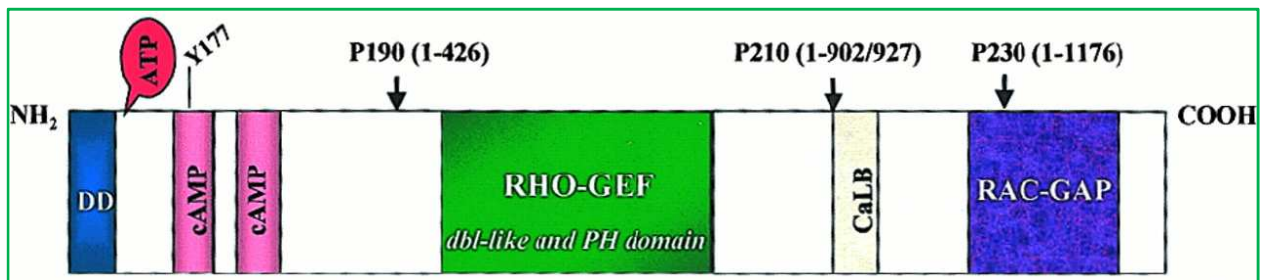


Figura 5 - Struttura della proteina p160 BCR

Il gene *ABL* (Fig. 6) codifica per una proteina chinasica non-recettoriale di 145 kDa (p145<sup>ABL</sup>) espressa in due diverse isoforme, generate dallo splicing alternativo del primo esone (1a-1b). L'N-terminale presenta tre domini Src Homology: SH1 è dotato di funzione tirosin-chinasica, e ha forte affinità per il primo esone di *BCR*, mentre i domini SH2 e SH3 permettono l'interazione con altre proteine. In questa regione è anche presente la porzione Cap, che probabilmente controlla l'attività chinasica di ABL, in quanto, se deleta, come in effetti avviene in BCR-ABL, si ha un aumento e una deregolazione dell'attività fosforilativa. Il C-terminale presenta i domini di legame con l'actina e il DNA e i siti di localizzazione nucleare. Le complesse funzionalità di ABL concernono la regolazione del ciclo cellulare, la risposta cellulare allo stress genotossico, la trasduzione del segnale inviato dalle integrine per lo sviluppo, e il coinvolgimento nel processo di riparazione del DNA attraverso il legame con altri enzimi coinvolti in questo step, fra cui il prodotto dei geni RAD51 e ATM [41].

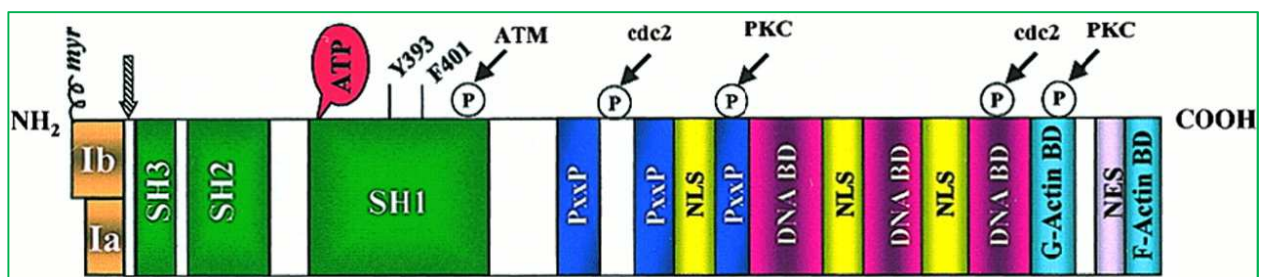


Figura 6 - Struttura della proteina p145 ABL



## 1.2 IL GENE CHIMERICO BCR-ABL

Nella formazione del gene chimerico (Fig. 7), il punto di rottura sul gene *ABL* avviene a monte dell'esone 1a o 1b oppure, più frequentemente, tra gli esoni 1a e 2a, e lo splicing del trascritto primario genera un mRNA nel quale la sequenza di *BCR* è fusa all'esone 2a di *ABL*. A seconda della regione in cui avviene la rottura del gene *BCR*, il trascritto codificherà per diversi tipi di proteina, p190, p210, o p230, tutte contenenti domini fondamentali per la trasformazione neoplastica delle cellule. Caratteristica comune a queste proteine è l'alterata e incontrollata attività tirosin-chinasica che deriva dal dominio tyr-chinasico presente sul gene *ABL*, ma, a differenza del prodotto di quest'ultimo che si distribuisce nel nucleo, l'enzima BCR-ABL si distribuisce nel citoplasma [42].

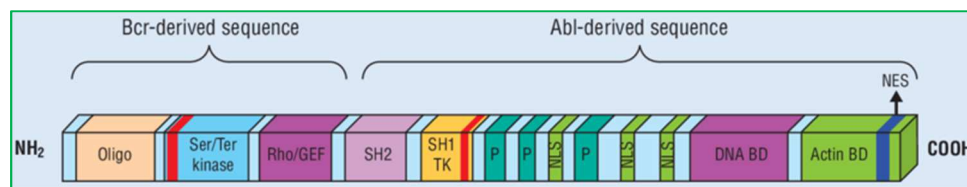
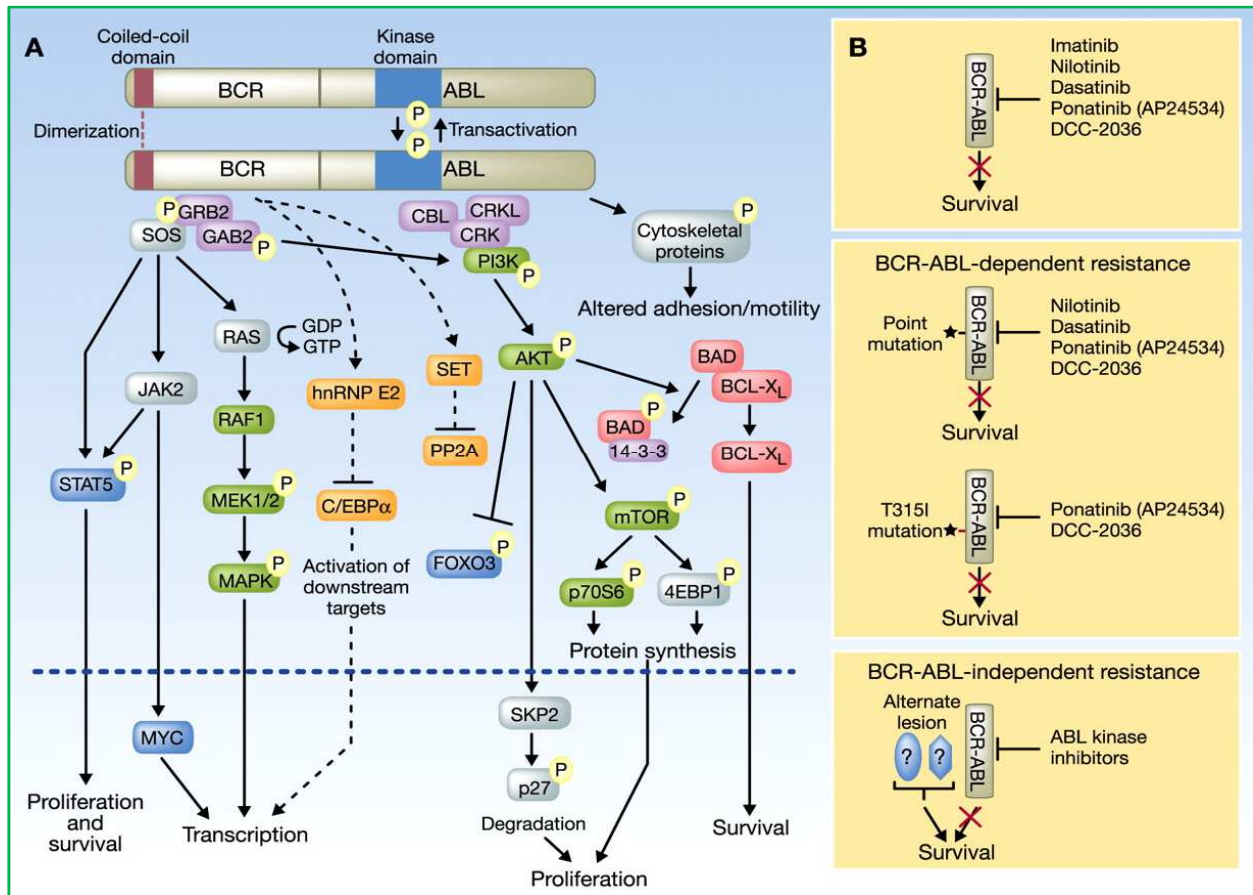


Figura 7 - Gene chimerico BCR-ABL

Nonostante la presenza di quest'alterazione nella maggior parte dei pazienti affetti dalla CML, in realtà, la sola mutazione non è condizione sufficiente per l'insorgenza della patologia. Questo è confermato dalla presenza di soggetti affetti da CML Ph- e BCR-ABL negativi, nonché dalla presenza del gene chimerico, seppure con frequenza molto bassa, nel sangue di individui sani. La motivazione per cui questi soggetti non sviluppano malattia non è del tutto chiara: una spiegazione plausibile potrebbe essere che la mutazione insorga nello stadio terminale della differenziazione cellulare, quindi poco prima dell'eliminazione, oppure che il sistema immunitario sopprima queste cellule aberranti, oppure che il gene *BCR-ABL* non sia l'unica alterazione genetica responsabile della comparsa della leucemia [42]. La proteina BCR-ABL causa l'attivazione aberrante dei pathway di segnalazione cellulare e uno spostamento verso un ambiente cellulare che supporti la leucemia. Quest'avviamento atipico si correla con cambiamenti a livello dei fattori di crescita dipendenti, con apoptosi, proliferazione e adesione cellulare alterati. Questi eventi sono responsabili della iper-proliferazione dei granulociti e delle caratteristiche cliniche osservate nella CP-CML [34]. Poiché l'espressione della sequenza codificante BCR-ABL nelle cellule staminali ematopoietiche è sufficiente per generare patologie simili alla CML, è stato generalmente accettato il fatto che la presenza di *BCR-ABL* sia l'unica lesione necessaria per lo sviluppo di CML [34]. Dopo aver determinato il fenotipo risultante dalla formazione del gene ibrido, il focus della ricerca

si è spostato sull'identificazione dei target di BCR-ABL. È stato dimostrato che i pathway Jak/STAT, PI3K/Akt and Ras/MAPK sono all'origine dell'anomala segnalazione di BCR-ABL (Fig. 8) [43].



**Figura 8** - Via di trasduzione di BCR-ABL e inibizione della chinasi ABL. **8A** Pathway attivato nella CML, provocato dalla dimerizzazione del recettore che comporta autofosforilazione; **8B** Predizione degli effetti causati da inibitori della tirosin-chinasi in condizioni di BCR-ABL non mutato, mutato o in presenza di lesioni alternative

### 1.3 Jak/STAT

I segnali provenienti dal pathway Jak/STAT sono generalmente incrementati nella leucemia e le proteine STAT sono fattori di trascrizione attivati dal recettore Jak (Janus family kinase). La costitutiva fosforilazione dei fattori STAT (STAT1 e STAT5) è stata evidenziata in diverse linee cellulari BCR-ABL positive e nelle linee cellulari trasformate dalla p190 c'è anche l'attivazione di STAT6 [44]. Modelli leucemici di CML hanno dimostrato che l'attività chinastica del recettore di fusione incrementa l'attivazione di Jak2/STAT, promuovendo la crescita cellulare e la sopravvivenza [45]. È stato inoltre proposto che BCR-ABL possa attivare direttamente la STAT5, evitando la regolazione endogena ad opera di JAK e favorendo quindi la patogenesi [46,47]. Nonostante questo, gli inibitori di JAK hanno dimostrato di essere efficaci contro cellule primarie di CML, anche verso quelle resistenti agli inibitori TK, e studi recenti hanno suggerito

che la via di segnalazione di Jak sia importante per la biologia delle staminali [48]. Anche se STAT5 ha numerose funzioni, il suo principale effetto nelle cellule *BCR-ABL* trasformate sembra di tipo anti-apoptotico e coinvolge l'attivazione trascrizionale di Bcl-x1 (proteina anti-apoptotica). Il ruolo di RAS e JAK nella risposta ai fattori di crescita può spiegare come BCR-ABL renda alcune linee cellulari indipendenti dai fattori di crescita; ad esempio, è stato riportato che la proteina di fusione induce un loop autocrino di G-CSF e di IL-3 nei progenitori immaturi [45].

#### 1.4 PI3K/Akt

BCR-ABL determina una costitutiva attivazione di PI3K, che fosforila il fosfatidil-inositolo (PI) in posizione D3 e produce in vivo PI-(3,4)-bifosfato e PI-(3,4,5)-trifosfato, con la funzione di secondi messaggeri. Le proteine PI3K trasmettono segnali extracellulari per modulare l'attivazione dei fattori di trascrizione e la programmazione che favorisce la crescita/sopravvivenza e l'inibizione della morte cellulare [49]; AKT, invece, è l'effettore principale della via di trasduzione di PI3K, ma quest'ultimo regola anche RAC (motilità e sopravvivenza cellulare), e la S6kinasi (sintesi proteica). AKT è importante soprattutto per due motivi: 1) AKT è a valle del segnale dell'IL-3 Receptor, quindi BCR-ABL sarebbe in grado di mimare il segnale di sopravvivenza di IL-3 in modo PI3K-dipendente, 2) AKT ha come substrato Bad (proteina con funzione proapoptotica), la cui fosforilazione ne determina l'inattivazione: normalmente Bad non fosforilato si lega a Bcl-x1, inibendo la sua funzione anti-apoptotica e promuovendo la morte cellulare [50]. Alcuni studi hanno dimostrato che PI3K è necessario per la trasformazione delle cellule emopoietiche mediata da BCR-ABL [51], mentre altri hanno evidenziato, oltre a questa caratteristica, la sua importanza nel mantenimento della CML, insistendo sul fatto che l'inibizione dell'intero pathway possa eludere l'oncogenesi di BCR-ABL e uccidere le cellule primarie di CML [52]. Un'ulteriore conseguenza dell'attivazione di PI3K è la stimolazione del pathway di mTOR, che è responsabile del controllo della sintesi proteica, della crescita/aumento di dimensioni delle cellule e dell'autofagia [53]. Poiché il coinvolgimento dell'autofagia nella CML è un campo di interesse piuttosto attuale, recenti ricerche hanno osservato che, mentre BCR-ABL inibisce l'autofagia, al contrario, gli inibitori TK lo ristabiliscono, perciò, la co-inibizione dell'autofagia e di BCR-ABL potrebbe promuovere in maniera considerevole l'eliminazione delle cellule di CML primitive, rispetto ai soli inibitori [54].

### 1.5 Ras/MAPK

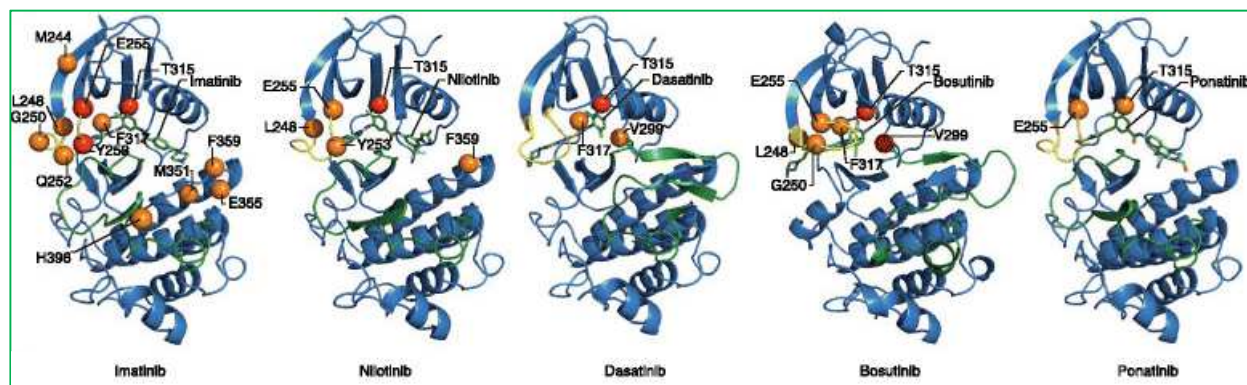
L'attivazione delle chinasi Ras GTPasi/MEK stimola la crescita cellulare mediante la cascata di legame con il recettore di membrana che attiva la trascrizione di numerosi fattori di crescita, ed è un pathway deregolato nel cancro [55].

Le famiglie delle chinasi Src (SFK) sono un altro gruppo di target a valle di BCR-ABL ampiamente studiato per la loro correlazione con la leucemia. I membri di questa famiglia coordinano la crescita cellulare, la differenziazione e la motilità in risposta ai segnali extracellulari [56]. Inizialmente era stato ipotizzato che, in linee cellulari di CML, l'espressione di BCR-ABL attivasse significativamente le SFK Hck e Lyn, mentre ulteriori approfondimenti hanno dimostrato che queste due chinasi sono necessarie per la trasformazione tumorale, così come la fosforilazione di altre chinasi [57]. Nelle linee cellulari di CML K562 (in crisi blastica) e primarie, BCR-ABL inibisce l'espressione di un RNA non codificante, il lncRNA-BGL3, in maniera chinasi-dipendente attraverso il fattore di trascrizione MYC [58]. L'espressione forzata di questo lncRNA nelle K562 induce l'apoptosi e riduce l'abilità di queste cellule di innestarsi nel topo. Successivamente è stato anche osservato che lncRNA-BGL3 agisce come un falso bersaglio per molti miRNA, che così possono influenzare pTEN stabilizzandolo e provocando un'inibizione della leucemogenesi.

## 2 - TRATTAMENTO DELLA CML

Gli inibitori tirosin-chinasici (TKI) hanno completamente rivoluzionato il trattamento della CML. Il trapianto di cellule staminali allogeniche (alloSCT) è associato ad un profilo di tossicità unico, infezioni particolarmente opportunistiche e patologie dovute all'innesto sull'ospite (GVHD), che concorrono ad una mortalità correlata al trattamento pari a 5-20% e ad una notevole morbilità nei pazienti che sopravvivono a lungo termine. Queste problematiche, unite all'evidente successo dell'impiego degli inibitori TK, ha fatto sì che l'alloSCT venga riservato solo ai pazienti affetti da leucemia in stadio avanzato o che non rispondono al trattamento [59]. Prima dell'avvento della *target therapy* per i CP-CML, i pazienti erano trattati con chemioterapici quali busulfan e idrossiurea, ottenendo una risposta ematologica completa (CHR) nel 50-80% dei trattati, mentre la remissione citogenetica completa (CCyR) era un evento raro [60]. La successiva introduzione della terapia con la citochina umana interferon- $\alpha$  ha prodotto alti livelli di risposte complete ematologiche e citogenetiche; tuttavia, l'inibitore TK imatinib mesilato (IM), approvato dalla Food and Drug Administration americana (FDA) negli USA nel 2001, permise di raggiungere una CHR nel 95% e una CCyR nel 76% dei pazienti affetti da CML trattati nel trial IRIS [61,62]. Dall'introduzione di IM come farmaco d'elezione per la CP-CML la percentuale di sopravvivenza

è notevolmente aumentata, passando da un 31% di fine anni '90 ad un 66% negli anni compresi fra il 2006 e il 2012. Il sito attivo del recettore TK esiste in due conformazioni principali che sono distinguibili fra loro nei motivi chiave di struttura, come il loop di attivazione (A-loop), che controlla l'accesso del substrato al sito catalitico, il loop di legame dell'ATP (P-loop) e il motivo altamente conservato aspartato-fenilalanina-glicina (DFG) che coordina il legame di ATP con lo ione magnesio. Quando il recettore si trova nella sua conformazione inattiva, il sito di attivazione si trova nella posizione chiusa e il DFG è orientato verso l'esterno (DFG "out"). Quando invece la chinasi è attiva, l'A-loop è in conformazione aperta e il DFG è orientato verso il sito catalitico (DFG "in") (Fig. 9) [63,64]. Ci sono 3 TKI approvati dalla FDA per il trattamento iniziale della CP-CML: imatinib, nilotinib (introdotto nel 2006) e dasatinib (in commercio dal 2012).



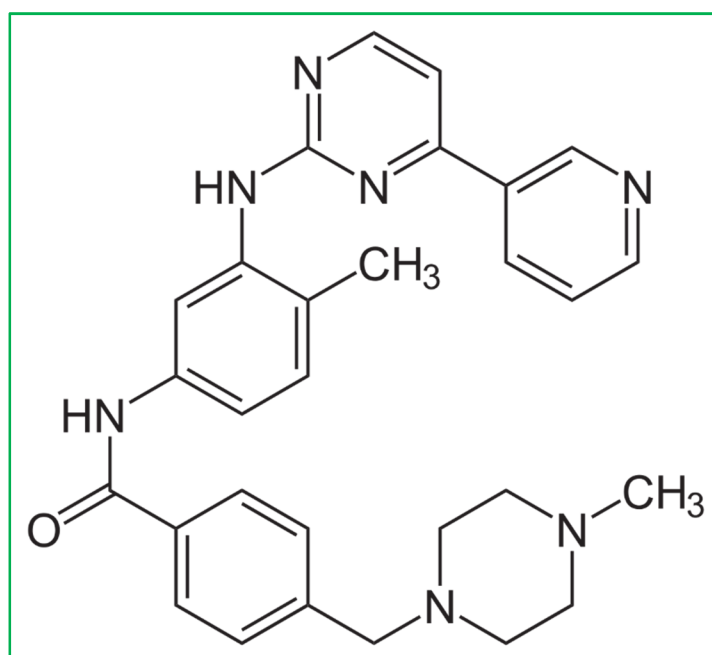
**Figura 9** - Conformazione del recettore tirosin-chinasico quando avviene l'interazione con gli inibitori

## 2.1 IMATINIB

Imatinib mesilato (IM, STI571, Gleevec<sup>®</sup>) (Fig. 10) è stato il primo inibitore TK approvato dall'FDA per il trattamento dei pazienti con CML e il suo meccanismo d'azione prevede l'inibizione dell'attività chinasica sia della proteina di fusione BCR-ABL sia di altre TK rilevanti per la funzione dei linfociti, come PGDFR, e il recettore per il fattore di crescita dei mastociti e delle cellule staminali KIT [65,66]. Questo farmaco è utilizzato anche per il trattamento di GIST c-KIT positivi, pazienti adulti con dermatofibrosarcoma protuberance (DFSP) non operabile e pazienti adulti con DFSP recidivante e/o metastatico. IM, formulato in capsule rigide o compresse, è una base quadrivalente che si dissolve facilmente in una soluzione a pH 5,5. La sua struttura contribuisce ad avere una biodisponibilità del 98%, anche se vi può essere una forte variabilità fra pazienti. In seguito alla somministrazione per via orale, il picco di concentrazione plasmatica (circa 1,6 g/ml) è raggiunto dopo 1,5-6 ore. Il farmaco si distribuisce rapidamente nei tessuti, ma non attraversa la barriera emato-encefalica; a concentrazioni clinicamente rilevanti, il legame con le proteine plasmatiche è del 95% circa, soprattutto con albumina e con glicoproteine alfa-acide,

mentre è minimo quello con le lipoproteine. Ciononostante, solo la porzione non legata di IM è attiva [67]. Il metabolismo avviene soprattutto tramite reazioni di fase I, che riguardano la N-demetilazione, che forma il metabolita principale CGP74588, ugualmente attivo. Inoltre, vi sono diverse reazioni di ossidazione secondarie, ed è possibile l'apertura dell'anello piperazinico [68]. Le reazioni metaboliche di fase II includono la coniugazione di IM e del suo metabolita N-demetilato con acido glucuronico e la glucoronidazione dei metaboliti ossidati. IM ha un'emivita di circa 19 ore (14-23 ore); approssimativamente il 68% della dose viene escreta entro 7 giorni con le feci, il 13% con le urine. Il 25% della dose è costituito da IM invariato (di cui il 20% viene escreto con le feci e il 5% con le urine), il resto è dato dai metaboliti. La maggior parte degli effetti collaterali colpisce i pazienti nelle prime fasi del trattamento e poi tende a ridursi nel tempo sia per frequenza sia per intensità. Gli eventi avversi, però, sono di difficile interpretazione a causa della varietà di sintomi correlati alla malattia, alla sua progressione e all'eventuale somministrazione contemporanea di altri farmaci. Negli studi clinici, la sospensione del farmaco per eventi avversi è riportata in percentuale molto bassa (1-5%). Le reazioni avverse più comuni sono nausea lieve (56%), vomito (33%), diarrea (24%), mialgia (11%), crampi muscolari (33%) ed eruzioni cutanee, come eritemi (35%). In tutti gli studi si sono riscontrati anche edemi superficiali, preorbitali (30%) o agli arti inferiori (17%). Nonostante questa frequenza, nella maggior parte dei casi gli edemi non sono gravi e vengono gestiti grazie all'utilizzo di diuretici, oppure riducendo la dose di farmaco somministrata. Inoltre, vi sono eventi avversi quali la ritenzione di fluidi, l'effusione pleurica, l'ascite, edemi polmonari e rapido aumento di peso che vengono gestiti interrompendo il trattamento o utilizzando, anche in questo caso, diuretici [69,70]. Fra gli inibitori TK approvati, IM mostra il più largo spettro di vulnerabilità e infatti sono state descritte più di 50 mutazioni nel dominio chinasi correlate a resistenza a questo inibitore. È stato scoperto che IM riconosce la conformazione chinasi inattiva, con l'A-loop in posizione chiusa. Inoltre, questa molecola forma dei legami ad idrogeno con la treonina 315, che si riflette nei tipi di mutazioni sul dominio chinasi (KD) associate con la farmacoresistenza [71]. Si pensa che le mutazioni sul P-loop prevengano l'aggiustamento strutturale richiesto per l'ottimale legame con il farmaco, e, per esempio, nei portatori dell'allele mutato T315I si abbia un ingombro sterico e una mutazione sull'A-loop che stabilizza la chinasi nella forma attiva, sfavorendo e impedendo il legame con IM. La presenza di questa mutazione prevede l'insorgere di resistenza, ma non ci sono garanzie che una persona portatrice di una mutazione "sensibile" al farmaco, risponda effettivamente ad un dato inibitore. La dose standard cui viene somministrato IM è di 400 mg/giorno, ma non è ancora stata completamente stabilita la programmazione di dosaggio più efficace. Dosi più frequenti (400 mg/2 volte al giorno) inducono risposte più rapide rispetto ad una sola dose giornaliera, ma non sono

state chiaramente associate a migliori outcome, e sono invece accompagnate da maggiori tossicità ematiche ed extra-ematologiche [72]. Nonostante l'effetto inibitorio di IM sia meno potente rispetto a nilotinib e dasatinib, questo farmaco viene spesso preferito perché è più economico rispetto agli inibitori di seconda generazione. Inoltre, da gennaio 2017, IM è disponibile come equivalente in moltissimi paesi, e il suo impiego permette una riduzione del bilancio sanitario nel trattamento a lungo termine [73]. Gli inibitori di 2° generazione sono stati sviluppati per migliorare i risultati ottenuti con IM e per superare i differenti meccanismi di resistenza [74].

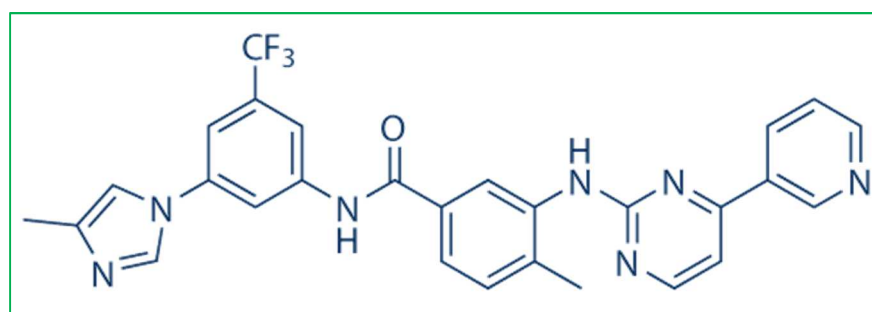


**Figura 10** - Struttura molecolare di imatinib

## 2.2 NILOTINIB

Nilotinib (AMN107) (Fig. 11) è un analogo strutturale di IM, con un effetto inibitorio 50 volte superiore rispetto al suo predecessore [75]. In aggiunta alla sua maggiore potenza, nilotinib ha una maggiore affinità per il KD ed è molto meno suscettibile alla comparsa di mutazioni puntiformi rispetto ad IM. Dagli studi eseguiti su questo inibitore è emerso che, paragonando la somministrazione di IM con nilotinib in prima linea (400 mg/2 volte al giorno), quest'ultimo è più efficace e produce una risposta più rapidamente [76,77]. Nonostante il basso rischio di progressione nella patologia promosso dall'impiego di nilotinib (impiegato alle dosi di 400 mg o 300 mg/2 volte al giorno), non è stato osservato un vantaggio nella sopravvivenza rispetto ad IM; la sopravvivenza globale, tuttavia, è maggiore nei due programmi di somministrazione di questo inibitore rispetto ad IM [78]. In particolare, i pazienti che hanno ricevuto la dose di 300 mg x 2 volte/giorno hanno avuto eventi avversi con una minor frequenza e meno interruzioni di terapia

dovuta alla scelta del farmaco rispetto a coloro cui è stata somministrata la dose più alta. Perciò, la dose di 300 mg/2 volte al giorno è quella correntemente impiegata per la somministrazione di prima linea [72,78]. Nilotinib induce risposte molecolari profonde più frequentemente e il suo profilo di tollerabilità generale è favorevole rispetto al suo predecessore, con ritenzione di fluidi, crampi muscolari e tossicità gastrointestinale riportati meno spesso con nilotinib [78]. Tuttavia, le anomalie nel profilo biochimico dei pazienti, come l'incremento dei livelli di bilirubina, esiti anomali degli esami epatici ed elevati livelli di lipasi, sono stati descritti ripetutamente più da chi si trova in cura con nilotinib, rispetto ad IM, comportando, talvolta, la sospensione della terapia. In aggiunta, è da tenere in considerazione che pazienti con fattori di rischio basale per il diabete devono essere tenuti sotto stretta sorveglianza durante l'impiego di nilotinib, e sarebbe meglio prendere in considerazione l'utilizzo di un inibitore TK alternativo per costoro [79]. Questi dati sono importanti anche se, nella maggioranza dei casi, i pazienti che sviluppano effetti tossici hanno dei fattori di rischio pre-esistenti, perciò può essere sufficiente un attento monitoraggio di tali individui. Inoltre, la valutazione dei rischi cardiovascolari associati con particolari inibitori TK indica che il numero di infarti al miocardio è maggiore per gli utilizzatori di nilotinib e dasatinib piuttosto che IM, perciò, prima di iniziare la terapia, è fortemente raccomandata una stima del rapporto rischi-benefici.



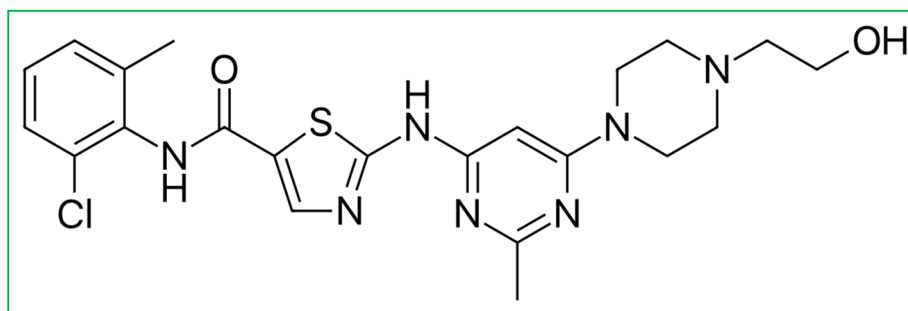
**Figura 11** - Struttura molecolare di nilotinib

### 2.3 DASATINIB

Dasatinib (BMS 354825) (Fig. 12) è un inibitore di 2° generazione con un'attività inibitoria *in vitro* 350 volte superiore a quella di IM [80]. Il vantaggio nell'utilizzo di questo inibitore è rappresentato dalla sua capacità di bloccare anche le chinasi della famiglia Src, una caratteristica che potrebbe essere importante per diminuire l'influenza dei pathway di segnalazione critici per le cellule di CML [81]. La dose registrata per dasatinib è 100 mg per la CML ai primi stadi della CP, secondo i dati riportati dal trial randomizzato DASISION, in cui sono stati comparati gli effetti dell'utilizzo di dasatinib in prima linea, 100 mg/giorno, con IM 400 mg/giorno. È stato dimostrato



che la CCyR a 12 mesi viene raggiunta in percentuale maggiore dai pazienti trattati con dasatinib, a discapito di IM, così come un maggior valore di risposta molecolare maggiore (MMR). Il tasso di progressione tumorale è più basso con l'inibitore di 2° generazione, ma non sono emersi vantaggi nella sopravvivenza. Il profilo di tollerabilità è favorevole verso l'impiego di dasatinib nei confronti di IM e il trattamento con questo inibitore non è associato con un notevole incremento della frequenza della tossicità cardiovascolare [82].



**Figura 12** - Struttura molecolare di dasatinib

Dai risultati ottenuti, si può sicuramente affermare che imatinib, dasatinib e nilotinib costituiscono un'adeguata opzione terapeutica per i pazienti affetti da CP-CML nel momento della diagnosi. Al di là dei trial clinici, la decisione riguarda quale inibitore TK sia più opportuno utilizzare per un singolo paziente e dipende dalla valutazione di diversi fattori, fra cui il rischio relativo della patologia, fattori di rischio per specifici eventi avversi, il possibile impatto del programma di somministrazione della dose e i costi. In pazienti con una bassa probabilità di rispondere a IM 400 mg, è preferibile utilizzare un inibitore di 2° generazione; al contrario, pazienti con un basso rischio, o quelli con un alto rischio di sviluppare eventi atero-trombotici, IM è da preferire. Alte dosi di questo farmaco possono comportare eventi benefici simili a quelli raggiungibili con dasatinib o nilotinib, ma, contemporaneamente, alte dosi si associano con un incremento dell'incidenza di alcuni eventi avversi, fra cui edema periferico, crampi muscolari, o tossicità del tratto gastro-intestinale [83]. Alcuni farmaci devono essere evitati a causa della tossicità intrinseca; per esempio, è preferibile non utilizzare nilotinib in pazienti con una storia clinica di patologie coronariche o con un serio rischio coronarico, e dasatinib dovrebbe essere evitato in coloro che hanno una diminuita funzionalità respiratoria, a causa della possibilità di provocare versamenti pleurici. Inoltre, sempre più spesso, viene presa in considerazione anche la farmaco-economia; infatti, da fine gennaio 2017 è disponibile IM equivalente e c'è quindi una notevole differenza di prezzo fra questo medicinale e gli inibitori di 2° generazione, fattore che pesa molto quando viene selezionata una terapia a discapito di un'altra.

### 3 - FARMACO-RESISTENZA

La frequenza della CML è in aumento, in quanto i pazienti in trattamento con inibitori TKI convivono con quello che viene sempre più considerato un disturbo cronico piuttosto che una malattia potenzialmente letale. È stato stimato che più del 25% dei pazienti che faccia uso di un inibitore lo cambi almeno una volta nel corso del trattamento a causa di intolleranze o resistenza [84]. Le mutazioni presenti sul KD di BCR-ABL sono il meccanismo di resistenza più studiato nella CML, ma non sono in grado di spiegare il 20-40% dei casi che insorgono. L'attivazione di pathway alternativi di sopravvivenza, indipendenti da BCR-ABL, potrebbero essere coinvolti in questo meccanismo.

Il *National Comprehensive Cancer Network* e le linee guida della *European LeukemiaNet* categorizzano le risposte citogenetiche e molecolari in ogni intervallo come 'ottimali', 'allerta', o 'fallimento'. La risposta ottimale è associata ad una aspettativa di vita simile a quella della popolazione generale, mentre il fallimento corrisponde alla resistenza agli inibitori TK e rischio incrementato di progressione o morte, con richiesta di sostituzione del farmaco con un inibitore più adatto [66]. Gli obiettivi della terapia sono tre, 1) impedire la trasformazione blastica e assicurare un'aspettativa di vita normale, 2) eliminare o ridurre a proporzioni così piccole la popolazione leucemica da consentire al paziente di sospendere senza danno la terapia (cosiddetta guarigione clinica o "treatment-free remission"), 3) assicurare una qualità di vita normale. I primi due obiettivi sono a lungo o lunghissimo termine, quindi è utile stabilire alcuni obiettivi a breve termine, che in qualche misura anticipino i risultati a lungo termine (la vita e la guarigione) e siano di aiuto per regolare la terapia nel tempo. Ci sono degli obiettivi "minimi" (o stato di allerta, che corrispondono alla definizione di "warning" secondo l'European LeukemiaNet) e degli obiettivi "ottimali" (che corrispondono alla definizione di risposta ottimale secondo l'European LeukemiaNet). Se l'obiettivo "minimo" non è raggiunto, la terapia deve essere cambiata. Invece, se l'obiettivo "ottimale" non è raggiunto, la terapia può essere mantenuta o può essere cambiata, per cercare di ottenere una risposta ottimale, valutando i pro e i contro del cambiamento. Il fallimento del trattamento di prima linea può essere definito come il mancato raggiungimento della CHR/<95% Ph+ ai 3 mesi, quindi non aver raggiunto la risposta ematologica e la MMR, del <10% BCR-ABL/Ph<35% ai 6 mesi o <1% BCR-ABL/CCyR ai 12 mesi (Tab. 1). Questo fenomeno capita circa nel 25% circa dei pazienti trattati con IM [66], la progressione della patologia agli stadi AP/BP determina invece l'insuccesso in qualunque momento. Il trattamento di seconda linea viene definito inefficace nel momento in cui, in seguito ad iniziale risposta, si ha perdita di beneficio, e la perdita di risposta è rappresentata dalla perdita di CCyR, CHR o progressione ad

AP/BP. Le possibili cause del fallimento terapeutico sono molteplici [85]. Una scarsa adesione alla terapia è fra i motivi più frequenti di mancato successo e deve essere seriamente tenuta in considerazione; le mutazioni su BCR-ABL, che modificano il legame con la molecola di farmaco e che alterano direttamente gli aminoacidi presenti sul sito di legame (tipo la T315I, F317L, o F359C/V) o cambiano indirettamente la conformazione della proteina (G250E, Q252H, E255K/V), sono cruciali per capire se la loro presenza infici o meno l'efficacia della terapia e la conseguente scelta dell'inibitore TK. Altre ragioni potenziali includono le interazioni farmacocinetiche, come un metabolismo accelerato degli inibitori a causa di induttori degli enzimi epatici CYP3A4, o l'impiego degli inibitori della pompa protonica che inibiscono l'assorbimento dei farmaci. Ci sono molti meccanismi che possono provocare una ridotta concentrazione dell'inibitore TK nella cellula nonostante gli adeguati livelli plasmatici, come una sovraespressione delle proteine di efflusso glicoproteina-P o ABCG2 (che influenzano imatinib, dasatinib e nilotinib), o una bassa attività di OCT1, che è richiesta per l'ingresso di IM nella cellula, oppure, l'over-espressione della chinasi Src Lyn, attraverso un meccanismo non ancora del tutto chiarito [86].

A livello meccanicistico, le resistenze agli inibitori TK possono essere classificate in base al fatto che esse siano dipendenti da BCR-ABL o indipendenti. Della prima categoria fanno parte tutti i meccanismi che stravolgono l'effettiva inibizione chinastica del recettore, come mutazioni puntiformi nel KD che compromettono il legame con i farmaci o i processi cellulari/biologici che interferiscono con la disponibilità degli inibitori TK e portano a concentrazioni non ottimali dei farmaci al loro target [87]. Al contrario, i meccanismi indipendenti da BCR-ABL sono mediati dall'attivazione di pathway di sopravvivenza alternativi che operano in un contesto di effettiva inibizione del recettore chinastico.

La resistenza clinica manifesta appartiene ad entrambe le tipologie, anche se la resistenza acquisita sembra essere più della prima categoria, mentre la primaria è soprattutto indipendente da BCR-ABL [88]. Nella resistenza dipendente da BCR-ABL, il raggiungimento o il ripristino dell'inibizione di BCR-ABL dovrebbe indurre o recuperare le risposte e l'approccio più efficace è l'utilizzo di un inibitore TK alternativo. Per ovvie ragioni, questa strategia non sarà efficace nella resistenza indipendente da BCR-ABL.

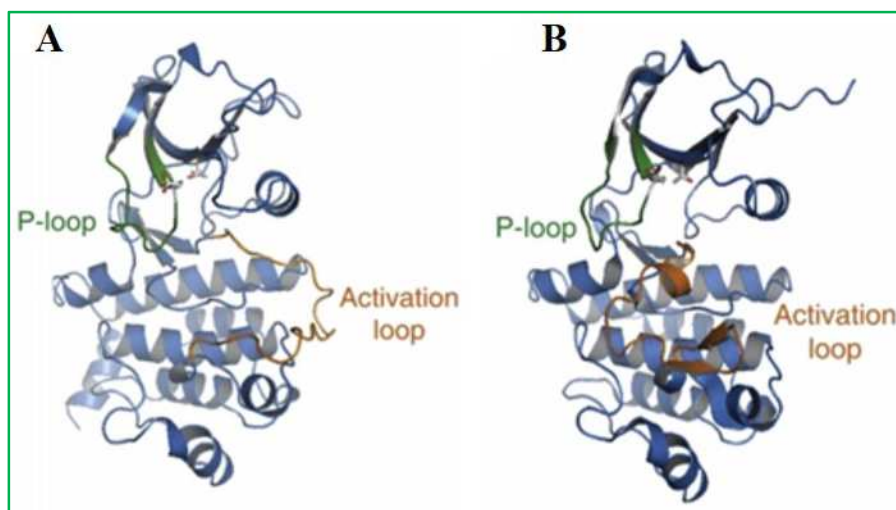
<b>Tabella 1 - Criteri di risposta secondo la European LeukemiaNet (ELN)</b>			
<b>TEMPO</b>	<b>OTTIMALE</b>	<b>ALLERTA</b>	<b>FALLIMENTO</b>
Baseline	NA <sup>a</sup>	Alto rischio, o CCA/Ph+, percorso principale	NA
3 mesi	BCR-ABL $\leq$ 10% e/o Ph+ $\leq$ 35%	BCR-ABL >10% e/o Ph+ 36-95%	Non-CHR e/o Ph+ >95%
6 mesi	BCR-ABL <1% e/o Ph+ 0	BCR-ABL 1-10% e/o Ph+ 1-35%	BCR-ABL >10% e/o Ph+ >35%
12 mesi	BCR-ABL $\leq$ 0,1% (per es MMR)	BCR-ABL >0,1-1% (per es. perdita di MMR)	BCR-ABL >1% e/o Ph+ >0% (per es. perdita di CCyR)
In ogni momento	BCR-ABL $\leq$ 0,1%	CCA/Ph- (-7, o 7q-)	Perdita di CHR
			Perdita di CCyR
			Perdita confermata di MMR <sup>b</sup>
			Mutazioni
			CCA/Ph+

<sup>a</sup> Abbreviazioni: CCA/Ph+ = anormalità citogenetiche clonali nelle cellule Ph+; CCA/Ph- = anormalità citogenetiche clonali nelle cellule Ph-; CCyR = risposta citogenetica completa; MMR = risposta molecolare maggiore; NA = non applicabile.

<sup>b</sup> In due test consecutivi, almeno uno dei quali che abbia il trascritto BCR-ABL  $\geq$ 1%

### 3.1 RESISTENZA DIPENDENTE DA BCR-ABL

A seconda di quale conformazione chinasi riconoscono, gli inibitori TK si classificano come inibitori di tipo I o II (Fig. 13). Tutti gli inibitori del sito attivo sono essenzialmente competitivi per l'ATP, quelli di II tipo possono essere considerati come stabilizzatori della conformazione inattiva dell'enzima, mentre gli inibitori di tipo I competono molto più direttamente con l'ATP per il legame con la tasca enzimatica. Fra gli inibitori TK approvati, imatinib, nilotinib e ponatinib sono di tipo II, mentre dasatinib appartiene alla prima categoria e bosutinib ha caratteristiche di entrambe le tipologie [89,90]. Queste informazioni sono importanti poiché permettono di prevedere quali tipologie di mutazioni e in che numero conferiscono resistenza ad uno specifico inibitore. Generalmente, gli inibitori di II tipo hanno requisiti di legame più stringenti, sono molto più vulnerabili alle mutazioni, ma hanno il vantaggio di essere molto selettivi [91]. Viceversa, quelli di tipo I sono meno sensibili verso il target, ma più permissivi alla comparsa di alterazioni sul sito di legame.



**Figura 13** - Inibitori di tipo I o tipo II. **13A** 'DFG in', conformazione attiva, inibitore di I tipo; **13B** 'DFG out', conformazione inattiva, inibitore di II tipo

In una percentuale che varia dal 50 al 90%, i pazienti che sono stati trattati con IM e hanno avuto una ricaduta sviluppano mutazioni nel KD [88]. Poiché gli inibitori TK bloccano l'attività di BCR-ABL legando e inattivando l'ATP-binding loop del dominio chinasi, la presenza di mutazioni può conferire resistenza alterando la conformazione proteica. Questo processo può prevenire l'accesso degli inibitori TK alla tasca riducendo l'affinità di legame, oppure indebolire i legami a idrogeno necessari per il legame con la molecola di farmaco o mantenere l'A-loop in conformazione attiva (sfavorita per il legame di molti inibitori TK) [92]. Le sostituzioni puntiformi a 12 residui (M244, G250, Q252, Y253, E255, V299, F311, T315, F317, M351, F359 e H396) rappresentano le mutazioni più comuni associate a resistenza, e si sviluppano più frequentemente durante la fase accelerata/blastica rispetto a quella cronica [93]. Questo aspetto suggerisce che la riattivazione del segnale di BCR-ABL sia critico e conferisca un fenotipo clinico aggressivo; poiché, però, questo sviluppo non è prevedibile, non è generalmente raccomandabile testare i pazienti per le mutazioni al KD al momento della diagnosi [66,94]. È interessante notare che la durata della malattia prima dell'inizio della terapia con gli inibitori si associa con la frequenza delle mutazioni nel KD, a sostegno della teoria che evidenzia il ruolo dell'auto-mutagenesi indotta da BCR-ABL [93]. Inoltre, nella fase avanzata della CML, l'evoluzione citogenetica clonale e il numero di mutazioni nel KD sono correlate, suggerendo una relazione temporale fra l'esposizione non-inibente l'attività chinasi di BCR-ABL e il grado d'instabilità genomica [92]. Nonostante le mutazioni puntiformi nel KD dell'oncogene di fusione siano fra i meccanismi di resistenza ad IM fra i più studiati, queste mutazioni non sono riscontrabili in tutti i tutti i pazienti che sviluppano resistenza agli inibitori TK [95]. Il fallimento nella risposta ad un determinato inibitore in assenza di mutazioni sul KD può far ipotizzare il coinvolgimento di un meccanismo di resistenza

alternativo dipendente da BCR-ABL (come le pompe di efflusso) oppure indipendente dal gene ibrido. L'aumentata espressione di BCR-ABL mediante amplificazione genica, duplicazione del cromosoma Ph e differente regolazione della trascrizione genica è stata dimostrata nei pazienti, ma la sua relazione con la resistenza clinica acquisita è meno certa rispetto ai casi in cui sono presenti le mutazioni nel KD [96]. L'incapacità di IM di legare BCR-ABL mutato ha dato lo slancio per lo sviluppo degli inibitori di 2° generazione dasatinib, nilotinib. Questi inibitori TK sono in grado di superare la resistenza ad IM derivante dalla presenza di mutazioni puntiformi mediante un'affinità di legame con BCR-ABL notevolmente maggiore rispetto ad IM; tuttavia, un'eccezione è rappresentata dalla mutazione T315I definita "gate-keeper", che conferisce resistenza anche agli inibitori di 2° generazione [75,97].

Poiché gli inibitori TK sono somministrati oralmente, la loro biodisponibilità dipende dall'assorbimento gastrointestinale, dal metabolismo di primo passaggio e dalle pompe di influsso/efflusso cellulare. Ne consegue che, nel caso siano presenti variazioni nei geni che regolano il metabolismo, si avranno ripercussioni sulla farmacocinetica e la farmacodinamica del farmaco [60].

## **3.2 GENI DEL PROCESSO ADME**

### **3.2.2 GENI DEL METABOLISMO**

#### **- CITOCROMO P450**

Il complesso del citocromo P450 è il maggior responsabile del metabolismo primario degli inibitori TK; l'isoforma 3A4 è il principale enzima coinvolto, ma intervengono anche il CYP3A5, CYP2C8 e CYP2D6 [98]. IM viene convertito nel metabolita principale N-demetil-imatinib, che è farmacologicamente attivo, ma 3-4 volte meno citotossico di IM [99]. Studi recenti hanno dimostrato che, durante il trattamento con IM, si ha un'auto-inibizione di CYP3A4 ad opera del farmaco stesso, che viene in parte superata mediante l'intervento di CYP2C8 [100]. Alcuni studi hanno preso in considerazione il ruolo dei polimorfismi sulle isoforme del citocromo *CYP450* rispetto agli outcome clinici. La presenza del genotipo GG su *CYP3A5\*3* è significativamente associato con un'alta concentrazione plasmatica, ma non ci sono ripercussioni a livello di esito clinico; i portatori del genotipo 15631 GG/TT su *CYP2B6* hanno una perdita di CHR maggiore rispetto al genotipo etero, mentre la CCyR è maggiore nel modello dominante GG/GT rispetto al recessivo TT. Inoltre, la resistenza citogenetica primaria è risultata maggiore in soggetti con la variante wild-type (WT) o mutata rispetto agli etero, al contrario della comparsa di effetti collaterali, che era più frequente nei GG rispetto ai GT/TT [101]. CYP3A4 è anche il principale metabolizzatore di dasatinib e nilotinib, con il primo inibitore TK che funge da agente competitivo

per CYP3A4 e CYP2C8, mentre nilotinib ha un'attività di blocco su CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9 e CYP2D6 [102].

- *UGT1A1*

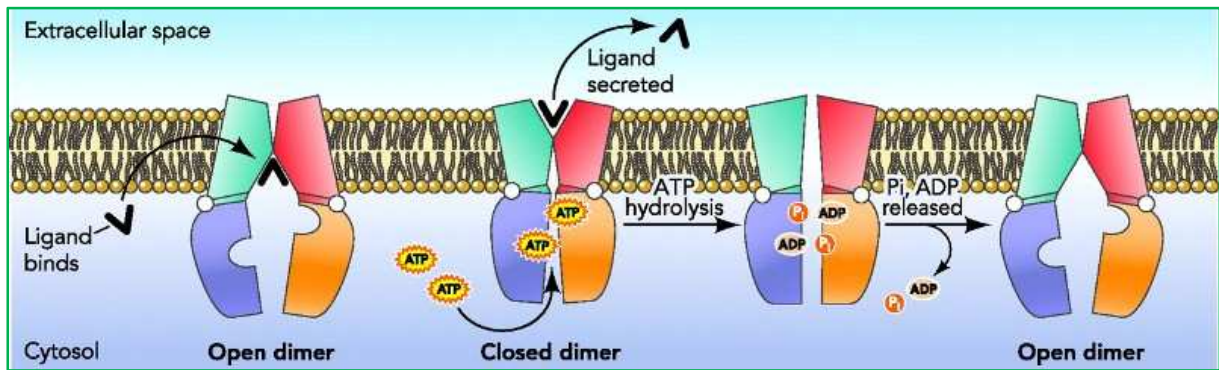
Un altro aspetto che coinvolge il metabolismo degli inibitori TK riguarda il processo di glucuronidazione del metabolita attivo in uno inattivo e facilmente eliminabile. La reazione è catalizzata dall'enzima uridina difosfato glucuronosiltrasferasi (UGT1A1), che trasforma piccole molecole lipofile, fra cui anche gli inibitori, nei corrispondenti derivati solubili in acqua. Questo enzima coniuga il gluconato con la bilirubina umana e la presenza di mutazioni nella sua struttura può associarsi a rischio di iperbilirubinemia nei pazienti trattati con inibitori TK [103].

### 3.2.2 GENI ADIBITI AL TRASPORTO DI FARMACI

La concentrazione intracellulare del farmaco dipende dall'ingresso e dall'efflusso dello stesso attraverso le proteine trasportatrici transmembrana. ABCB1 (o MDR o P-GP) e ABCG2 (BCRP2), membri della famiglia di proteine multidrug-resistance ATP-binding cassette (MDR-ABC), sono mediatori chiave dell'efflusso attivo del farmaco [104] e i polimorfismi presenti su questi geni sono utili marcatori predittivi per la risposta al trattamento. Studi clinici hanno dimostrato che i livelli di espressione di ABCB1 sono elevati negli stadi avanzati di CML e l'alta espressione di ABCB1 è associata con un basso livello di MMR e con sviluppo di resistenza ad IM [105,106].

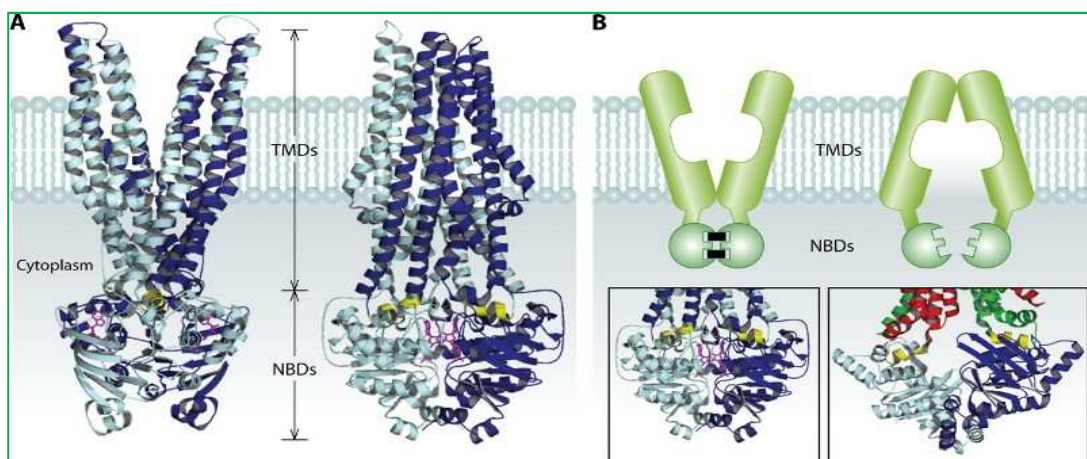
#### **STRUTTURA-FUNZIONI-GENERALITÀ:**

I trasportatori ATP-binding cassette (ABC) sono una superfamiglia di proteine integrali di membrana espresse in tutti gli organismi viventi e che utilizzano l'energia creata idrolizzando l'ATP per permettere il trasporto, attraverso le membrane di cellule e organelli citosolici, di una vasta gamma di substrati [107]. Queste proteine possono essere di efflusso o di uptake a seconda che favoriscano il passaggio dei composti all'esterno o verso l'interno della membrana. Nell'uomo però, come in tutti gli organismi eucarioti, esistono solo le ABC di efflusso, che hanno quindi un meccanismo unidirezionale che gli permette di spostare i substrati dagli organelli - reticolo endoplasmatico, mitocondri e perossisomi - al citoplasma e da questo allo spazio extracellulare (Fig. 14) [108]. Le proteine ABC si possono trovare soprattutto a livello di fegato, intestino, barriere emato-encefalica ed emato-testicolare, reni e placenta, e trasportano una vasta quantità di molecole, come zuccheri, peptidi, ioni metallici, composti idrofobici e metaboliti necessari per il sostentamento delle cellule [109].



**Figura 14** - Meccanismo d'azione dei trasportatori ABC umani

La struttura base che definisce i membri di questa famiglia di proteine è data dalla combinazione di domini ATP-binding e transmembrana. Nell'uomo, le proteine ABC presentano quattro domini: due transmembrana (TMD: Transmembrane Domain) costituenti la via di passaggio, e due citoplasmatici in grado di legare ATP (NBD: Nucleotide Binding Domain) (Fig. 15) [110]. Le proteine ABC possono essere strutturalmente classificate in trasportatori pieni, formati dai quattro domini presenti all'interno di una catena polipeptidica, oppure in emi-trasportatori che presentano una catena polipeptidica contenente un solo TMD e un solo NBD citosolico. In quest'ultimo caso, i trasportatori ABC diventano funzionalmente competenti solo dopo aver subito dimerizzazione, con un'associazione tra le due catene di tipo transitorio [111].



**Figura 15** - Struttura di un trasportatore ABC e meccanismo di apertura/chiusura. **15A** Rappresentazione con  $\alpha$ -eliche; **15B** Rappresentazione schematica

- *ABCB1*

Nello studio condotto da Gurney e collaboratori sono state analizzate le associazioni fra le tre varianti più frequenti di *ABCB1*, 1236 T>C, 2677 G>T/A and 3435 C>T, e la clearance di IM in pazienti affetti da CML o tumori stromali gastrointestinali (GIST). La riduzione della clearance è



minore se i pazienti hanno il genotipo TT in tutte e tre le varianti [112]. In particolare, mediante altri studi, è stato dimostrato che i pazienti con 1236TT o 2677TT/TA raggiungono un valore di MMR significativamente maggiore [113], risultati parzialmente in contrasto con quanto trovato da Deenik e coll. che affermano che 1236CT/TT, 3435TT e 2677TT siano associati con bassa CMR e MMR [114]. Nonostante i risultati non siano ancora stati confermati all'unanimità, i ricercatori sono concordi nell'attribuire enorme importanza ai livelli di espressione di ABCB1 per la responsività nei confronti di IM, e supportano la necessità di monitorarli come marcatori precoci di risposta nei pazienti affetti da CML e in trattamento con IM [105,106].

#### - ABCG2

Imatinib, nilotinib e dasatinib hanno dimostrato di essere substrati con una notevole affinità per ABCG2. Studi *in vitro* hanno mostrato che la sovraespressione di questo gene si accompagna con un'elevata resistenza ad IM, nilotinib e dasatinib [60]. Nonostante tutti gli inibitori TK possano inibire l'attività di ABCG2 ad alte dosi, l'inibitore di 3° generazione ponatinib non influenza l'espressione di ABCB1 né di ABCG2 [115]. È stato dimostrato che i livelli di espressione di ABCG2 sono più alti in pazienti resistenti ad IM e in coloro che non hanno mai raggiunto la MMR [116]. Sono state inoltre valutate due varianti di questo gene: 34 G>A e 421 C>A, ed è stato trovato che il diplotipo 34AA-421AA si associa ad una miglior risposta ad IM, mentre la variante 421A è correlata a più alte MMR e CCyR [117].

#### - SLC22A1

L'uptake intracellulare attivo degli inibitori TK è controllato dall'attività delle proteine di influsso, come il membro della famiglia di trasportatori di soluti SLC22A1 (o OCT1). Questa proteina può legare IM, ma le variazioni nei suoi livelli di espressione possono essere o meno associate con la risposta al trattamento [118]. Secondo studi *in vitro*, l'uptake di IM non dipende dall'espressione di SLC22A1 ma, dall'altro lato, l'attività di OCT1 sembra essere un ottimo predittore della risposta ad IM e della MMR [119].

#### - TRASPORTATORI ALTERNATIVI

In aggiunta alle pompe di influsso/efflusso primarie, ci sono altri trasportatori transmembrana che possono introdurre variabilità nella risposta agli inibitori TK, come il trasportatore di influsso SLCO1B3, SLCO1A2 e OCTN1, e quelli di efflusso ABCA3 e ABCC4. Il motivo per cui è importante analizzare ulteriori trasportatori deriva dai risultati spesso conflittuali ottenuti nel corso dei vari progetti realizzati; infatti, nonostante sia chiara l'importanza di questi geni nell'eventuale risposta agli inibitori TK, spesso gli studi sono realizzati solo *in vitro* o in coorti di pazienti di piccole dimensioni che ne limitano la potenza statistica, rendendo necessari ulteriori approfondimenti [120].

### 3.3 RESISTENZA INDIPENDENTE DA BCR-ABL

Per tutti i pazienti che sono risultati resistenti al trattamento con gli inibitori TK, ma non hanno mutazioni evidenti su BCR-ABL, numerosi studi hanno mostrato che i pathway disposti a valle di BCR-ABL possono compensare la perdita dell'attività del recettore chinasi di fusione e possono essere responsabili della resistenza acquisita alla terapia. Il principale razionale alla base di questa ipotesi deriva da uno studio precoce che ha osservato la presenza di una popolazione di cellule staminali progenitori di CD34<sup>+</sup> resistenti ad IM nel sangue dei pazienti [121]. Le cellule staminali CD34<sup>+</sup> di CML sono differenti dalle normali staminali nel loro profilo molecolare e trascrittomico [122], ed il trattamento con IM non è in grado di eliminare totalmente questo ceppo di cellule, così come falliscono anche gli inibitori di 2° generazione [123].

#### 3.3.1 KIT e HIF1A

Il proto-oncogene *KIT* (noto anche come *SCFR*, *CD117* o *c-KIT*) codifica per un recettore di citochine di superficie delle cellule staminali ematopoietiche, che viene attivato in diversi tipi di cancro e regola la proliferazione cellulare, il differenziamento e la migrazione. Le cellule di CML Ph<sup>+</sup> hanno elevata espressione di KIT ed è stato dimostrato che IM e nilotinib legano e bloccano direttamente l'attività di KIT, ma l'efficienza d'inibizione delle cellule di CML CD34<sup>+</sup> con KIT elevato può variare notevolmente da un farmaco all'altro [124]. Inoltre, il completo arresto di KIT sembra essere necessario per indurre l'apoptosi nelle cellule CD34<sup>+</sup> dopo l'inibizione di BCR-ABL. Questi risultati fanno ipotizzare che l'attivazione di KIT possa influenzare la risposta terapeutica agli inibitori TK, ma gli studi sulla CML e KIT sono al momento ancora agli albori e necessitano di ulteriori approfondimenti [60]. Uno dei target attivati da KIT, il fattore 1 $\alpha$  inducibile con l'ipossia (HIF1A), è un fattore di trascrizione che regola la risposta all'ipossia. La sua sovraespressione è associata con differenti tipologie tumorali, con influenza su metabolismo cellulare, sopravvivenza ed invasione. In assenza di mutazioni su BCR-ABL, le cellule di CML Ph<sup>+</sup> resistenti ad IM hanno mostrato un'alta espressione di HIF1A, suggerendo l'ipotesi che l'attività di HIF1A possa sostenere i progenitori delle cellule leucemiche e permetterne la sopravvivenza all'interno del microambiente ipossico del midollo osseo [125].

#### 3.3.2 PATHWAY DI SEGNALAZIONE A VALLE

Molti studi focalizzati sui meccanismi dell'oncogenesi della CML sono concordi nell'affermare che i pathway di segnalazione PI3K/AKT/mTOR, p38/MAPK e STAT5, a valle di BCR-ABL, sono attivati [60]. Questi studi hanno dimostrato che i pathway non solo mediano l'effetto dell'attivazione di BCR-ABL, ma la loro inibizione è necessaria per controllare la crescita e la proliferazione delle cellule di CML. Lo studio condotto da Jilani e colleghi ha mostrato che i pazienti resistenti hanno livelli significativamente più bassi di BCR-ABL, di *CRKL* (proto-

oncogene CRK-simile) e i livelli di fosforilazione di AKT [126], suggerendo la presenza di vie di trasduzione alternative che possono attivarsi nei paziente refrattari alla terapia, indipendenti dall'attivazione del recettore ibrido. Studi *in vitro* hanno inoltre dimostrato che, in pazienti resistenti agli inibitori TK, è possibile lo sviluppo di mutazioni che attivino costitutivamente il pathway PI3K/AKT, e la co-inibizione dei segnali di PI3K/AKT e di MAPK comporta un'eliminazione significativamente amplificata dei progenitori delle cellule CD34<sup>+</sup> [127]. Recentemente è stato dimostrato che i livelli di espressione di STAT5 sono aumentati nei pazienti trattati con IM, perciò, la selezione di cloni cellulari che esprimono eccessivamente STAT5 potrebbe essere un meccanismo di resistenza acquisita nei pazienti Ph<sup>+</sup> che inizialmente rispondevano al trattamento con gli inibitori [128]. Altri studi recenti hanno riportato che l'inibizione del segnale Jak/STAT, sia mediante l'impiego di inibitori di JAK, sia attraverso il blocco di STAT5A e STAT5B, incrementa significativamente la responsività ad IM nelle cellule CML Ph<sup>+</sup> e alla chemioterapia nelle cellule resistenti.

Il trattamento della CML ha subito un notevole passo in avanti in seguito all'introduzione degli inibitori TK, ma, nonostante questo, la resistenza e le ricadute inficiano parte degli ottimi risultati ottenuti. Numerosi varianti germinali possono influenzare l'efficacia della terapia target nei pazienti con CML, sia quelle presenti sui geni coinvolti nel metabolismo e nel trasporto dei farmaci, sia quelle presenti sul gene bersaglio. Inoltre, è possibile si attivino pathway di segnalazione compensatori a valle di BCR-ABL che influenzano il successo terapeutico. Ai pazienti con CML, nella routine diagnostica, non viene eseguito il *profiling* per varianti genetiche per predire l'efficacia del trattamento, soprattutto perché la maggioranza dei risultati riportati fa riferimento a studi clinici condotti su piccola scala. Perciò, per ottenere dei biomarcatori clinici affidabili, è richiesta una validazione in studi realizzati su larga scala, e i pazienti che ricevono come trattamento gli inibitori TK dovrebbero essere monitorati nel lungo tempo in modo da osservare, e comprendere, come varia il loro genoma tumorale in risposta alla terapia.

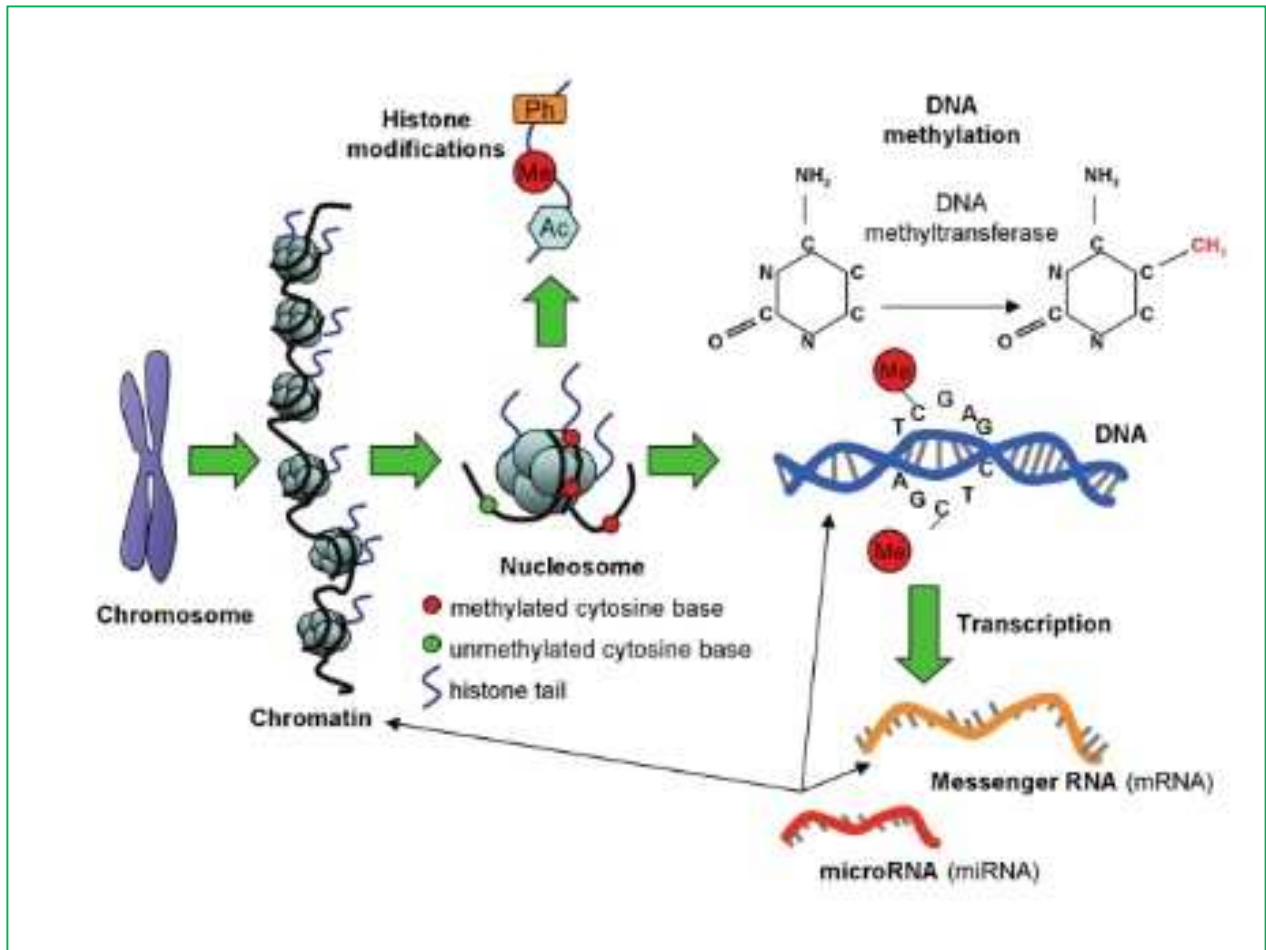
## FARMACOGENETICA, FARMACOGENOMICA ED EPIGENETICA

Le strategie antitumorali si sono evolute molto nel corso delle ultime decadi per soddisfare le nuove tecnologie e le più recenti opzioni terapeutiche che sono state sviluppate in risposta all'ampia variabilità ed eterogeneità degli outcome dei pazienti presentanti caratteristiche clinico-patologiche simili [129]. In molti casi, pazienti trattati con lo stesso regime terapeutico ottengono significative differenze nella risposta al farmaco e nella sopravvivenza, perciò, le strategie tradizionali che si basano solo sui fattori clinico-istopatologici della patologia o su quelli ambientali quali sesso ed età, non sono poi efficaci per tutti i malati [130]. Con l'evoluzione delle tecnologie in grado di analizzare l'intero genoma e la possibilità di svolgere *high-throughput screening* genetici, è stato ampiamente dimostrato che il make-up genetico dell'individuo influenza la risposta ai farmaci. Questo nuovo interesse ha come conseguenza un notevole incremento di studi focalizzati sul ruolo della farmacogenetica e della farmacogenomica nel trattamento dei tumori [131,132]. La farmacogenomica è una scienza che sta rapidamente prendendo piede e che studia come l'interazione della genetica dell'individuo con la farmacologia molecolare determini il contributo delle variazioni genetiche inter-individuali sull'esito clinico e la risposta ad un trattamento farmacologico [133]. Utilizzando il profilo genomico di un paziente per chiarire le determinanti rilevanti per il processo ADMET (assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione, tossicologia) del farmaco o per la risposta alla terapia, potrebbe essere possibile sviluppare trattamenti più sicuri e più efficaci [134]. L'idea alla base è che la scelta del farmaco possa essere eseguita bilanciando la probabilità di cura contro la possibile insorgenza di effetti avversi, basandosi sulle caratteristiche genetiche individuali. I profili genomici dei pazienti possono inoltre suggerire quali siano le terapie di scarso effetto, ma associate ad un alto rischio di sviluppare effetti avversi in quel particolare sottogruppo di pazienti [135]. Con il rapido sviluppo di nuove tecnologie nel campo del *profiling* genomico, è possibile esaminare efficacemente le varianti presenti nell'intero genoma, mediante studi di associazione *genome wide* (GWAS), testando e analizzando qualche milione di marcatori genetici per ogni paziente, al fine di determinare le associazioni fra queste varianti e un particolare fenotipo di interesse [136]. Gli studi GWAS sono indagini sistematiche e potenziate che esaminano le relazioni fra le variazioni comuni nelle sequenze genomiche e la predisposizione alle diverse patologie a livello dell'intero genoma. La capacità di realizzare questa tipologia di studi ha avuto come risultato quello di comprendere le basi genetiche dei comuni fenotipi di importanza biomedica, come diabete, asma e alcune tipologie di tumori [136]. La farmacogenetica può essere, quindi, definita come lo studio dei fattori

genetici che possono influenzare la risposta ad un trattamento in un paziente, infatti, essa consiste nell'analisi delle basi genetiche delle differenze nella risposta al farmaco. In particolare, si occupa delle variazioni nella sequenza nucleotidica in uno o più specifici geni, mentre la farmacogenomica prende in considerazione l'intero genoma e le sue eventuali associazioni con i diversi fenotipi farmacologici. Grazie allo sviluppo di una tecnologia genomica, è stato possibile elaborare un approccio genetico da genotipo a fenotipo, analizzando i polimorfismi genetici, considerati il punto di partenza per la valutazione di come la variabilità genomica si traduca in differenziamento fenotipico [137]. Ciascun individuo differisce dagli altri approssimativamente ogni 300-1.000 nucleotidi, con un totale stimato di 10 milioni di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP, che sono sostituzioni di singole paia di basi riscontrate con una frequenza, rispetto alla popolazione generale, maggiore o uguale all'1%), aplotipi o loro mutazioni ereditabili, alterazioni cromosomali e migliaia di variazioni nel numero di copie di geni (CNV) [60]. La risposta al farmaco risulta quindi associata ad un fenotipo gene-ambiente, e da questo ne consegue che l'outcome di un individuo dipende dalla complessa relazione tra fattori ambientali e genetici. La variazione nella risposta potrebbe perciò essere causata da modifiche ambientali e genetiche, o da entrambe [138]. Grazie a questa nuova consapevolezza, si possono gettare le basi per la futura identificazione di nuovi target farmacologici e dei corrispondenti nuovi farmaci. In questo contesto, la farmacogenetica permette di individuare gruppi di pazienti con una più alta o bassa probabilità di rispondere ad un determinato trattamento, mentre la farmacogenomica ha come obiettivo l'identificazione di nuovi bersagli molecolari. L'integrazione e lo sviluppo delle due discipline permette di impiegare un farmaco in una popolazione selezionata e ristretta definendone i parametri di risposta positivi e minimizzando lo sviluppo di eventi avversi in pazienti che non ne trarrebbero alcun beneficio, promuovendo un aggiustamento del dosaggio farmacologico genotipo-specifico [139]. Esaminare ed identificare i fattori genetici sia somatici sia germinali che influenzano la sensibilità ai farmaci è importante per ottenere informazioni prognostiche, prevedere l'outcome di un trattamento e migliorare l'efficacia e la sicurezza di un farmaco per il benessere dei pazienti [60]. In seguito all'insorgenza di effetti non specifici dovuti all'impiego di agenti chemioterapici citotossici con uno stretto indice terapeutico, l'approccio farmacogenetico ha acquisito sempre maggior rilevanza in molti trattamenti. Soprattutto, l'importanza di questo metodo diventa fondamentale nei casi in cui i pazienti non rispondono, sviluppano resistenza o vanno incontro all'insorgenza di effetti avversi al farmaco [33]. Il progresso nella conoscenza dei complessi scambi fra le mutazioni puntiformi, le aberrazioni cromosomiche e i cambiamenti epigenetici che avvengono nel processo multi-step della carcinogenesi rappresenta un notevole aiuto per la nuova classificazione molecolare dei tumori [140]. Molti studi stanno cercando di

validare i biomarcatori epigenetici responsabili della risposta terapeutica e che, se combinati con le mutazioni geniche dei pazienti, lo stato di instabilità cromosomica (CIN) e dei microsatelliti (MSI), e la caratterizzazione clinica del tumore, possono aiutare a definire quegli individui che possono realmente trarre benefici dall'impiego di una determinata cura [140]. In modo analogo, integrando i dati provenienti dai trial attivi e in fase di avviamento con gli studi *in vitro* volti a determinare su scala genomica i pathway epigenetici responsabili dell'acquisizione della resistenza tumorale, si potrebbe arrivare all'identificazione dei target più promettenti e allo sviluppo o di nuove strategie o di composti che riducano la tossicità e ottimizzino la risposta cellulare al trattamento, con la speranza che alcuni di essi possano arricchire l'armamentario terapeutico ad oggi disponibile per il paziente.

Parlando di farmacogenetica, un capitolo di grande interesse va dedicato a quelle modificazioni genetiche, citogenetiche ed epigenetiche che avvengono durante il processo di transizione dalla lesione precancerosa a patologia conclamata, siano esse *driver* dell'acquisizione del fenotipo tumorale step-by-step, o siano esse risultanti da questo meccanismo [141,142]. L'epigenetica riguarda lo studio dei cambiamenti ereditabili nell'espressione genica che non derivano da alterazioni nella sequenza nucleotidica del DNA, e l'analisi di centinaia di geni che modificano i livelli della loro espressione durante la carcinogenesi come una conseguenza degli eventi epigenetici che includono variazioni nei livelli di metilazione del DNA, cambiamenti nelle code istoniche e rimodellamento cromatinico, oppure interferenze nei meccanismi mediati da molecole di RNA non codificante (Fig. 16) [142,143]. Alcuni di questi marcatori epigenetici stanno acquisendo notevole rilevanza nella routine clinica come potenziali biomarcatori di risposta terapeutica, e quindi la 'farmaco-epigenetica' diventa lo studio delle basi epigenetiche responsabili di variazioni nella risposta ad una terapia [144]. Inoltre, le modificazioni epigenetiche sono reversibili, quindi la ricerca sugli effetti benefici dei farmaci epigenetici ('epi-farmaci'), da soli o in combinazione con le terapie standard, è un argomento assolutamente attuale nella cura antitumorale [140]. I meccanismi epigenetici includono tre principali pathway molecolari: metilazione del DNA, modificazioni delle code istoniche (acetilazione e deacetilazione) e regolazione dell'espressione genica mediata dall'RNA [145]. Molti farmaci, definiti appunto epi-farmaci, sono in grado di inibire l'attività degli enzimi che aggiungono o rimuovono i marcatori epigenetici.



**Figura 16** - Processi epigenetici: metilazione del DNA, modificazioni code istoniche e riarrangiamento cromatinico, regolazione miRNA

## 1 - METILAZIONE DEL DNA

Il potenziale contributo dei cambiamenti epigenetici, specialmente la metilazione del DNA, alla progressione della CML non sono stati ancora ampiamente analizzati. La metilazione del DNA è fisiologicamente necessaria per lo sviluppo embrionale, per il differenziamento cellulare, per l'inattivazione del cromosoma X, per l'imprinting genomico, la repressione degli elementi ripetuti e per il mantenimento dell'identità cellulare [140]. La metilazione gioca un ruolo cruciale per la stabilità cromosomale e influenza le interazioni eucromatina-eterocromatina. Il grado di metilazione delle isole CpG della regione regolatoria di un gene è associato ai livelli di trascrizione di quel gene: l'ipometilazione favorisce in genere un aumento dell'espressione genica, mentre l'ipermetilazione si associa al silenziamento dei geni (il contrario di quello che succede nella metilazione degli istoni). Esiste naturalmente anche una variabilità genetica tra gli individui che riguarda la densità dei siti CpG, e che quindi influenza i potenziali livelli di metilazione, con conseguente effetto sulle attività regolatorie dei geni di riferimento. Una metilazione aberrante del DNA è stata identificata in molte patologie ematopoietiche, fra cui la CML; inoltre, è stato

osservato che l'ipermetilazione di alcuni geni oncosoppressori (TGS) è coinvolta non solo nella patogenesi, ma anche nella progressione della CML [146]. I tumori umani sono caratterizzati da una globale perdita di metilazione del DNA associata ad una ipermetilazione dei promotori che comporta un silenziamento dei geni correlati [147]. Normalmente, l'ipermetilazione e il silenziamento riguardano regioni contenenti elementi ripetitivi, che risultano invece sostanzialmente demetilati nelle cellule cancerose [147]; mentre i geni oncosoppressori e quelli addetti alla riparazione del DNA sono silenziati con l'ipermetilazione dei promotori, e possono inficiare la risposta tumorale ai farmaci anti-cancro [142]. Studi epidemiologici sono riusciti a correlare le variazioni epigenetiche con i fattori ambientali e hanno identificato alcuni biomarcatori diagnostici e prognostici che possono essere applicati nella routine clinica; in particolare, l'epidemiologia epigenetica studia le alterazioni dei tratti epigenetici e il rischio di sviluppare patologie nella popolazione [148]. Nel genoma dei mammiferi, le citochine presenti nei siti CpG sono le principali target di questo processo di metilazione. Lungo il genoma, distribuite in modo disomogeneo, si trovano sequenze dinucleotidiche Citosina-Guanina (CpG, dove p è la molecola di fosfato che lega le due basi per formare, insieme allo zucchero desossiribosio, la struttura esterna del DNA) che sono il target della metilazione del DNA. Le zone di DNA con un'elevata densità di siti CpG, piccole regioni di circa 0,5-2 kb di lunghezza, sono chiamate isole CpG e sono localizzate generalmente nelle regioni regolatorie di geni costitutivi (housekeeping) e di geni con espressione tessuto-specifica [149]. Queste sezioni si trovano per il 60% nei promotori dei geni umani e meno frequentemente nel corpo dei geni o nelle regioni intergeniche. La metilazione consiste nell'aggiunta di un gruppo metile alla citosina delle isole CpG ad opera della famiglia di enzimi DNA metiltrasferasi (DNMT). La famiglia delle DNMT comprende principalmente due tipi di enzimi: la DNMT1 che riconosce in modo specifico i siti di metilazione in un emi-filamento di DNA e li copia sul filamento figlio durante la replicazione, garantendo la fedeltà nel profilo di metilazione durante la mitosi; le DNMT3a e 3b che sono implicate invece nella metilazione "de novo" che avviene durante lo sviluppo embrionale e durante la differenziazione cellulare. Il silenziamento della trascrizione genica è associato con la metilazione dei siti CpG e le isole sono localizzate vicino ai siti di inizio della trascrizione (TSS) dei geni [149]. Nelle cellule tumorali, queste regioni possono essere spesso metilate, risultando in un blocco della trascrizione ad opera di molti geni associati con il cancro [150,151]. Anche se la metilazione dei siti contenuti nel corpo dei geni può contribuire al tumore causando mutazioni somatiche e germinali, la funzione della metilazione delle CpG intergeniche non è ancora stata del tutto compresa. Poiché questa trasformazione è reversibile, i geni metilati possono essere nuovamente espressi mediante l'uso di inibitori delle DNMT, come, per esempio, la 5-aza-2'-deossicitidina (Aza-dC) [152]. Inoltre, questi



inibitori, utilizzati con gli inibitori delle istone-deacetilasi (come la Tricostatina A, TSA), agiscono sinergicamente sulla ri-espressione genica. Questo campo ha il potenziale di portare benefici ai pazienti attraverso l'identificazione di biomarcatori diagnostici che permettano la rilevazione tempestiva della malattia e dei marcatori prognostici utili per la scelta delle strategie di trattamento più indicate [148]. A questo proposito, il fenotipo di metilazione delle isole CpG (CIMP) è stato ritrovato in molte patologie umane e caratterizza una sottocategoria di tumori presentanti una ipermetilazione di multiple isole CpG, suggerendolo come un pathway distintivo per il carcinoma. Inoltre, il CIMP risulta fortemente associato con l'esito clinico, permettendo quasi di paragonarlo ad un biomarcatore predittivo. La metilazione è considerata biologicamente importante nella patogenesi di molte patologie maligne, perciò è estremamente importante studiare il metiloma (profilo di metilazione del DNA) nei pazienti affetti da CML sia alla diagnosi sia con il progredire della malattia [153].

## 2 - MODIFICAZIONI DELLE CODE ISTONICHE

Modificazioni post-trascrizionali sui residui delle code istoniche dei nucleosomi permettono il rilassamento cromatinico e la sua condensazione, e questo consente sia una regolazione dell'espressione genica, la replicazione del DNA, e sia processi di ricombinazione e riparazione [154]. L'acetilazione e la metilazione sono due dei principali marcatori epigenetici; l'acetilazione dei residui di lisina sulla coda istonica comporta un'apertura della struttura cromatinica che consente la trascrizione mentre, al contrario, la sua deacetilazione mediata dalle deacetilasi (HDAC) fa sì che si ottenga condensazione della cromatina [155]. La metilazione può avvenire sia a livello dei residui della lisina sia dell'arginina nel core degli istoni H3 e H4; è un processo mediato dalle metiltrasferasi lisiniche (HMT) o da quelle proteiche argininiche (PRMT) e può essere accompagnato da condensamento o rilassamento cromatinico. Infatti, per esempio, la trimetilazione della lisina 4 di H3 (H3K4me3) è associata ad attivazione della trascrizione, mentre la trimetilazione della lisina 9, sempre su H3 (H3K9me3) e quella della lisina 27 (H3K27me3) sono fattori repressivi [155]. Le modificazioni proteiche sono meno stabili rispetto alla metilazione del DNA, quindi risultano meno adatti ad essere utilizzati come biomarcatori per il cancro [156].

## 3 - MOLECOLE DI RNA NON CODIFICANTE

Molte classi di RNA non codificanti, in cui sono compresi miRNA (miRNA) e lunghi RNA non codificanti (lncRNA), regolano i livelli di espressione dei geni e sono considerati fattori epigenetici [157,158]. Gli RNA non codificanti circolanti sono stati il focus dei numerosi sforzi effettuati negli ultimi anni per la ricerca di biomarcatori tumorali e per la comprensione di come avviene la

modulazione della risposta ai trattamenti [157,158]; inoltre, moltissimi miRNA sono stati associati alla resistenza ai chemioterapici standard [159].

### 3.1 ORIGINI E FUNZIONI

Si deve a Victor Ambros, Rosalind Lee e Rhonda Feinbaum la scoperta, nel 1993, del primo miRNA codificato dal locus *lin-4* del nematode *Caenorhabditis elegans*, associato al tempo di sviluppo attraverso la modulazione della proteina *lin-14* [160]. I miRNA sono molecole di RNA non codificante (Fig. 17) di circa 18-24 nucleotidi la cui regolazione è implicata in numerosi processi fisiologici tra cui lo sviluppo, la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi e la risposta a segnali extracellulari e di stress. Recentemente, queste piccole molecole sono diventate oggetto di studio più approfondito in quanto presentano un ruolo chiave come modulatori dell'espressione genica e perciò possono essere direttamente implicati in molteplici malattie, tra cui il cancro. I geni che codificano per i miRNA rappresentano approssimativamente l'1% del genoma delle differenti specie, e ognuno di essi possiede sequenze conservate o non conservate in centinaia di differenti geni bersaglio: è stato stimato infatti che circa il 30% dei geni sia regolato da almeno un miRNA. È stata inoltre riportata la correlazione tra le posizioni genomiche di un largo numero di miRNA e regioni tumore-associate [161]. Circa il 20% dei miRNA è stato associato a siti fragili del genoma umano che, a loro volta, sono correlati con l'instabilità del DNA nelle cellule cancerose. Infatti, i siti fragili sono siti preferenziali per scambi di cromatidi fratelli, traslocazioni, delezioni, amplificazioni o integrazioni di virus associati a tumori come l'HPV. Oltre all'associazione con i siti fragili, i geni dei miRNA possono essere coinvolti nel processo di tumorigenesi attraverso altri meccanismi, quali mutazioni puntiformi, delezioni, amplificazioni, traslocazioni o modificazioni epigenetiche. L'effetto globale in caso di inattivazione di un miRNA sarà la sovraespressione dei suoi geni target, mentre la sua attivazione porterà alla sottoespressione di centinaia di geni bersaglio. Qualora i geni target dei miRNA deregolati siano coinvolti nella regolazione di importanti processi biologici come apoptosi, ciclo cellulare, invasività od angiogenesi, vi sarà un aumentato rischio di crescita incontrollata e di sviluppo dei tumori. In aggiunta, essendo un singolo miRNA in grado di regolare l'espressione genica di centinaia di geni bersaglio, la sua alterata espressione cellulare porterà alla deregolazione di numerosi pathway molecolari che potrebbero contribuire, separatamente o sinergicamente, all'instaurarsi di un fenotipo cellulare di natura maligna. Inoltre, fra i miRNA analizzati, moltissimi sono stati individuati all'interno di regioni genomiche associate al cancro (CAGR), tra cui regioni minime di perdita di eterozigosi (LOH), nelle quali sono frequentemente presenti geni oncosoppressori, o regioni minime di amplificazione, dove sono spesso localizzati gli oncogeni.

La correlazione fra l'espressione genica a livello post-trascrizionale e il miRNA è di tipo inversamente proporzionale [162]. La maggior parte dei geni che codifica per i miRNA ha isoforme multiple paraloghe, e in genere presenta una sequenza identica nella porzione 5' relativa alle posizioni nucleotidiche 2-7, definita "seed sequence", fondamentale per l'appaiamento con l'mRNA. Nonostante ciò, miRNA con stessa *seed sequence* possono avere ruoli differenti in vivo in quanto anche la porzione 3' è importante per l'accoppiamento con l'mRNA target [163]. I miRNA possono essere generati da unità trascrizionali non codificanti, possono trovarsi all'interno di sequenze codificanti proteine, e localizzarsi sia in regioni introniche non codificanti, sia in regioni esoniche.

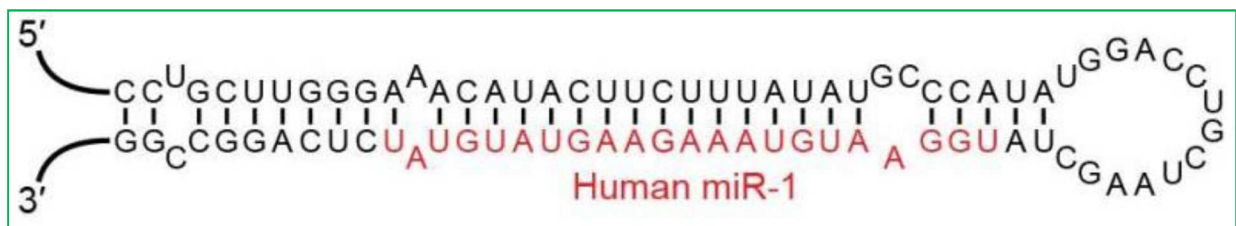
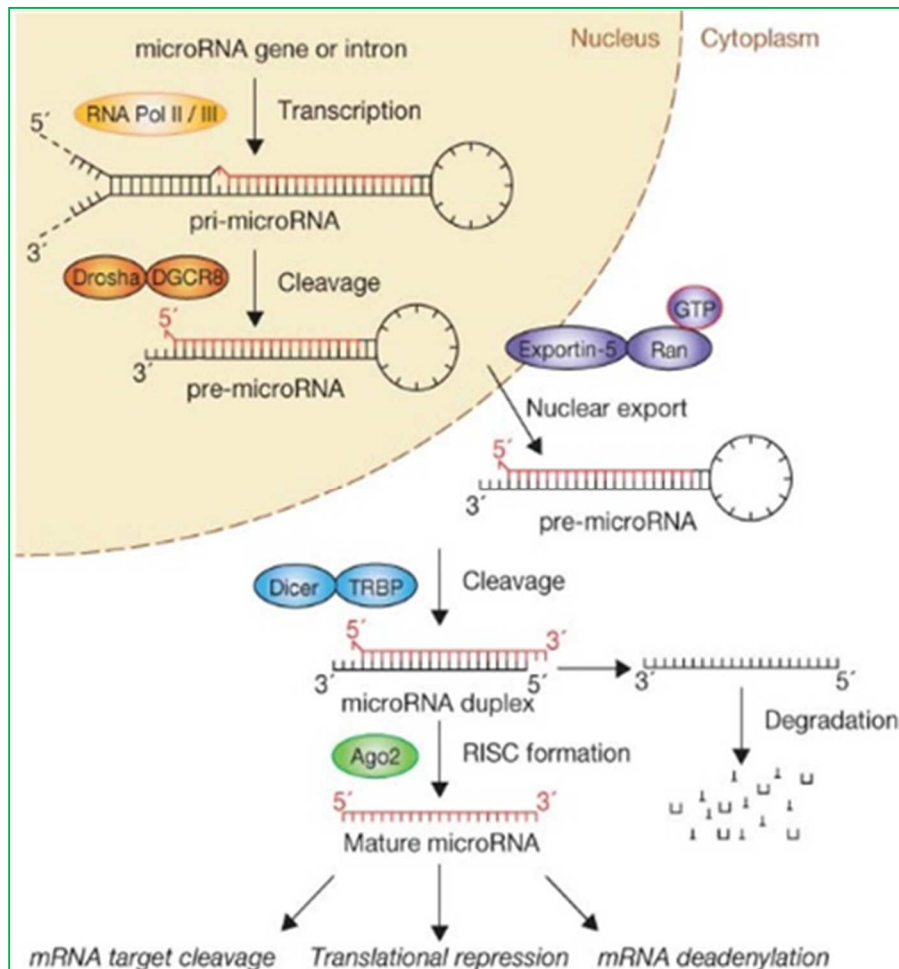


Figura 17 - Struttura stem-loop del miRNA

### 3.2 BIOGENESI E MATURAZIONE

La trascrizione dei miRNA avviene principalmente per opera della RNA polimerasi II e, per un numero minore di miRNA, mediante l'intervento della RNA polimerasi III, fattore che garantisce una fine regolazione della trascrizione genica (Fig. 18). La polimerasi lega un promotore localizzato vicino alla sequenza codificante, si forma un trascritto che in seguito subisce *capping* su 5', poliadenilazione su 3' e infine *splicing* [164]. Il prodotto di questo processo è chiamato primary miRNA (pri-miRNA), della lunghezza di 1-2 kb, e può avere due diverse origini: alcuni sono introni derivanti dallo *splicing* di un mRNA, mentre gli altri sono trascritti a partire dai propri promotori [165]. I pri-miRNA, avendo struttura a singolo filamento, si ripiegano per formare una doppia elica (conformazione stem-loop) appaiandosi a sequenze complementari. In seguito, all'interno del nucleo, il pri-miRNA viene processato da un complesso proteico chiamato microprocessore e costituito da una RNasi di tipo II, chiamata Drosha, che dimerizza con la proteina DGCR8. Il prodotto di questo processo è definito pre-miRNA ed è costituito da circa 70-100 nucleotidi [166]. Successivamente, queste molecole vengono trasportate fuori dal nucleo mediante il trasporto attivo dell'Esportina 5. Una volta giunto nel citoplasma, il pre-miRNA viene tagliato dalla RNasi III Dicer la quale genera un RNA a doppio filamento (dsRNA) di circa 22 nucleotidi chiamato dsmiR/miR\*. Questa piccola sequenza viene poi legata alla proteina Argonata (AGO) ed incorporata nel complesso proteico RISC (RNA-induced silencing complex)

all'interno del quale un filamento diventerà il miRNA maturo. Quest'ultimo rimane legato ad AGO, mentre l'altro filamento sarà sottoposto a degradazione da parte di alcune elicasi [167].



**Figura 18** - Meccanismo di biogenesi, maturazione e processazione dei miRNA, e appaiamento con l'mRNA bersaglio

Il complesso proteico RISC-miRNA maturo si lega a sequenze complementari sulla regione 3'UTR di RNA messaggeri e ne regola l'espressione genica a livello post-trascrizionale attraverso due distinti meccanismi d'azione; in caso vi sia totale complementarità tra le basi del miRNA e il sito bersaglio, avviene la degradazione dell'mRNA, viceversa, in caso di complementarità parziale, avviene il blocco della traduzione senza degradazione dell'mRNA. L'interazione miRNA-mRNA provoca la formazione di una struttura a doppio filamento dovuta dall'appaiamento tra la *seed sequence* del miRNA (basi da 2 a 8) e la sequenza complementare dell'mRNA (Fig. 19) [168].

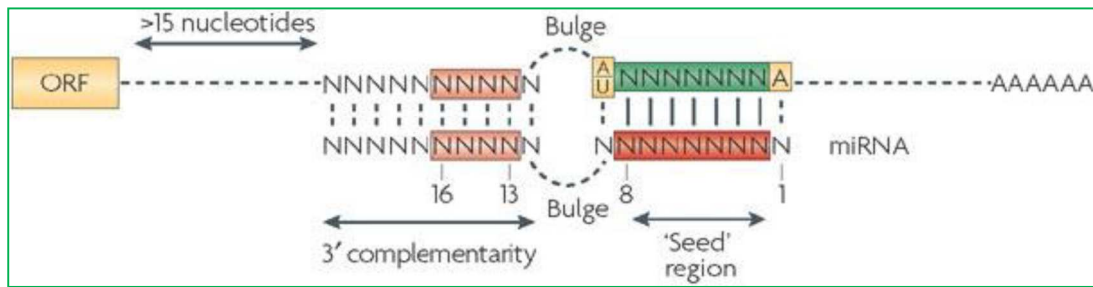
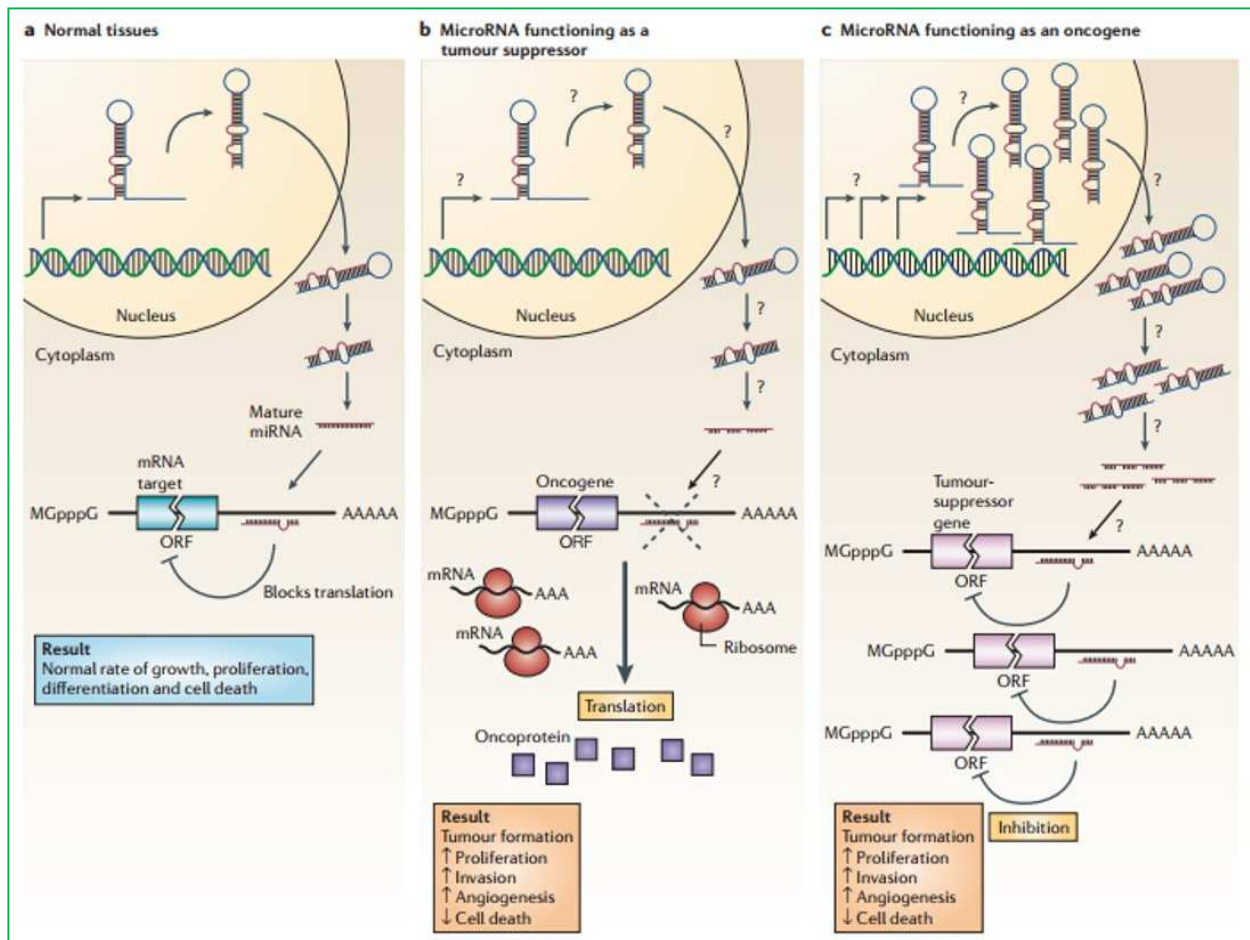


Figura 19 - Appaiamento miRNA-mRNA

I miRNA possono legarsi anche ad altre regioni, tra cui la sequenza Open Reading Frame (ORF) e la 5'UTR, cui è associata l'attivazione post-trascrizionale [169]. Fra i meccanismi di repressione ci può essere l'inibizione del legame del ribosoma all'mRNA bersaglio, effetti di deadenilazione, di *decapping* dell'mRNA o sequestro del messaggero in corpi citoplasmatici GW/PBodies<sup>71</sup>, il cui esito finale è la diminuzione delle proteine codificate da quel preciso mRNA [170].

### 3.3 MIRNA E CANCRO

L'alterazione dei livelli dei miRNA in numerosi processi biologici quali sviluppo, crescita e differenziazione cellulare comporta lo sviluppo di patologie e, fra questa, la cancerogenesi occupa un ruolo fondamentale [171]. È stato osservato che il funzionamento degli enzimi necessari per lo sviluppo e la maturazione dei miRNA non ottimale sia correlato alla progressione di malattie; per esempio, una ridotta espressione di Dicer si correla con una bassa sopravvivenza post-operatoria di individui con tumori polmonari, e la delezione delle proteine AGO è frequente nel tumore renale di Wilms e nei tumori neuro-ectodermici [172]. Prima della scoperta dei miRNA, si riteneva che solo le alterazioni genetiche, quali mutazioni puntiformi, SNP, inserzioni, delezioni, o riarrangiamenti cromosomici, causando una sovraespressione di proteine ad attività oncogena o la sottoespressione di quelle oncosoppressive, fossero alla base della tumorigenesi. In seguito, la scoperta del ruolo primario svolto dai miRNA nello sviluppo tumorale ha fatto sì che venissero denominati "oncomiR", al fine di evidenziarne la capacità di agire come oncosoppressori o oncogeni nel processo di genesi e progressione del cancro [171]. Nei tessuti normali, trascrizione, processazione e legame dei miRNA con le sequenze complementari degli mRNA porta alla repressione dell'espressione genica attraverso un blocco nella traduzione proteica o mediante l'alterazione della stabilità dell'mRNA. Ne risulta una normale crescita, proliferazione, differenziazione cellulare e apoptosi (Fig. 20A).



**Figura 20** - Ruolo dei miRNA nell'oncogenesi. **20A** Nei tessuti normali; **20B** Funzionamento come oncosoppressori dei miRNA; **20C** miRNA che agiscono come onco-miR

Una down-regolazione o una delezione di un miRNA oncosoppressore porta allo sviluppo tumorale. La diminuzione della quantità di miRNA maturo può dipendere dalla presenza di difetti in uno qualunque degli stadi della sua biogenesi ed è correlata ad un'inappropriata espressione della proteina target del miRNA. Il risultato complessivo porta all'aumento di proliferazione, invasività, angiogenesi e diminuzione dei livelli di apoptosi, tutti fattori direttamente legati alla formazione del tumore (Fig. 20B). Inoltre, anche l'amplificazione e la sovraespressione di un miRNA con ruolo oncogeno può portare allo sviluppo tumorale: l'aumento di miRNA può infatti portare all'eliminazione dei geni oncosoppressori ed è perciò correlato con la progressione della patologia. L'aumento dei livelli di miRNA può dipendere dall'amplificazione del gene che codifica per quel miRNA, oppure da un alterato promotore costitutivamente attivo, che aumenta la processazione e la stabilizzazione del miRNA (Fig. 20C). I primi oncomiR identificati furono i miRNA della famiglia let-7, i quali, agendo da oncosoppressori, attivano il complesso RISC su diversi mRNA di oncogeni. Fra questi è degno di nota il gene RAS, la cui attivazione stimola la crescita e la proliferazione cellulare [173]. I geni dei miRNA hanno spesso loci in prossimità di

siti fragili del genoma umano, in regioni minime di perdita di eterozigosi dove si trovano oncosoppressori, nelle regioni minime di amplificazione dove vi sono oncogeni e in regioni di breakpoint comuni; sono perciò correlati direttamente all'instabilità del DNA nelle cellule cancerose [161]. Attualmente, l'espressione dei miRNA viene considerato uno strumento di diagnosi, prognosi e trattamento clinico dei pazienti con tumore e questo ha comportato evidenti miglie rispetto alla normale ricerca di marcatori proteici [174]. Infatti, la peculiarità di alcuni miRNA di essere tumore-specifici permette una migliore caratterizzazione della malattia e della sua malignità [175], e il loro impiego implica una non invasività della raccolta dei campioni, poiché essi sono presenti nei fluidi biologici come siero, plasma, saliva e urine [176].

### 3.4 MIRNA E CML

Nell'ultima decade si è visto che i miRNA sono differenzialmente regolati in diverse patologie [162,177,178]. Profili distintivi, di attivazione e/o silenziamento di più miRNA, associati a determinati sottogruppi citogenetici e molecolari di leucemia sono stati identificati effettuando studi genome-wide sfruttando tecniche di biologia molecolare high-throughput. Questi studi di *profiling* hanno portato non solo all'identificazione di nuovi processi molecolari implicati nella leucemogenesi, ma hanno anche fornito informazioni prognostiche che vanno ad integrare quelle acquisite con la conoscenza di alterazioni citogenetiche, mutazioni genetiche e alterata espressione nelle leucemie acute e croniche [179]. In particolare, il primo studio di questo tipo ha mostrato una correlazione fra la leucemia e i miRNA in relazione al cluster di miR-15a/miR-16-1, successivamente correlato al gene Bcl-2, che risulta altamente espresso in questa malattia [180-182]. Secondo quanto conosciuto finora, il gruppo miR17-92 sembra essere coinvolto nella regolazione di BCR-ABL e c-Myc. Infatti, il knockdown di c-Myc nelle cellule di CML è correlato ad una sotto-regolazione di questo cluster di miRNA, e la sua up-regolazione si evidenzia in linee cellulari derivate da pazienti in fase cronica, ma non in quelle in BC [183]. Inoltre, è stato dimostrato negli studi condotti da Bueno e Faber che il miR-203 sia coinvolto nella fisiopatologia della CML, poiché ABL è un potenziale target di questo miRNA. Il silenziamento del miR-203 porta ad una sovra-regolazione del gene ABL e di BCR-ABL, mentre la sua ri-espressione comporta una riduzione dei livelli della proteina di fusione BCR-ABL e di ABL, nonché l'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali dipendenti da ABL. Di conseguenza, è evidente che il miR-203 funzioni come un oncosoppressore e la sua ri-espressione potrebbe avere importanti implicazioni terapeutiche in specifiche patologie ematopoietiche [184,185].

### 3.5 APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEI MIRNA

La capacità dei miRNA di regolare diverse proteine e pathway ha fatto sì che essi venissero considerati come degli ottimi candidati terapeutici. Essi vengono infatti utilizzati per regolare la loro sovraespressione o sottoespressione, mimando o inibendo la loro azione.

#### 3.5.1 ATTIVAZIONE DEI MIRNA

In caso di sottoespressione dei miRNA, un approccio volto al ripristino delle loro funzionalità consiste nell'uso dei miRNA mimic, i quali, scelti in base all'espressione genica del paziente, riducono gli effetti indesiderati della terapia. I miRNA mimic sono RNA sintetici a doppio filamento con modificazioni chimiche che migliorano la stabilità e l'uptake da parte delle cellule, e sono processati in un singolo filamento in modo tale da regolare l'espressione genica in maniera analoga ai miRNA endogeni [186]. Il filamento guida è identico al miRNA di interesse, mentre l'altro filamento contiene modificazioni chimiche che gli consentono di incrementare l'uptake o di prevenire il legame con RISC che lo degraderebbe (Fig. 21). Questa terapia, inoltre, sfrutta l'utilizzo di specifici vettori per l'indirizzamento tessuto- o tumore-specifico del miRNA. Su un modello murino sono state sfruttate alcune emulsioni neutre lipidiche per indirizzare, all'interno del flusso sanguigno, l'azione di let-7 e miR-34 per permettergli di localizzarsi a livello del tumore polmonare [187]. Alternativamente, si possono rivestire le nanoparticelle contenenti i miRNA con anticorpi tumore-specifici che aumentino gli effetti terapeutici del miRNA mimic e riducano gli effetti collaterali [188]. Gli studi in cui sono stati riportati questi esperimenti forniscono evidenze precliniche sul potenziale uso dei miRNA mimic nel trattamento di numerosi tumori. È possibile utilizzare anche una terapia farmacologica che sfrutti agenti metilanti come la decitabina o la 5-azacitidina per attivare i miRNA. Questo tipo di terapia non viene però utilizzata come prima scelta in quanto i suoi effetti non sono ancora stati del tutto chiariti e la specificità verso i miRNA non è stata definitivamente comprovata [189].

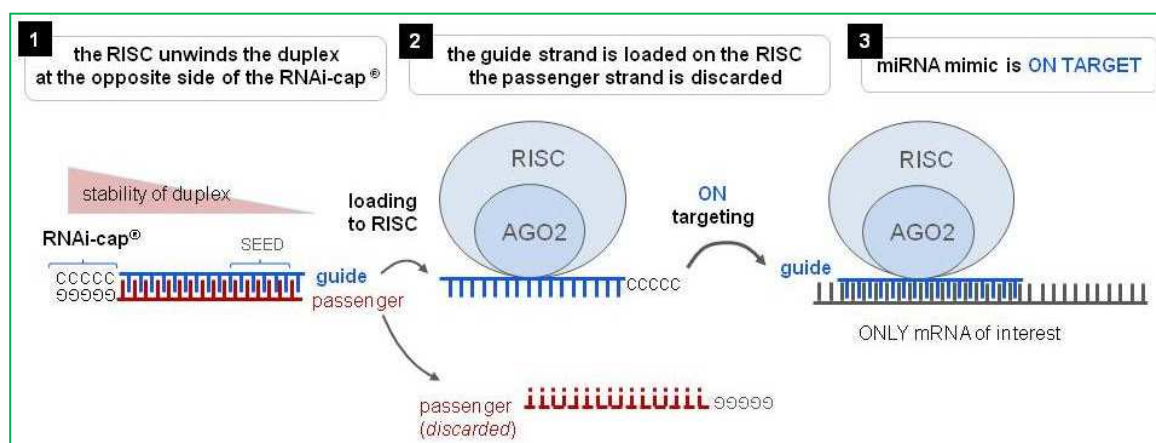


Figura 21 - Meccanismo d'azione dei miRNA mimic



### 3.5.2 INIBIZIONE DEI MIRNA

L'inibizione dei miRNA è diventata la maggior area di interesse per la terapia genica poiché, in numerose patologie, è stato dimostrato che moltissimi miRNA sono sovraespressi. Attualmente sono disponibili differenti metodi per inibire i miRNA: miRNA sponge, oligonucleotidi anti-miRNA (AMO) e piccole molecole inibitrici di specifici miRNA (SMIR) (Fig. 22) [190].

#### - miRNA SPONGE

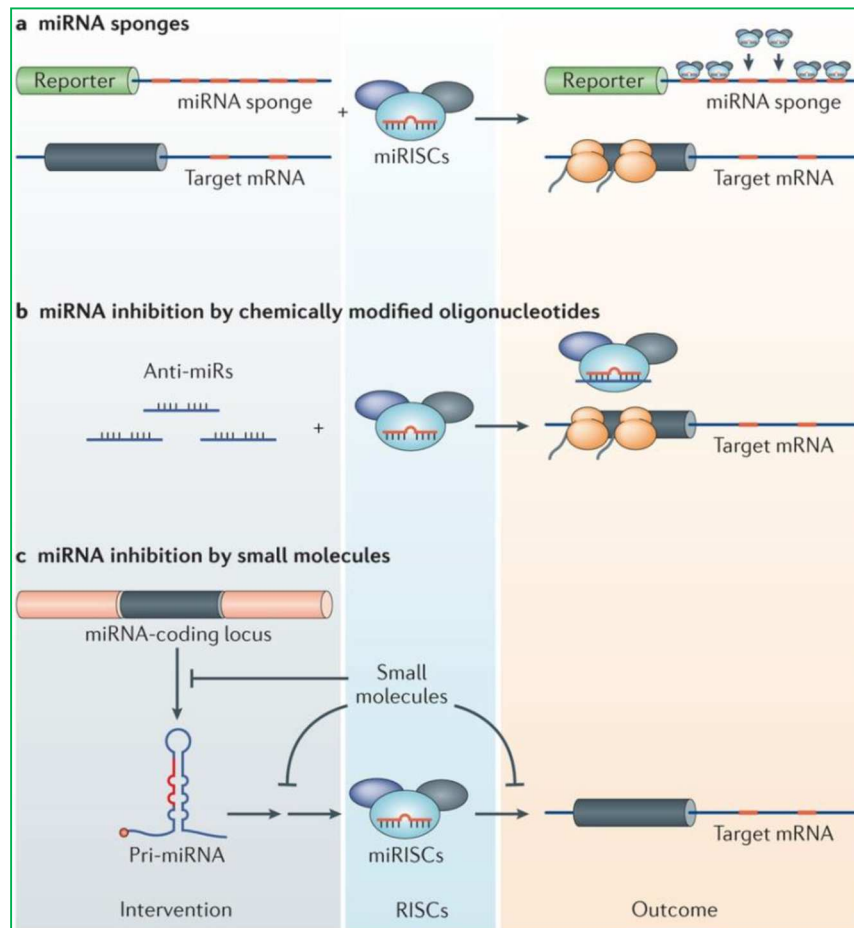
I miRNA sponge (Fig. 22A) prevencono il legame con l'mRNA target legandosi a geni report e fungendo da esche al posto dei miRNA sovraespressi [191]. Sono sintetici e costituiti da plasmidi o vettori virali che contengono 4-10 siti di legame, separati da un piccolo nucleotide spaziatore, e vengono inseriti nella sequenza 3'UTR di un gene reporter guidato dal promotore della RNA polimerasi II. Quando il vettore contenente il miRNA viene trasfettato all'interno di colture cellulari, viene amplificato dalla RNA polimerasi II come fosse il miRNA endogeno, e inibisce specificatamente sia i miRNA aventi una *seed sequence* complementare, sia le intere famiglie di miRNA accomunate dalla stessa *seed sequence* [191].

#### - AMO

Gli AMO (Fig. 22B) sono sequenze di nucleotidi perfettamente complementari al miRNA target, legano il filamento guida e inattivano i miRNA sia tramite il legame con l'mRNA sia attraverso la degradazione del miRNA, attivando la RNasi H. Affinché gli AMO esplicino la loro funzione, devono essere in grado di entrare nella cellula target, essere stabili in vivo e avere alta affinità di legame. Gli oligonucleotidi non modificati sono degradati dalla nucleasi sierica e non riescono ad attraversare la membrana cellulare, per cui occorre apportare alcuni riarrangiamenti che ne incrementino la stabilità e ne favoriscano l'ingresso nelle cellule [192]. Gli AMO di prima generazione, anche definiti "antagomiR", presentano una 2'-O-metilazione che aumenta la resistenza alle nucleasi e facilita il legame ai miRNA, un legame fosforilato sul 5' previene la degradazione per opera delle nucleasi e il legame sul 3' con una molecola di colesterolo facilita l'uptake cellulare [193]. L'introduzione di ulteriori sostituzioni ha apportato migliorie nell'affinità di legame e nella resistenza alle nucleasi, permettendo l'ingresso degli AMO in alcuni trial clinici.

#### - SMIR

Gli SMIR (Fig. 22C) sono piccole molecole inibitrici di specifici miRNA e possono legarsi a questi ultimi in differenti stadi: interferiscono con la trascrizione primaria dell'RNA, inibiscono il processo attuato da Dicer e RISC sul pre-miRNA e impediscono l'interazione tra RISC e mRNA [194]. Il primo SMIR ad essere scoperto fu un'azobenzene che inibiva il miR-21 bloccando il suo precursore, e agendo perciò come regolatore in numerosi tipi di cancro [195].



**Figura 22** - Meccanismi di inibizione dei miRNA. **22A** I miRNA sponge sfruttano siti di legame multipli inseriti a valle di un gene reporter, e all'interno della cellula servono come riconoscimento per il miRNA target, riattivando i geni soppressi; **22B** Gli AMO sono complementari al miRNA target e, legandolo con alta affinità, ne inibiscono l'azione; **22C** Gli SMIR inibiscono i miRNA portando alla perdita della soppressione del gene target

#### 4 - FARMACI EPIGENETICI

I più noti farmaci epigenetici possono essere classificati in due gruppi: gli inibitori delle DNMT e quelli che inibiscono le HDAC. I primi includono gli analoghi nucleosidici, come la 5-azacitidina e la 5-aza-2'-deossicitina (decitabina), entrambi approvati dalla Food and Drug Administration americana (FDA) per il trattamento delle sindromi mielodisplastiche, così come alcune molecole non-nucleosidiche più specifiche in grado di inibire direttamente gli enzimi [145]. Nelle cellule umane sono noti 18 enzimi HDAC e sono disponibili numerosi inibitori HDAC, appartenenti agli acidi grassi a corta catena, agli idrossammati, alle benzamidi e ai tetrapeptidi ciclici [196]. Gli acidi grassi a corta catena, come il sodio butirato e valproato, e gli idrossammati, che includono Tricostatina A e vorinostat, sono soprattutto inibitori generali, che bloccano le intere classi I e II degli HDAC, mentre gli altri composti sono più selettivi [196]. Fra gli inibitori HDAC, il vorinostat e il romidepsin (appartenente alla classe dei tetrapeptidi ciclici) hanno ricevuto l'approvazione della FDA per il linfoma cutaneo a cellule T [145]. Studi recenti sono stati

progettati in modo da valutare il contributo della combinazione degli inibitori DNMT con quella con gli anti HDAC e per determinare il potenziale dell'utilizzo di basse dosi di epi-farmaci per "riprogrammare" le cellule tumorali in modo da renderle nuovamente suscettibili ai regimi terapeutici standard [145]. Seguendo la rapida comprensione dell'importanza delle modificazioni epigenetiche nello sviluppo tumorale, nella progressione e nella chemioresistenza, e in linea con il generale entusiasmo scaturito dall'approvazione di alcuni epi-farmaci per il trattamento delle patologie ematologiche, sono stati condotti molti studi, nelle ultime decadi, per cercare di traslare i biomarcatori epigenetici nella clinica [140]. È inoltre importante ricordare che i tumori appartengono a differenti sub-pathway molecolari, ognuno caratterizzato da eventi genetici e citogenetici peculiari e dalla deregolazione dell'espressione di centinaia di geni. Perciò, una caratterizzazione integrata degli eventi molecolari che intervengono in ogni sub-pathway potrebbe essere molto più utile rispetto all'analisi dei singoli marcatori anche nel contesto della farmacoepigenetica. Dobbiamo inoltre tenere presente che tutte le tecnologie "omiche", come la genomica, l'epigenomica, la proteomica e la trascrittomica, sono ancora piuttosto costose da applicare negli approcci di medicina personalizzata, e richiedono ampie coorti di pazienti per ottenere risultati significativi. Sono però rilevanti per identificare un piccolo sottoinsieme di marcatori candidati responsabili della risposta al trattamento negli studi epidemiologici e validi per essere utilizzati nei kit per potenziali applicazioni cliniche [140]. Nonostante questo, iniziali strategie a singolo farmaco o in combinazione con alte dosi di epi-farmaci risultano nel complesso tossiche per i pazienti, e sono al momento in studio dosaggi ridotti in combinazione con le terapie standard per raggiungere la chemiosensibilizzazione, la radiosensibilizzazione e la modulazione immunitaria nelle cellule cancerose. Complessivamente, il potenziale dell'impiego degli epi-farmaci nel trattamento delle resistenze tumorali è elevato, e i trial clinici creati per valutare quest'area sono già stati avviati, e c'è un generale ottimismo che, unendo tutte le informazioni in nostro possesso, si possano tradurre queste informazioni nell'applicazione clinica nei prossimi anni. Bisogna però tenere in considerazione che gli epi-farmaci, soprattutto se utilizzati a ridotte dosi non tossiche, come quelle somministrate negli studi in atto, necessitano di tempo per raggiungere gli effetti attesi, e spesso hanno anche una ridotta emivita. Quindi, per esempio, essi non potrebbero essere impiegati da soli nel trattamento delle metastasi avanzate, ed è anche per questo motivo che deve essere ancora ottimizzata la ricerca sul loro dosaggio e sulla durata della loro attività. Un altro importante problema che necessita ulteriori approfondimenti rimane il potenziale effetto benefico di questi trattamenti in quei pazienti che hanno una risposta tossica ai trattamenti standard [140].

## OBIETTIVO

Le leucemie, un gruppo eterogeneo di neoplasie del sistema ematopoietico, rappresentano il 30% di tutti i tumori e ogni anno in Italia si osservano circa 8.000 nuovi casi. La leucemia mieloide cronica (CML) costituisce, in particolare, il 15-20% di tutte le leucemie negli adulti e il 4% nei bambini. L'evento patogenetico alla base dell'insorgenza della malattia è la traslocazione reciproca fra i cromosomi 9 e 22, che dà origine al cromosoma Philadelphia (Ph). Imatinib mesilato (IM), il primo inibitore della tirosin-chinasi chimerica BCR-ABL, è stato introdotto in terapia agli inizi degli anni 2000 e rimane tutt'ora il trattamento d'elezione per la cura della CML. Nonostante questo inibitore abbia notevolmente migliorato la prognosi, in circa il 30% dei pazienti si osserva la comparsa di resistenza e la progressione della patologia dopo circa 18-24 mesi. Tra le molteplici cause che sottendono questo fenomeno, le più comuni sono amplificazione e sovraespressione del gene BCR-ABL, e comparsa di mutazioni puntiformi che comportano un'alterazione conformazionale del recettore.

Più di recente è stato osservato che una sovraespressione delle proteine coinvolte nel trasporto e nel metabolismo del farmaco può contribuire alla perdita di responsività di IM. Tale up-regolazione può dipendere da meccanismi genetici, come la presenza di polimorfismi, o da alterazioni epigenetiche, come la deregolazione di miRNA. Il cancro è anche una malattia causata da alterazioni del DNA che possono essere innate, casuali oppure insorgere in seguito all'azione di agenti esterni. Questo modello però, è riduttivo poiché non tiene conto del fatto che, a parità di carico mutazionale del DNA, uno stesso tumore può assumere fenotipi diversi e gradazioni che possono andare dalla malattia cronica, poco pericolosa, al tumore che insorge improvvisamente e in poche settimane conduce al decesso del paziente. In questo contesto si inserisce l'epigenetica, i cui processi più rappresentativi si classificano principalmente in tre categorie: modificazioni istoniche, RNA non codificanti e metilazione di DNA. Insieme, questi meccanismi possono esercitare i loro effetti regolando direttamente la trascrizione, danno/riparazione e replicazione del DNA, controllando i livelli di RNA e la stabilità post-trascrizionale, normalizzando la traduzione proteica oppure provocando variazioni post-traduzionali delle proteine.

I miRNA sono importanti regolatori dell'attività dei geni e un singolo miRNA può avere effetti notevoli, poiché influenza centinaia di trascritti genici e determina un cambiamento generale nella fisiologia della cellula. Praticamente tutti i tipi di tumore sono caratterizzati da una complessiva deregolazione dei miRNA. Alcuni promuovono la cancerogenesi quando raggiungono livelli superiori alla norma, ma nella maggioranza dei casi nei tumori maligni i livelli di miRNA appaiono ridotti rispetto ai tessuti normali. Questi miRNA, visto il loro ruolo regolatorio, si trovano molto

conservati all'interno delle varie specie e, in alcuni casi, arrivano a costituire l'1% dell'intero genoma. Per quanto riguarda le alterazioni epigenetiche, come la differente metilazione/acetilazione del DNA, un'estensiva analisi genomica delle sequenze geniche che codificano per i miRNA ha evidenziato che circa il 50% dei loci sono associati con isole CpG [197], facendo supporre che un alterato stato di metilazione potrebbe essere responsabile della deregolazione di miRNA nei tumori [198].

È stato dimostrato, inoltre, che le alterazioni genetiche nei livelli di metilazione del DNA sono tra le più comuni modificazioni molecolari nella neoplasia umana [199]. La metilazione del DNA di solito provoca l'ostruzione della regione del promotore, ostacolando la trascrizione genica e causando il silenziamento genico. Inoltre, alterazioni nella metilazione del DNA si verificano frequentemente in molti tumori umani con regioni normalmente ipometilate che diventano metilate (come i promotori delle isole CpG) e regioni con alti livelli di metilazione che perdono gruppi metilici (come DNA ripetitivo e trasposoni). Quest'inversione dei normali schemi di metilazione del DNA può portare ad alterazioni nell'espressione genica e nella stabilità del genoma attraverso cambiamenti nella struttura della cromatina.

Date le suddette premesse, l'obiettivo della presente tesi di dottorato è stato quello di identificare nuovi potenziali biomarcatori epigenetici di risposta ad IM nella CML, sia a livello dell'RNA (miRNA) sia a livello del DNA (metilazione). Questi processi epigenetici sono stati quindi correlati con i livelli di espressione delle principali proteine coinvolte nel trasporto di IM, per individuare ipotetici network epigenetici.

Per realizzare questo progetto, sono quindi state generate 6 linee di leucemia (K562) resistenti a concentrazioni crescenti di IM (da 0,05 a 3  $\mu$ M).

Per ogni linea cellulare sono stati valutati:

- 1) i livelli di espressione delle proteine coinvolte nel trasporto di IM, con particolare attenzione ai trasportatori di efflusso;
- 2) i livelli di espressione di un pannello di 384 miRNA;
- 3) i livelli globali di metilazione del DNA.

Il fine ultimo di questo progetto di tesi è quello di comprendere il ruolo di questi meccanismi genetici ed epigenetici alterati nella leucemia mieloide cronica, per rispondere agli attuali interrogativi terapeutici e sviluppare una medicina di precisione adatta alle peculiarità del paziente, in modo da ottimizzarne l'efficacia, ridurre le reazioni avverse e migliorare gli esiti clinici globali.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su cellule della linea K562, generate da una paziente di 56 anni affetta da CML in crisi blastica terminale (ATCC®-LCG, Sesto San Giovanni, MI, Italia). Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco®, Carlsbad, CA, USA), con aggiunta del 10% di siero fetale bovino (Gibco®, inattivato per 30' a 56°C), e mantenute a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Al terreno sono inoltre stati aggiunti l'1% di penicillina (10.000 u/mL)/streptomicina (10mg/mL, Lonza Walkersville, Inc. Walkersville, MD, USA) e lo 0.6% di fungizone (Gibco®), per prevenire l'instaurarsi di contaminazioni. Il terreno è stato sostituito ogni 3-4 giorni per mantenere la concentrazione cellulare intorno ai  $5 \cdot 10^5$  cells/mL.

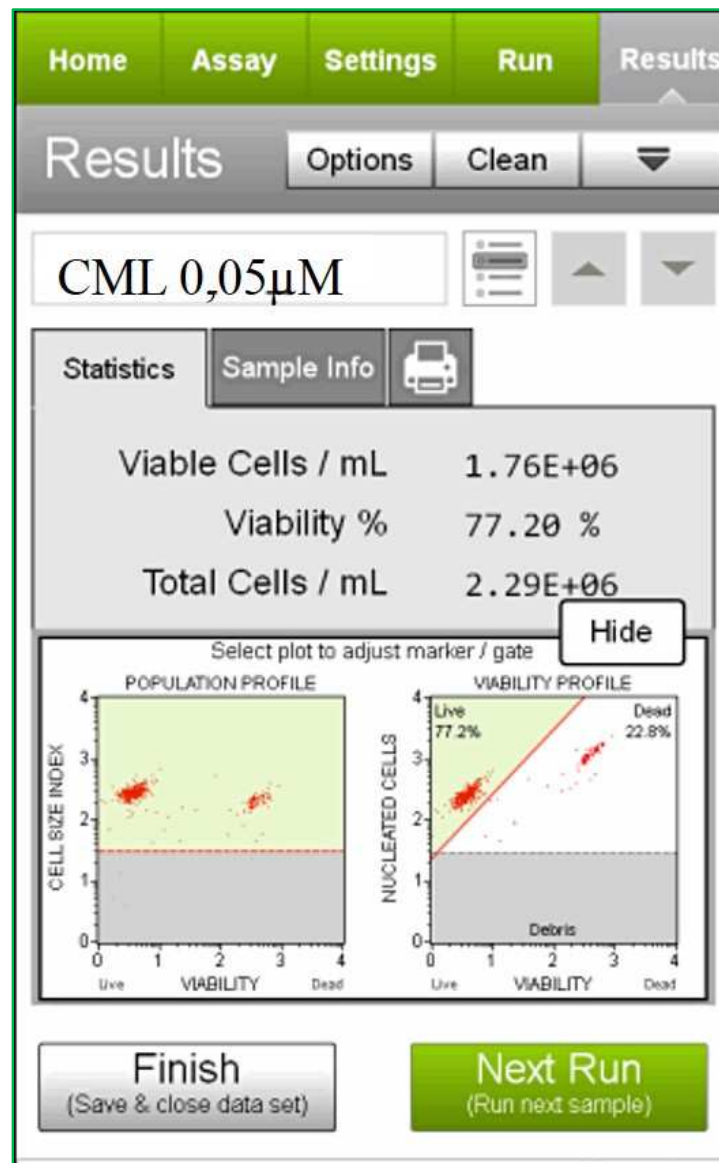
### 1 - CREAZIONE DI SUB-COLTURE RESISTENTI AD IMATINIB

Per creare le linee resistenti, le cellule in crescita esponenziale sono state esposte a concentrazioni crescenti di IM (SelleckChem Chemicals LLC, Houston, TX, USA). Il farmaco in polvere è stato conservato a -80°C; la soluzione stock (10 mM) è stata preparata sospendendo la polvere in DMSO, ed è stata aliquotata e conservata a -80°C. Dalla soluzione stock sono state effettuate le opportune diluizioni per ottenere le concentrazioni necessarie. La concentrazione utilizzata per il trattamento iniziale è stata 0,05 µM e il terreno è stato cambiato ogni 3-4 giorni per assicurarsi che le cellule crescessero esposte alla giusta concentrazione di farmaco. Le cellule sono state considerate resistenti nel momento in cui acquisivano nuovamente la normale capacità di crescita in presenza della specifica concentrazione di farmaco e raggiungevano una vitalità di almeno il 90%. A questo punto, una porzione è stata opportunamente congelata e conservata in azoto, mentre l'altra è stata sospesa nel terreno contenente la nuova concentrazione di IM. Ad ogni cambio di concentrazione (0,05 - 0,2 - 0,3 - 0,5 - 1 - 3 µM IM) sono stati estratti i campioni di miRNA, mRNA e DNA e l'intero processo di creazione delle sub-culture ha richiesto circa un anno. Le estrazioni sono state eseguite secondo i protocolli appropriati descritti nei capitoli successivi.

### 2 - VITALITÀ CELLULARE

La vitalità è stata determinata utilizzando il Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Questo strumento sfrutta il principio della citometria tramite un detector fluorimetrico miniaturizzato e la tecnologia microcapillare per determinare, in un unico passaggio, la vitalità cellulare/mL, la vitalità % e il numero totale di cellule nel campione. Il campione è stato preparato utilizzando 20 µL di sospensione cellulare e 380 µL di reagente (Count & Viability Reagent,

Muse® Count & Viability Assay Kit) contenente coloranti in grado di permeare nelle cellule la cui parete ha subito lisi (Fig. 23).



**Figura 23** - Schermata ottenuta dal Muse cell Analyzer: il grafico a sinistra mostra la vitalità in relazione alle dimensioni delle cellule, quello a destra correla le cellule vive con i detriti e le cellule morte.

Prima di ogni cambio di concentrazione, grazie alla collaborazione avviata con il Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, è stato estratto il DNA dalle cellule per determinare l'eventuale presenza di mutazioni a carico del gene BCR-ABL.

### 3 - ESTRAZIONE del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata centrifugando circa  $2 \cdot 10^6$  cellule a 1.200 rpm per 10' per ottenere un pellet cellulare. Per isolare il DNA è stato utilizzato il kit QIAamp® DNA mini (Qiagen,

Hilden, Germania). Il pellet ottenuto è stato risospeso in 1 mL di DPBS (Lonza Walkersville) per essere sicuri di eliminare ogni residuo di terreno che potrebbe inficiare le operazioni. Segue un'ulteriore centrifuga con le medesime condizioni, si risospende il pellet con 200  $\mu$ L di DPBS cui si aggiungono 20  $\mu$ L di Proteasi K, che lisa i componenti cellulari rendendo accessibile il DNA, e si agita bene per rendere omogenea la soluzione ottenuta. Si aggiungono 200  $\mu$ L di buffer AL, anch'esso con un'azione promovente la lisi cellulare, si agita al vortex per 15 secondi, si centrifuga brevemente per raccogliere le gocce presenti sul tappo della provetta, e si mette in incubazione il campione per 15' in una piastra pre-riscaldata a 56°C, per incrementare l'attività del buffer. In seguito, si aggiungono 200  $\mu$ L di etanolo assoluto conservato a 4°C, si agita al vortex per 15 secondi e si carica tutta la soluzione, circa 600  $\mu$ L, nell'apposita colonna QIAmp spin column, inserita in un tubo di raccolta. Segue una centrifugazione a 10.000 rpm per 1' durante la quale il DNA, che ha elevata affinità per la resina di gel di silice presente in colonna, viene trattenuto, mentre tutti gli altri componenti passano nel tubo di raccolta e vengono eliminati. Si effettuano due lavaggi con i due tamponi salini (AW1 ed AW2), volti ad eliminare contaminanti quali proteine, lipidi e altri componenti cellulari presenti in soluzione, poiché il DNA resta legato alla silice mentre le impurezze passano nel tubo di raccolta sottostante con i buffer. Terminati i lavaggi e fatto un ciclo a vuoto, si aggiungono 30  $\mu$ L di buffer AE, si lascia in incubazione per 5' a temperatura ambiente ed infine si procede con l'ultima centrifuga, a 10.000 rpm per 1'. Il tampone AE, che ha maggiore affinità per il DNA rispetto alla resina in silice, ne provoca l'eluizione. L'eluato è trasferito in un'epENDORF sterile opportunamente codificata e stoccato a -20°C.

### 3.1 SEQUENZIAMENTO

Per confermare le mutazioni geniche a carico del gene di fusione BCR-ABL, il DNA è stato sequenziato mediante ABI 310 (Applied Biosystem). Il processo è complesso e formato da diverse fasi:

- PCR (Polymerase chain reaction, reazione a catena della polimerasi): è una reazione di amplificazione delle sequenze di DNA, innescato da una coppia di primer la cui sequenza può essere ricavata da articoli e banche dati o mediante progettazione ex-novo. Con la PCR, attraverso 40 cicli, si possono amplificare specifici frammenti di DNA, solitamente tra 200 e 1200 bp, utili per il sequenziamento. La procedura viene allestita aggiungendo 1  $\mu$ L di DNA dei campioni con una concentrazione di 20 ng/ $\mu$ L e utilizzando la ricetta inserita in tabella 2.



<b>Tabella 2 - Componenti necessari per la reazione di amplificazione</b>	
<b>Reagenti</b>	<b>Volume/Campione (µL)</b>
FastStart™ Taq DNA Polymerase	0,25
Primer Forward 10 nM	1,25
Primer Reverse 10 nM	1,25
10X Buffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP mix	0,5
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	16,75
<b>Totale</b>	<b>24 µL</b>

Il programma di amplificazione è caratterizzato dall'alternarsi di tre diversi stadi di temperatura per 40 cicli:

- *denaturazione*, a 95°C per 30 s, che permette la separazione dei due filamenti di DNA,
- *annealing*, 50-65°C per 30 s, con una temperatura specifica per ciascuna coppia di primer che determina l'appaiamento dei due con le rispettive regioni complementari all'interno dei filamenti di DNA denaturati,
- *elongazione*, a 72°C per 30 s, che permette la sintesi del DNA grazie all'intervento della Taq, utilizzando il singolo filamento come stampo.

Ne risulta, così, un'amplificazione esponenziale del segmento di DNA di interesse.

- *Gel di controllo della PCR*: viene valutata la buona riuscita dell'amplificazione tramite una corsa elettroforetica su gel preparati al momento. Il gel viene preparato sciogliendo 0,5 g di agarosio (UltraPure™ Agarose) in 50 mL di TBE 0,5X, a cui si aggiungono 2 µL di SYBR™ Safe DNA Gel Stain (tutti forniti da Invitrogen™). Una volta pronto, si caricano 3 µL di campione addizionati con 2 µL di DNA Gel Loading Dye (6X, ThermoFisher Scientific) e si lascia correre a 120 V per circa 20'. Il DNA così intercalato emette luce fluorescente (590 nm), rilevata tramite VERSADOC-4000 (BIO-RAD), uno strumento dotato di fotocamera digitale attraverso la quale si acquisisce l'immagine del gel.

I campioni vengono conservati overnight in emoteca a 4°C.

- *Purificazione della PCR*: la purificazione dei campioni viene effettuata tramite *CleanSweep™ PCR Purification Reagent* (ThermoFisher Scientific), per cui si addizionano 5 µL di prodotto della PCR con 2 µL di reagente del kit. La soluzione così ottenuta viene quindi posta a 37°C per 15' per idrolizzare i primer e defosforilare i dNTP, poi viene incubata a 80°C per 15' per inattivare il reagente aggiunto.

- *Cycling*: il protocollo prevede che il filamento del DNA sia amplificato in maniera indipendente per ciascuno dei due primer, in presenza dei terminatori BigDye. Per ogni campione sono stati quindi amplificati sia il filamento guidato dal primer forward sia quello del reverse in due reazioni separate. Per ottenere la soluzione di cycling si utilizzano i reagenti riportati in tabella 3, mentre il programma di amplificazione è riassunto in tabella 4.

<b>Tabella 3 - Componenti utilizzati per il cycling</b>	
<b>Reagenti</b>	<b>Volume/Campione (µL)</b>
Big Dye	1
Primer 10 ng/µL	0,32
Buffer 5X	2
Campione	1
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	5,68
<b>Totale</b>	<b>10 µL</b>

Si avvia il programma di cycling, dopo aver introdotto i campioni in PCR, e si effettua la reazione impostando 25 ripetizioni secondo il seguente schema:

<b>Tabella 4 - Schema di amplificazione per il programma di cycling</b>			
<b>Fase</b>	<b>Step 1</b>	<b>Step 2</b>	<b>Step 3</b>
<b>Temperatura (°C)</b>	96	96	54
<b>Tempo</b>	30 sec	10 sec	4'

- *Purificazione del prodotto di cycling*: lo scopo perseguito con questo passaggio è quello di far precipitare il DNA e purificarlo da eventuali residui aspecifici. Si prepara quindi una mix per ogni campione seguendo lo schema riportato in tabella 5.

<b>Tabella 5 - Reagenti utilizzati per la precipitazione del DNA</b>	
<b>Reagenti</b>	<b>Volume/Campione (µL)</b>
EtOH assoluto	30,64
Acetato di Sodio 3M (NaAc)	1,5
Nuclease free water	7,86
<b>Totale</b>	<b>4,5</b>

In ogni tubino contenente il DNA amplificato e marcato, si aggiungono 40 µL di mix e si esegue un'incubazione a -20°C di almeno 2 ore. Trascorso il tempo necessario, si esegue una centrifuga

a 4°C per 30' alla massima velocità e si svuota accuratamente la eppendorf. Si aggiungono 100 µl di EtOH al 70% (300 µl acqua + 700 µl di etanolo) e si esegue un'ulteriore centrifuga a 4°C per 15'. Si svuota nuovamente la eppendorf e si lascia asciugare l'etanolo mediante una centrifuga di 5' a 500 rpm con l'apertura dei tubini rivolta verso il basso.

- Solubilizzazione e denaturazione: si solubilizza il DNA con 10 µl di formammide e si effettua un ciclo di denaturazione dei campioni per 2' a 96°C. Terminata questa operazione i campioni sono pronti per essere analizzati nel sequenziatore.
- Sequencing: l'ultimo passaggio prevede l'analisi in un sequenziatore automatico (Fig. 24), uno strumento con elevate potenzialità che permette di identificare mutazioni o anomalie strutturali nella sequenza dei DNA. Infatti, il sequenziamento permette di ricostruire l'ordine delle basi azotate che si susseguono all'interno di un tratto di DNA.



**Figura 24** - Sequenziatore ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer

Il sequenziamento automatico prevede l'utilizzo di fluorocromi, non radioattivi e non tossici, per marcare i diversi ddNTP (dideossiribonucleotidi) e dell'elettroforesi capillare, usando come mezzo di separazione un polimero incluso nel capillare di silice. La soluzione contenente l'amplificato viene posta a contatto con l'anodo del capillare su cui viene applicato un campo elettrico. Le molecole del campione cominciano a migrare con velocità differenti lungo il capillare e i frammenti di DNA marcato vengono colpiti da una sorgente luminosa (laser ad Argon) che gli permette di emettere una fluorescenza rilevabile da un sensore. La fluorescenza produce quattro differenti colori, ognuno dei quali è associato ad una base nucleotidica: adenina, timina, guanina e citosina. La rappresentazione dei risultati ottenuti è costituita da un'elettroferogramma, in cui ogni picco rappresenta una base letta durante il procedimento. Si individuano, così, la successione delle basi che rappresentano la sequenza.

## 4 - ANALISI dell'mRNA

### 4.1 ESTRAZIONE dell'mRNA

L'RNA è stato ottenuto utilizzando *RNeasy®mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany). Circa  $2 \cdot 10^6$  cellule sono state centrifugate a 1.100 rpm per 5' per ottenere il pellet, che è poi stato lisato, utilizzando dai 300 ai 600 µL di tampone (Buffer RLT) contenente una guanidina-tiocianato altamente denaturante, che ha subito inattivato le RNasi. La soluzione è stata agitata al vortex ed

omogeneizzata filtrandola, per almeno 5 volte, con una siringa da 1 mL; in seguito, è stato addizionato l'1% (rispetto al volume di buffer utilizzato) di  $\beta$ mercapto-etanolo che inattiva le ribonucleasi rilasciate durante la lisi cellulare. Si procede unendo alla soluzione etanolo al 70% per migliorare le condizioni di binding e il campione viene poi caricato in una colonna RNeasy mini Spin. Si favorisce il legame dell'RNA con la membrana della fase stazionaria centrifugando le colonnine a 10.000 rpm per 1', si allontana il filtrato e si procede con una sequenza di 3 lavaggi per eliminare tutti gli inquinanti che potrebbero contaminare il prodotto desiderato. Per essere sicuri di rimuovere ogni residuo dell'etanolo contenuto nei buffer di lavaggio (Buffer RW1 e RPE), la colonnina viene centrifugata per 1' senza solventi, prima di eseguire l'ultima centrifuga a 10.000 rpm per 1' con 50  $\mu$ L di acqua priva di RNasi per permettere l'eluizione dell'RNA purificato. L'eluato viene in seguito opportunamente raccolto in una eppendorf specifica, etichettato e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2 QUANTIFICAZIONE

La quantificazione dell'RNA è stata eseguita mediante l'utilizzo del NanoDrop™ 2000c (Fig. 25), uno spettrofotometro UV-visibile a spettro totale (220-750 nm) che permette di lavorare con microvolumi di soluzioni (fino ad 1  $\mu$ L), anche ad alta concentrazione, garantendo accuratezza e riproducibilità elevate. Questo metodo sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV con un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 260 nm (il range varia da 230 a 280 nm). Il sistema non richiede l'uso di cuvette e capillari in quanto utilizza la tensione superficiale dei liquidi (che si crea fra due piccoli volumi posti fra le due piastre di lettura dello strumento) e consente così di ridurre l'impiego di materiale e il tempo necessario per la misura. Inoltre, il cammino ottico molto ridotto (1 mm) permette di misurare concentrazioni 50 volte più elevate rispetto ad uno spettrofotometro tradizionale, eliminando in questo modo la necessità di diluire i campioni. Le piastre sono collegate a fibre ottiche e la sorgente è costituita da una lampada allo Xenon. Lo strumento è poi collegato ad un computer con software dedicato con interfaccia grafica che elabora i dati nell'immediato, restituendo lo spettro con la curva di assorbimento, la concentrazione (ng/  $\mu$ L) e la purezza (Abs 260/280 nm).



**Figura 25** - Spettrofotometro NanoDrop

### 4.3 RETROTRASCRIZIONE

Per la sintesi del cDNA a partire dall'RNA è stato impiegato il kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems<sup>®</sup>, ThermoFisher Scientific). Sono stati retrotrascritti 400 ng di RNA per ogni campione (10 µL) cui sono stati aggiunti 10 µL di mix preparata come illustrato in tabella 6.

<b>Tabella 6 - Componenti della reazione di retrotrascrizione</b>	
<b>Reagenti</b>	<b>Volume/Campione (µL)</b>
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
Multiscribe <sup>™</sup> Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3,2
<b>Totale per reazione</b>	<b>10</b>

Gli strips con i campioni sono stati messi in incubazione in ghiaccio per 5' prima di procedere con la reazione di retrotrascrizione mostrata in tabella 7.

<b>Tabella 7 - Programma di reazione impostato in PCR</b>				
	<b>Step 1</b>	<b>Step 2</b>	<b>Step 3</b>	<b>Step 4</b>
<b>Temperature (°C)</b>	25	37	85	4
<b>Tempo</b>	10'	120'	5'	∞

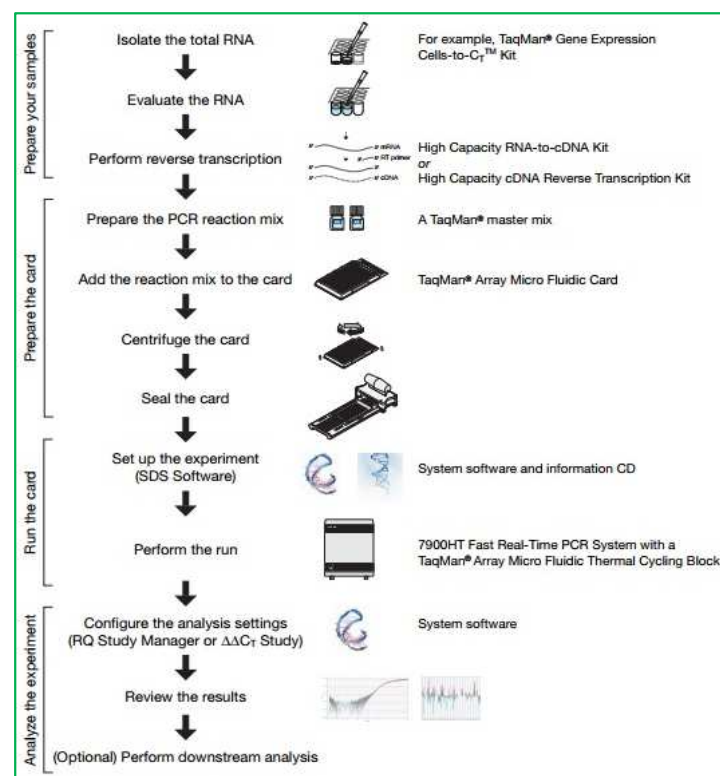
Il cDNA sintetizzato è stato poi conservato a -20°C.

### 4.4 ANALISI DI ESPRESSIONE MEDIANTE ABC TRANSPORTER ARRAY

La quantificazione degli amplificati tramite Real-Time PCR (RT-PCR) si basa sulla possibilità di monitorare la quantità di acido nucleico prodotto (nel nostro caso cDNA) attraverso il grado di fluorescenza emesso da particolari sonde o primer durante lo svolgersi della reazione, segnale che aumenta proporzionalmente rispetto la quantità di prodotto di amplificazione. La fluorescenza si può ottenere con metodiche differenti: si possono impiegare intercalanti del DNA a doppio filamento, oppure oligonucleotidi di DNA (sonde) che hanno subito modificazioni che li rendono fluorescenti quando si ibridano con il DNA. Quest'ultimo è il principio di funzionamento delle sonde da noi utilizzate, le sonde TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Le sonde sono filamenti lineari

totalmente complementari alle sequenze target e sono costituite da un colorante fluorescente, il reporter, collocato in posizione 5' e, in posizione opposta, al 3', da uno speggitore (quencher). Fino a quando la sonda non si lega con il DNA, rimane intatta, perciò il segnale fluorescente viene annullato dalla presenza del quencher mediante trasferimento di energia al fluoroforo. In seguito si ha una separazione della sonda che si ibrida con il DNA: l'intervento della Taq polimerasi (una particolare DNA polimerasi resistente ad alte temperature) fa sì che si abbia idrolisi della sonda, appaiamento di quest'ultima con la porzione contenente il reporter e sviluppo del segnale di fluorescenza.

Per l'analisi dei nostri campioni abbiamo utilizzato microfluidic card, le TaqMan<sup>®</sup> Human ABC Transporter Array, che permettono di effettuare 384 reazioni simultanee di RT-PCR, sfruttando la tecnologia delle sonde TaqMan<sup>®</sup>, poste in forma liofilizzata all'interno di ciascun pozzetto (Fig. 26). Gli array utilizzati contengono saggi per 50 geni umani, codificanti per il gruppo di proteine ABC, prodotte in triplicato per ciascun campione, oltre a 13 controlli endogeni.



**Figura 26** - Workflow della procedura seguita per l'analisi di espressione dei geni ABC transporter

I trasportatori ABC (ATP-binding cassette) sono una superfamiglia di proteine di membrana che traslocano un'incredibile varietà di substrati all'interno ed all'esterno della membrana cellulare. In moltissime linee cellulari tumorali, è stato dimostrato che la resistenza multi-farmaco possa essere parzialmente imputabile ad una deregolazione dell'espressione di queste proteine.

All'interno dei nostri saggi, sono contenuti i 3 principali gruppi di trasportatori ABC coinvolti nel processo ADMET, importanti anche nella ricerca e nello sviluppo di farmaci. In tabella 8 è rappresentato come si dispongono le 7 sottofamiglie all'interno della card.

Sottocategoria	N° di geni	Nome alternativo
<b>ABCA</b>	13	-
<b>ABCB</b>	11	MDR
<b>ABCC</b>	13	Sottofamiglia di trasportatori coniugati
<b>ABCD</b>	4	ALD
<b>ABCE</b>	1	-
<b>ABCF</b>	3	EF3
<b>ABCG</b>	5	Sottofamiglia White

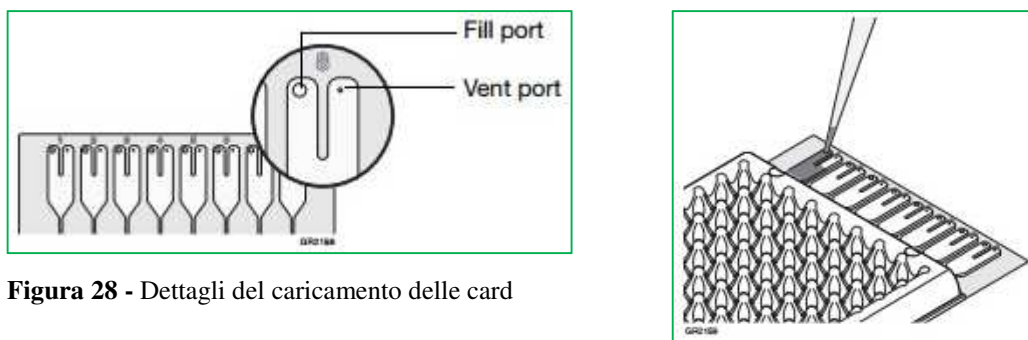
In figura 27 è invece riportata la distribuzione dei geni all'interno della card.

**Figura 27 - Rappresentazione dei geni spottati all'interno delle card Human ABC Transporter Array**

Il cDNA dei diversi campioni, retrotrascritto come precedentemente descritto, è stato addizionato con 20 µL di acqua RNase-free e con 50 µL di TaqMan® Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems) (Tab. 9).

<b>Tabella 9 - Ricetta per i reagenti della reazione necessaria per il caricamento della card</b>		
<b>Reagenti</b>	<b>Quantità per un pozzetto (µL)</b>	<b>Quantità per una card (µL)</b>
TaqMan® Universal PCR Master Mix II	50	400
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	30	240
cDNA (100ng)	20	160
<b>Totale per reazione</b>	<b>100</b>	<b>800</b>

Per ogni campione si caricano 4 porte, ognuna con 100 µL di soluzione, perciò ogni card può analizzare contemporaneamente due campioni differenti (Fig. 28).



**Figura 28** - Dettagli del caricamento delle card

Una volta riempite le porte con la soluzione preparata, le card sono state centrifugate a 1.200 rpm per 1', due volte, per permettere al campione di distribuirsi in ogni pozzetto; la card è stata quindi sigillata e caricata nello strumento 7900HT RT-PCR (Applied Biosystems®). Il profilo termico seguito è stato quello indicato in tabella 10.

<b>Tabella 10 - Programma di reazione impostato sullo strumento 7900HT RT-PCR</b>				
	<b>Step 1</b>	<b>Step 2</b>	<b>Step 3</b>	<b>Step 4</b>
<b>Temperature (°C)</b>	50	94,5	97	59,7
<b>Tempo</b>	2'	10'	30 sec	1'
<b>Ripetizioni</b>	1	40		

I Ct ottenuti dalla Real-Time sono stati ottenuti impostando la threshold a 0.2, sono stati considerati indeterminati tutti i valori superiori a 35 e i dati sono stati normalizzati sottraendo ad ogni Ct la media dei Ct del GAPDH, considerato il controllo endogeno.



## 5 - ANALISI dei MIRNA

### 5.1 ESTRAZIONE

L'estrazione dei miRNA ha previsto l'impiego del kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific, Foster City, Ca, USA) (Fig. 29). Circa  $2 \times 10^6$  cellule sono state centrifugate a 1.000 rpm per 5' per ottenere il pellet. Questo viene poi lavato con 1 mL di DPBS (Lonza) che verrà poi eliminato, mentre le cellule saranno mantenute in ghiaccio. È necessario aggiungere dai 300 ai 600  $\mu$ L di Lysis/binding buffer, a seconda del numero di cellule, e agitare al vortex fino ad ottenere un lisato omogeneo. Si procede aggiungendo 1/10 di volume di miRNA Homogenate Additive e si agita bene sul vortex prima di mettere in incubazione in ghiaccio, per 10'. Trascorso il tempo di incubazione, viene addizionato un volume di Acid-Phenol/Chloroform uguale a quello del lisato iniziale prima dell'aggiunta dell'Additive (dai 300 ai 600  $\mu$ L), si pone sul vortex per 1' e poi si trasferisce in una eppendorf da 2 mL che sarà centrifugata per 5' a 14.000 rpm. Si formano così due fasi: una lipofila sul fondo e una acquosa in superficie contenente i miRNA. Quest'ultima viene trasferita in una nuova eppendorf, cui si aggiungono 1.25 volumi di etanolo assoluto a temperatura ambiente, prima di trasferire tutta la soluzione su una colonnina fornita dal kit. Si centrifuga a 14.000 rpm per 10', si scarta l'eluato e si procede con le fasi di lavaggio della colonna: prima si addizionano 700  $\mu$ L di miRNA wash solution 1 e poi 500  $\mu$ L di wash solution 2/3 per due volte, allontanando ogni volta il filtrato. A questo punto si centrifuga per un 1' per eliminare eventuali residui e si colloca la colonnina su un tubo pulito. Si esegue la fase di eluzione aggiungendo 100  $\mu$ L di Elution solution preriscaldato a 95°C e si centrifuga alla massima velocità per 1'. Il lisato contenente i miRNA sarà trasferito in un tubo sterile appositamente etichettato e conservato a -80°C.

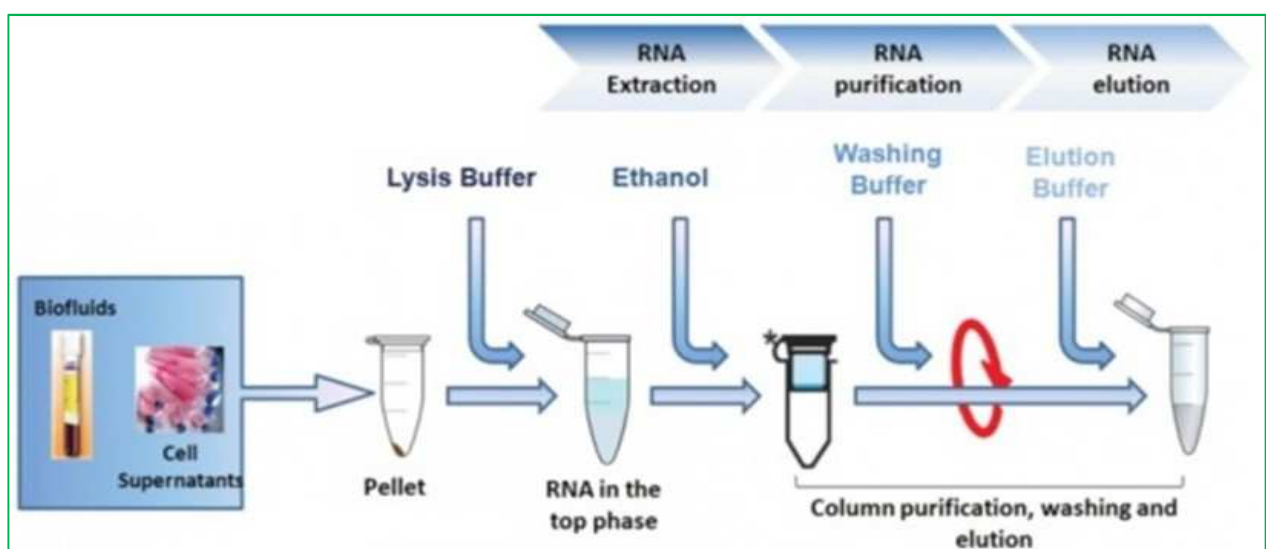


Figura 29 - Processo di estrazione dei miRNA

Al termine della procedura di estrazione, i miRNA sono stati dosati secondo le procedure precedentemente illustrate per la quantificazione dell'RNA, utilizzando come bianco l'Elution solution.

### 5.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE

Il *profiling* dei miRNA è stato analizzato utilizzando l'array TaqMan® Low Density Pool A, che permette di studiare simultaneamente 384 miRNA utilizzando una 7900HT Real-Time (RT)-PCR. L'identificazione e la quantificazione viene effettuata tramite reazione con Megaplex™ Pools (fino a 380 miRNA per pool), una combinazione di primer e TaqMan polimerasi:

- **Megaplex™ RT primer**, un pool di primer predefinito contenente fino a 380 *stem-looped-reverse-transcription* primer necessari per l'appaiamento con i miRNA maturi;
- **TaqMan® MiRNA Array A**, una microfluidic card (Fig. 30) con 384 pozzetti contenenti primer e sonde TaqMan liofilizzati. Il saggio permette la quantificazione dei livelli di espressione genica di 378 miRNA e dei loro 6 controlli endogeni.

A	hsa-let-7a	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7f	hsa-let-7g	hsa-let-7i	hsa-miR-1	hsa-miR-9	hsa-miR-10a	hsa-miR-10b	UB	UB	hsa-miR-15a	hsa-miR-15b	hsa-miR-16	hsa-miR-17	hsa-miR-18a	hsa-miR-18b	hsa-miR-19a	hsa-miR-19b	hsa-miR-20a	hsa-miR-20b	hsa-miR-21	hsa-miR-22	1	
B	hsa-miR-23a	hsa-miR-23b	hsa-miR-24	hsa-miR-25	hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28-5p	UB	UB	hsa-miR-30a	hsa-miR-30b	hsa-miR-30c	hsa-miR-30d	hsa-miR-31	hsa-miR-37	hsa-miR-33b	hsa-miR-34a	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-34b	hsa-miR-33	2		
C	hsa-miR-35	hsa-miR-36	hsa-miR-38	hsa-miR-39a	hsa-miR-39b	hsa-miR-100	hsa-miR-101	hsa-miR-103	hsa-miR-105	hsa-miR-106a	hU644	hsa-miR-108a	hsa-miR-107	hsa-miR-122	hsa-miR-124	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b	hsa-miR-126	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-129-3p		hsa-miR-129-5p	3
D	hsa-miR-130a	hsa-miR-130b	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b	hsa-miR-134	hsa-miR-135a	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	hsa-miR-137	hU644	hsa-miR-138	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-141	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-146a	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-147a	4	
E	hsa-miR-148a	hsa-miR-148b	hsa-miR-149	hsa-miR-156	hsa-miR-152	hsa-miR-153	hsa-miR-156	hsa-miR-181a	hsa-miR-181c	hsa-miR-182	hU644	hsa-miR-183	hsa-miR-184	hsa-miR-186	hsa-miR-187	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-190	hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-192a-3p	hsa-miR-192a-5p	hsa-miR-193a	hsa-miR-194	5		
F	hsa-miR-192	hsa-miR-198a	hsa-miR-197	hsa-miR-198	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-200a	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-202	hsa-miR-203	hsa-miR-204	hsa-miR-205	hsa-miR-208a	hsa-miR-210	hsa-miR-214	hsa-miR-215	hsa-miR-218a	hsa-miR-218b	hsa-miR-217	hsa-miR-218	hsa-miR-219-5p		hsa-miR-221	6
G	hsa-miR-222	hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-301a	hsa-miR-301b	hsa-miR-302a	hsa-miR-302b	hsa-miR-302c	hsa-miR-303	hsa-miR-304	hsa-miR-305	hsa-miR-308a	hsa-miR-310	hsa-miR-314	hsa-miR-315	hsa-miR-318a	hsa-miR-318b	hsa-miR-319	hsa-miR-320-3p	hsa-miR-320-5p	7	
H	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-355	hsa-miR-37a	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-345	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-363	hsa-miR-365	hsa-miR-367	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-372	hsa-miR-373	hsa-miR-374a		8
I	hsa-miR-374b	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	hsa-miR-376b	hsa-miR-377	hsa-miR-379	hsa-miR-380	hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-383	hsa-miR-408-5p	hsa-miR-410	hsa-miR-411	hsa-miR-422a	hsa-miR-422-5p	hsa-miR-424	hsa-miR-425	hsa-miR-429	hsa-miR-431	hsa-miR-433	hsa-miR-449a	hsa-miR-449b	hsa-miR-450a	hsa-miR-450b-3p	9	
J	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-451	hsa-miR-452	hsa-miR-453	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-487a	hsa-miR-487b	hsa-miR-488	hsa-miR-489	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-493	hsa-miR-494	hsa-miR-495	hsa-miR-496		10
K	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499-5p	hsa-miR-500	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-503	hsa-miR-504	hsa-miR-505	hsa-miR-507	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-510	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-513-5p	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-516b-5p	hsa-miR-518a	hsa-miR-517a	hsa-miR-517c	
L	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-519a	hsa-miR-519b	hsa-miR-519c	hsa-miR-519d	hsa-miR-519e	hsa-miR-519f	hsa-miR-519g	hsa-miR-519h	hsa-miR-519i	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-520b-5p	hsa-miR-520c	hsa-miR-521	hsa-miR-522	hsa-miR-523	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-526a	hsa-miR-526b	hsa-miR-527-5p	hsa-miR-528-3p	12
M	hsa-miR-529	hsa-miR-541	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-544	hsa-miR-545	hsa-miR-548a-3p	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-548b-3p	hsa-miR-548b-5p	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-548e-5p	hsa-miR-548f-5p	hsa-miR-549-5p	hsa-miR-551b	hsa-miR-552-3p	hsa-miR-552-5p	hsa-miR-561	hsa-miR-553	hsa-miR-553-3p	hsa-miR-553-5p	hsa-miR-557a	hsa-miR-557b	
N	hsa-miR-561-5p	hsa-miR-569	hsa-miR-569-5p	hsa-miR-583	hsa-miR-588	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-616	hsa-miR-616	hsa-miR-624	hsa-miR-625	hsa-miR-627	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-628	hsa-miR-636	hsa-miR-642	hsa-miR-651	hsa-miR-653	hsa-miR-653	hsa-miR-653-3p	hsa-miR-653-5p	hsa-miR-655	hsa-miR-660	hsa-miR-671-3p	hsa-miR-671-5p	14
O	hsa-miR-672	hsa-miR-674	hsa-miR-698	hsa-miR-694	hsa-miR-698	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	hsa-miR-697	
P	hsa-miR-698	hsa-miR-711	hsa-miR-712	hsa-miR-719-1-3p	hsa-miR-719-2-3p	hsa-miR-720	hsa-miR-720a	hsa-miR-720c	hsa-miR-798	hsa-miR-725	hsa-miR-746	hsa-miR-726c	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	hsa-miR-784	16
																										18
																										20
																										22
																										24

Figura 30 - TaqMan® Human MiRNA Array A

La reazione di retrotrascrizione ha un volume finale di 7,5 µL per ogni campione, ed è costituita da:

- 3 µL di miRNA ad una concentrazione di 200 ng/µL, pari ad un totale di 600 ng,
- 4,5 µL di mix per la retrotrascrizione realizzata come illustrato in tabella 11.

<b>Tabella 11 - Componenti della reazione di retrotrascrizione</b>	
<b>Reagenti</b>	<b>Volume/Campione (μL)</b>
Megaplex™ RT Primers Pool A	0,8
10X dNTP Mix (100nM)	0,2
Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ μL)	1,5
10X RT Buffer	0,8
MgCL <sub>2</sub>	0,9
RNase Inhibitor	0,1
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	0,2
<b>Totale per reazione</b>	<b>4,5</b>

Gli strips contenenti la soluzione sono stati incubati per 5' in ghiaccio e poi introdotti in PCR dove sono stati sottoposti al programma riportato in tabella 12.

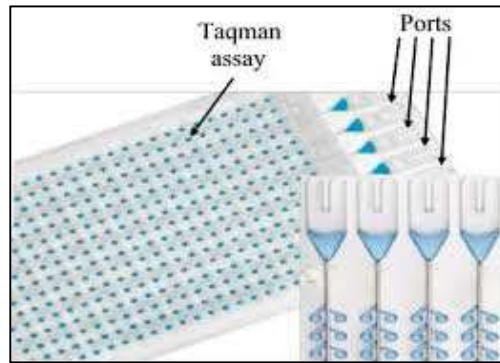
<b>Tabella 12 - Programma di reazione impostato in PCR</b>					
	<b>Step 1</b>	<b>Step 2</b>	<b>Step 3</b>	<b>Step 4</b>	<b>Step 5</b>
<b>Temperature (°C)</b>	16	42	50	85	4
<b>Tempo</b>	2'	1'	1 sec	5'	∞
<b>Ripetizioni</b>	40			1	

Il prodotto retrotrascritto è stato poi conservato a -20°C.

Ogni card può analizzare un solo campione per volta, e ogni array necessita di un totale di 800 μL di soluzione composta come mostrato in tabella 13.

<b>Tabella 13 - Ricetta utilizzata per il caricamento di una card, considerando un margine di errore</b>	
<b>Componenti</b>	<b>Volume (μL)</b>
TaqMan® Universal MasterMix	425
Megaplex RT product	7,5
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	417,5
<b>Totale per ogni card</b>	<b>850</b>

Per ognuna delle 8 porte della card si caricano 100 μL di mix (Fig. 31). Per permettere la distribuzione del campione nei vari pozzetti, la card viene centrifugata 1' a 1.200 rpm, per due volte, infine sigillata e caricata nello strumento 7900HT RT-PCR.



**Figura 31** - Illustrazione del caricamento della card e dettaglio della struttura

Il profilo termico seguito per la reazione di analisi in RT-PCR è mostrato in tabella 14.

Tabella 14 - Programma di reazione impostato sulla 7900HT RT-PCR				
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature (°C)	50	50	95	60
Tempo	2'	30 sec	15 sec	1'
Ripetizioni	1	40		

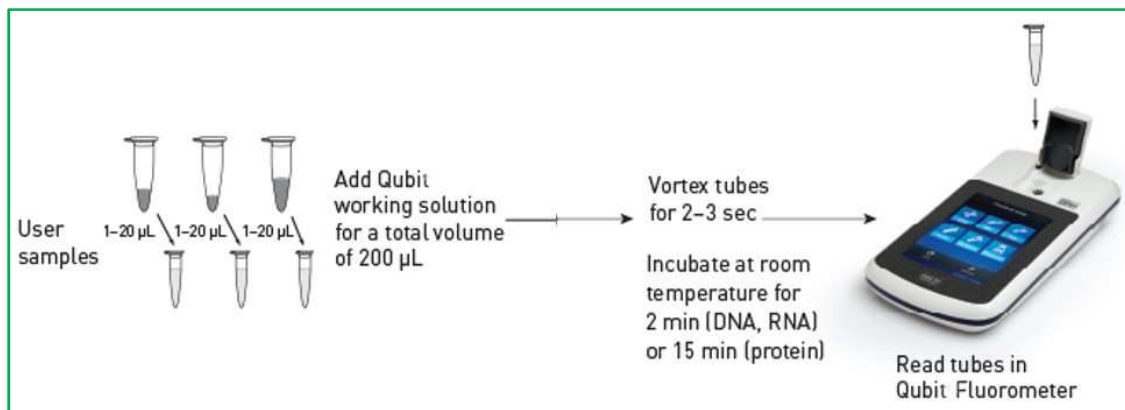
I Ct ottenuti dalla Real-Time sono stati ottenuti impostando la threshold a 0,2, sono stati considerati indeterminati tutti i valori superiori a 35 e i dati sono stati normalizzati sottraendo ad ogni Ct la media dei Ct degli U6, considerati il controllo endogeno.

## 6 - ANALISI della METILAZIONE del DNA

### 6.1 QUANTIFICAZIONE E DETERMINAZIONE dello STATO DI DEGRADAZIONE

L'estrazione del DNA è stata effettuata come descritto precedentemente nel paragrafo 3. Il DNA è stato dosato utilizzando il fluorometro Qubit (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific) (Fig. 32). I kit di assay dsDNA BR (ad ampio raggio, con un range di 2-1.000 ng di DNA) e HS (alta sensibilità, con un range di 0,2-100 ng di DNA) sono progettati per fornire una quantificazione semplice ed accurata, poiché sono molto selettivi per il doppio filamento del DNA rispetto al singolo dell'RNA. I contaminanti comuni, come sali, nucleotidi liberi, solventi, detersivi e proteine dispersi all'interno del campione non sono un limite per la funzionalità del saggio. La procedura prevede la preparazione di una soluzione che, una volta miscelata, ha un segnale stabile per 3 ore a temperatura ambiente. I campioni vengono incubati per 30' a 37°C, si prepara una soluzione contenente 199 µL di Qubit® dsDNA BR Buffer (Componente B) e 1 µL di Qubit® dsDNA BR Reagent (Componente A), si mescola bene e poi si prelevano 2 µL di soluzione, che

vengono sostituiti con 2  $\mu\text{L}$  di campione. Si lascia in incubazione per almeno 2' al buio, e poi si legge nello strumento.



**Figura 32** - Procedura di preparazione e caricamento dei campioni di DNA sul fluorometro Qubit

Si procede con la preparazione di un gel di agarosio 1% per determinare se il DNA è degradato o può essere impiegato per le successive analisi. Il gel viene preparato sciogliendo 0,65 g di agarosio (UltraPure™ Agarose) in 50 mL di TBE 0,5X, a cui si aggiungono 0,8  $\mu\text{L}$  di SYBR™ Safe DNA Gel Stain (tutti forniti da Invitrogen™). Una volta pronto, si carica 1  $\mu\text{L}$  di campione addizionato con 4  $\mu\text{L}$  di DNA Gel Loading Dye (6X, ThermoFisher Scientific) e poi si avvia la corsa elettroforetica per 20' a 120V.

## 6.2 TRATTAMENTO CON BISOLFITO

Per analizzare il grado di metilazione sono stati scelti i campioni estratti da ogni trattamento cronico, più un campione di cellule non trattate sensibili ad IM, ed è stato impiegato il kit EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research Corp, Irvine, CA, USA). Questa procedura, realizzabile in 3 ore, ma che preferenzialmente si esegue in due giornate, permette la conversione completa con il bisolfito del DNA ricco in GC, una reazione a caldo accoppiata con denaturazione/conversione converte le citosine non metilate in uracile. Il DNA non viene fatto precipitare, ma viene purificato e desolforato in uno step singolo usando le spin column. In questo modo si ottiene un eluato con DNA ultrapuro pronto per l'analisi di metilazione. Per cominciare, si diluiscono i campioni per avere 600 ng in 20  $\mu\text{L}$  (se il volume è differente, porto a secchezza in centrifuga sotto vuoto e diluisco i 600 ng di DNA con 20  $\mu\text{L}$  di acqua). La prima reazione prevede la dissoluzione dei cristalli presenti nel Ct Conversion Reagent mediante l'aggiunta di 900  $\mu\text{L}$  di acqua RNase-free, 300  $\mu\text{L}$  di M-Dilution Buffer e 50  $\mu\text{L}$  di M-Dissolving Buffer. A temperatura ambiente si agita sul vortex per 10', poi si prelevano 130  $\mu\text{L}$  di soluzione omogenea e si aggiungono ai 20  $\mu\text{L}$  di DNA;

si carica in PCR e si avvia il programma raccomandato da Illumina per ottimizzare il protocollo (Tab. 15).

Tabella 15 - Programma di reazione impostato in PCR			
	Step 1	Step 2	Step 3
Temperature (°C)	95	50	4
Tempo	30 sec	60'	∞
Durata ripetizioni	16 ore		-

Il giorno dopo si pone la piastra in ghiaccio per almeno 10', poi si centrifuga. Si aggiungono, per ciascun well, 600 µL di Binding Buffer nell'apposita colonna per l'eluizione, e si miscela il prodotto della PCR nella colonnina prima di procedere con una centrifuga di 1' a 21130 rcf. A questo punto viene fatto un primo lavaggio con 100 µL di M-Wash Buffer e si centrifuga sempre alla massima velocità per 1'. Si procede aggiungendo 200 µL di M-Desulphonation Buffer, si centrifuga, e si fanno due lavaggi consecutivi con 200 µL di buffer di lavaggio ogni volta. Infine si posiziona la colonna su un nuovo tubo di raccolta e si eluisce il DNA purificato con 22 µL di M-Elution Buffer. Questa procedura è completa nel caso il DNA provenga da fresco, ma necessita di un ulteriore step di ripristino (restoration DNA) nel caso il DNA provenga da paraffina. Il campione è ora pronto per essere trattato con gli opportuni reagenti per l'analisi sulla piattaforma Illumina.

Per consentire un'analisi della metilazione del DNA, Illumina offre una piattaforma per il *profiling* di metilazione costituita da prodotti chimici e da sistemi come iScan® e HiScan®. Durante gli ultimi 5 anni di ricerca sul metiloma, in cui sono stati inclusi progetti come ENCODE e FANTOM5, sono state identificate le regioni enhancer come siti critici per la metilazione differenziale. L'*Infinium MethylationEPIC BeadChip* di Illumina (Fig. 33) migliora le performance ottenute dal precedente chip 450k incrementando il numero di CpG analizzate di oltre 350.000 nuovi loci. Fornendo misurazioni quantitative della metilazione a livello di singolo sito CpG per campioni normali e/o provenienti da paraffina (FFPE), questo test offre una potente risoluzione per la comprensione dei



Figura 33 - Infinium MethylationEPIC BeadChip

cambiamenti epigenetici. L'*Infinium MethylationEPIC BeadChip* offre una copertura eccezionale delle isole CpG, geni RefSeq, cromatina aperta ENCODE, siti di legame del fattore di trascrizione

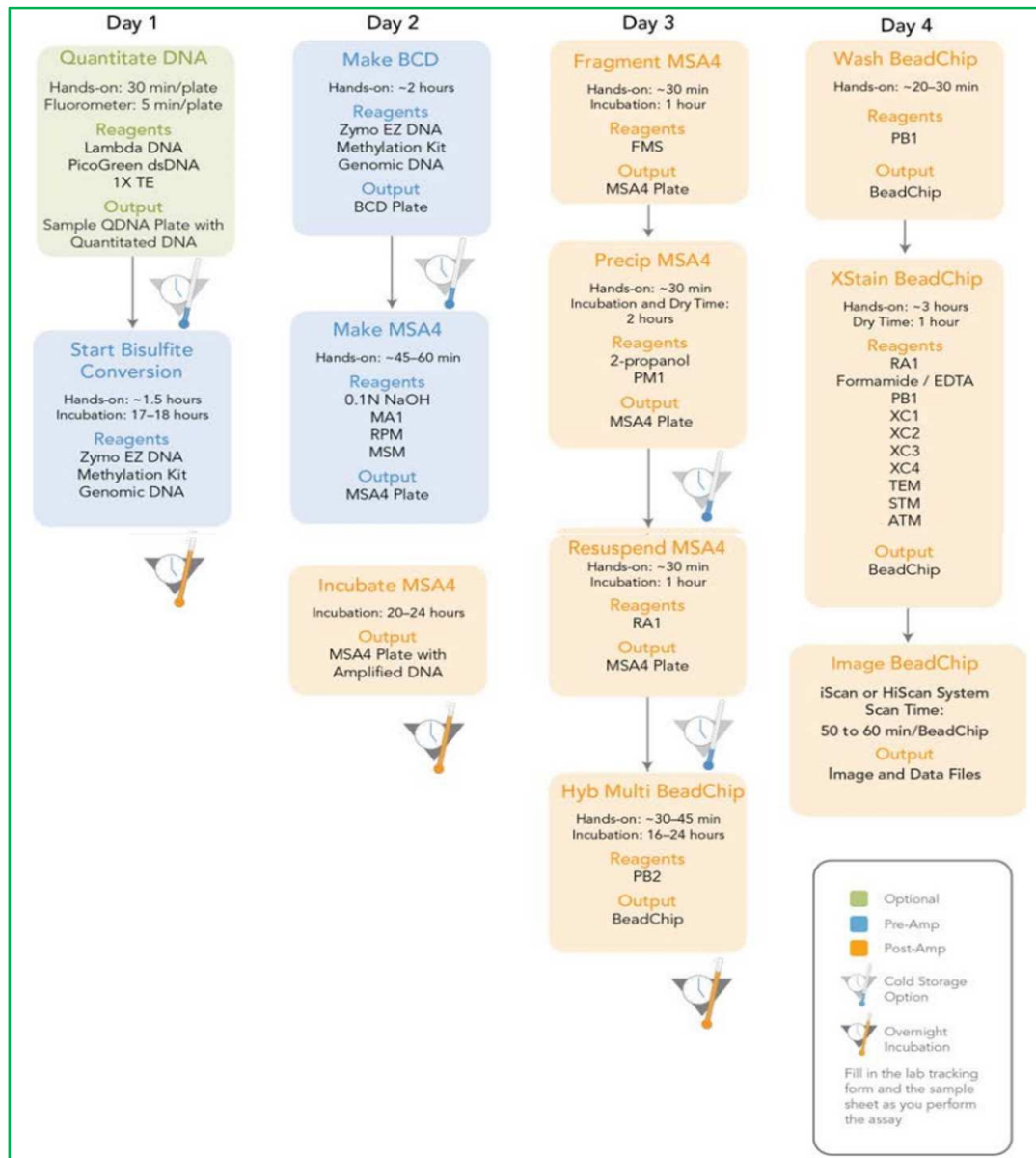
ENCODE ed enhancer FANTOM5. La tecnologia HD Infinium consente la selezione del contenuto indipendentemente dalle limitazioni associate alla polarizzazione, spesso associate ai metodi di captazione del DNA metilato. È importante sottolineare che l'Infinium MethylationEPIC BeadChip contiene più del 90% del contenuto originale di Infinium Methylation450k BeadChip, scelto per fornire una visione ampia e completa del metiloma.

### 6.3 PROTOCOLLO PER LA PREPARAZIONE DI ILLUMINA® INFINIUM® HD METHYLATION ASSAY

Il test Illumina® Infinium® HD per la metilazione ha rivoluzionato l'analisi della metilazione del DNA ottimizzando la preparazione del campione e consentendo una procedura efficace. La guida al protocollo di analisi della metilazione calcola il profilo di metilazione su migliaia di loci CpG per campione e supporta l'automazione di un numero molto elevato di campioni. Questo protocollo combina la conversione del bisolfito del DNA genomico e l'amplificazione dell'intero genoma (WGA) con acquisizione diretta, basata su array e con il calcolo dei loci CpG. L'intensità del segnale viene misurata con il sistema Illumina iScan® o HiScan® per generare valori beta, una misura del grado di metilazione in un locus. I valori beta possono essere indagati e confrontati tra campioni per solidi studi su larga scala. Una o due sonde vengono utilizzate per interrogare un locus CpG, a seconda della progettazione della sonda per un particolare sito CpG. L'estremità 3' delle sonde è posizionata direttamente di fronte al sito CpG (per Infinium I) o immediatamente adiacente al sito (per Infinium II). L'estensione delle sonde incorpora un nucleotide di biotina o un nucleotide marcato con dinitrofenile, i nucleotidi C e G sono marcati con biotina e i nucleotidi A e T sono marcati con dinitrofenile. La procedura si svolge in 4 giorni e prevede lunghi periodi di incubazione (Fig. 34). Il primo passaggio è quello di pre-amplificazione: si prepara una piastra da 96 pozzetti MSA4 con 5 µL di DNA convertito cui si aggiungono 20 µL di Multi-Sample Amplification 1 Mix (MA1) e 4 µL di NaOH 0,1 N, in ciascun pozzetto, a temperatura ambiente. Si sigilla e si pone in agitazione a 1.600 rpm per 1', poi si fa una centrifuga pulsata a 280 g e si lascia in incubazione 10'. Si aggiungono 68 µL di Random Primer Mix (RPM) e 75 µL di Multi-Sample Amplification Master Mix (MSM), si lascia in agitazione con le stesse condizioni di prima e poi si lascia incubare in forno a 37°C per 20-24h. Il secondo giorno si eseguono le operazioni di post-amplificazione. Si centrifuga brevemente la MSA4, e si aggiungono in ogni well 50 µL di Fragmentation solution (FMS), si pone sul vortex 1' a 1.600 rpm, si centrifuga e si lascia in incubazione a 37°C per un'ora. Allo scadere dell'ora, si procede con la precipitazione del DNA. Per colorare il DNA che precipiterà, si aggiungono in ogni pozzetto 100 µL di Precipitation solution (PM1), si centrifuga e si lascia incubare a 37°C per 5', poi si centrifuga. Si continua

aggiungendo 300  $\mu\text{L}$  di 2-propanolo, si capovolge la piastra per almeno 10 volte, in modo da mescolare energicamente la sospensione che si forma in ogni pozzetto, e si mette in incubazione a 4°C per almeno 30'. Si centrifuga per 20' a 4°C e si elimina il surnatante capovolgendo la piastra con un movimento deciso. Si lascia evaporare a testa in giù per almeno 1 ora a temperatura ambiente; al termine di questo periodo di evaporazione saranno visibili i pellet azzurro-blu del DNA convertito. A questo punto si procede con la risospensione del precipitato. Si aggiungono 46  $\mu\text{L}$  di Resuspension, hybridization, and wash solution (RA1), che va agitato molto bene prima di essere utilizzato (per sciogliere i cristalli presenti nella sospensione), e si pone in incubazione 1 ora a 48°C. Al termine si passa sul vortex e in centrifuga. A questo punto la piastra viene messa in freezer a -20°C per la notte. Il giorno successivo si prosegue con l'ibridazione e il caricamento dell'array EPIC. I campioni in piastra vengono denaturati 20' a 95°C e poi si lasciano in incubazione a temperatura ambiente per 30'. Nel frattempo si assembla la camera (Hyb Chamber) secondo le istruzioni fornite da Illumina® per il caricamento dei BeadChip EPIC, utilizzando 400  $\mu\text{L}$  di Humidifying buffer (PB2). Usando un'opportuna pipetta multi canale, estremamente precisa, si caricano contemporaneamente 26  $\mu\text{L}$  di 8 campioni; per capillarità, la soluzione si distribuisce all'interno di tutto il chip. Chiudere i chip all'interno della camera e lasciarli almeno 16 ore, ma non più di 24, in forno a 48°C. Il giorno successivo si continua con i cicli di lavaggio dei BeadChip ibridati. Si lascia raffreddare la camera a temperatura ambiente per 25' prima di aprirla e poi si lavano i chip, dopo aver rimosso la pellicola protettiva, inserendoli su un rack che viene immerso ripetutamente per 1' in 200  $\mu\text{L}$  di "Reagent used to prepare BeadChips" (PB1). Dopo il primo' si lavano nuovamente i chip in 200  $\mu\text{L}$  di PB1 pulito. Chiudere ogni chip adeguatamente nella Flow-Through Chamber con gli appositi vetrini ben puliti con etanolo al 70%. A questo punto i chip vengono sottoposti ad una sequenza di lavaggi con RA1, XStain BeadChip solution 1 e 2 (XC1 e XC2), Two-Color Extension Master Mix (TEM), formammide al 95%, Superior Two-Color Master Mix (STM), XStain BeadChip solution 3 (XC3), mantenendo i chip in immersione a 44°C, poi si prosegue con ulteriori lavaggi con STM, XC3, Anti-Stain Two-Color Master Mix (ATM) a 32°C. Infine si lavano nuovamente in PB1 e XC4; si passano su un panno bagnato con etanolo al 70% e si caricano i chip in macchina, avviando l' 'Illumina Iscan Control Software'.





**Figura 34** - Procedura operativa del protocollo dell'assay Infinium HD Methylation

## 7 - ANALISI STATISTICA

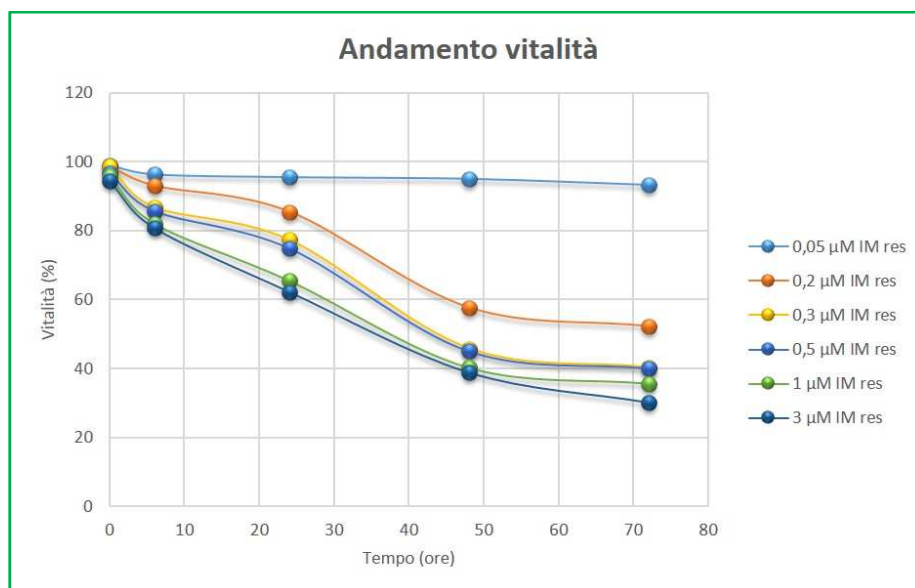
Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software Array Tool BRB (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>), un pacchetto integrato per la visualizzazione e l'analisi statistica dell'espressione genica dei Microarray, del copy number, dei dati di metilazione e dell'RNA-seq. I tool analitici e di visualizzazione sono integrati in excel come componente aggiuntivo e sono stati sviluppati nel sistema statistico di R, oltre che nei programmi C e Fortran, e nelle applicazioni Java. È stato utilizzato questo tool per realizzare un test F di confronto mediante supervised clustering con il fine di identificare miRNA e mRNA deregolati tra i diversi gruppi di studio. Abbiamo filtrato i dati per escludere quei miRNA e quegli mRNA il cui valore di espressione fosse inferiore al 10% in tutti i campioni, i rimanenti sono stati selezionati in modo da selezionare quelli

che presentavano un valore di fold change di almeno 2 punti in entrambe le direzioni rispetto alla mediana delle intensità dei miRNA/mRNA in tutti i campioni. È stato eseguito un primo cluster non supervisionato che ci ha permesso di ripartire i campioni in due sottocategorie: 1) contenente i campioni NT, 0,05 e 0,2  $\mu$ M IM resistenti, 2) di cui fanno parte i campioni da 0,3 a 3  $\mu$ M IM resistenti. I due gruppi sono stati indicati, rispettivamente, a bassa e ad alta concentrazione. Dall'analisi univariata ( $P < 0,05$ ) sono stati identificati i miRNA e gli mRNA che sono risultati significativamente deregolati [200].

Per quanto riguarda la metilazione, l'analisi dei dati è stata realizzata mediante il software GenomeStudio che permette di realizzare un'efficace analisi della differente metilazione dei campioni analizzati. È dotato di strumenti di visualizzazione avanzati che consentono di visionare grandi quantità di dati in un singolo grafico, come heatmap, grafici a dispersione (scatterplot) e grafici lineari. Questi tool e il GenomeStudio Genome Browser mostrano informazioni utili per codificare le CpG selezionate, come le coordinate cromosomiche, la percentuale di GC, la posizione in un'isola CpG e i valori  $\beta$  di metilazione. I dati sono poi stati elaborati in excel, considerando validi solo quelli con un p-value  $< 0,001$  e sono stati calcolati i  $\Delta$ Avg (average) sottraendo ai  $\beta$ value il corrispondente valore proveniente dal campione non trattato. Sono stati poi selezionati dei range di significatività, e la metilazione di un sito è stata considerata significativa se il  $\Delta$ Avg  $< 0,33$  o  $> 0,33$ .

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Circa il 20% dei pazienti affetti da CML non risponde al trattamento con IM, sia a causa di resistenza primaria, sia in seguito ad acquisizione di resistenza secondaria. Recentemente, fra i meccanismi proposti per la mancata risposta al trattamento, vi sono la sovraespressione di trasportatori di membrana, l'alterata espressione dei miRNA e un'anomala metilazione del DNA. Per svolgere le analisi è stata utilizzata una linea cellulare di CML in crisi blastica, le K562. In particolare, sono state sviluppate 6 sub-colture di K562 resistenti a concentrazioni crescenti di IM: da 0,05  $\mu\text{M}$  fino a 3  $\mu\text{M}$ . Prima di ogni cambio di concentrazione (0,05  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  0,2  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  0,3  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  0,5  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  1  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  3  $\mu\text{M}$ ) è stata valutata la vitalità cellulare per definire l'instaurarsi di resistenza. Le linee cellulari così generate sono state definite resistenti ad IM solo se la vitalità cellulare era superiore al 90%. La valutazione del *profiling* è stata effettuata sia dopo trattamento acuto - 24 h, 48 h, 72 h - sia dopo trattamento cronico (tempo 0h al cambio di concentrazione). In figura 35 è stato invece riportato l'andamento della vitalità, alle diverse concentrazioni testate, in seguito ad incremento della dose somministrata.



**Figura 35** - Vitalità delle cellule K562 a concentrazioni di IM crescenti, misurata alle 0, 6, 24, 48, 72h

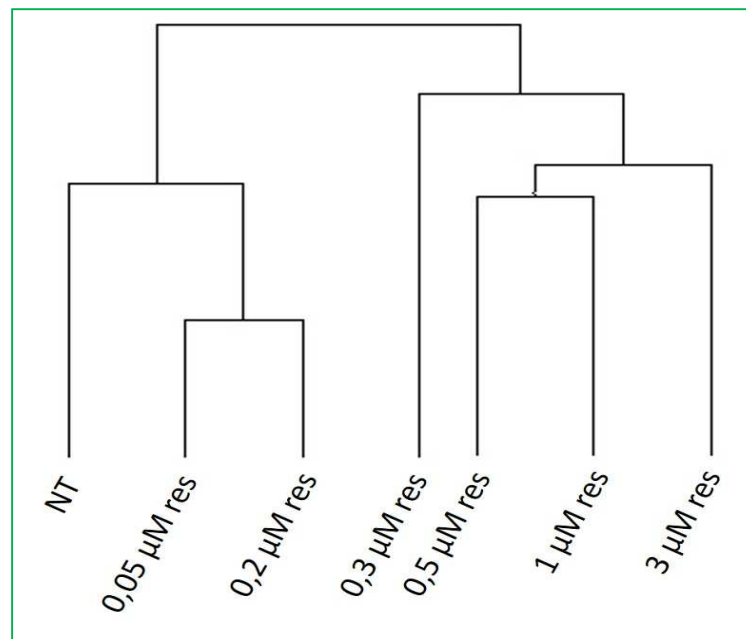
Come si osserva dalla figura, la crescita cellulare in seguito alla somministrazione del trattamento si è mantenuta pressoché costante (~98% di vitalità) per la concentrazione di 0,05  $\mu\text{M}$ . Successivamente, per le altre concentrazioni testate, la vitalità è calata sensibilmente nelle 72 ore successive all'incremento di dosaggio. Prima di ogni cambio di concentrazione, grazie alla collaborazione avviata con il Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale,

è stato valutato, mediante sequenziamento diretto, la presenza di mutazioni nel gene BCR-ABL. Questo ci ha permesso di escludere che la comparsa di resistenza nelle linee cellulari resistenti fosse dovuta alla comparsa di mutazioni puntiformi nel gene chimerico. Inoltre, grazie alla stessa collaborazione, abbiamo anche escluso che la resistenza fosse dovuta alla sovraespressione di BCR-ABL, altro fondamentale, e tra i più conosciuti, meccanismo di resistenza identificato.

## 1 - ANALISI dell'ESPRESSIONE degli mRNA

### 1.1 TAQMAN® HUMAN ABC TRANSPORTER ARRAY

Per identificare potenziali proteine del trasporto deregolate è stato analizzato il profilo dell'espressione dei trasportatori ABC mediante uno specifico TaqMan® array. In particolare, sono stati esaminati campioni di RNA delle cellule K562 resistenti alle diverse concentrazioni di IM. Al termine di ciascuna corsa, la macchina restituisce un valore di Ct, ovvero il numero di cicli in cui la curva di amplificazione dell'mRNA in fase esponenziale supera il valore soglia. Per normalizzare i valori ottenuti, sono stati sottratti ai Ct dei campioni la media dei Ct del GAPDH, usato come controllo endogeno. Il clustering non supervisionato del profilo di espressione dei trasportatori ABC ha mostrato che le cellule trattate con la concentrazione minore di IM sono più simili fra loro rispetto a quelle trattate con concentrazioni più alte (da 0,3 a 3  $\mu\text{M}$  IM res), che formano un unico gruppo a sé stante (Fig. 36).



**Figura 36** - Diagramma del cluster dei campioni, usando la correlazione centrata e l'average linkage

Nella figura 37 è stato riportato il cluster gerarchico dei geni significativi e la loro disposizione nei campioni.

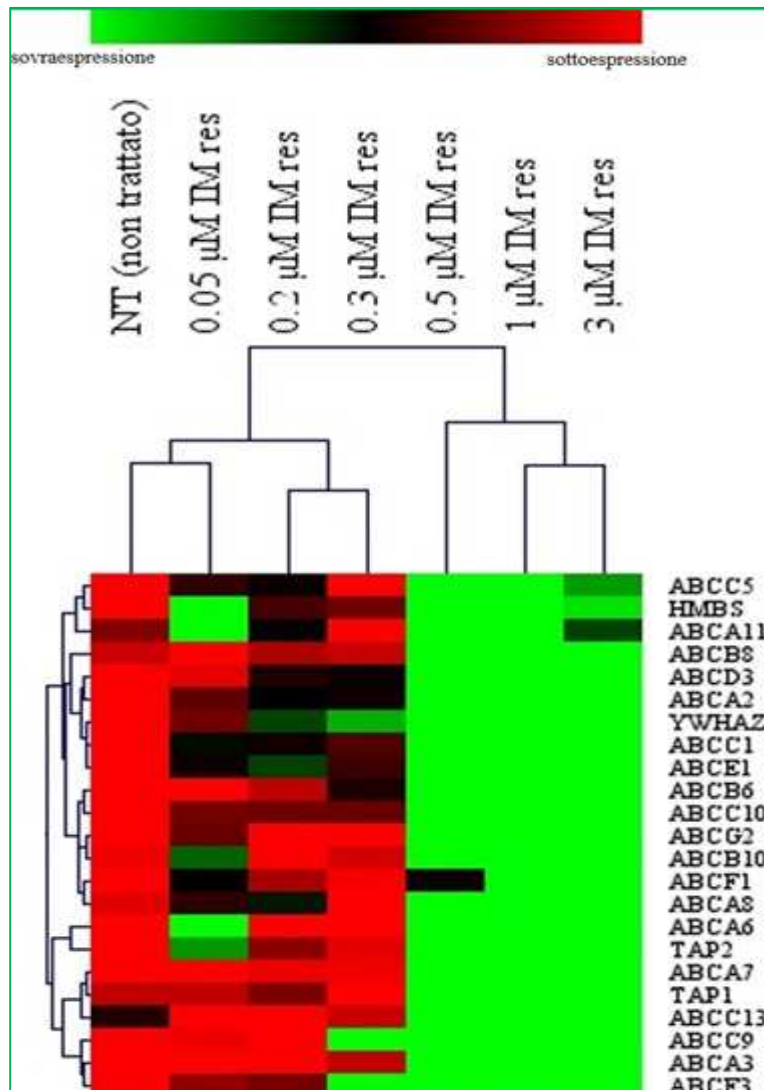


Figura 37 - Heatmap dei trasportatori clusterizzati secondo la somiglianza dei campioni

Come si deduce dalla figura, i campioni mostrano una separazione nei livelli di espressione per cui, dopo essere stati trattati con una concentrazione pari o superiore allo 0,05 µM, subiscono un’inversione netta nei livelli di espressione dei geni analizzati. Questo dato è molto importante poiché ci permette di capire che lentamente le cellule iniziano a modificare i loro livelli di espressione in seguito al trattamento con il farmaco e, ad un certo punto - nel nostro caso coincidente con la somministrazione della concentrazione 0,5 µM - il cambiamento è brusco e perfettamente riscontrabile nei campioni da noi analizzati e si delinea un profondo aumento dell’espressione dei trasportatori di membrana. In tabella 16 sono stati riportati i valori di  $\Delta Ct$ ,

FDR (Fold Discovery Rate, <0,05) e i p-value, derivanti dall'analisi statistica eseguita con BRB Array tool.

**Tabella 16** - Espressione dei geni degli RNA significativi, FDR e p-value

GENI	NT (non trattato)	0,05 $\mu$ M IM res	0,2 $\mu$ M IM res	0,3 $\mu$ M IM res	0,5 $\mu$ M IM res	1 $\mu$ M IM res	3 $\mu$ M IM res	FDR	p-value
Classi	BASSA conc	BASSA conc	BASSA conc	ALTA conc	ALTA conc	ALTA conc	ALTA conc		
ABCG2	12,033	11,427	12,264	12,656	10,152	8,302	9,792	0,002	2,81E-05
ABCA7	7,138	7,665	6,975	6,987	5,748	4,141	4,181	0,002	0,0001
ABCA3	8,294	7,796	7,495	7,247	5,198	5,232	4,316	0,002	0,0001
ABCC9	16,5	14,697	14,879	13,782	13,126	11,766	12,127	0,002	0,0001
ABCB8	5,481	5,826	5,4	5,477	3,219	3,198	4,468	0,003	0,0003
ABCB6	5,359	5,293	4,964	4,507	3,76	2,589	3,176	0,004	0,0004
TAP1	8,847	8,848	8,655	9,144	7,836	6,886	6,61	0,004	0,0006
ABCC13	14,033	14,697	14,879	14,485	13,704	12,753	11,61	0,008	0,0013
ABCA6	13,642	11,961	13,331	13,592	11,413	11,399	10,593	0,008	0,0014
ABCB10	4,856	4,116	5,158	4,783	3,608	1,848	3,626	0,013	0,0024
TAP2	7,677	6,251	6,756	7,001	4,403	5,646	5,468	0,014	0,0028
ABCC10	7,219	6,837	6,822	6,808	5,857	4,809	5,881	0,016	0,0036
ABCC5	6,831	6,085	5,974	6,732	4,622	4,186	5,825	0,016	0,0039
ABCC1	7,675	6,245	6,299	6,482	5,31	4,779	5,624	0,02	0,0052
ABCD3	7,449	6,963	6,41	6,356	4,787	4,984	5,953	0,025	0,0068
YWHAZ	6,938	5,845	5,482	5,401	4,567	4,297	4,852	0,026	0,0078
ABCA2	8,442	7,882	7,622	7,661	6,793	6,208	7,37	0,059	0,0187
ABCE1	4,74	3,599	3,51	3,729	2,648	2,445	2,89	0,067	0,0223
HMBS	4,95	3,763	4,269	4,388	2,999	2,89	3,899	0,068	0,024
ABCF1	6,901	5,903	6,354	6,583	5,919	3,874	4,326	0,083	0,0307
ABCA11	9,254	8,507	8,89	9,887	8,1	7,414	8,842	0,103	0,0419
ABCA8	7,984	7,487	7,339	8,098	7,053	5,598	6,583	0,103	0,0419
ABCF3	5,613	4,942	4,864	4,256	3,835	3,879	3,02	0,111	0,0482

Fra i trasportatori risultati significativamente deregolati, degno di nota è ABCG2.

ABCG2 appartiene alla superfamiglia di trasportatori ATP-binding cassette (ABC), sottofamiglia White, noto per il suo coinvolgimento nella multifarmaco resistenza. ABCG2 è un trasportatore di xenobiotici ad alta capacità, con un'ampia specificità di substrato. Si ritiene che questa proteina contribuisca a fornire un meccanismo di difesa cellulare in risposta all'impiego di farmaci antitumorali e, poiché è stata osservata un'espressione significativa di questa proteina nella placenta, è stato suggerito che possa svolgere un ruolo potenziale di difesa in questo tessuto. La

sovraespressione dei trasportatori ABC, diminuendo l'uptake dei farmaci, aumenta l'efflusso delle molecole e provoca un abbassamento netto della concentrazione citoplasmatica, riducendo l'efficacia del trattamento e favorendo l'insorgenza di resistenza. Quando gli inibitori TK si legano ai trasportatori ABC, in particolare ABCB1 e ABCG2, il legame del substrato con i siti di legame ad alta affinità induce una over-espressione di questi trasportatori [201]. Anche altri trasportatori ABC, della sottofamiglia di tipo C, come ABCC1 e ABCC1 da noi trovati iperespressi, partecipano al fenomeno di sviluppo di resistenza. Data l'influenza di questi trasportatori sull'azione degli inibitori TK, la somministrazione di antagonisti dei trasportatori ABC potrebbero fornire un supporto per invertire questo processo [202]. I risultati da noi osservati trovano conferma anche nel lavoro condotto da Dharmapuri e colleghi i quali, in un layout sperimentale analogo a quello svolto da noi in cui è stato analizzato il livello di espressione dei trasportatori ABC in cellule di CML K562, hanno dimostrato che ABCG2, ABCA2, ABBC1 e ABCC5 sono sovraespressi nelle cellule resistenti al farmaco rispetto a quelle non trattate [203]. Questi trasportatori, agendo simultaneamente, sono responsabili dello sviluppo di resistenza poiché inibiscono numerosi pathway di trasduzione del segnale, fra cui PGE2-cAMP-NF- $\kappa$ B, Wnt-GSK3 $\beta$ - $\beta$ -catenina e quello di Ras-Raf-MEK-ERK. Per quanto riguarda l'applicazione clinica, è stato dimostrato da Kim e collaboratori, che i pazienti presentanti un'alta espressione di ABCG2 hanno una ridotta sopravvivenza priva di progressione (PFS) e un basso esito clinico [204] se trattati con dasatinib. Un altro studio, che si trova in accordo con i nostri risultati e quindi con la precedente letteratura, è rappresentato da quello svolto da Steinbach e colleghi, in cui viene confermato che ABCA2, ABCA3, ABCB2 e ABCC10 risultano sovraespressi nell'AML pediatrica, confrontando i campioni provenienti dai pazienti con quelli derivanti da midollo osseo sano; fra questi, il più importante trasportatore coinvolto nella resistenza è ABCA3 [205].

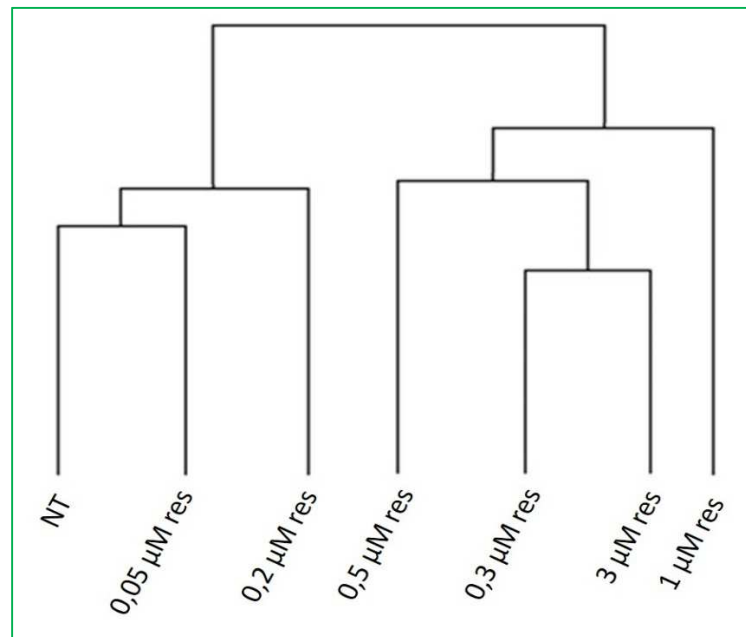
## 2 - ANALISI del PROFILO di ESPRESSIONE dei MIRNA

### 2.1 TAQMAN<sup>®</sup> LOW DENSITY ARRAY POOL A

Per analizzare i miRNA deregolati in seguito al trattamento a lungo termine con IM, è stata effettuata un'analisi della loro espressione mediante microarray. L'analisi è stata effettuata sulle cellule K562 rese resistenti alle diverse concentrazioni crescenti (0,05  $\mu$ M  $\rightarrow$  0,2  $\mu$ M  $\rightarrow$  0,3  $\mu$ M  $\rightarrow$  0,5  $\mu$ M  $\rightarrow$  1  $\mu$ M  $\rightarrow$  3  $\mu$ M) di farmaco. In aggiunta è stata condotta una ricerca *in silico* per determinare i possibili/probabili target dei miRNA risultati deregolati.

L'array TaqMan<sup>®</sup> Low Density Pool A ha permesso di analizzare simultaneamente 384 miRNA osservando una media di circa 250 miRNA espressi e 134 non amplificabili. È stato valutato l'andamento progressivo con l'incremento della dose impiegata nei diversi step ed i dati sono stati

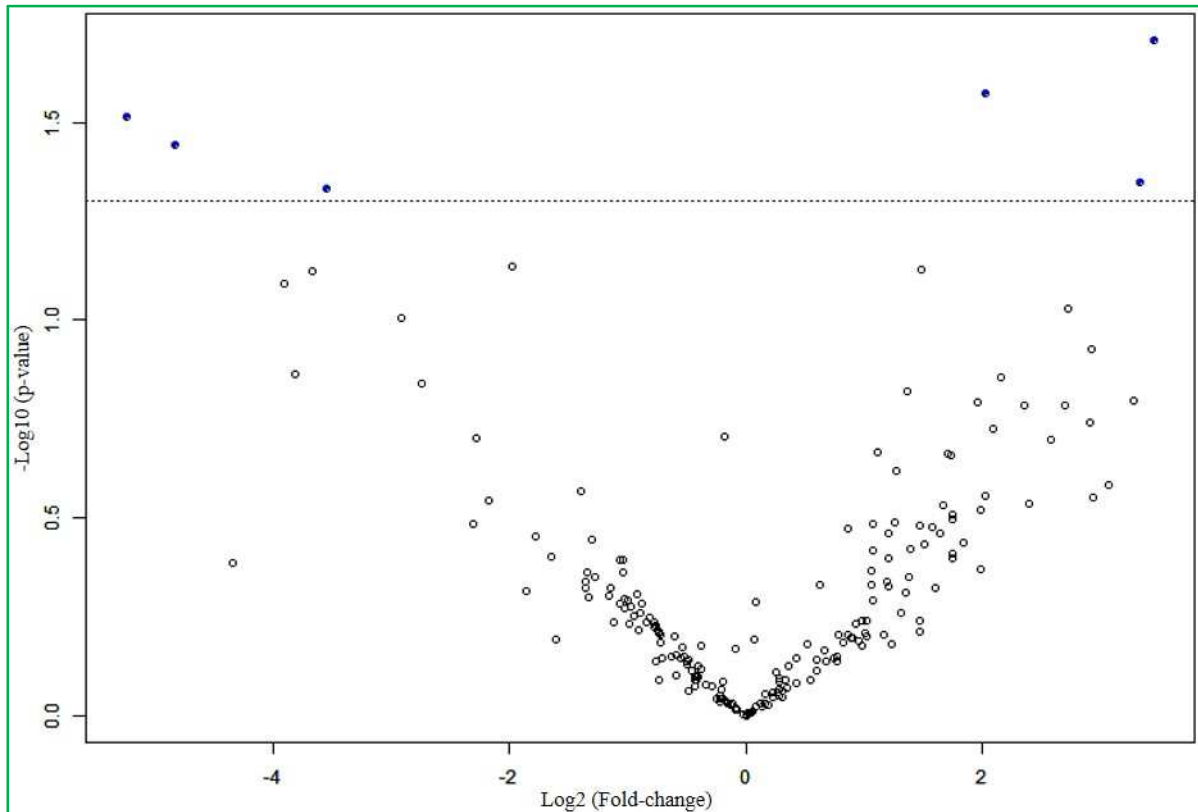
analizzati mediante piattaforma R (Fig. 38), impostando un'analisi analoga a quella eseguita per i trasportatori.



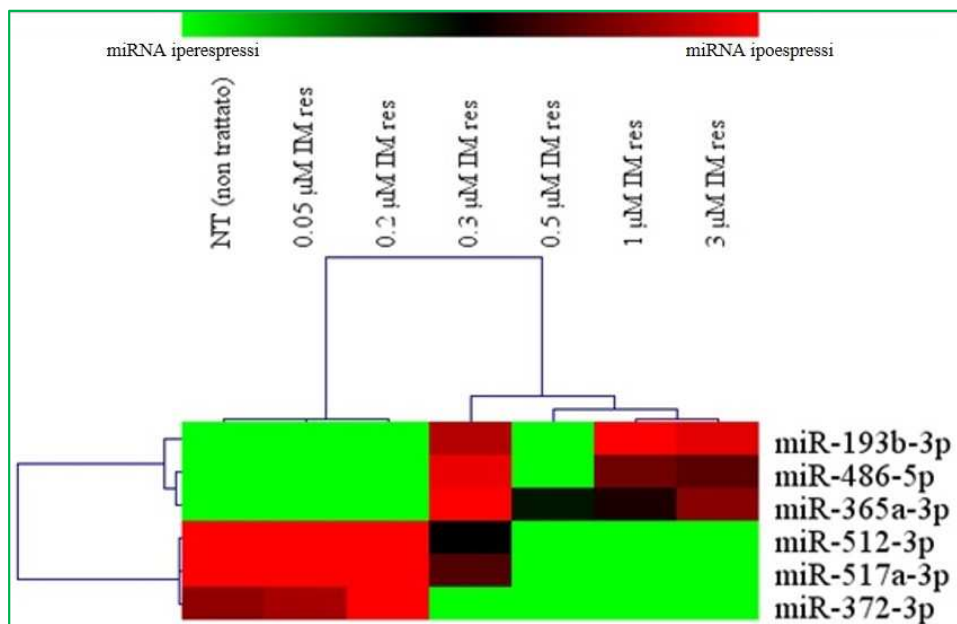
**Figura 38** - Diagramma del cluster dei campioni, usando la correlazione centrata e l'average linkage

Il clustering gerarchico del profilo di espressione dei miRNA ha mostrato che le cellule non trattate o trattate con basse concentrazioni si dispongono indipendentemente da quelle trattate con concentrazioni maggiori. In particolare, sulla base del profilo di espressione dei miRNA, i campioni si suddividono in due cluster, definiti rispettivamente a bassa e ad alta concentrazione. Del primo sottogruppo fanno parte le cellule non trattate, e quelle trattate con le concentrazioni 0,05 e 0,2 µM; al secondo appartengono a quelle trattate con 0,3 - 0,5 - 1 - 3 µM. Invece, in figura 39 è stato mostrato il VolcanoPlot rappresentate la disposizione dei miRNA fra i campioni analizzati e, in figura 40, è riportata la heatmap dei miRNA significativamente deregolati.





**Figura 39** - VolcanoPlot rappresentativo di come si dispongono i miRNA nei campioni analizzati



**Figura 40** - Heatmap dei miRNA significativi nei campioni analizzati

Mediante la funzione ‘class comparison’ multivariate permutation in BRB array tool sono stati identificati i miRNA differenzialmente espressi nei due diversi gruppi; l’analisi statistica per le differenti espressioni è stata ottenuta usando una varianza t-statistica random per ogni miRNA. In particolare, dalle analisi eseguite, sono emersi 6 miRNA la cui espressione variava

significativamente ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ) fra il gruppo trattato con basse concentrazioni di IM e quello ad alte concentrazioni: miR-193b-3p, miR-486-5p, miR-512-3p, miR-517a-3p, miR-365a-3p, miR-372-3p (Tab. 17).

**Tabella 17 - Espressione dei miRNA significativi e relativo p-value**

miRNA	NT (non trattato)	0,05 $\mu\text{M}$ IM res	0,2 $\mu\text{M}$ IM res	0,3 $\mu\text{M}$ IM res	0,5 $\mu\text{M}$ IM res	1 $\mu\text{M}$ IM res	3 $\mu\text{M}$ IM res	p-value
Classi	BASSA conc			ALTA conc				
miR-193b-3p	8,975	8,894	10,024	12,862	10,487	14,408	13,24	0,0196
miR-486-5p	5,138	5,277	5,969	8,668	6,141	7,636	7,477	0,0267
miR-512-3p	15,73	16,23	18,639	13,447	9,902	14,343	8,8	0,0307
miR-517a-3p	16,064	16,23	19,346	14,661	10,555	14,309	10,012	0,0360
miR-365a-3p	12,466	12,148	14,748	19,005	15,148	15,381	16,262	0,0449
miR-372-3p	16,064	16,23	19,346	14,481	13,275	15,422	11,451	0,0464

In seguito, sono stati identificati *in silico* i target dei miRNA significativi mediante l'impiego di programmi che permettono di predire i target più probabili. Sono stati utilizzati 5 programmi (TargetScan, DianaLab, mirDB, microrna.org, TarBase v.8), ed il target è stato ritenuto attendibile se almeno 4 su 5 erano concordi (Tab. 18).

**Tabella 18 - Elenco dei geni target predetti per i miRNA significativi**

miR-193b-3p	miR-486-5p	miR-512-3p	miR-517a-3p	miR-365a-3p	miR-372-3p
FHDC1	BTAF1		ZNF521	DLAT	LATS2
SOS2	ARID4B		PHF13	RAPGEF4	ZNF800
AP2M1	TOB1	PDIK1L	VSTM2B	USP48	OXR1
PLAU	FOXO1	DHX40	DBN1	NR3C2	ZNF367
CTDSPL2	CTDSPL2	SPOP	FOXJ3	ACVR1	ELAVL2
	HAT1	FGL2	USP1	ARRB2	UBE2B
	PTEN		TNIP1	EHF	TGFBR2
	DOCK3		TRPA1	TBK1	MYT1L
	CSPG5			ESRRA	

Successivamente, la seconda fase del lavoro ha previsto l'analisi dei pathway in cui tali geni sono coinvolti per capire quali fossero simultaneamente regolati dai miRNA presi in esame (mirPath v.3). I principali pathway individuati in questa analisi sono riportati in tabella 19 e la principale via di trasduzione, comprendente geni modulati da tutti i 6 miRNA, è quella di ErbB (Fig. 41).

**Tabella 19 - Riassunto dei pathway interessati dalla regolazione dei miRNA significativi**

PATHWAY INTERESSATI	miRNA coinvolti	p-value
Pathway di segnalazione di ErbB	miR-193b-3p, miR-486-5p, miR-512-3p, miR-517a-3p, miR-365a-3p, miR-372-3p	0.000587
Degradazione degli acidi grassi	miR-486-5p, miR-512-3p, miR-517a-3p, miR-365a-3p	0.000178
Malattie prioniche	miR-193b-3p, miR-512-3p, miR-365a-3p	2.31210800691e <sup>-36</sup>
Glioma	miR-193b-3p, miR-365a-3p, miR-372-3p	0.020149
Sintesi degli ormoni tiroidei	miR-193b-3p, miR-486-5p	0.005804
Biosintesi dei glico-sfingolipidi	miR-193b-3p, miR-512-3p	0.0410675

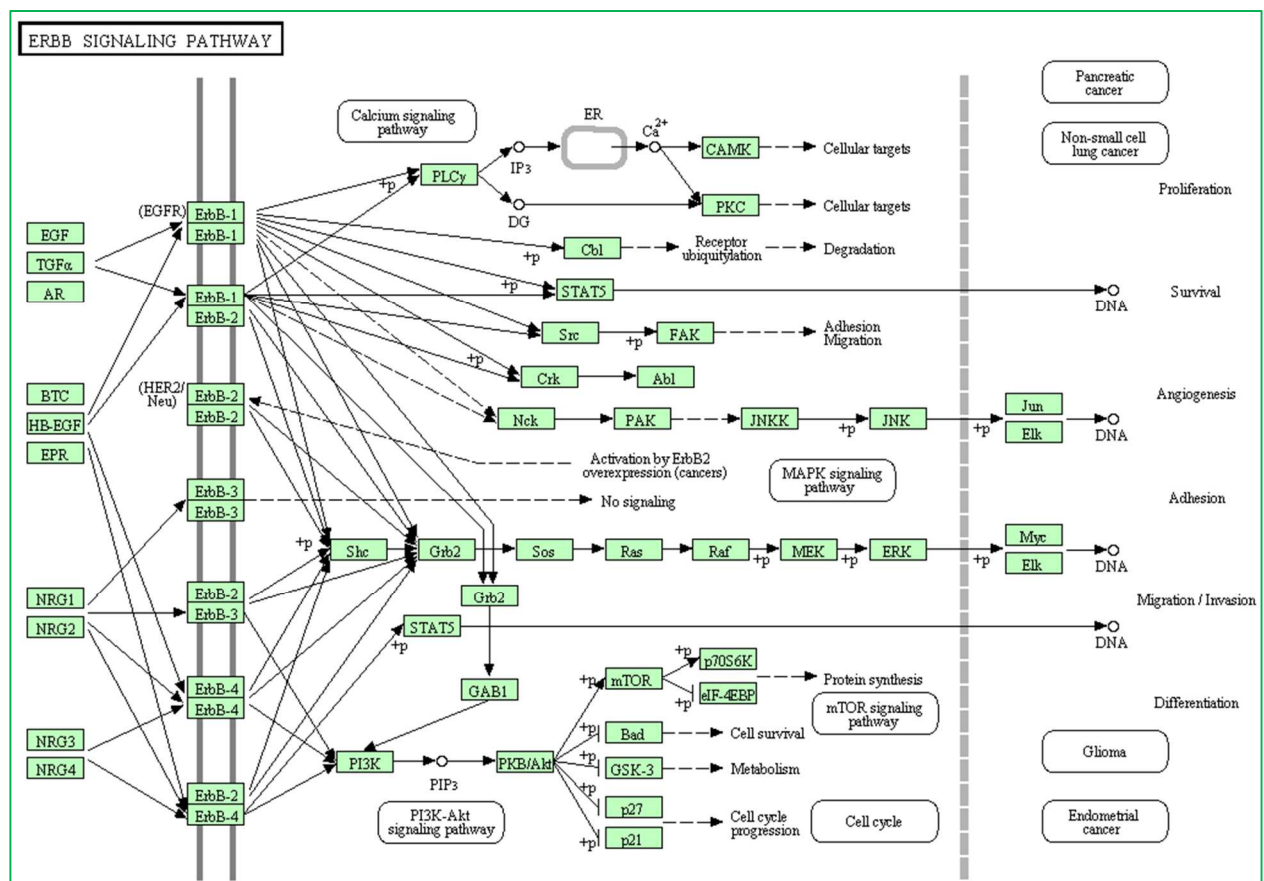


Figura 41 - Pathway di segnalazione di ErbB

L’attivazione o inattivazione di alcuni pathway di segnalazione intracellulari svolge un ruolo critico nella biologia delle cellule staminali tumorali. I pathway associati con una up-regolazione dei miRNA nelle micro-vescicole blastiche, nella CML e nell’AML, sono principalmente quello che coinvolge ErbB e quello di PI3K/Akt. Queste vie di trasduzione sono principalmente correlate alla vitalità cellulare, all’apoptosi, al metabolismo e alla tumorigenesi [206]. I membri della superfamiglia ErbB (o EGFR/Her), che includono EGFR/ErbB1/Her1, ErbB2/Her2/Neu,

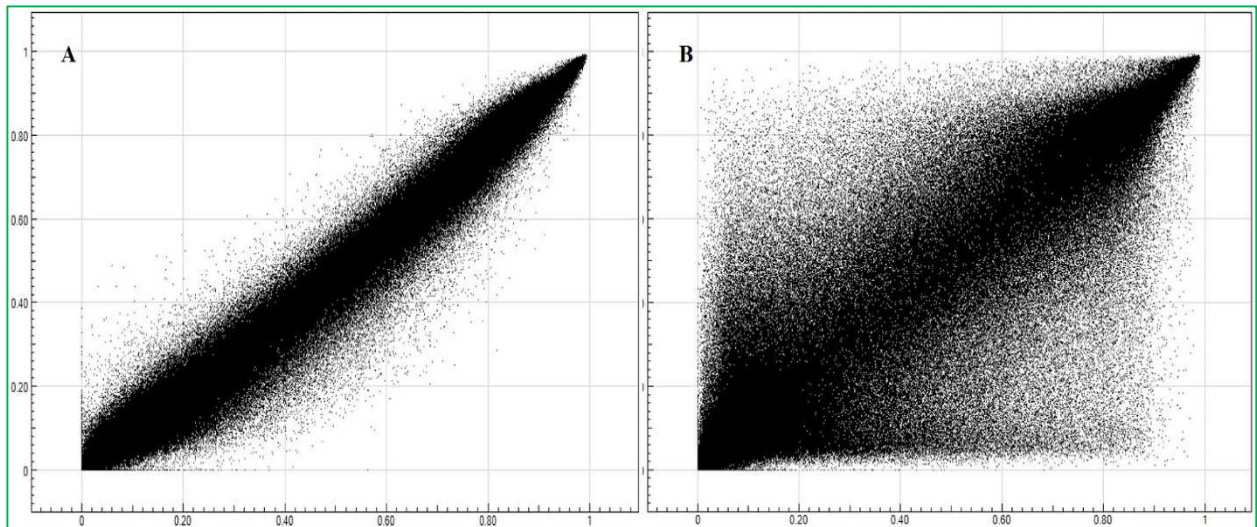
ErbB3/Her3 e ErbB4/Her4, sono target comuni per i farmaci antitumorali in virtù della loro alterata funzione in molte patologie tumorali. Questi recettori condividono la stessa struttura globale: una regione extracellulare, una regione transmembrana e una coda intracellulare carbossi-terminale che contiene un sito di autofosforilazione della tirosina. L'attivazione di oncogeni per mutazione o aumento del numero di copie (amplificazione del DNA), insieme alla perdita di attività dei geni oncosoppressori per mutazione o diminuzione di numero di copie, sono alterazioni somatiche del genoma che determinano lo sviluppo del cancro [207]. In generale, quindi, geni che sono comunemente amplificati o deleti spesso includono mutazioni puntiformi che attivano o silenziano questi oncogeni. L'attivazione di questi ultimi, come per esempio quella di ErbB2, fornisce l'opportunità di sviluppare target terapeutici che colpiscano la proteina stessa o gli eventi a valle di questo recettore [208]. Questo dato è di particolare interesse perché suggerisce la possibilità di utilizzare un inibitore di questo pathway, per esempio lapatinib - inibitore della tirosin-chinasi a doppio strato del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) - in combinazione con altri farmaci citotossici, per aumentare l'efficacia del trattamento in pazienti affetti da leucemia [209].

### 3 - ANALISI DEI LIVELLI DI METILAZIONE DEL DNA

Il processo di metilazione aberrante nei tumori è particolarmente complesso, tuttavia ci sono due punti fermi degni di nota: I) l'ipermetilazione di un'isola CpG di un promotore è associata all'inattivazione dei geni oncosoppressori codificanti e non codificanti, II) è presente una generale ipometilazione globale del genoma nel cancro, come recentemente dimostrato dall'esistenza di blocchi di DNA ipometilato. Una conoscenza approfondita del meccanismo di metilazione del DNA nel tumore ha una importante rilevanza clinica. Prima di tutto perché può fornire nuovi biomarcatori epigenetici che affianchino i classici indicatori diagnostici e prognostici per predire la chemiosensibilità ad un farmaco; secondo perché può essere esso stesso un target per nuove molecole, così come lo sono le DNA metiltrasferasi nel trattamento delle patologie ematiche [210,211]. In questo contesto è assolutamente necessario avere a disposizione tecniche robuste e accessibili che permettano di acquisire un profilo di metilazione del DNA completo. Al momento, il sequenziamento genomico con bisolfito di cloni multipli rappresenta il gold standard per la determinazione dello stato di metilazione di una sequenza di DNA. Questa strategia, combinata con una chimica '*deep-sequencing*', ha permesso il completamento della sequenza dell'intero genoma umano [212,213]. Tuttavia, ottenere metilomi (pattern di metilazione) di DNA umano completo richiede un grande sforzo in termini di tempo e budget e quindi sono ancora pochi quelli disponibili e, generalmente, associati ad un alto livello di specializzazione. Sono necessari microarray di DNA perfettamente validati e completi, con una grande copertura genomica per

essere in grado di rilevare gli SNP genome-wide che sono infatti ampiamente utilizzati negli studi GWAS. Tra i microarray utilizzati, la piattaforma *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip 450.000 CpG* (450K, Illumina Inc., CA, USA) per studi di metilazione del DNA [214] ha raggiunto un posto predominante nel mercato e in area scientifica, essendo non solo la piattaforma di elezione per gli studi del Cancer Genome Atlas (TCGA) [215], ma anche per numerosi studi che interrogano i campioni tumorali al di fuori di questi database [216], il processo di invecchiamento [217] o la variabilità interindividuale [218].

Anche se i cambiamenti nei pattern della metilazione sono stati ampiamente analizzati in numerose patologie maligne, i dati generati sull'impatto della metilazione nella CML sono ancora piuttosto ridotti e spesso limitati a singoli geni o ad un esiguo numero di geni. Tuttavia, con lo sviluppo delle recenti tecnologie all'avanguardia, è sempre più possibile ottenere un'analisi estensiva e performante della metilazione dei campioni di CML, utilizzando l'approccio del sequenziamento con il bisolfito come riducente (RRBS). Un esempio è il lavoro svolto da Heller e colleghi che, analizzando campioni di pazienti affetti da CML nei tre differenti stadi della malattia, hanno dimostrato che il numero dei siti CpG metilati aumenta notevolmente durante la progressione dalla patologia CP-CML ad AP/BC-CML [153]. In aggiunta, hanno sequenziato l'RNA (RNA-seq), per studiare l'espressione genica negli stessi campioni. I principali vantaggi nell'impiego di RRBS, confrontandolo con le tecniche di microarray, sono rappresentati dall'alta sensibilità, dalla risoluzione al singolo nucleotide, dall'ampia copertura di CpG e dalla quantità minima di DNA richiesta [219]. Dalle analisi è emerso che la frequenza dei siti CpG metilati è significativamente maggiore nei pazienti affetti da CML rispetto ai controlli sani e, soprattutto, con il progredire della patologia si passa dalla CP in cui i valori sono simili a quelli dei controlli - e questo supporta la teoria per cui la CP-CML sia principalmente guidata dalla traslocazione BCR-ABL - fino alle fasi AP e BC in cui il numero di siti metilati è significativamente più elevato. Questo fenomeno potrebbe indicare che la metilazione sia un processo estremamente importante per la progressione della patologia. Anche nei campioni da noi analizzati, ovvero cellule in crisi blastica, è possibile evidenziare un notevole aumento del numero di CpG metilate (Fig. 42). In particolare, come si osserva nello scatterplot, globalmente, il numero di siti metilati è esponenzialmente maggiore nelle cellule diventate resistenti al trattamento alla concentrazione più alta utilizzata (3  $\mu$ M).



**Figura 42** - Rappresentazione grafica (scatterplot) del numero di siti metilati nel campione di CML K562 non trattato con IM (**41A**) e in quello resistente alla massima concentrazione utilizzata, 3  $\mu$ M (**41B**)

Dall'analisi dei siti che risultano metilati con l'incremento del dosaggio, si può osservare che le “nuove” CpG metilate sono localizzate principalmente all'interno o in prossimità delle isole CpG. Questi siti possono essere coinvolti nella regolazione dell'espressione dei geni trascrizionali così come la metilazione delle isole CpG è fortemente associata con il silenziamento genico [149]. Dato che lo stato di metilazione può influenzare il legame con i fattori di trascrizione interessati [220], è altamente probabile che le differenze di metilazione del DNA nelle sequenze enhancer esercitino un ruolo importante nella funzionalità cellulare e tissutale, e che i profili alterati possano contribuire all'insorgenza di malattie e resistenza al trattamento farmacologico. Il lancio di una nuova piattaforma di 853.307 CpG (850K) per la metilazione del DNA, la MethylationEPIC BeadChip Infinium, è stato un aiuto fondamentale per ottenere lo sviluppo di una tecnologia altamente performante. Questo BeadChip, infatti, incorpora 333.265 siti CpG ubicati in regioni enhancer identificate dai progetti ENCODE [221] e FANTOM5 [222]. È stato dimostrato che la nuova piattaforma è in grado di riprodurre in maniera eccellente i dati di metilazione dell'array 450K, inoltre, a differenza di quest'ultimo, è in grado di analizzare anche i campioni di DNA estratti dalla paraffina. In aggiunta, l'EPIC include 59 polimorfismi utilizzati per i processi di controllo qualità.

I dati grezzi provenienti dalle nostre analisi (idat) sono stati normalizzati (normalizzazione di controllo) e il background è stato corretto utilizzando il modulo di metilazione (1.9.0) disponibile sul software GenomeStudio (v2011.1). Tutti i calcoli statistici sono stati eseguiti mediante piattaforma R (v.3.1.1), in accordo con quanto eseguito durante la realizzazione dello studio di Moran e collaboratori [223]. I marcatori CpG presenti su MethylationEPIC sono stati classificati in base alla posizione cromosomica, alla chimica dell'Infinium utilizzata per interrogare il

marcatore (Infinium I, Infinium II) e alla regione del gene della categoria caratteristica secondo l'annotazione UCSC (University of California, Santa Cruz Genome Browser Gateway- TSS200, TSS1500, 5'UTR, 1° esone, Corpo, 3'UTR). In relazione a quest'ultima classificazione, le categorie includevano TSS200 come regione compresa tra 0 e 200 basi a monte del sito TSS, la categoria TSS1500 classificava le CpG collocate 200-1500 basi prima di TSS, invece la 5'UTR includeva la regione tra il TSS e il sito iniziale (ATG). Le CpG all'interno del primo esone di un gene sono state considerate come appartenenti alla categoria esoni, quelle a valle del primo esone, comprese le regioni introniche fino al codone di stop, sono state classificate come corpi genici; le CpG localizzate a valle del codone di stop fino al segnale di poli A sono state considerate come 3'UTR, mentre quelle che non appartenevano a nessuna delle precedenti categorie sono state annotate come intergeniche. Dall'elaborazione di queste informazioni sono stati organizzati i campioni selezionando solo i valori di  $\Delta\text{Avg}$  accettati, e sono stati confrontati fra loro i vari campioni studiati. Sono poi stati selezionati i geni che erano andati incontro ad un differente metilazione a partire dalla prima somministrazione (0,05  $\mu\text{M}$ ) di farmaco, e avevano mantenuto questa alterazione anche alla concentrazione maggiore (3  $\mu\text{M}$ ). Questo ci ha permesso di identificare geni che potrebbero, eventualmente, essere biomarcatori predittivi di resistenza perché, subendo modificazioni sin dal primo contatto con il farmaco, potrebbero rappresentare un possibile target per una terapia mirata che inverta questo processo di metilazione. In figura 43 è stata riportata la heatmap che rappresenta come si dispongono i geni differentemente metilati nei diversi campioni analizzati. Sono mostrati i livelli di metilazione delle CpG significativamente deregolate tra le cellule trattate con basse concentrazioni di IM e quelle resistenti alle più alte concentrazioni. Come visibile dal grafico, vi è una netta contrapposizione tra il gruppo a bassa concentrazione e quello ad alta, in quanto, a partire da 0,3  $\mu\text{M}$  si ha un notevole incremento del numero di siti coinvolti nella metilazione rispetto alle cellule non trattate.

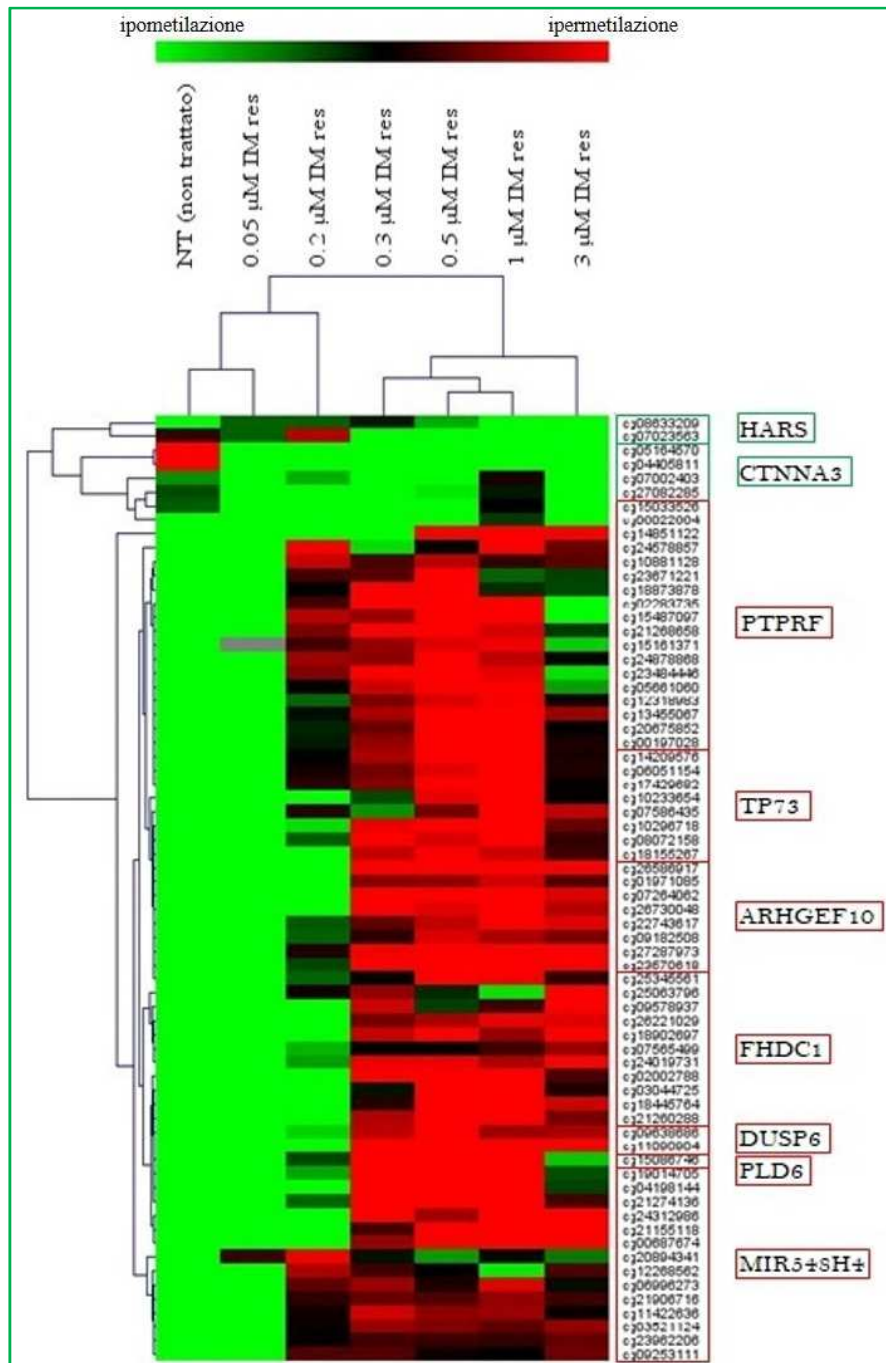
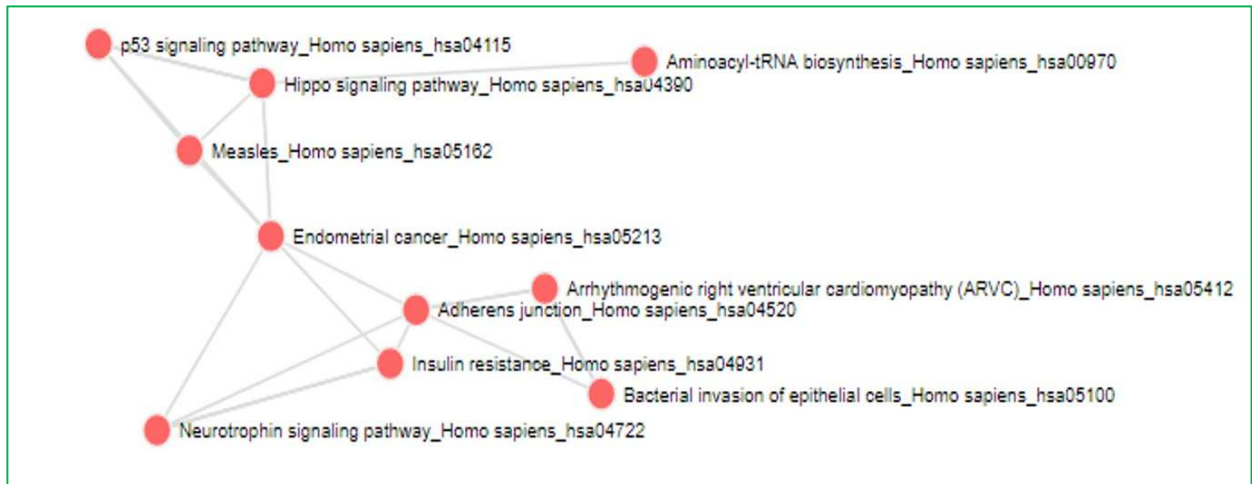


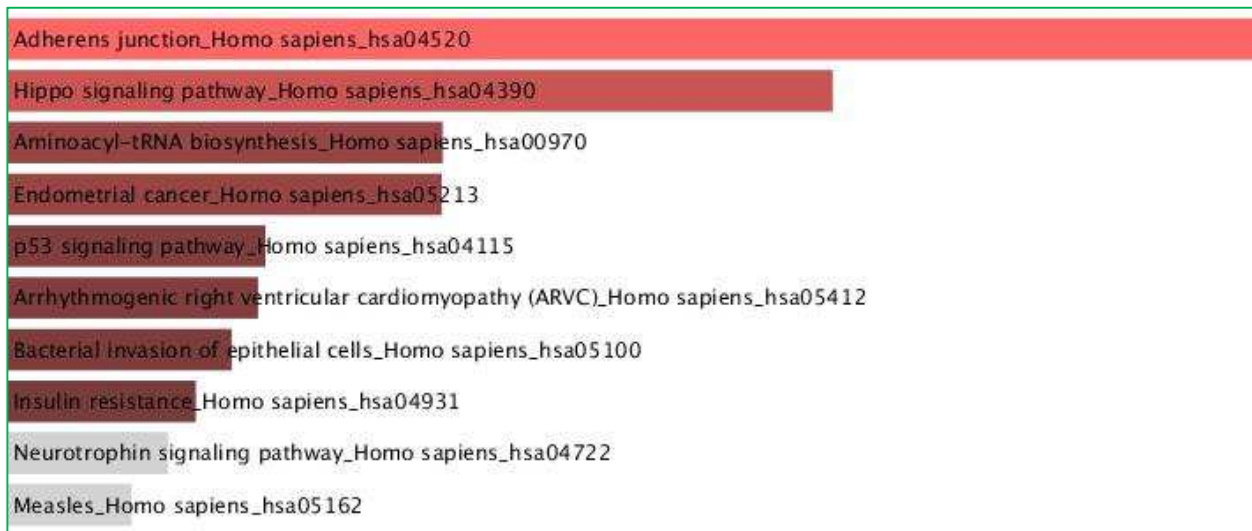
Figura 43 - Heatmap che indica i livelli di metilazione delle CpG significative e i geni cui appartengono

È interessante osservare che la maggior parte dei siti coinvolti dall'aumentata metilazione appartengono a isole che clusterizzano per specifici geni. I principali pathway regolati da questi geni alterati sono rappresentati nelle figure 44 e 45, e coinvolgono soprattutto l'adesione cellulare, il pathway di segnalazione del p53, il tumore dell'endometrio e la biosintesi dell'amminoacil-t-RNA (Tab. 20).





**Figura 44** - Interazione fra i pathway regolati dai geni significativi



**Figura 45** - Principali meccanismi fisio-patologici in cui intervengono i geni metilati

Queste rappresentazioni sono state realizzate utilizzando il software Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>). In particolare, la figura 44 evidenzia il numero di geni coinvolti per ogni meccanismo attribuendo un colore rosso chiaro, ed una maggiore lunghezza della barra, ai meccanismi modulati da un maggior numero di geni. Il software Enrichr contiene un'ampia collezione di diverse librerie geniche disponibili per le analisi; in totale, questo tool contiene 180.184 set di geni provenienti da oltre 102 librerie di set genici.

**Tabella 20** - Elenco dei processi coinvolti dalla metilazione dei geni significativi predetti mediante Enrichr

Processi coinvolti	p-value
Giunzioni aderenti o di ancoraggio	0,0081
Pathway di segnalazione Hippo (oncosoppressori)	0,0172
Biosintesi aminoacil-tRNA	0,0754
Tumore dell'endometrio	0,0754
Pathway di segnalazione del p53	0,0754
Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro	0,0754
Invasione batterica dell'epitelio cellulare	0,0754
Resistenza all'insulina	0,0754
Pathway di segnalazione della neurotrofina	0,0754
Morbillo	0,0754
Migrazione trans-endoteliale dei leucociti	0,0754
Pathway di segnalazione dell'insulina	0,0754
Giunzioni occludenti	0,0754
Molecole di adesione cellulare	0,0754

Il gene *HARS* (Istidil-tRNA sintetasi), che risulta significativamente ipometilato nelle cellule resistenti ad IM, fa parte delle aminoacil-tRNA sintasi, una classe di enzimi che scambiano il tRNA con il loro amminoacido analogo. La proteina codificata da questo gene è un enzima citoplasmatico appartenente alla 2° classe della famiglia delle aminoacil-tRNA sintasi. Questo enzima è responsabile della sintesi della istidil-trasfer-RNA, che è essenziale per l'incorporazione delle istidine nelle proteine. Il gene si trova in un orientamento testa a testa con *HARSL* sul cromosoma 5, dove i geni omologhi condividono un promotore bidirezionale. Spesso, il prodotto genico è un bersaglio per gli auto-anticorpi nelle patologie autoimmuni polimiosite e dermatomiosite [224]. Per quanto riguarda le possibili associazioni con il cancro, è stato dimostrato da He e collaboratori l'associazione dell'allele minore del polimorfismo rs801186 su *HARS* con un incremento del rischio di sviluppare tumore al seno [225]. Inoltre, recentemente, è stato riportato che mutazioni nell'introne di *HARS* possono regolare i livelli di trascrizione del gene bersaglio influenzando il legame proteico [226]. Infine, *HARS* è coinvolto nella via di segnalazione mitogenica e nell'attivazione della stessa cascata di trasduzione del segnale [227].

Il gene *CTNNA3* (catenina  $\alpha$  3) codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle vinculin- $\alpha$ -catenine [228]. Questa proteina svolge un ruolo nell'adesione fra cellule adiacenti nei tessuti muscolari. La presenza di mutazioni in *CTNNA3* può essere associata con displasia aritmogena, familiare, al ventricolo destro. Sfortunatamente, al momento, in letteratura non sono presenti studi che spieghino quali effetti abbiano le ipometilazioni a carico di questi due geni in pazienti affetti

da CML o da altri tipi di tumore, ma, poiché sono piuttosto recenti gli studi sulla metilazione e le nuove tecnologie in grado di analizzare il metiloma, è possibile che nel giro di qualche anno si possa superare questo gap nei processi di farmacoresistenza.

Il gene *PTPRF* codifica per il recettore di tipo F della proteina tirosin-fosfatasi ed è un membro della famiglia delle PTP. Le PTP sono note per essere molecole di segnale che regolano un'incredibile varietà di processi cellulari, fra cui la crescita cellulare, la differenziazione, il ciclo mitotico e la trasformazione oncogenica. La *PTPRF* possiede una regione extracellulare, una singola regione transmembrana e due domini catalitici intracitoplasmatici, che lavorano in tandem e che rappresentano la peculiarità della famiglia PTP. Il sito extracellulare contiene tre domini Ig-simili e 9 domini non Ig-simili che hanno affinità di struttura con quelli della molecola di adesione delle cellule neurali. Questo gene, inoltre, sembra coinvolto nella regolazione dell'adesione cellula-cellula nel tessuto epiteliale e nelle giunzioni di ancoraggio, e nel controllo del segnale delle  $\beta$ -catenine [229]. La fosforilazione tirosinica è un processo reversibile ed è governata dal bilanciamento fra le azioni delle proteine tirosin-chinasiche (PTK) e delle PTP. Tuttavia, anche se nel corso degli ultimi 20 anni sono stati compiuti moltissimi progressi nel comprendere il significato delle numerose PTK nella trasduzione del segnale, si sa ancora poco delle PTP, e solo recentemente è diventata evidente la complessità di questa famiglia di proteine [230].

Il gene *TP73* (proteina tumorale) codifica per un membro della famiglia dei fattori di trascrizione del p53 coinvolto nelle risposte cellulari allo stress e allo sviluppo. Si trova in una regione sul cromosoma 1p36, la quale risulta frequentemente deleta nel neuroblastoma e in altri tumori e si pensa possa contenere più geni oncosoppressori. La dimostrazione che questo gene è espresso in maniera monoallelica (probabilmente ereditato dall'allele materno), supporta l'idea che si tratti di un gene target per il neuroblastoma. Sono state identificate per questo gene molte isoforme risultanti da splicing alternativo e/o uso di promotori alternativi, ma la validità biologica e la natura dell'intera lunghezza di alcune di queste varianti non sono ancora note. La metilazione è associata con il silenziamento della trascrizione dei geni che operano a livello del differenziamento cellulare, dell'apoptosi, della regolazione della crescita e della segnalazione cellulare, conferendo un vantaggio selettivo alle cellule maligne. Dai risultati emersi dal nostro studio, il livello di metilazione di *TP73* aumenta con l'acquisizione di fenotipi più aggressivi e maligni da parte delle cellule tumorali, ovvero con lo sviluppo di resistenza anche ai dosaggi maggiori utilizzati. Questo dato è in accordo con quanto dimostrato da Mori e colleghi [231], il cui studio dimostra che, nonostante la frequenza della metilazione sia abbastanza alta nei pazienti con BC, rispetto a quelli con CP, l'incremento di metilazione di *PRDM2*, *RUNX3* e *TP73* è associata con la progressione

tumorale; questo dato però, non trova corrispondenza con la sopravvivenza dei pazienti, per la quale sembra non ci siano correlazioni con il grado di metilazione [232].

Per quanto riguarda *ARHGEF10*, questo gene, localizzato vicino ad una regione collegata al cancro sul braccio corto del cromosoma 8 (8p), codifica per un fattore di scambio del nucleotide (GEF) Rho-guanina. Questo fattore regola l'attività delle GTPasi Rho stimolando lo scambio della guanina difosfato (GDP) con la corrispondente trifosfato (GTP), giocando un ruolo fondamentale nella morfogenesi neurale. La perdita del braccio corto del cromosoma 8 è stata osservata nel carcinoma uroteliale e in altri tumori epiteliali, ed è stata associata con gli stadi più avanzati di numerosi tumori [233]. Mutazioni in questo gene possono essere associate con una velocità di conduzione dei nervi rallentata (SNCV) e, influenzando l'affinità di legame con il fattore di trascrizione Sp1 - che a sua volta può incrementare la trascrizione del gene *ARHGEF10* - può portare ad un'altra espressione di RhoA [234,235]. Poiché le GTPasi Rho controllano la divisione cellulare, la motilità, l'adesione, la circolazione e la fagocitosi vescicolare, possono essere coinvolte nella progressione e/o nella prognosi del cancro. In particolare, è stato dimostrato che 4 SNP su *RHOA* (rs10916352 G>C), *ARHGAP22* (rs3851552 T>C), *ARHGAP44* (rs72635537 C>T), e *ARHGEF10* (rs7826362 A>T), mostrano, individualmente o insieme, effetti predittivi sulla sopravvivenza in pazienti affetti da melanoma, suggerendo un potenziale ruolo per questi geni nella progressione della malattia [236].

La proteina codificata dal gene *DUSP6* è un membro della sottofamiglia delle proteine fosfatasi a doppia specificità. Queste fosfatasi inattivano le loro chinasi target defosforilando sia i residui di fosfoserina/treonina sia quelli di fosfotirosina. Inoltre, regolano negativamente i membri della superfamiglia delle protein-chinasi attivate dal mitogeno (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), che sono associati con la proliferazione e la differenziazione cellulare. Diversi membri di questa famiglia di fosfatasi mostrano distinte specificità di substrato per varie MAP chinasi, diversa distribuzione tissutale e localizzazione subcellulare e differenti modalità di inducibilità della loro espressione da parte di stimoli extracellulari. Il prodotto genico di *DUSP6* inattiva l'ERK2, è espresso in una varietà di tessuti, con maggiore frequenza a livello di cuore e pancreas e, diversamente dalla maggior parte degli altri membri di questa famiglia, è localizzato nel citoplasma. Mutazioni in questo gene sono state associate a ipogonadismo ipogonadotropo congenito. In letteratura è stato riportato che *DUSP6* può potenzialmente essere un gene chiave per lo sviluppo e la metastatizzazione del tumore dell'endometrio [237]. Questo gene funziona come un oncosoppressore e la metilazione delle CpG sul suo primo introne, riscontrabile nei nostri campioni, è stata osservata anche in pazienti affetti da tumore pancreatico. Nel carcinoma del pancreas, l'espressione di *DUSP6* è sottoregolata, evento che conduce ad una eccessiva attivazione

di ERK e ad un aumento di sviluppo e progressione del carcinoma [238]. Inoltre, è stato osservato che un silenziamento di DUSP6 favorisce la tumorigenesi, la transizione epiteliale-mesenchimale e l'invasione cellulare dei carcinomi a cellule squamose esofagee, carcinomi rinofaringei e cancro alla prostata. Nel carcinoma ovarico, si ha una perdita dell'espressione di DUSP6, in particolare a livello proteico, che determina l'iperattivazione di ERK1/2, con conseguente acquisizione, da parte delle cellule tumorali ovariche umane, di un fenotipo più aggressivo e resistente [239]. In aggiunta, lo studio condotto da Ma e coll. ha dimostrato che l'ipermetilazione delle isole CpG nell'introne 1 di DUSP6 può rappresentare uno dei principali meccanismi che portano al silenziamento di DUSP6 nei tumori squamosi esofagei, mentre la sua riattivazione, che si osserva durante il periodo di risposta al trattamento farmacologico, comporta una riattivazione del normale ciclo di apoptosi [239]. Considerazioni analoghe sono riportate nel lavoro di Kim e coll. sull'impiego di aloperidolo in cellule di tumore pancreatico. In questo studio viene dimostrato che l'aloferidolo aumenta l'espressione di DUSP6 in maniera concentrazione-dipendente e inibisce la proliferazione delle cellule di tumore pancreatico (MIA PaCa-2), con effetti paragonabili a quelli della 5-azacitidina. L'analisi dei livelli di metilazione eseguita con pyrosequencing ha confermato l'ipermetilazione intronica di DUSP6 nelle cellule e ha rivelato che entrambi i farmaci inducono la demetilazione delle sequenze CpG in questa regione. Da questo si può dedurre che l'aloferidolo induca la ri-espressione di DUSP6 correlata alla demetilazione intronica e inibisca la proliferazione delle cellule di tumore al pancreas [240]. Risultati simili sono riportati nel lavoro di Okudela e coll. [241] sul tumore al polmone. In questo studio si evince che l'espressione di DUSP6 diminuisce all'aumentare sia dell'attività di crescita tumorale sia del grado istologico del tumore; per cui, l'inattivazione di questo gene, un oncosoppressore, sembrerebbe promuovere la progressione del cancro al polmone.

*PLD6* (mitoPLD, 6° membro della famiglia della fosfolipasi D) codifica per una isoforma di PLD che interagisce con i mitocondri ed è coinvolto nei processi riguardanti fertilità, cancro e omeostasi neuronale. Tra le vie di segnalazione ad esso correlate ci sono quella del metabolismo e quella delle fosfolipasi. È stato dimostrato che PLD6 ha due importanti funzioni catalitiche poiché può agire come una lipasi, scindendo la cardiolipina lipidica localizzata nel mitocondrio per generare acido fosfatidico, e può funzionare come una endonucleasi scindendo lunghi RNA durante la spermatogenesi per generare PIWI-RNA (piRNA). I piRNA svolgono essenzialmente un ruolo protettivo nei confronti dell'attività degli 'elementi trasponibili' (o elementi genetici mobili), per analogia. Il silenziamento dei trasposoni mediato da questi piccoli RNA è perciò un processo critico per il mantenimento della stabilità genomica, in particolare nelle cellule germinali quando i trasposoni vengono mobilizzati come conseguenza di una demetilazione genomica diffusa. Data

la somiglianza fra questa fosfolipasi e la cardiolipina-idrolasi, è stato proposto che PLD6 possa agire proprio come una cardiolipina-idrolasi generando acido fosfatidico sulla membrana mitocondriale [242], sebbene la cardiolipina sia stata trovata quasi esclusivamente sulla membrana mitocondriale interna, mentre il PLD6 si localizza su quella esterna, interfacciandosi sul citosol. In aggiunta, è stato dimostrato che PLD6 è una nucleasi a carattere aspecifico, che aderisce indifferentemente e con un'affinità simile a substrati di RNA o DNA, producendo 5 fosfati e 3 terminali idrossilici. Questo suggerisce che PLD6 potrebbe direttamente partecipare all'elaborazione dei trascritti di piRNA primari, ed agire anche come regolatore della stabilizzazione della forma mitocondriale facilitando la fusione mitocondriale [243].

MIR548H4 (miRNA 548h-4) è un RNA non codificante. Ad oggi in letteratura non sono presenti studi in cui sia riportata l'associazione fra la metilazione di MIR548H4 e l'insorgenza/progressione tumorale. La presenza di polimorfismi sui miRNA (miRSNP) e sui loro siti target può alterare la regolazione del gene su cui agisce lo specifico miRNA; infatti, negli ultimi anni, la presenza di miRSNP è stata associata con la suscettibilità tumorale. Tuttavia, sono ancora relativamente poche le analisi sulle variazioni genetiche associate ai miRNA su scala genomica. L'unico lavoro presente in cui ci si interroga sul coinvolgimento di questo gene nella regolazione post-trascrizionale è rappresentato dallo studio di Wilkins e colleghi, in cui è stato dimostrato che esiste una variante a monte di MIR548H4 (rs7834169), che risulta associata con il rischio di sviluppare carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC) e cancro della cavità orale. Da un'analisi accurata del rischio di HNSCC, rs7834169 non sembra sovrapporsi a marcatori di enhancer o promotori noti, tuttavia è importante sottolineare che il gene MIR548H4 non è espresso nel tessuto normale [244].

Al momento gli studi sui livelli di metilazione, soprattutto riferito a geni coinvolti nei processi di farmacoresistenza nella CML, sono praticamente nulli, per questo motivo, le uniche informazioni che siamo in grado di dedurre provengono da studi funzionali dei geni coinvolti o dai meccanismi che si instaurano in altre patologie tumorali. Tuttavia è necessario tenere a mente che non tutti i geni si comportano in uguale maniera nei differenti carcinomi. Inoltre, un numero elevato di geni, la cui trascrizione risulta essere regolata dalla metilazione in campioni di BC-CML non è stata al momento indagata in soggetti affetti da CML in qualunque stadio. Concludendo, le informazioni fin qui raccolte potrebbero suggerire che le analisi sull'efficacia dell'impiego degli inibitori delle DNMT, nei pazienti che vanno incontro a progressione o che sviluppano farmacoresistenza, dovrebbero essere prese maggiormente in considerazione.

## CONCLUSIONI

La CML è una malattia delle cellule staminali ematopoietiche con un'incidenza di circa 2 casi ogni 100.000 persone, che corrispondono approssimativamente a 1.000 nuovi casi in Italia ogni anno. Ad oggi sono disponibili numerosi inibitori delle TK utilizzati per il trattamento della CML e di altre forme di leucemia. Questi inibitori, nella maggior parte dei pazienti che presentano la malattia in fase cronica, inducono facilmente completa remissione ematologica e citogenetica. Tuttavia, anche quando i pazienti rispondono, possono essere identificate cellule leucemiche persistenti (malattia residua). Le cellule leucemiche resistenti agli inibitori TK sono di natura quiescente e risiedono in nicchie protette nel midollo osseo dove, nel tempo, acquisiscono mutazioni genetiche addizionali [245]. Queste cellule possiedono molteplici caratteristiche biologiche cellulari per la resistenza innata agli inibitori, come alterazione del dominio chinasi sul recettore BCR-ABL, o sovraespressione del gene stesso, e possono provocare l'insorgenza di recidiva dopo la sospensione del trattamento. Inoltre, l'interazione tra le cellule leucemiche e la nicchia midollare potrebbe determinare la comparsa di segnali maligni nel microambiente midollare (segnali infiammatori, stimolazione della produzione di citochine e interferone) che facilitano la riprogrammazione dei progenitori, al fine di evolvere in cellule leucemiche che perdono le loro capacità di differenziazione, tipiche della crisi blastica. Questa scoperta ha sicuramente importanti ripercussioni sulla pato-biologia e la potenziale gestione clinica della CML. La fissazione delle cellule staminali nel loro stato quiescente di progenitori, mediata dagli inibitori TK, può aiutare a sviluppare approcci innovativi per la creazione di sistemi che portino all'eradicazione delle cellule staminali di CML. I modelli attuali causano quiescenza nei sottogruppi di progenitori leucemici per cui le cellule non sono interessate dal trattamento, ma subiscono - stocasticamente e con una certa frequenza - attivazione proliferativa e differenziazione, rendendo tali cellule nuovamente suscettibili ai farmaci [246].

Nonostante la CML rappresenti il modello di *target therapy* con il più alto successo fra i trattamenti oncologici, rimangono ancora aperte numerose sfide. L'identificazione a priori dei pazienti che hanno una scarsa probabilità di rispondere al trattamento è ancora agli inizi e gli strumenti predittivi per guidare la scelta dell'ottimale inibitore TK non sono ancora ampiamente disponibili, rendendo la selezione dell'opportuna terapia da intraprendere in gran parte empirica. Per questo, l'utilizzo di studi di *profiling* d'espressione nella CML rappresenta un approccio significativo per l'identificazione di pathway deregolati e quindi dei geni in essi coinvolti. Tuttavia, a causa della diversità dei layout sperimentali degli studi svolti nei pazienti e nelle cellule, si rende sempre più necessario validare i risultati ottenuti in casistiche più ampie e, possibilmente, indipendenti.

Questo permetterebbe di avere a disposizione dati riproducibili e più affidabili, identificando geni target e biomarcatori prognostici nei pazienti affetti da CML. In particolare, i pazienti che non rispondono a più di un inibitore tirosinico, hanno esiti clinici molto ridotti e non sono ancora disponibili dati per una terapia di seconda linea per pazienti trattati inizialmente con inibitori TK di 2° generazione. Un ulteriore aspetto da considerare è rappresentato dalla possibilità d'impiego di studi di *profiling* per prevenire le reazioni avverse da farmaco (ADR). Ad esempio, un approccio di questo tipo potrebbe avere ripercussioni sulla diagnosi e la prognosi delle CML. I meccanismi che sottendono il rischio di eventi atero-trombotici, riscontrati con l'utilizzo di diversi inibitori TK, richiedono di essere compresi in maniera più approfondita, in modo che la prevenzione e il trattamento possano essere gestiti in modo più accurato e sicuro. Inoltre, la stragrande maggioranza dei pazienti necessita di una terapia soppressiva a lungo termine, cui è associato un rischio cumulativo di potenziale tossicità derivante dal trattamento di patologie spesso croniche, di modesta entità, ma che influenzano significativamente la qualità della vita. Risultano quindi essenziali strategie volte a ridurre al minimo la malattia, associate con la minore tossicità possibile, che permettano di diminuire l'onere farmaco-economico di una terapia a lungo termine con gli inibitori TK.

L'avvento degli inibitori TK, quali imatinib, nilotinib e dasatinib, ha modificato enormemente la terapia della leucemia mieloide cronica, migliorandone la prognosi e riducendone la mortalità. Tuttavia, questa classe di farmaci non può rappresentare l'unica soluzione per questo tipo di tumore, sia a causa dello sviluppo di resistenze, sia perché essi non risultano efficaci nei casi di anomala espressione dei geni trasportatori dei farmaci o di alterazioni epigenetiche, come deregolazione di miRNA e/o aberrante metilazione del DNA.

Il primo obiettivo del mio progetto è stata l'identificazione dei meccanismi che provocano alterazione dei livelli di espressione dei trasportatori dei farmaci. Com'è noto, fra i principali responsabili di farmacoresistenza vi è quello per cui la cellula diventa in grado di produrre un numero eccessivo di trasportatori di efflusso posti sulla membrana. Questa abbondanza fa sì che il farmaco venga estruso in maniera eccessiva dalla cellula, non raggiunga la concentrazione intracellulare efficace, e quindi la molecola non possa svolgere la sua azione citotossica. I trasportatori ABC, grazie alla capacità di legare numerosi composti e, mediante trasporto attivo, guidarli all'esterno della cellula, sono tra i più importanti geni coinvolti nella resistenza alle terapie antitumorali. Fino ad oggi, la conoscenza sulle svariate funzioni dei trasportatori ABC risulta piuttosto limitata, soprattutto nello specifico caso della CML, e proprio per questo motivo non si conoscono a fondo i potenziali coinvolgimenti nei processi biologici di tumorigenesi e comparsa di resistenza. Questo studio, da considerarsi di tipo esplorativo, per la prima volta ha posto



l'attenzione su nuovi trasportatori potenzialmente implicati nei meccanismi di resistenza ad IM nella CML, non precedentemente descritti. Dall'analisi svolta è emerso che numerosi trasportatori ABC risultano essere sovraespressi nelle cellule trattate in cronico con una concentrazione di 3  $\mu$ M del farmaco, rispetto a quelle non trattate. In particolare, una più alta espressione di ABCG2, ABCA7, ABCA3, ABCC9, ABCB8, ABCB6, TAP1, ABCC13, ABCA6, ABCB10, TAP2, ABCC10, ABCC5, ABCC1, ABCD3, YWHAZ, ABCA2, ABCE1, HMBS, ABCF1, ABCA11, ABCA8, ABCF3 sembra essere correlata con lo sviluppo della resistenza a IM. Alcuni di questi trasportatori sono già stati identificati e riportati in studi simili a quello da noi svolto e i risultati si trovano in accordo fra loro, evidenziando una maggiore espressione in cellule che hanno perso la responsività a farmaci antineoplastici, probabilmente a causa dell'estrusione del composto dalle cellule che ne impedisce l'accumulo e lo sviluppo dell'azione citotossica. Fino ad oggi, la conoscenza sulle svariate funzioni dei trasportatori ABC risulta piuttosto limitata, e proprio per questo motivo, non si conoscono a fondo i potenziali coinvolgimenti nei processi biologici di tumorigenesi e comparsa di resistenza.

Il cancro è una malattia su base genetica, il cui fenotipo finale dipende profondamente dal contributo di modificazioni epigenetiche. È noto, infatti, che a parità di carico mutazionale del DNA, lo stesso tumore può assumere aspetti diversi con caratteristiche che vanno dalla malattia cronica, poco pericolosa, al tumore più aggressivo e fulminante che in poche settimane conduce al decesso. In questo contesto si inserisce l'epigenetica, i cui processi più rappresentativi si classificano principalmente in tre categorie: modificazioni istoniche, RNA non codificanti e metilazione di DNA.

Dopo aver escluso il contributo di mutazioni secondarie sul gene BCR-ABL, lo studio si è quindi concentrato sull'analisi di eventuali meccanismi epigenetici implicati nella comparsa di resistenza a IM. Per questo, il secondo obiettivo focalizzato sul contributo dell'RNA alla farmacoresistenza è stato quello di valutare il profilo di espressione dei miRNA. Negli ultimi decenni, la ricerca si è focalizzata sull'identificazione di piccole molecole di RNA non codificante, chiamate miRNA, come potenziali responsabili di aspetti fondamentali della cancerogenesi. I miRNA sono oligonucleotidi di circa 18-24 nucleotidi, filogeneticamente ben conservati, che esercitano un ruolo cruciale nella regolazione di importanti processi fisiologici, quali sviluppo, proliferazione, differenziamento, apoptosi e risposta a numerosi segnali extracellulari e di stress. I miRNA, legandosi principalmente, anche se non esclusivamente, alla 3'UTR dell'mRNA target, sono responsabili della fine regolazione dell'espressione di centinaia di geni bersaglio a livello post-trascrizionale, causando il blocco della traduzione o degradando l'mRNA. Le analisi del genoma hanno evidenziato un'espressione alterata dei miRNA in patologie maligne ed un potenziale

doppio ruolo nella formazione dei tumori: i miRNA possono modulare sia geni di pathway oncogenici, sia oncosoppressori, e viceversa. Inoltre, è stato dimostrato che comparando i tessuti tumorali con i tessuti sani dello stesso tipo, nei tumori è presente una differente espressione dei miRNA. È ormai accertato la localizzazione dei miRNA nei tessuti tumorali nei quali si osserva un'espressione deregolata di questi miRNA rispetto a pazienti sani e ciò comporta una variazione nella modulazione dei loro geni target i quali, per lo più, sono coinvolti in diversi pathway di segnalazione fondamentali per le cellule. Dallo studio svolto durante il periodo di tesi è emerso che 6 miRNA sono deregolati nelle cellule trattate con concentrazioni maggiori. In particolare, miR-193b-3p, miR-486-5p e miR-365a-3p, sono risultati significativamente sottoespressi, mentre miR-512-3p, miR-517a-3p, miR-372-3p sono risultati iperespressi nelle cellule resistenti alle concentrazioni maggiori. Questi miRNA concorrono alla modulazione del pathway di ErbB, implicato in numerosi processi fisio-patologici quali proliferazione, sopravvivenza, angiogenesi, adesione, migrazione/invasione, differenziamento e ciclo cellulare, e che è stato associato con l'insorgenza e la progressione di numerose patologie tumorali come cancro al pancreas, all'endometrio, al polmone non a piccole cellule, e al glioma.

La resistenza farmacologica, però, implica non solo profonde alterazioni a livello dell'RNA. Infatti, un numero sempre più vasto di lavori ascrive un ruolo fondamentale anche alle modificazioni che hanno luogo a livello del DNA e, in questo contesto, la metilazione rappresenta il meccanismo epigenetico più importante. L'aberrante metilazione del DNA è il principale fenomeno epigenetico osservabile nel cancro, con conseguente inattivazione di geni oncosoppressori. Dei 7.775 geni in cui si osserva un aumento del numero di siti metilati nel DNA delle regioni del promotore, circa la metà sono geni 'sensibili' alla metilazione, vale a dire che subiscono metilazione in tutte le regioni del promotore e risultano, di conseguenza, silenziati; fra questi, si trovano soprattutto geni oncosoppressori. L'altra metà è invece costituita da geni 'resistenti' alla metilazione, per cui il processo altera l'area circostante le regioni del promotore, ma lo stato di non-metilato viene protetto nelle vicinanze del sito di inizio della trascrizione. Questi geni mantengono perciò l'espressione genica; tra questi ci sono, per esempio, i geni coinvolti nella riparazione del DNA [247]. Nei campioni da noi analizzati, numerosi geni sono risultati ipermetilati nelle cellule trattate con alte concentrazioni di farmaco. Fra questi, degni di nota sono *PTPRF*, *TP73*, *DUSP6* e *PLD6*, la cui metilazione è associata ad un cambiamento nella fisiologia cellulare che la porta ad assumere un fenotipo tumorale più aggressivo e resistente, ovvero con lo sviluppo di resistenza anche ai dosaggi maggiori utilizzati. È stato inoltre dimostrato che la metilazione del DNA interviene anche nel silenziamento di alcuni miRNA, favorendo effetti sostanziali sulla modulazione dell'espressione genica. Un esempio di questo meccanismo è stato

riportato da Gu e colleghi in modelli cellulari di tumore al polmone resistenti al cisplatino. In presenza di resistenza, infatti, si ha una metilazione che provoca un silenziamento del miR-493 e, di conseguenza, un aumento dell'espressione del suo target, TCRP1 [248]. Quando si ripristina forzatamente la normale espressione del miRNA, diminuisce l'espressione di TCRP1 e le cellule diventano nuovamente sensibili al trattamento. Diventa quindi di fondamentale interesse l'analisi nel suo complesso, poiché i meccanismi epigenetici operano in singolo, ma soprattutto interferiscono fra loro alterando ulteriormente il make-up epigenetico dei pazienti.

In conclusione, lo scopo ultimo di questo studio è quello di identificare nuovi possibili target farmacologici, genetici ed epigenetici, sia derivanti da specifici pathway, sia in grado di interagire fra loro, al fine di sviluppare una terapia di precisione, basata sulle differenze genetiche ed epigenetiche inter-individuali che caratterizzano pazienti diversi. La ricerca di nuovi approcci terapeutici risulta di notevole rilevanza a causa della sempre più frequente insorgenza di resistenza nei confronti dei farmaci in commercio, e risulta fondamentale l'analisi dei pathway epigenetici nei pazienti affetti da leucemia. Trattandosi di farmacologia di base, l'impiego di approcci *in vitro*, in particolare in un modello cellulare di CML in crisi blastica, che costituisce lo stadio finale e più aggressivo della patologia, rappresenta un punto di partenza efficace e funzionale per uno studio preliminare di tipo esplorativo. Infatti, questo tipo di ricerca potrebbe essere un utile mezzo per predire l'efficacia di uno specifico trattamento o la possibile resistenza ad esso, e soprattutto un buon principio per lo sviluppo di farmaci mirati, caratterizzati da una minor insorgenza di reazioni avverse e maggior successo terapeutico.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1 Humanitas research Hospital- *Enciclopedia di anatomia umana*.
- 2 Tura S: Corso di malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici. Ed. Esculapio 2015.
- 3 Sadava D, Heller G, Orians G, Purves W, Hillis D, Pignocchino M: *Biologia Blu*. Ed. Zanichelli 2017.
- 4 Michael L, M WJ, Sindhu C: Hematopoietic and Lymphoid Tissues; in Pres A (ed): *Comparative Anatomy and Histology*, 2012, pp 309–338.
- 5 AIL: <https://www.ail.it>
- 6 AIRC: <http://www.airc.it>
- 7 Barbara I, Raffaella A, Simona C, Biagio DA, Ciro DP, Santa E, Alessandra G, Giada MC, Filomena M, Concetta Q, Roberta V, Fabrizio P: Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia (CML); in *clinica B* (ed), 2015, 39.
- 8 Stevenson M, Pandor A, Hamilton J, Stevens J, Rowntree C, Martyn-St James M, Rawdin A, Wong R: Ponatinib for Treating Acute Lymphoblastic Leukaemia: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal. *Pharmacoeconomics* 2018.
- 9 Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Bellam N, Blum W, Boyer MW, Carraway HE, Coccia PF, Coutre SE, Cultrera J, Damon LE, DeAngelo DJ, Douer D, Frangoul H, Frankfurt O, Goorha S, Millenson MM, O'Brien S, Petersdorf SH, Rao AV, Terezakis S, Uy G, Wetzler M, Zelenetz AD, Naganuma M, Gregory KM, Network NCC: Acute lymphoblastic leukemia. *J Natl Compr Canc Netw* 2012;10:858-914.
- 10 Pallera A, Altman JK, Berman E, Abboud CN, Bhatnagar B, Curtin P, DeAngelo DJ, Gotlib J, Hagelstrom RT, Hobbs G, Jagasia M, Kantarjian HM, Kropf P, Metheny L, Moore JO, Ontiveros E, Purev E, Quiery A, Reddy VV, Rose MG, Shah NP, Smith BD, Snyder DS, Sweet KL, Tibes R, Yang DT, Gregory K, Sundar H, Deininger M, Radich JP: NCCN Guidelines Insights: Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14:1505-1512.
- 11 Radich JP: Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001;15:21-36.
- 12 Fielding AK: Current treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:231-237.
- 13 Hamblin TJ: Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:455-468.

- 14 Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E: Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011;105:1684-1692.
- 15 Mansouri L, Wierzbinska JA, Plass C, Rosenquist R: Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biological impact. *Semin Cancer Biol* 2018.
- 16 Baliakas P, Mattsson M, Stamatopoulos K, Rosenquist R: Prognostic indices in chronic lymphocytic leukaemia: where do we stand how do we proceed? *J Intern Med* 2016;279:347-357.
- 17 Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R: Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma* 2013;54:2351-2364.
- 18 Goethe E, Carter BZ, Rao G, Pemmaraju N: Glioblastoma and acute myeloid leukemia: malignancies with striking similarities. *J Neurooncol* 2018;136:223-231.
- 19 Pemmaraju N, Kantarjian H, Ravandi F, Nogueras-Gonzalez GM, Huang X, O'Brien S, Wierda W, Garcia-Manero G, Thomas D, Pierce S, Verstovsek S, Borthakur G, Cortes J: Patient Characteristics and Outcomes in Adolescents and Young Adults (AYA) With Acute Myeloid Leukemia (AML). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2016;16:213-222.e212.
- 20 Grove CS, Vassiliou GS: Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis Model Mech* 2014;7:941-951.
- 21 Ostgård LS, Kjeldsen E, Holm MS, Brown PeN, Pedersen BB, Bendix K, Johansen P, Kristensen JS, Nørgaard JM: Reasons for treating secondary AML as de novo AML. *Eur J Haematol* 2010;85:217-226.
- 22 Craddock C, Tauro S, Moss P, Grimwade D: Biology and management of relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005;129:18-34.
- 23 Schlenk RF, Döhner H: Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:324-330.
- 24 Jabbour E, Kantarjian H: Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol* 2018;93:442-459.
- 25 Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM: Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer* 2008;112:2112-2118.
- 26 Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J: Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 2008;111:1774-1780.
- 27 Harrison CJ, Feroni L: Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2002;6:91-113; discussion 200-112.

- 28 Quintás-Cardama A, Cortes JE: Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006;81:973-988.
- 29 Mendizabal AM, Garcia-Gonzalez P, Levine PH: Regional variations in age at diagnosis and overall survival among patients with chronic myeloid leukemia from low and middle income countries. *Cancer Epidemiol* 2013;37:247-254.
- 30 Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE: Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clin Proc* 2015;90:1440-1454.
- 31 Melo JV, Barnes DJ: Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:441-453.
- 32 Ilaria RL: Pathobiology of lymphoid and myeloid blast crisis and management issues. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:188-194.
- 33 Bhamidipati PK, Kantarjian H, Cortes J, Cornelison AM, Jabbour E: Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 2013;4:103-117.
- 34 Chereda B, Melo JV: Natural course and biology of CML. *Ann Hematol* 2015;94 Suppl 2:S107-121.
- 35 Score J, Calasanz MJ, Ottman O, Pane F, Yeh RF, Sobrinho-Simões MA, Kreil S, Ward D, Hidalgo-Curtis C, Melo JV, Wiemels J, Nadel B, Cross NC, Grand FH: Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. *Leukemia* 2010;24:1742-1750.
- 36 Thielen N, Richter J, Baldauf M, Barbany G, Fioretos T, Giles F, Gjertsen BT, Hochhaus A, Schuurhuis GJ, Sopper S, Stenke L, Thunberg S, Wolf D, Ossenkoppele G, Porkka K, Janssen J, Mustjoki S: Leukemic Stem Cell Quantification in Newly Diagnosed Patients With Chronic Myeloid Leukemia Predicts Response to Nilotinib Therapy. *Clin Cancer Res* 2016.
- 37 Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, Fabarius A, Proetel U, Schnittger S, Haferlach C, Krause SW, Schubert J, Einsele H, Hänel M, Dengler J, Falge C, Kanz L, Neubauer A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Baerlocher GM, Pffirmann M, Hasford J, Hofmann WK, Hochhaus A, Müller MC, Group SatGCS: Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica* 2014;99:1441-1447.
- 38 Lucas CM, Harris RJ, Giannoudis A, Davies A, Knight K, Watmough SJ, Wang L, Clark RE: Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. *Haematologica* 2009;94:1362-1367.

- 39 Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES: The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011;117:5019-5032.
- 40 von Bubnoff N, Duyster J: Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107:114-121.
- 41 Melo JV, Deininger MW: Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:545-568, vii-viii.
- 42 Deininger MW, Goldman JM, Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-3356.
- 43 O'Hare T, Deininger MW, Eide CA, Clackson T, Druker BJ: Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clin Cancer Res* 2011;17:212-221.
- 44 Hennighausen L, Robinson GW: Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev* 2008;22:711-721.
- 45 Warsch W, Walz C, Sexl V: JAK of all trades: JAK2-STAT5 as novel therapeutic targets in BCR-ABL1+ chronic myeloid leukemia. *Blood* 2013;122:2167-2175.
- 46 Hantschel O, Warsch W, Eckelhart E, Kaupe I, Grebien F, Wagner KU, Superti-Furga G, Sexl V: BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nat Chem Biol* 2012;8:285-293.
- 47 Schafranek L, Nievergall E, Powell JA, Hiwase DK, Leclercq T, Hughes TP, White DL: Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2015;29:76-85.
- 48 Samanta AK, Chakraborty SN, Wang Y, Kantarjian H, Sun X, Hood J, Perrotti D, Arlinghaus RB: Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET-PP2A-SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Oncogene* 2009;28:1669-1681.
- 49 Zhao JJ, Cheng H, Jia S, Wang L, Gjoerup OV, Mikami A, Roberts TM: The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:16296-16300.
- 50 Kuroda J, Kimura S, Strasser A, Andreeff M, O'Reilly LA, Ashihara E, Kamitsuji Y, Yokota A, Kawata E, Takeuchi M, Tanaka R, Tabe Y, Taniwaki M, Maekawa T: Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second-generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia. *Cell Death Differ* 2007;14:1667-1677.

- 51 Bussolari R, Candini O, Colomer D, Corradini F, Guerzoni C, Mariani SA, Cattelani S, Silvestri C, Pecorari L, Iacobucci I, Soverini S, Fasano T, Martinelli G, Cervantes F, Calabretta B: Coding sequence and intron-exon junctions of the c-myb gene are intact in the chronic phase and blast crisis stages of chronic myeloid leukemia patients. *Leuk Res* 2007;31:163-167.
- 52 Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A, Skorski T: Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. *Oncogene* 2002;21:5868-5876.
- 53 Mayerhofer M, Valent P, Sperr WR, Griffin JD, Sillaber C: BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. *Blood* 2002;100:3767-3775.
- 54 Salomoni P, Calabretta B: Targeted therapies and autophagy: new insights from chronic myeloid leukemia. *Autophagy* 2009;5:1050-1051.
- 55 Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo P, Ruvolo V, Evangelisti C, Martelli AM, McCubrey JA: Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia* 2011;25:1080-1094.
- 56 Kim LC, Song L, Haura EB: Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:587-595.
- 57 Wilson MB, Schreiner SJ, Choi HJ, Kamens J, Smithgall TE: Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. *Oncogene* 2002;21:8075-8088.
- 58 Guo G, Kang Q, Zhu X, Chen Q, Wang X, Chen Y, Ouyang J, Zhang L, Tan H, Chen R, Huang S, Chen JL: A long noncoding RNA critically regulates Bcr-Abl-mediated cellular transformation by acting as a competitive endogenous RNA. *Oncogene* 2015;34:1768-1779.
- 59 Matte-Martone C, Liu J, Zhou M, Chikina M, Green DR, Harty JT, Shlomchik WD: Differential requirements for myeloid leukemia IFN- $\gamma$  conditioning determine graft-versus-leukemia resistance and sensitivity. *J Clin Invest* 2017;127:2765-2776.
- 60 Nath A, Wang J, Stephanie Huang R: Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Targeted Therapeutics in Chronic Myeloid Leukemia. *Mol Diagn Ther* 2017.
- 61 Kujawski LA, Talpaz M: The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:459-471.
- 62 Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M,



Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E, Group ISCS: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;346:645-652.

63 Treiber DK, Shah NP: Ins and outs of kinase DFG motifs. *Chem Biol* 2013;20:745-746.

64 Eiring AM, Deininger MW: Individualizing kinase-targeted cancer therapy: the paradigm of chronic myeloid leukemia. *Genome Biol* 2014;15:461.

65 Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA, Investigators I: Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355:2408-2417.

66 Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Müller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rousselot P, Saglio G, Saúbele S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R: European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013;122:872-884.

67 Ksienski D: Imatinib mesylate: past successes and future challenges in the treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Med Insights Oncol* 2011;5:365-379.

68 O'Brien SG, Meinhardt P, Bond E, Beck J, Peng B, Dutreix C, Mehring G, Milosavljev S, Huber C, Capdeville R, Fischer T: Effects of imatinib mesylate (STI571, Glivec) on the pharmacokinetics of simvastatin, a cytochrome p450 3A4 substrate, in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 2003;89:1855-1859.

69 Cohen MH, Johnson JR, Justice R, Pazdur R: Approval summary: imatinib mesylate for one or three years in the adjuvant treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Oncologist* 2012;17:992-997.

70 Ferraresi V, Catricalà C, Ciccarese M, Ferrari A, Zeuli M, Cognetti F: Severe skin reaction in a patient with gastrointestinal stromal tumor treated with imatinib mesylate. *Anticancer Res* 2006;26:4771-4774.

71 Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL: Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293:876-880.

- 72 Baccarani M, Rosti G, Castagnetti F, Haznedaroglu I, Porkka K, Abruzzese E, Alimena G, Ehrencrona H, Hjorth-Hansen H, Kairisto V, Levato L, Martinelli G, Nagler A, Lanng Nielsen J, Ozbek U, Palandri F, Palmieri F, Pane F, Rege-Cambrin G, Russo D, Specchia G, Testoni N, Weiss-Bjerrum O, Saglio G, Simonsson B: Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood* 2009;113:4497-4504.
- 73 Kantarjian HM, Cortes J, La Rosée P, Hochhaus A: Optimizing therapy for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer* 2010;116:1419-1430.
- 74 Breccia M, Alimena G: Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2010;34:129-134.
- 75 O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ: In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* 2005;65:4500-4505.
- 76 Cortes JE, Jones D, O'Brien S, Jabbour E, Konopleva M, Ferrajoli A, Kadia T, Borthakur G, Stigliano D, Shan J, Kantarjian H: Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. *J Clin Oncol* 2010;28:392-397.
- 77 Rosti G, Palandri F, Castagnetti F, Breccia M, Levato L, Gugliotta G, Capucci A, Cedrone M, Fava C, Intermesoli T, Cambrin GR, Stagno F, Tiribelli M, Amabile M, Luatti S, Poerio A, Soverini S, Testoni N, Martinelli G, Alimena G, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Party GCW: Nilotinib for the frontline treatment of Ph(+) chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;114:4933-4938.
- 78 Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM, Investigators E: Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;362:2251-2259.
- 79 Rosti G, Castagnetti F, Gugliotta G, Baccarani M: Tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukaemia: which, when, for whom? *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:141-154.
- 80 Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, Kish K, Lee FY, Borzilleri R, Lombardo LJ, Xie D, Zhang Y, Klei HE: The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res* 2006;66:5790-5797.
- 81 Jabbour E, Kantarjian HM, Saglio G, Steegmann JL, Shah NP, Boqué C, Chuah C, Pavlovsky C, Mayer J, Cortes J, Baccarani M, Kim DW, Bradley-Garelik MB, Mohamed H,

Wildgust M, Hochhaus A: Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 2014;123:494-500.

82 Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, Shah NP, Chuah C, Casanova L, Bradley-Garelik B, Manos G, Hochhaus A: Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol* 2016;34:2333-2340.

83 Jain P, Kantarjian H, Alattar ML, Jabbour E, Sasaki K, Nogueras Gonzalez G, Dellasala S, Pierce S, Verstovsek S, Wierda W, Borthakur G, Ravandi F, O'Brien S, Cortes J: Long-term molecular and cytogenetic response and survival outcomes with imatinib 400 mg, imatinib 800 mg, dasatinib, and nilotinib in patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia: retrospective analysis of patient data from five clinical trials. *Lancet Haematol* 2015;2:e118-128.

84 Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, Casado LF, García-Gutiérrez V, Hochhaus A, Kim DW, Kim TD, Khoury HJ, Le Coutre P, Mayer J, Milojkovic D, Porkka K, Rea D, Rosti G, Saussele S, Hehlmann R, Clark RE: European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2016;30:1648-1671.

85 Jabbour E, Branford S, Saglio G, Jones D, Cortes JE, Kantarjian HM: Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2011;117:1800-1811.

86 Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, Talpaz M: BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 2003;101:690-698.

87 Hochhaus A: Chronic myelogenous leukemia (CML): resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Ann Oncol* 2006;17 Suppl 10:x274-279.

88 Patel AB, O'Hare T, Deininger MW: Mechanisms of Resistance to ABL Kinase Inhibition in Chronic Myeloid Leukemia and the Development of Next Generation ABL Kinase Inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017;31:589-612.

89 Zhou T, Commodore L, Huang WS, Wang Y, Thomas M, Keats J, Xu Q, Rivera VM, Shakespeare WC, Clackson T, Dalgarno DC, Zhu X: Structural mechanism of the Pan-BCR-ABL inhibitor ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chem Biol Drug Des* 2011;77:1-11.

90 Vajpai N, Strauss A, Fendrich G, Cowan-Jacob SW, Manley PW, Grzesiek S, Jahnke W: Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR

substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J Biol Chem* 2008;283:18292-18302.

91 Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK, Zarrinkar PP: Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 2011;29:1046-1051.

92 O'Hare T, Eide CA, Deininger MW: Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;110:2242-2249.

93 Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T: Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003;102:276-283.

94 Willis SG, Lange T, Demehri S, Otto S, Crossman L, Niederwieser D, Stoffregen EP, McWeeney S, Kovacs I, Park B, Druker BJ, Deininger MW: High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* 2005;106:2128-2137.

95 Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, Iacobucci I, Amabile M, Abruzzese E, Orlandi E, Radaelli F, Ciccone F, Tiribelli M, di Lorenzo R, Caracciolo C, Izzo B, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Martinelli G, Leukemia GWPoCM: Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12:7374-7379.

96 Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E, Schultheis B, Yong AS, Wong A, Pattacini L, Goldman JM, Melo JV: Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 2005;65:8912-8919.

97 Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, Nicolini FE, Apperley JF, Khoury HJ, Talpaz M, DiPersio J, DeAngelo DJ, Abruzzese E, Rea D, Baccarani M, Müller MC, Gambacorti-Passerini C, Wong S, Lustgarten S, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Guilhot F, Deininger MW, Hochhaus A, Hughes T, Goldman JM, Shah NP, Kantarjian H, Investigators P: A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2013;369:1783-1796.

98 Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Druker BJ, Talpaz M, Sawyers CL, Rosamilia M, Ford J, Lloyd P, Capdeville R: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol* 2004;22:935-942.

- 99 Mlejnek P, Dolezel P, Faber E, Kosztyu P: Interactions of N-desmethyl imatinib, an active metabolite of imatinib, with P-glycoprotein in human leukemia cells. *Ann Hematol* 2011;90:837-842.
- 100 Filppula AM, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT: Autoinhibition of CYP3A4 leads to important role of CYP2C8 in imatinib metabolism: variability in CYP2C8 activity may alter plasma concentrations and response. *Drug Metab Dispos* 2013;41:50-59.
- 101 Adeagbo BA, Bolaji OO, Olugbade TA, Durosinmi MA, Bolarinwa RA, Masimirembwa C: Influence of CYP3A5\*3 and ABCB1 C3435T on clinical outcomes and trough plasma concentrations of imatinib in Nigerians with chronic myeloid leukaemia. *J Clin Pharm Ther* 2016;41:546-551.
- 102 Deremer DL, Ustun C, Natarajan K: Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Ther* 2008;30:1956-1975.
- 103 Shibata T, Minami Y, Mitsuma A, Morita S, Inada-Inoue M, Oguri T, Shimokata T, Sugishita M, Naoe T, Ando Y: Association between severe toxicity of nilotinib and UGT1A1 polymorphisms in Japanese patients with chronic myelogenous leukemia. *Int J Clin Oncol* 2014;19:391-396.
- 104 Zheng Q, Wu H, Yu Q, Kim DH, Lipton JH, Angelini S, Soverini S, Vivona D, Takahashi N, Cao J: ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2015;15:127-134.
- 105 Eadie LN, Dang P, Saunders VA, Yeung DT, Osborn MP, Grigg AP, Hughes TP, White DL: The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment. *Leukemia* 2017;31:75-82.
- 106 da Cunha Vasconcelos F, Mauricio Scheiner MA, Moellman-Coelho A, Mencalha AL, Renault IZ, Rumjanek VM, Maia RC: Low ABCB1 and high OCT1 levels play a favorable role in the molecular response to imatinib in CML patients in the community clinical practice. *Leuk Res* 2016;51:3-10.
- 107 James A, Blumenstein L, Glaenzel U, Jin Y, Demailly A, Jakab A, Hansen R, Hazell K, Mehta A, Trandafir L, Swart P: Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [(14)C]BYL719 (alpelisib) in healthy male volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;76:751-760.
- 108 Juric D, Baselga J: Tumor genetic testing for patient selection in phase I clinical trials: the case of PI3K inhibitors. *J Clin Oncol* 2012;30:765-766.
- 109 Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ: Structure of ABC transporters. *Essays Biochem* 2011;50:43-61.

- 110 Dassa E, Bouige P: The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* 2001;152:211-229.
- 111 Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B: The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv* 2004;1:27-42.
- 112 Gurney H, Wong M, Balleine RL, Rivory LP, McLachlan AJ, Hoskins JM, Wilcken N, Clarke CL, Mann GJ, Collins M, Delforce SE, Lynch K, Schran H: Imatinib disposition and ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) genotype. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:33-40.
- 113 Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, Molimard M, Krajcinovic M, Mahon FX: Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008;112:2024-2027.
- 114 Deenik W, van der Holt B, Janssen JJ, Chu IW, Valk PJ, Ossenkoppele GJ, van der Heiden IP, Sonneveld P, van Schaik RH, Cornelissen JJ: Polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1) predict for molecular resistance in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia receiving high-dose imatinib. *Blood* 2010;116:6144-6145; author reply 6145-6146.
- 115 Hegedus C, Ozvegy-Laczka C, Apáti A, Magócsi M, Németh K, Orfi L, Kéri G, Katona M, Takáts Z, Váradi A, Szakács G, Sarkadi B: Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br J Pharmacol* 2009;158:1153-1164.
- 116 de Lima LT, Vivona D, Bueno CT, Hirata RD, Hirata MH, Luchessi AD, de Castro FA, de Lourdes F Chauffaille M, Zanichelli MA, Chiattoni CS, Hungria VT, Guerra-Shinohara EM: Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol* 2014;31:851.
- 117 Au A, Aziz Baba A, Goh AS, Wahid Fadilah SA, Teh A, Rosline H, Ankathil R: Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Pharmacother* 2014;68:343-349.
- 118 Watkins DB, Hughes TP, White DL: OCT1 and imatinib transport in CML: is it clinically relevant? *Leukemia* 2015;29:1960-1969.
- 119 White DL, Dang P, Engler J, Frede A, Zrim S, Osborn M, Saunders VA, Manley PW, Hughes TP: Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol* 2010;28:2761-2767.

- 120 Hu S, Franke RM, Filipski KK, Hu C, Orwick SJ, de Bruijn EA, Burger H, Baker SD, Sparreboom A: Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res* 2008;14:3141-3148.
- 121 Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL: Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 2002;99:319-325.
- 122 Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ: Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest* 2011;121:396-409.
- 123 Jørgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, Mountford JC, Holyoake TL: Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* 2007;109:4016-4019.
- 124 Belloc F, Airiau K, Jeanneteau M, Garcia M, Guérin E, Lippert E, Moreau-Gaudry F, Mahon FX: The stem cell factor-c-KIT pathway must be inhibited to enable apoptosis induced by BCR-ABL inhibitors in chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 2009;23:679-685.
- 125 Zhao F, Mancuso A, Bui TV, Tong X, Gruber JJ, Swider CR, Sanchez PV, Lum JJ, Sayed N, Melo JV, Perl AE, Carroll M, Tuttle SW, Thompson CB: Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1alpha-induced metabolic reprogramming. *Oncogene* 2010;29:2962-2972.
- 126 Jilani I, Kantarjian H, Gorre M, Cortes J, Ottmann O, Bhalla K, Giles FJ, Albitar M: Phosphorylation levels of BCR-ABL, CrkL, AKT and STAT5 in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells implicate alternative pathway usage as a survival strategy. *Leuk Res* 2008;32:643-649.
- 127 Quentmeier H, Eberth S, Romani J, Zaborski M, Drexler HG: BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance. *J Hematol Oncol* 2011;4:6.
- 128 Okabe S, Tauchi T, Katagiri S, Tanaka Y, Ohyashiki K: Combination of the ABL kinase inhibitor imatinib with the Janus kinase 2 inhibitor TG101348 for targeting residual BCR-ABL-positive cells. *J Hematol Oncol* 2014;7:37.
- 129 Westbrook K, Stearns V: Pharmacogenomics of breast cancer therapy: an update. *Pharmacol Ther* 2013;139:1-11.
- 130 Panczyk M: Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World J Gastroenterol* 2014;20:9775-9827.
- 131 Huang RS, Dolan ME: Approaches to the discovery of pharmacogenomic markers in oncology: 2000-2010-2020. *Pharmacogenomics* 2010;11:471-474.

- 132 Huang RS, Ratain MJ: Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin* 2009;59:42-55.
- 133 Relling MV, Ramsey LB: Pharmacogenomics of acute lymphoid leukemia: new insights into treatment toxicity and efficacy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:126-130.
- 134 Kager L: Genomic strategies to improve outcome and individualize therapy in cancer: the paradigm of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J BUON* 2009;14 Suppl 1:S181-186.
- 135 Lee SHR, Yang JJ: Pharmacogenomics in acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2017;30:229-236.
- 136 McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN: Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 2008;9:356-369.
- 137 Roden DM, Altman RB, Benowitz NL, Flockhart DA, Giacomini KM, Johnson JA, Krauss RM, McLeod HL, Ratain MJ, Relling MV, Ring HZ, Shuldiner AR, Weinshilboum RM, Weiss ST, Network PR: Pharmacogenomics: challenges and opportunities. *Ann Intern Med* 2006;145:749-757.
- 138 Hertz DL, McLeod HL: Use of pharmacogenetics for predicting cancer prognosis and treatment exposure, response and toxicity. *J Hum Genet* 2013;58:346-352.
- 139 Lesko LJ, Schmidt S: Clinical implementation of genetic testing in medicine: a US regulatory science perspective. *Br J Clin Pharmacol* 2014;77:606-611.
- 140 Lopomo A, Coppedè F: Pharmacoepigenetics and pharmacoepigenomics of gastrointestinal cancers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017:1-14.
- 141 Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F: Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:792362.
- 142 Sandoval J, Esteller M: Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:50-55.
- 143 Relton CL, Davey Smith G: Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Med* 2010;7:e1000356.
- 144 Smits KM, Cleven AH, Weijenberg MP, Hughes LA, Herman JG, de Bruïne AP, van Engeland M: Pharmacoepigenomics in colorectal cancer: a step forward in predicting prognosis and treatment response. *Pharmacogenomics* 2008;9:1903-1916.
- 145 Abdelfatah E, Kerner Z, Nanda N, Ahuja N: Epigenetic therapy in gastrointestinal cancer: the right combination. *Therap Adv Gastroenterol* 2016;9:560-579.



- 146 Yao DM, Zhou JD, Zhang YY, Yang L, Wen XM, Yang J, Guo H, Chen Q, Lin J, Qian J: GPX3 promoter is methylated in chronic myeloid leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:6450-6457.
- 147 Miousse IR, Koturbash I: The Fine LINE: Methylation Drawing the Cancer Landscape. *Biomed Res Int* 2015;2015:131547.
- 148 Barrow TM, Michels KB: Epigenetic epidemiology of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;455:70-83.
- 149 Jones PA: Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012;13:484-492.
- 150 Ghanim V, Herrmann H, Heller G, Peter B, Hadzijusufovic E, Blatt K, Schuch K, Cerny-Reiterer S, Mirkina I, Karlic H, Pickl WF, Zöchbauer-Müller S, Valent P: 5-azacytidine and decitabine exert proapoptotic effects on neoplastic mast cells: role of FAS-demethylation and FAS re-expression, and synergism with FAS-ligand. *Blood* 2012;119:4242-4252.
- 151 Esteller M: Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-1159.
- 152 Navada SC, Steinmann J, Lübbert M, Silverman LR: Clinical development of demethylating agents in hematology. *J Clin Invest* 2014;124:40-46.
- 153 Heller G, Topakian T, Altenberger C, Cerny-Reiterer S, Herndlhofer S, Ziegler B, Datlinger P, Byrgazov K, Bock C, Mannhalter C, Hörmann G, Sperr WR, Lion T, Zielinski CC, Valent P, Zöchbauer-Müller S: Next-generation sequencing identifies major DNA methylation changes during progression of Ph<sup>+</sup> chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30:1861-1868.
- 154 Bannister AJ, Kouzarides T: Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011;21:381-395.
- 155 Berger SL: The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007;447:407-412.
- 156 Coppedè F: The role of epigenetics in colorectal cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;8:935-948.
- 157 He Y, Lin J, Kong D, Huang M, Xu C, Kim TK, Etheridge A, Luo Y, Ding Y, Wang K: Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers. *Clin Chem* 2015;61:1138-1155.
- 158 Huarte M: The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med* 2015;21:1253-1261.
- 159 Xie T, Huang M, Wang Y, Wang L, Chen C, Chu X: MicroRNAs as Regulators, Biomarkers and Therapeutic Targets in the Drug Resistance of Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2016;40:62-76.
- 160 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-854.

- 161 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2999-3004.
- 162 Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
- 163 Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T: Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008;132:875-886.
- 164 Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002;21:4663-4670.
- 165 Borchert GM, Lanier W, Davidson BL: RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1097-1101.
- 166 Murchison EP, Hannon GJ: miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:223-229.
- 167 Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199-208.
- 168 Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA: Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Res* 2005;15:336-360.
- 169 Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH: MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 2008;30:460-471.
- 170 Wu L, Fan J, Belasco JG: MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4034-4039.
- 171 Palmero EI, de Campos SG, Campos M, de Souza NC, Guerreiro ID, Carvalho AL, Marques MM: Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet Mol Biol* 2011;34:363-370.
- 172 Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-269.
- 173 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005;120:635-647.
- 174 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838.

- 175 Strillacci A, Valerii MC, Sansone P, Caggiano C, Sgromo A, Vittori L, Fiorentino M, Poggioli G, Rizzello F, Campieri M, Spisni E: Loss of miR-101 expression promotes Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway activation and malignancy in colon cancer cells. *J Pathol* 2013;229:379-389.
- 176 Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA: MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:467-477.
- 177 Iorio MV, Croce CM: MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009;27:5848-5856.
- 178 Robertson NM, Yigit MV: The role of microRNA in resistance to breast cancer therapy. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014;5:823-833.
- 179 Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, Croce CM: MicroRNA expression profiling in acute myeloid and chronic lymphocytic leukaemias. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22:239-248.
- 180 Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanasi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5166-5171.
- 181 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13944-13949.
- 182 Zhao H, Wang D, Du W, Gu D, Yang R: MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;74:149-155.
- 183 Venturini L, Battmer K, Castoldi M, Schultheis B, Hochhaus A, Muckenthaler MU, Ganser A, Eder M, Scherr M: Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* 2007;109:4399-4405.
- 184 Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, Croce CM, Fernández-Piqueras J, Malumbres M: Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008;13:496-506.
- 185 Faber J, Gregory RI, Armstrong SA: Linking miRNA regulation to BCR-ABL expression: the next dimension. *Cancer Cell* 2008;13:467-469.
- 186 Bader AG, Brown D, Winkler M: The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010;70:7027-7030.

- 187 Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Homer R, Brown D, Bader AG, Weidhaas JB, Slack FJ: Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 2010;29:1580-1587.
- 188 Chen Y, Zhu X, Zhang X, Liu B, Huang L: Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol Ther* 2010;18:1650-1656.
- 189 Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Gitt A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M: Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:1424-1429.
- 190 Simonson B, Das S: MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet? *Mini Rev Med Chem* 2015;15:467-474.
- 191 Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA: MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 2007;4:721-726.
- 192 Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ: Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* 2011;19:1116-1122.
- 193 Lennox KA, Behlke MA: A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency. *Pharm Res* 2010;27:1788-1799.
- 194 Shan G, Li Y, Zhang J, Li W, Szulwach KE, Duan R, Faghihi MA, Khalil AM, Lu L, Paroo Z, Chan AW, Shi Z, Liu Q, Wahlestedt C, He C, Jin P: A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotechnol* 2008;26:933-940.
- 195 Gumireddy K, Young DD, Xiong X, Hogenesch JB, Huang Q, Deiters A: Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008;47:7482-7484.
- 196 Huang T, Lin C, Zhong LL, Zhao L, Zhang G, Lu A, Wu J, Bian Z: Targeting histone methylation for colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol* 2017;10:114-131.
- 197 Weber B, Stresmann C, Brueckner B, Lyko F: Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 2007;6:1001-1005.
- 198 Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L, Diverio D, Ammatuna E, Cimino G, Lo-Coco F, Grignani F, Nervi C: Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell* 2007;12:457-466.
- 199 Geiman TM, Robertson KD: Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *J Cell Biochem* 2002;87:117-125.

- 200 Wang C, Yang S, Sun G, Tang X, Lu S, Neyrolles O, Gao Q: Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis. *PLoS One* 2011;6:e25832.
- 201 Shi Z, Tiwari AK, Shukla S, Robey RW, Singh S, Kim IW, Bates SE, Peng X, Abraham I, Ambudkar SV, Talele TT, Fu LW, Chen ZS: Sildenafil reverses ABCB1- and ABCG2-mediated chemotherapeutic drug resistance. *Cancer Res* 2011;71:3029-3041.
- 202 Huang L, Fu L: Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm Sin B* 2015;5:390-401.
- 203 Dharmapuri G, Doneti R, Philip GH, Kalle AM: Celecoxib sensitizes imatinib-resistant K562 cells to imatinib by inhibiting MRP1-5, ABCA2 and ABCG2 transporters via Wnt and Ras signaling pathways. *Leuk Res* 2015;39:696-701.
- 204 Kim YK, Lee SS, Jeong SH, Ahn JS, Yang DH, Lee JJ, Shin MG, Kim HJ: OCT-1, ABCB1, and ABCG2 Expression in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Treated with Dasatinib or Nilotinib. *Chonnam Med J* 2014;50:102-111.
- 205 Steinbach D, Gillet JP, Sauerbrey A, Gruhn B, Dawczynski K, Bertholet V, de Longueville F, Zintl F, Remacle J, Efferth T: ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12:4357-4363.
- 206 Zhang J, Zhao A, Sun L, Chen W, Zhang H, Chen Z, Liu F: Selective surface marker and miRNA profiles of CD34+ blast-derived microvesicles in chronic myelogenous leukemia. *Oncol Lett* 2017;14:1866-1874.
- 207 Haverty PM, Fridlyand J, Li L, Getz G, Beroukhir R, Lohr S, Wu TD, Cavet G, Zhang Z, Chant J: High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:530-542.
- 208 Santos S, Baptista CS, Abreu RM, Bastos E, Amorim I, Gut IG, Gärtner F, Chaves R: ERBB2 in cat mammary neoplasias disclosed a positive correlation between RNA and protein low expression levels: a model for erbB-2 negative human breast cancer. *PLoS One* 2013;8:e83673.
- 209 Chen YJ, Fang LW, Su WC, Hsu WY, Yang KC, Huang HL: Lapatinib induces autophagic cell death and differentiation in acute myeloblastic leukemia. *Onco Targets Ther* 2016;9:4453-4464.
- 210 Heyn H, Esteller M: DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012;13:679-692.
- 211 Baylin SB, Jones PA: A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011;11:726-734.

- 212 Heyn H, Vidal E, Sayols S, Sanchez-Mut JV, Moran S, Medina I, Sandoval J, Simó-Riudalbas L, Szczesna K, Huertas D, Gatto S, Matarazzo MR, Dopazo J, Esteller M: Whole-genome bisulfite DNA sequencing of a DNMT3B mutant patient. *Epigenetics* 2012;7:542-550.
- 213 Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR: Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009;462:315-322.
- 214 Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, Esteller M: Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* 2011;6:692-702.
- 215 Weisenberger DJ: Characterizing DNA methylation alterations from The Cancer Genome Atlas. *J Clin Invest* 2014;124:17-23.
- 216 Sandoval J, Mendez-Gonzalez J, Nadal E, Chen G, Carmona FJ, Sayols S, Moran S, Heyn H, Vizoso M, Gomez A, Sanchez-Céspedes M, Assenov Y, Müller F, Bock C, Taron M, Mora J, Muscarella LA, Liloglou T, Davies M, Pollan M, Pajares MJ, Torre W, Montuenga LM, Brambilla E, Field JK, Roz L, Lo Iacono M, Scagliotti GV, Rosell R, Beer DG, Esteller M: A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:4140-4147.
- 217 Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, Esteller M: Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:10522-10527.
- 218 Heyn H, Moran S, Hernando-Herraez I, Sayols S, Gomez A, Sandoval J, Monk D, Hata K, Marques-Bonet T, Wang L, Esteller M: DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res* 2013;23:1363-1372.
- 219 Michels KB, Binder AM, Dedeurwaerder S, Epstein CB, Grealley JM, Gut I, Houseman EA, Izzi B, Kelsey KT, Meissner A, Milosavljevic A, Siegmund KD, Bock C, Irizarry RA: Recommendations for the design and analysis of epigenome-wide association studies. *Nat Methods* 2013;10:949-955.
- 220 Perini G, Diolaiti D, Porro A, Della Valle G: In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12117-12122.
- 221 Consortium EP: An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.

- 222 Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, Severin J, Kasukawa T, Sahin S, Abugessaisa I, Fukuda S, Hori F, Ishikawa-Kato S, Mungall CJ, Arner E, Baillie JK, Bertin N, Bono H, de Hoon M, Diehl AD, Dimont E, Freeman TC, Fujieda K, Hide W, Kaliyaperumal R, Katayama T, Lassmann T, Meehan TF, Nishikata K, Ono H, Rehli M, Sandelin A, Schultes EA, 't Hoen PA, Tatum Z, Thompson M, Toyoda T, Wright DW, Daub CO, Itoh M, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest AR, Kawaji H, consortium F: Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol* 2015;16:22.
- 223 Moran S, Arribas C, Esteller M: Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics* 2016;8:389-399.
- 224 Abbott JA, Guth E, Kim C, Regan C, Siu VM, Rupar CA, Demeler B, Francklyn CS, Robey-Bond SM: The Usher Syndrome Type IIIB Histidyl-tRNA Synthetase Mutation Confers Temperature Sensitivity. *Biochemistry* 2017;56:3619-3631.
- 225 He Y, Gong J, Wang Y, Qin Z, Jiang Y, Ma H, Jin G, Chen J, Hu Z, Guan X, Shen H: Potentially functional polymorphisms in aminoacyl-tRNA synthetases genes are associated with breast cancer risk in a Chinese population. *Mol Carcinog* 2015;54:577-583.
- 226 Yu Q, Shen XH, Li Y, Li RJ, Li J, Luo YY, Liu SF, Deng MY, Pei MF, Zhang GS: An intron mutation in the ACVRL1 may be associated with a transcriptional regulation defect in a Chinese family with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *PLoS One* 2013;8:e58031.
- 227 Lu Q, Hope LW, Brasch M, Reinhard C, Cohen SN: TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7626-7631.
- 228 Stahn V, Nagel I, Fischer-Huchzermeyer S, Oyen F, Schneppenheim R, Gesk S, Bohring A, Chikobava L, Young P, Gess B, Werner M, Senner V, Harder A: Molecular Analysis of Hybrid Neurofibroma/Schwannoma Identifies Common Monosomy 22 and  $\alpha$ -T-Catenin/CTNNA3 as a Novel Candidate Tumor Suppressor. *Am J Pathol* 2016;186:3285-3296.
- 229 Scrima M, De Marco C, De Vita F, Fabiani F, Franco R, Pirozzi G, Rocco G, Malanga D, Viglietto G: The nonreceptor-type tyrosine phosphatase PTPN13 is a tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol* 2012;180:1202-1214.
- 230 Davis TL, Hoi CSL, Rebay I: Mutations that impair Eyes absent tyrosine phosphatase activity in vitro reduce robustness of retinal determination gene network output in *Drosophila*. *PLoS One* 2017;12:e0187546.
- 231 Mori N, Ohwashi-Miyazaki M, Yoshinaga K, Okada M, Shiseki M, Motoji T, Tanaka J: Tumor suppressor gene methylation on the short arm of chromosome 1 in chronic myelogenous leukemia. *Eur J Haematol* 2017;98:467-477.

- 232 De Mello MR, Albuquerque DM, Pereira-Cunha FG, Albanez KB, Pagnano KB, Costa FF, Metze K, Lorand-Metze I: Molecular characteristics and chromatin texture features in acute promyelocytic leukemia. *Diagn Pathol* 2012;7:75.
- 233 Williams SV, Platt FM, Hurst CD, Aveyard JS, Taylor CF, Pole JC, Garcia MJ, Knowles MA: High-resolution analysis of genomic alteration on chromosome arm 8p in urothelial carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:642-659.
- 234 Shibata S, Kawanai T, Hara T, Yamamoto A, Chaya T, Tokuhara Y, Tsuji C, Sakai M, Tachibana T, Inagaki S: ARHGEF10 directs the localization of Rab8 to Rab6-positive executive vesicles. *J Cell Sci* 2016;129:3620-3634.
- 235 Matsushita T, Ashikawa K, Yonemoto K, Hirakawa Y, Hata J, Amitani H, Doi Y, Ninomiya T, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M, Nakamura Y, Kiyohara Y, Kubo M: Functional SNP of ARHGEF10 confers risk of atherothrombotic stroke. *Hum Mol Genet* 2010;19:1137-1146.
- 236 Liu S, Wang Y, Xue W, Liu H, Xu Y, Shi Q, Wu W, Zhu D, Amos CI, Fang S, Lee JE, Hyslop T, Li Y, Han J, Wei Q: Genetic variants in the genes encoding rho GTPases and related regulators predict cutaneous melanoma-specific survival. *Int J Cancer* 2017;141:721-730.
- 237 Wu X, Miao J, Jiang J, Liu F: Analysis of methylation profiling data of hyperplasia and primary and metastatic endometrial cancers. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017;217:161-166.
- 238 Furukawa T, Fujisaki R, Yoshida Y, Kanai N, Sunamura M, Abe T, Takeda K, Matsuno S, Horii A: Distinct progression pathways involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 2005;18:1034-1042.
- 239 Ma J, Yu X, Guo L, Lu SH: DUSP6, a tumor suppressor, is involved in differentiation and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2013;6:1624-1630.
- 240 Kim SH, Lee HY, Yi H, Ahn YM, Kim YS: Haloperidol induces demethylation and expression of the dual specificity phosphatase 6 gene in MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells. *Life Sci* 2012;91:1317-1322.
- 241 Okudela K, Yazawa T, Woo T, Sakaeda M, Ishii J, Mitsui H, Shimoyamada H, Sato H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Takahashi T, Sugimura H, Kitamura H: Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol* 2009;175:867-881.
- 242 Huang H, Gao Q, Peng X, Choi SY, Sarma K, Ren H, Morris AJ, Frohman MA: piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Dev Cell* 2011;20:376-387.



- 243 Zhang Y, Liu X, Bai J, Tian X, Zhao X, Liu W, Duan X, Shang W, Fan HY, Tong C: Mitoguardin Regulates Mitochondrial Fusion through MitoPLD and Is Required for Neuronal Homeostasis. *Mol Cell* 2016;61:111-124.
- 244 Wilkins OM, Titus AJ, Gui J, Eliot M, Butler RA, Sturgis EM, Li G, Kelsey KT, Christensen BC: Genome-scale identification of microRNA-related SNPs associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2017;38:986-993.
- 245 Crews LA, Jamieson CH: Chronic myeloid leukemia stem cell biology. *Curr Hematol Malig Rep* 2012;7:125-132.
- 246 Roeder I, Horn M, Glauche I, Hochhaus A, Mueller MC, Loeffler M: Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nat Med* 2006;12:1181-1184.
- 247 Funata S, Matsusaka K, Yamanaka R, Yamamoto S, Okabe A, Fukuyo M, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A: Histone modification alteration coordinated with acquisition of promoter DNA methylation during Epstein-Barr virus infection. *Oncotarget* 2017;8:55265-55279.
- 248 Gu Y, Zhang Z, Yin J, Ye J, Song Y, Liu H, Xiong Y, Lu M, Zheng G, He Z: Epigenetic silencing of miR-493 increases the resistance to cisplatin in lung cancer by targeting tongue cancer resistance-related protein 1(TCRP1). *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36:114.