



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN

Farmacologia e Oncologia Molecolare

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

Studi pre-clinici per lo sviluppo di approcci terapeutici basati sui microRNA in un modello di Leucemia Linfatica Cronica

Settore Scientifico Disciplinare MED/06

Dottorando

Dott. D'Abundo Lucilla

Tutore

Prof. Negrini Massimo

Anni 2012/2014

Sommario

ABSTRACT	5
RIASSUNTO	6
INTRODUZIONE	7
1. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA	7
1.1 LLC: caratteristiche e prognosi	7
1.2 Vie del segnale deregolate nella LLC	10
1.3 Trattamento della LLC	11
2. I microRNA	18
2.1 I microRNA	18
2.2 I microRNA e il Cancro	20
2.3 microRNA e LLC	22
2.4 Il microRNA181b	24
2.5 Il microRNA34a	25
2.6 microRNA come agenti/bersagli terapeutici	27
3. MODELLO MURINO DI LLC	29
3.1 Topo transgenico E μ -TCL-1	29
SCOPO della TESI	31
MATERIALI e METODI	32
4.1 Linee Cellulari e Colture primarie	32
4.2 Transfezione	32
4.3 Western Blot	33
4.4. Saggi di Vitalità e Apoptosi	34
4.5 Modello murino di LLC e trapianto singenico	35
4.6 Analisi Citofluorimetrica	36
4.7 Real-time PCR	36
4.8 Trattamenti <i>in vivo</i> con microRNA o anti-microRNA	38
4.9 Estrazione degli acidi nucleici	39
RISULTATI	40
5.1 Il miR-181b regola negativamente l'espressione dell'oncogene TCL-1 in cellule B	40
5.2 Il miR-181b induce apoptosi e riduce la vitalità di cellule B umane e di splenociti tumorali del modello murino E μ -TCL-1FL <i>in vitro</i>	43
5.3 Il miR-181b regola diverse vie dei segnali molecolari coinvolti nella LLC.	46
5.4 Studio della progressione della LLC in topi trapiantati con splenociti E μ -TCL1FL derivanti	49

5.5 Veicolazione di microRNA e anti-microRNA <i>in vivo</i>	52
5.6 Effetti a breve termine di microRNA o anti-microRNA su splenociti leucemici <i>in vivo</i>	53
5.7 Modulazione dei geni bersaglio del microRNA-34a <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	55
5.8 Il miR-181b e il miR-34a sono in grado di rallentare la progressione della leucemia nel modello murino.....	57
DISCUSSIONE e CONCLUSIONE.....	62
GLOSSARIO	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

ABSTRACT

Despite its indolent nature, chronic lymphocytic leukemia (CLL) is an incurable disease. The involvement of microRNAs (miRNAs) in CLL pathogenesis has been established and it suggests that miRNAs are attractive candidates as therapeutic targets for CLL.

Here, we employed the E μ -TCL1 transgenic mouse model, which develops a chronic B-cell CD5⁺ leukemia similar to an aggressive form of human B-CLLs, to investigate miR-181b and miR-34a as a new therapeutic agents.

In vitro, the enforced expression of miR-181b mimics induced a significant apoptotic effect in human B-cells (RAJI, DAUDI, 697, EHEB) as well as in mouse E μ -TCL1 leukemic splenocytes. In addition molecular analyses revealed that miR-181b not only affected the expression of Tcl1, but also of Bcl2 and Mcl1 anti-apoptotic proteins, and reduced the phosphorylation levels of Akt and Erk1/2. Similarly, the restoration of miR-34a induced an increase of apoptosis in murine leukemic spleen cells, which could be related to the modulation of CDK6 and Bcl-2 targets. Finally, *in vivo* multiple treatments with miR-181b or miR-34a mimics induced a reduction/delay in the progression of leukemia and an increase of overall survival in treated mice.

Our pre-clinical assessment of miRNA-based therapies in a CLL mouse model proves a sizable anti-leukemic activity of miR-181b and miRNA-34a as single agents, and suggests that the use of microRNAs could represent a novel potential therapeutic approach for the treatment of CLL.

RIASSUNTO

Nonostante la sua natura indolente, la leucemia linfatica cronica (LLC) è una malattia incurabile. Negli ultimi anni notevoli progressi sono stati fatti nello sviluppo di nuovi farmaci contro la LLC, tuttavia la malattia rimane non curabile, rendendo essenziali ulteriori studi per meglio comprendere le basi molecolari di tale leucemia e sviluppare nuovi approcci terapeutici.

Il coinvolgimento dei microRNA nella patogenesi della LLC è stata confermata in molteplici studi suggerendo che i microRNA possano essere considerati degli interessanti agenti/bersagli terapeutici contro la LLC.

Nel nostro studio abbiamo impiegato il modello murino, E μ -TCL1-FL, che sviluppa una leucemia cronica a cellule B CD5 positive simile ad una forma aggressiva di LLC umana, per sviluppare un nuovo approccio terapeutico basato sull'utilizzo dei microRNA. In particolare abbiamo analizzato il potenziale effetto terapeutico di due microRNA, il miR-181b e il miR-34a, solitamente deregolati nella LLC.

Mediante esperimenti *in vitro*, abbiamo dimostrato che l'espressione del miR-181b è in grado di indurre un significativo effetto apoptotico nelle cellule B umane (RAJI, DAUDI, 697, EHEB) e negli splenociti leucemici di topo transgenico E μ -TCL1-FL. Inoltre le analisi molecolari hanno rivelato che in queste linee cellulari il miR-181b regola non solo l'espressione di TCL1, ma anche delle proteine anti-apoptotiche Bcl2, MCL1 e, indirettamente, i livelli di fosforilazione di Akt e Erk1/2 suggerendo che tale microRNA sia in grado di modulare diverse vie del segnale alterate nella LLC come PI3K/AKT e MAPK/ERK. Allo stesso modo, anche l'espressione del miR-34a ha indotto un aumento dell'apoptosi negli splenociti leucemici murini dopo trattamento *in vivo* e ciò potrebbe essere correlato alla modulazione di suoi bersagli molecolari, Bcl-2 e CDK6. Infine, trattamenti multipli con miR-181b o miR-34a *in vivo* hanno indotto una riduzione/ritardo nella progressione della leucemia e un aumento della sopravvivenza dei topi trattati.

Il nostro studio volto a valutare l'efficacia di una potenziale terapia contro la LLC basata sull'utilizzo dei microRNA ha dimostrato una significativa attività anti-leucemica esercitata dal miR-181b e dal miRNA-34a come agenti singoli e suggerisce quindi che l'uso dei microRNA potrebbe rappresentare un valido ausilio terapeutico per il trattamento della LLC.

INTRODUZIONE

1.LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

1.1 LLC: caratteristiche e prognosi

Con più di 15000 nuovi casi riconosciuti annualmente, la Leucemia Linfatica Cronica (LLC) è la più comune leucemia diagnosticata nel mondo occidentale (1). Il principale trattamento di tale leucemia è basato su chemioterapia citotossica; tuttavia la LLC rimane una malattia incurabile a causa dei meccanismi di resistenza che si sviluppano nella maggior parte dei pazienti (2).

La LLC è principalmente una malattia degli anziani, l'incidenza aumenta linearmente ogni decennio e colpisce più frequentemente gli individui di sesso maschile rispetto al sesso femminile, in un rapporto di 2:1(3).

Tale leucemia è caratterizzata dall'espansione clonale di cellule B CD5 positive e più del 90% delle cellule leucemiche non si dividono e sono bloccate a livello della fase G0/G1 del ciclo cellulare. Inoltre, i linfociti della LLC sono anche abbastanza resistenti all'apoptosi (4). In base a tale teoria, inizialmente si riteneva che le cellule leucemiche non fossero in grado di proliferare e che si accumulassero fino a livelli insopportabili per il paziente. Tuttavia questo punto di vista è stato modificato negli ultimi dieci anni (4). Diversi studi hanno infatti mostrato che l'alta conta linfocitaria nei pazienti affetti da LLC è causata non solo dalla prolungata sopravvivenza dei linfociti leucemici, ma anche dalla presenza di cellule proliferanti nel midollo osseo, milza o linfonodi (5, 6).

I progressi nella diagnostica molecolare e una maggiore comprensione della biologia di tale leucemia hanno facilitato la caratterizzazione delle variazioni che si osservano nel decorso clinico della malattia, portando ad una migliore stratificazione del rischio (7) e di conseguenza, alla possibile attuazione di una terapia più mirata (8).

Il decorso clinico della LLC è infatti molto variabile, ma diversi marcatori prognostici sono stati finora identificati per facilitare la gestione clinica dei pazienti affetti da LLC, come ad esempio lo stato mutazionale dei geni della regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgVH), i livelli di espressione della proteina ZAP-70, della proteina CD38 e la presenza di diverse alterazioni cromosomiche (9, 10). Generalmente i pazienti con uno stato non mutato del gene IgVH e alti livelli di espressione della proteina ZAP-70 manifestano una forma

aggressiva di LLC; mentre i pazienti con uno stato mutato a livello del *locus* IgVH e bassi livelli di espressione di ZAP-70 hanno un decorso indolente (11).

È stato inoltre scoperto che le alterazioni genomiche nella LLC sono anche importanti predittori indipendenti della progressione della malattia e indice della sopravvivenza; tuttavia, le basi molecolari di queste associazioni erano fino a poco tempo fa in gran parte sconosciute (12). L'individuazione di marcatori prognostici è stata implementata grazie all'utilizzo di approcci genetici e molecolari quali PCR, FISH (ibridazione *in situ* fluorescente) e analisi mediante microarray.

La più comune alterazione cromosomica della LLC è la delezione 13q14, la quale è riscontrata in circa il 50% dei pazienti; questa alterazione nella maggior parte dei casi è associata ad una forma indolente di LLC. La seconda alterazione più comune è la delezione 11q23, osservata in circa il 18% dei pazienti ed è caratteristica delle forme aggressive di LLC. La trisomia del cromosoma 12, la delezione 17p e 6q invece presentano un'incidenza più bassa, del 15%, 10% e 5% rispettivamente. La prognosi più avversa è riscontrata nei pazienti con delezione 17p (12-14).

Le anomalie citogenetiche possono essere utilizzate per identificare sottogruppi di pazienti con un differente decorso clinico, tempo di progressione e tasso di sopravvivenza. Secondo studi recenti, è possibile individuare tre gruppi di rischio:

- (1) a basso rischio: i pazienti con un cariotipo normale o isolata delezione 13q;
- (2) a rischio intermedio: soggetti con delezione 11q, trisomia 12, o delezione 6q;
- (3) ad alto rischio: i pazienti con delezione 17p o cariotipo complesso (15).

Inoltre, il sequenziamento dell'intero genoma ha portato all'individuazione di mutazioni genetiche ricorrenti che si verificano nelle cellule di LLC parallelamente alle aberrazioni genomiche strutturali prima citate. Alcune di queste mutazioni che colpiscono i geni *NOTCH1*, *MyD88*, *TP53*, *ATM* e *SF3B1* sembrano essere molto comuni e avere un rilevante impatto prognostico (16-18). Nonostante tali scoperte, è necessario individuare altre molecole che possano essere utilizzate come fattori prognostici. Recentemente, attraverso studi di profili di espressione è emerso che anche alcuni microRNA possono essere utilizzati come marcatori prognostici o terapeutici nella LLC (19). In tabella 1 sono riportati i principali fattori prognostici della LLC.

Fattori prognostici Clinici e di Laboratorio avversi nella LLC

1. Età avanzata
2. Stadio avanzato (Rai III/IV o Binet C)
3. Breve tempo di duplicazione dei linfociti (<12 mesi)
4. Diffusa infiltrazione del midollo osseo
5. Incremento della percentuale dei promielociti
6. Sesso maschile
7. Alti livelli della lattato deidrogenasi
8. Alti livelli della microglobulina b2
9. Incremento dei livelli di CD23 solubile

Fattori prognostici molecolari avversi

1. Delezione 17p o 11q
 2. Sovraespressione di CD38 (>30%)
 3. Alti livelli di ZAP-70 (più del 20%)
 4. IgVH non mutato
 5. Mutazioni in *NOTCH-1*
 6. Alti livelli di espressione della lipoproteina lipasi
 7. Variazione nell'espressione di specifici microRNA
-

Tabella 1. Fattori prognostici della LLC (8).

Il quadro clinico dei pazienti affetti da LLC è molto ampio, va da una forma indolente, malattia non progressiva che non richiede alcun trattamento ad una forma aggressiva che necessita di un trattamento immediato (20). Lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche contro la LLC è in continua evoluzione e si basa sul fatto che la patogenesi della LLC dipende da diversi pathway che conferiscono alla cellula leucemica un fenotipo a sostegno di stimoli proliferativi, di sopravvivenza e antiapoptotici che si manifesta con la sovraespressione di molecole favorenti la proliferazione, sopravvivenza cellulare e gli stimoli antiapoptotici (21).

1.2 Vie del segnale deregolate nella LLC

Per lo sviluppo di nuove terapie contro neoplasie ematologiche è importante sfruttare le informazioni biologiche disponibili e soprattutto considerare due caratteristiche distinte della leucemia bersaglio: (1) il processo di sviluppo mediante il quale una cellula normale da origine ad un tumore; (2) la suscettibilità o resistenza delle cellule leucemiche alle attuali terapie (22).

Vi è oramai una forte evidenza che le vie del segnale (pathway) mediate dal recettore delle cellule B (BCR) svolgono un ruolo importante nello sviluppo della LLC e che determinano il variabile comportamento clinico (22). La stimolazione di BCR, infatti, induce l'attivazione di diverse tirosin chinasi, come Bruton tirosin chinasi (BTK), milza tirosina chinasi (Syk), ZAP70, chinasi della famiglia Src (in particolare la chinasi Lyn) e fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), che stimolano la sopravvivenza delle cellule B leucemiche attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione come NF- κ B (22, 23).

Inoltre è diventato sempre più chiaro che la sopravvivenza delle cellule di LLC è un processo determinato geneticamente, non limitato a livello della cellula leucemica, ma strettamente dipendente anche da componenti cellulari del microambiente come macrofagi, cellule T o cellule follicolari dendritiche stromali che forniscono proteine essenziali (chemochine, citochine e fattori angiogenici) per l'attivazione delle vie dei segnali di proliferazione e sopravvivenza, quali NF κ B e PI3K/AKT, nelle cellule leucemiche (24, 25).

In effetti, queste vie sono costitutivamente attivate nelle cellule di LLC portando alla trascrizione e sovraespressione di proteine antiapoptotiche chiave, in particolare diversi membri delle famiglie Bcl-2 e IAP. X-linked IAP (XIAP) sembra avere un ruolo importante nell'inattivazione delle caspasi (26). Per quanto riguarda le proteine Bcl-2 è ormai ben noto che oltre a Bcl-2 stesso, anche Mcl-1 svolge un ruolo fondamentale nel processo apoptotico delle cellule leucemiche. Infatti, il silenziamento di Mcl-1 mediante RNA interferenti (siRNA) è in grado di indurre l'apoptosi nelle cellule di LLC (27, 28).

Infine, alterazioni dei regolatori dell'apoptosi come il gene *p53*, che sono spesso osservate nella LLC, possono essere implicate nei difetti del processo apoptotico (12). Tutti questi pathway hanno recentemente acquisito un'importanza rilevante poichè possono essere inattivati da piccole molecole inibitrici specifiche che hanno mostrato di essere efficaci al livello clinico per il trattamento di diverse neoplasie ematologiche (23).

1.3 Trattamento della LLC

Il trattamento della LLC è un processo in continuo cambiamento. In passato, gli approcci terapeutici erano basati sul controllo della leucemia, portando ad una malattia indolente cronica; l'obiettivo dei trattamenti attuali invece è quello di ottenere una remissione a lungo termine, almeno in un sottogruppo meno indolente di pazienti (2).

Attualmente quindi, lo scenario terapeutico è drasticamente cambiato grazie all'introduzione di nuovi farmaci e all'identificazione di diversi fattori prognostici, correlati sia alla progressione che all'andamento clinico della malattia.

La scelta della terapia da attuare dipende dallo stadio clinico, dall'attività della malattia, dall'età e da comorbidità esistenti.

Le opzioni terapeutiche comprendono:

Agenti citostatici.

Per molti anni la monoterapia con agenti alchilanti è stata utilizzata come terapia di prima linea per il trattamento della LLC e il *Clorambucil* (CLB) è stato considerato il composto migliore per diversi decenni (29). Ancora oggi, questo farmaco rimane un'opzione appropriata, soprattutto per i pazienti anziani, troppo fragili per sopportare terapie più aggressive o non idonee ad altri trattamenti. I vantaggi di questo composto sono infatti la bassa tossicità, il basso costo e la convenienza di essere un farmaco orale; tuttavia i principali svantaggi sono il suo basso tasso di remissione completa (CR), quasi inesistente, e alcuni effetti collaterali che si verificano dopo un uso prolungato (prolungata citopenia, mielodisplasia e leucemia acuta secondaria). Tuttavia, nuovi studi indicano che l'utilizzo di *Clorambucil* come trattamento monoterapico, potrebbe essere meno frequente, poiché la combinazione con Anticorpi anti-CD20 si è rivelata essere più efficace (24). Oltre agli agenti alchilanti sono stati introdotti nella pratica clinica degli analoghi delle purine, capaci di interferire con la via di biosintesi del DNA.

Tre analoghi delle purine attualmente utilizzati nel trattamento della LLC sono: *Fludarabina*, *Pentostatina* e *Cladribina* (2-CdA). La *Fludarabina* è il farmaco di gran lunga più studiato dei tre nella LLC. Il trattamento monoterapico con la *Fludarabina* induce una maggiore remissione e una più alta CR (7-40%) rispetto agli altri chemioterapici convenzionali come CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone), CAP (ciclofosfamide, doxorubicina, prednisone), o

Clorambucil; tuttavia non apporta significativi vantaggi sulla sopravvivenza dei pazienti se usato come agente singolo (30-32).

Anticorpi monoclonali

Anticorpi anti-CD20. Miglioramenti nel trattamento della LLC si sono osservati con l'introduzione di anticorpi anti-CD20. CD20 è una fosfoproteina glicosilata, attivata ed espressa sulla superficie di cellule B mature. Il suo ligando e la sua funzione non sono ancora state scoperte; tuttavia si ritiene che possa agire da canale calcio sulla membrana cellulare. Poichè CD20 è espresso sulla maggior parte delle cellule B tumorali, nel 1998 l'introduzione dell'anticorpo *Rituximab* anti-CD20 ha migliorato notevolmente il trattamento della maggior parte dei Linfomi non di Hodgkin CD20-positivi, inclusa la LLC (33, 34). Tuttavia nel trattamento della LLC il *Rituximab*, utilizzato come singolo agente, è risultato essere meno efficace che nel linfoma follicolare, a meno che non vengano utilizzate dosi elevate (35). La sicurezza di tale anticorpo unita alla sua prevedibile farmacocinetica lo hanno reso comunque un interessante farmaco antitumorale e studi aggiuntivi sono stati eseguiti per valutare la sua utilità nel trattamento della LLC in combinazione con chemioterapici. Questi studi hanno dimostrato che la combinazione *Fludarabina/Rituximab* è risultata essere più efficace a livello terapeutico rispetto al trattamento con sola Fludarabina (36) e miglioramenti ancor più significativi sono stati ottenuti con la combinazione *Fludarabina/Ciclofosfamide/Rituximab* (FCR) (37). Tuttavia questo regime terapeutico è risultato essere troppo tossico per i pazienti anziani, che più frequentemente hanno dovuto sospendere il trattamento; ma più idoneo a pazienti giovani con un adeguata funzione renale (38). In pazienti con LLC refrattaria ai trattamenti classici, è stata testata la combinazione *Bendamustina/Rituximab*, che è risultata essere più efficace delle combinazioni precedenti e con un migliore profilo di sicurezza per i pazienti (39). La FDA (Food and Drug Administration) e l'EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal) hanno recentemente approvato l'utilizzo di un altro anticorpo anti-CD20, *Ofatumumab*, per il trattamento monoterapico dei pazienti che sono refrattari alla fludarabina e all'alemtuzumab (40). Ofatumumab è un anticorpo umanizzato specifico per un unico epitopo della molecola CD20 espressa sulle cellule B umane, ciò porta ad un aumento dell'affinità di legame alla proteina CD20, ad prolungato tempo di dissociazione ed a una maggiore uccisione delle cellule mediante meccanismi di citotossicità dipendenti dal complemento

(CDC) e di citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC) rispetto al rituximab, specialmente in cellule esprimenti bassi livelli di CD20 (41).

Alemtuzumab. Alemtuzumab è un anticorpo monoclonale ricombinante, completamente umanizzato contro l'antigene CD52. Il trattamento monoterapico con *Alemtuzumab* ha prodotto alti tassi di risposta (33% - 53%) nei pazienti con LLC avanzata che erano stati precedentemente trattati con agenti alchilanti senza buon esito o recidivato dopo trattamento con fludarabina (42, 43). Inoltre, Alemtuzumab è risultato essere efficace anche nei pazienti presentanti marcatori ad alto rischio, come delezioni del cromosoma 11q o 17p e mutazioni di *TP53* (44, 45). Purtroppo, il farmaco non è più autorizzato, ma è disponibile in alcuni paesi solo per uso compassionevole.

Trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche viene attuato solo in pazienti con LLC ad alto rischio e/o in pazienti nei quali tutti i trattamenti standard sono risultati inefficaci. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche può essere di due tipi: autologo o allogenico. Il trapianto autologo consiste nella reinfusione dopo chemioterapia ad alte dosi di cellule staminali ematopoietiche prelevate precedentemente dallo stesso paziente e criopreservate. Questo trattamento può offrire lunghi periodi liberi da malattia, ma sono possibili recidive. Il trapianto allogenico, invece, consiste nell'infusione di cellule staminali ematopoietiche di un donatore compatibile con il paziente, è l'unica procedura che potenzialmente consente la guarigione (46).

Oltre ai farmaci sopra citati vi è un numero crescente di nuovi interessanti composti in fase di sperimentazione clinica. La caratteristica principale di questi composti è che il loro meccanismo di azione risulta essere altamente specifico per vie del segnale comunemente alterate nella LLC o volto a reindirizza il sistema immunitario contro le cellule leucemiche.

Agenti terapeutici contro la via del segnale mediata da BCR.

La via del segnale mediata dal Recettore delle cellule B (BCR) sembra svolgere un ruolo importante nella sopravvivenza delle cellule di LLC (22). Questo potrebbe spiegare perché l'inibizione della via del segnale mediata da BCR potrebbe essere

una nuova e potente strategia per il trattamento LLC (23). La via del segnale mediata da BCR nelle cellule di LLC è supportata da diverse tirosin-chinasi, come la Bruton tirosina chinasi, Syk, ZAP70, chinasi della famiglia Src (in particolare chinasi Lyn), così come da PI3K (23). Gli inibitori di alcune di queste chinasi sono entrati a far parte di studi clinici di fase III, suscitando un notevole interesse:

Fostamatinib. Syk incrementa il segnale mediato da BCR. La sua attivazione induce sopravvivenza cellulare attraverso l'attivazione di fosfatidilinositolo3-chinasi e AKT ed in genere è sovraregolata nei pazienti affetti da LLC (47). Quindi, potenzialmente potrebbe essere un promettente bersaglio terapeutico. *Fostamatinib disodium*, il primo inibitore orale di Syk disponibile in clinica, induce apoptosi interferendo con il segnale mediato da BCR. Studi clinici di fase I/II hanno mostrato una risposta complessiva nel 54% (6 su11) dei pazienti affetti da LLC e in tutti e sei i pazienti la risposta ha portato ad una remissione parziale (48). Tuttavia presenta dei limiti di tossicità per il dosaggio.

Idelalisib (CAL-101). La classe I delle phosphatidylinositol3-chinasi regolano le funzioni cellulari relative alla oncogenesi (49). L'espressione dell'isoforma PI3Kp110 δ (PI3K- δ) è limitata alle cellule di origine ematopoietiche dove svolge un ruolo chiave nella proliferazione e sopravvivenza delle cellule B. Nella LLC, il pathway PI3K è attivato costitutivamente e dipende da PI3K- δ . *Idelalisib* è un inibitore orale selettivo per PI3K- δ che promuove l'apoptosi in cellule primarie di LLC in maniera tempo e dose-dipendente senza indurre apoptosi nelle cellule T normali o natural killer e senza diminuire la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente. Inoltre, *Idelalisib* riduce i segnali di sopravvivenza derivanti da BCR o da cellule *nurse-like* e inibisce BCR e l'attivazione delle MAP chinasi (ERK) (50). In uno studio di fase I condotto su pazienti affetti da LLC precedentemente trattati, *Idelalisib* ha mostrato una tossicità accettabile, positivi effetti farmacodinamici e un'attività clinica favorevole (per esempio elevata regressione a livello dei linfonodi e prolungato controllo dei sintomi del tumore). Inoltre studi preliminari su *Idelalisib* in combinazione con rituximab, ofatumumab, o bendamustine / rituximab hanno mostrato risultati incoraggianti (51).

Ibrutinib. Bruton tirosina chinasi porta all'attivazione di vie del segnale di sopravvivenza cellulare, come NF- κ B e MAP chinasi attraverso la famiglia delle

chinasi SRC (52). Ibrutinib, precedentemente denominato PCI-32765, è una piccola molecola attiva per via orale in grado di inibire BTK, che svolge un ruolo nella trasduzione del segnale mediato da BCR. L'inibizione di BTK potrebbe indurre l'apoptosi nei linfomi a cellule B e nelle cellule di LLC (52). Infatti, Ibrutinib ha mostrato una significativa azione terapeutica nei pazienti con tumori a cellule B recidivanti o refrattari ai trattamenti standard, inclusa la LLC (53). Tale composto è stato associato ad un'alta frequenza di remissione nei pazienti con queste caratteristiche e a febbraio 2014 è stato approvato dalla FDA per il trattamento di questi casi di LLC purché abbiano già ricevuto un trattamento precedentemente.

Dasatinib. Dasatinib è un inibitore delle chinasi SRC e Abl che induce apoptosi nelle cellule primarie di LLC (54). Inoltre, il Dasatinib sembra aumentare gli effetti apoptotici indotti da diversi agenti chemioterapici come fludarabina, clorambucil, sorafenib e desametasone (54). Da studi effettuati sembra che il dasatinib sia efficace nella riduzione delle masse tumorali nodulari, ma sembra non essere efficace sui linfociti del sangue periferico.

Inibitori di Bcl-2

Le proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 sono fondamentali regolatori del processo apoptotico (55).

Inibitori di Bcl-2 ABT-263 (Navitoclax) e ABT-199. ABT-263 è una piccola molecola inibitrice delle proteine della famiglia Bcl-2 che si lega con alta affinità a più proteine antiapoptotica della famiglia Bcl-2, tra cui Bcl-XL, Bcl-2, Bcl-w e Bcl-B, e ha un'elevata biodisponibilità orale. Studi iniziali hanno mostrato risultati molto promettenti per questo farmaco, anche come un unico agente terapeutico (56). Tuttavia, il suo utilizzo terapeutico potrebbe essere limitato da una grave trombocitopenia che si manifesta come prominente effetto collaterale. Pertanto, il composto è stato riprogettato per creare una molecola molto potente, biodisponibile per via orale e inibitrice selettiva di Bcl-2, ABT-199. Questo composto inibisce la crescita dei tumori Bcl-2 dipendenti *in vivo* (57). La fase di studio è agli inizi, ma mostra risultati incoraggianti. Una singola dose di questo inibitore ha mostrato infatti una lisi tumorale in 24 ore in 3 pazienti refrattari ai trattamenti (57). Un primo studio effettuato su pazienti con delezione 17p o refrattari alla Fludarabina ha mostrato risultati favorevoli (58), confermando gli inibitori di BCL-2 come molecole interessanti nel trattamento della LLC.

BH3-mimetic AT-101. AT101 è un analogo dei domini BH3, attivo per via orale, che inibisce l'attività anti-apoptotica di Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1 e potrebbero essere un efficace agente per il trattamento della LLC, poichè la resistenza all'apoptosi nelle cellule leucemiche è associata ad alti livelli di espressione della proteina Bcl-2. È stato dimostrato che AT101 è in grado di indurre apoptosi nelle cellule di LLC *in vitro* e di superare la resistenza ai farmaci mediata dal microambiente (59). Inoltre, tale composto ha mostrato una buona tollerabilità e un'efficacia soddisfacente in combinazione con infusioni settimanali di rituximab in pazienti con LLC precedentemente trattati (51).

Farmaci immunomodulatori

Lenalinomide Lenalidomide è un analogo della talidomide di seconda generazione, è un agente immunomodulante con proprietà anti-angiogeniche che viene utilizzato nel trattamento della sindrome mielodisplastica e del mieloma multiplo ed è attualmente investigato per il trattamento della LLC. Tale composto è in grado di regolare negativamente la produzione di citochine antiapoptotiche nel microambiente tumorale e promuove l'attivazione dei linfociti T e delle cellule natural killer (NK) nella risposta antitumorale (60). Il trattamento con questo composto ha mostrato risultati incoraggianti in pazienti ad alto rischio, inclusi i casi con del17p (61); infatti, è risultato essere una molecola clinicamente efficace e ben tollerata in terapia ed induce una regressione duratura nei pazienti anziani affetti da LLC (62, 63).

Everolimus (RAD001). Everolimus è un composto che ha dimostrato una buona efficacia terapeutica in alcune neoplasie ematologiche (64), tuttavia nel trattamento della LLC i risultati sono stati finora deludenti, con bassi tassi di risposta e grave complicazioni (65).

In figura 1 è illustrata la via del segnale mediata da BCR e le varie molecole in grado di inibire tale via.

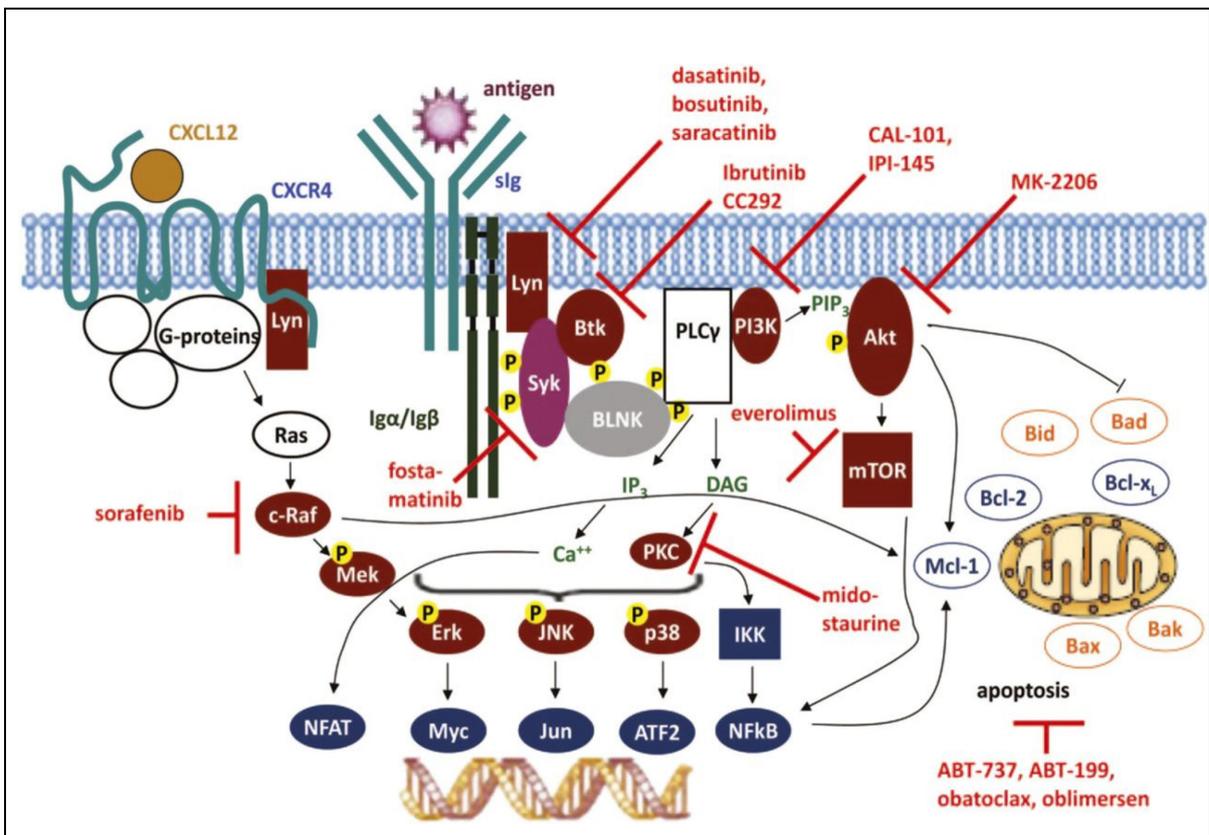


Figura1. Bersaglio delle nuove strategie terapeutiche: la via del segnale di BCR.
 In rosso sono indicati i farmaci inibenti la via del segnale mediata da BCR (24).

Nonostante lo sviluppo di nuove molecole relativamente più specifiche nel colpire proteine coinvolte nelle vie del segnale deregolate nella LLC e nel microambiente, la LLC rimane una malattia incurabile, infatti una remissione completa non si è osservata frequentemente neanche con i nuovi composti.

La LLC è una leucemia geneticamente eterogenea. Essa può essere causata da una serie complessa di eventi genetici e di conseguenza è una malattia biologicamente articolata. È molto probabile che per ottimizzare gli effetti terapeutici dei composti disponibili occorra individuare la migliore combinazione e sequenza dei trattamenti per ottenere un controllo a lungo termine della LLC migliorando notevolmente la qualità della vita dei pazienti. Infine è necessario continuare la ricerca di nuovi bersagli/agenti terapeutici.

Recentemente sta emergendo il potenziale utilizzo dei microRNA come agenti terapeutici, molecole regolatorie di diversi processi comunemente alterati in molteplici tumori inclusa la LLC.

2. I microRNA

2.1 I microRNA

I microRNA sono una classe di piccoli RNA di ~ 22 nucleotidi, non codificanti proteine che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, inducendo la degradazione dell'mRNA bersaglio con cui presentano regioni complementari o reprimendo la traduzione (66). I microRNA rappresentano una delle più importanti classi di molecole regolatrici dell'espressione genica, infatti si stima che essi regolino ~ 30% dei geni umani codificanti proteine. In vari studi è emerso che i microRNA sono coinvolti nella regolazione di un'ampia varietà di processi biologici, tra cui ciclo cellulare, il differenziamento, lo sviluppo, l'apoptosi e il metabolismo (67, 68); così come nelle malattie umane quali diabete, disordini immuno o neurodegenerativi e il cancro.

I meccanismi molecolari coinvolti nella biogenesi dei microRNA sono stati ampiamente studiati (66), essi sono molto complessi e si articolano in vari fasi.

Negli esseri umani, i geni codificanti i microRNA sono distribuiti in tutti i cromosomi, ad eccezione del cromosoma Y. Quasi il 50% dei microRNA noti si trovano in cluster e vengono trascritti come RNA policistronici. La maggior parte dei geni di microRNA dei mammiferi sono localizzati in introni di geni codificanti proteine o in regioni intergeniche definite unità trascrizionali, meno frequentemente invece risiedono negli esoni, presentando generalmente un orientamento anti-senso rispetto al gene ospite (69, 70).

I geni dei microRNA vengono solitamente trascritti dalla RNA polimerasi II in trascritti primari chiamati pri-miRNA, lunghi dai 100 a più di mille nucleotidi, aventi un Cap al 5' (*cappuccio 7-metilguanosa*) e una coda di poli-A al 3' (71, 72).

Il processo di maturazione dei microRNA inizia nel nucleo, dove il pri-miRNA viene processato da un complesso multiproteico detto *Microprocessore* costituito da *Drosha* (un RNasi III nucleare) e il suo cofattore DGCR8/Pasha. L'azione del *Microprocessore* porta alla formazione di un precursore del microRNA (pre-miRNA), un RNA di 60-70 nucleotidi avente una struttura a *stem-loop* imperfetta con due nucleotidi sporgenti all'estremità 3' (66, 70).

Successivamente il pre-miRNA viene trasportato attivamente dal nucleo al citoplasma da *Exportin-5* in presenza del cofattore *Ran-GTP*. Il legame di *Exportin-5* al pre-miRNA dipende da una minima lunghezza dello stelo (*stem*) della forcina del pre-miRNA, inoltre studi recenti hanno mostrato che alterazioni a livello dell'estremità 3' sporgente del microRNA influenzano l'efficienza di legame

del trasportatore (73, 74). Una volta nel citoplasma, una seconda RNasi III, *DICER*, processerà il pre-miRNA rilasciando un RNA a doppio filamento lungo ~22 nucleotidi con un gruppo fosfato all'estremità 5' e 2 nucleotidi sporgenti all'estremità 3'. Soltanto uno dei filamenti del *duplex* miRNA-miRNA*, il miRNA maturo, verrà successivamente incorporato in uno specifico complesso proteico che reprimere l'espressione genica, *RISC* (RNA-induced silencing complex), mentre l'altro filamento verrà degradato. La scelta di quale filamento verrà incorporato in *RISC* è determinata dalla stabilità della coppia delle basi all'estremità 5' del doppio filamento miRNA-miRNA* (75). Il processo di biogenesi dei microRNA è rappresentato nella figura 2.

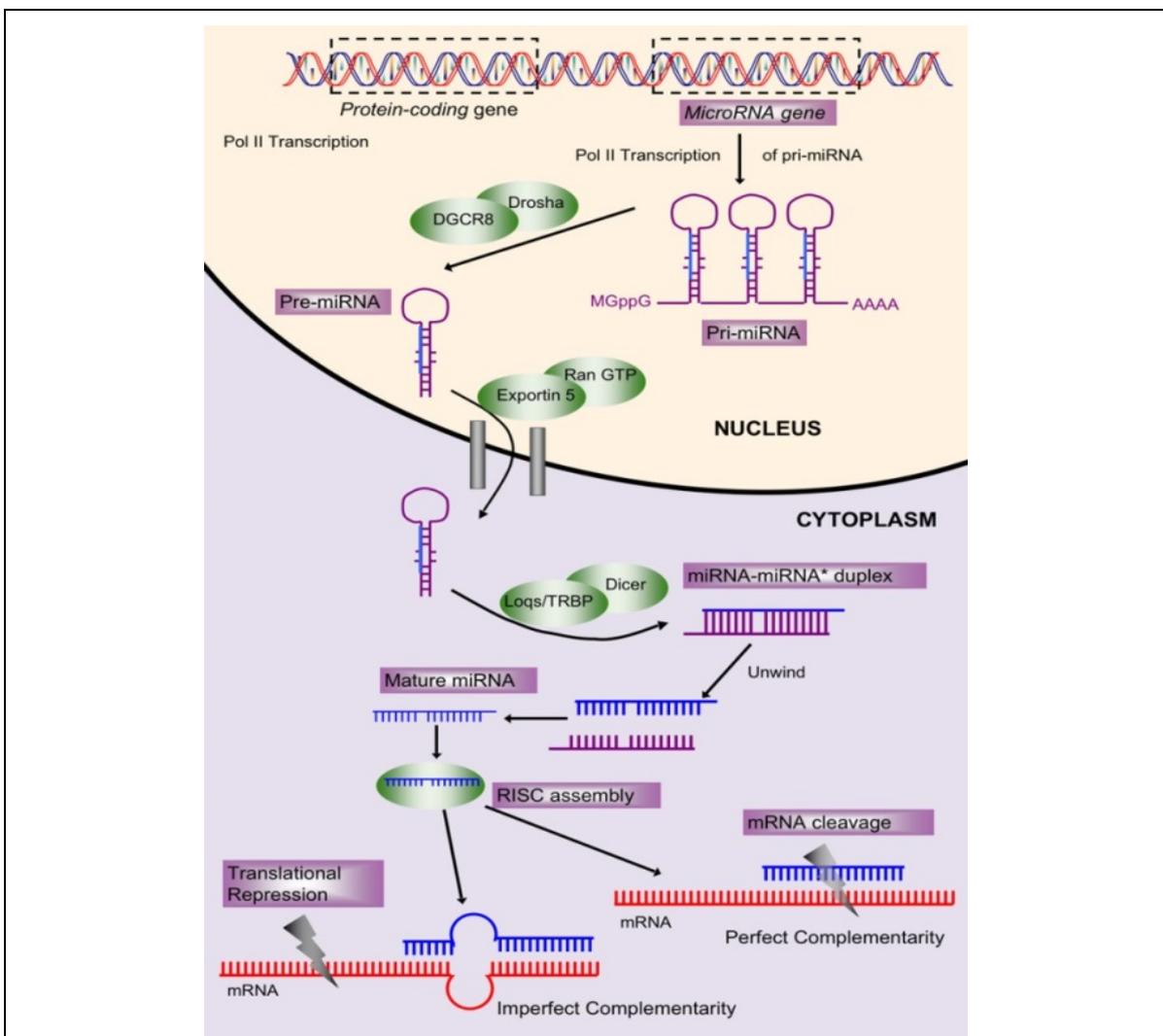


Figura 2. Biogenesi dei MicroRNA.

Nel nucleo i geni dei microRNA vengono trascritti da una RNA polimerasi II in pri-miRNA. Successivamente i pri-miRNA vengono processati dall'enzima nucleare *Drosha* in RNA precursori più piccoli, costituiti da forcine di circa 70 nucleotidi; questi ultimi vengono poi trasportati dal nucleo al citoplasma dal trasportatore *Exportin-5*. Nel citoplasma, vengono maturati dall'enzima *Dicer* e successivamente una singola catena dell'RNA a doppio filamento (miRNA-miRNA*) sarà incorporata nel complesso proteico effetore *RISC*. Questo complesso generalmente si lega alla regione 3'UTR di mRNA che presentano una o più regioni di omologia con il miRNA. Tale appaiamento porta alla repressione della traduzione o, raramente, alla degradazione dell'mRNA.

Il complesso RISC associato al microRNA maturo riconosce e reprime l'mRNA bersaglio. La scelta dello specifico trascritto bersaglio avviene principalmente in base alla complementarietà esistente tra l'mRNA bersaglio e la sequenza costituita dai nucleotidi 2-8 dell'estremità 5' (detta "seed") del microRNA. In molti casi, i siti di legame dei microRNA sono localizzati a livello del 3'UTR dei trascritti bersaglio e spesso sono presenti in copie multiple. Il legame del microRNA all'mRNA target generalmente induce l'inibizione del processo di traduzione o la degradazione dell'mRNA. Il grado di complementarietà miRNA-mRNA risulta essere critico nel decidere quale tipo di meccanismo di regolazione adottare. Attualmente sono stati sviluppati diversi algoritmi (<http://www.microrna.org/>; <http://www.targetscan.org/>; <http://pictar.bio.nyu.edu/>) per predire i potenziali target dei microRNA basati sull'analisi dei 3'UTR e sequenze *seed* conservate. I risultati di tali analisi computazionali suggeriscono che, nei mammiferi, ogni microRNA può avere più di 100 bersagli (76).

Grazie al continuo sviluppo di nuove tecnologie, il numero dei microRNA identificati è aumentato vertiginosamente, più di 28000 microRNA in differenti organismi animali, piante e virus sono stati riportati in miRBase; in particolare nell'uomo sono stati isolati più di 2500 microRNA maturi, ma si ritiene che tale numero sia destinato a crescere (miRbase).

2.2 I microRNA e il Cancro

Uno dei più grandi progressi nello studio dei microRNA è stato scoprire che essi giocano un importante ruolo nella patogenesi del cancro.

Il coinvolgimento dei microRNA nei tumori è stato inizialmente riconosciuto grazie a due osservazioni principali:

- 1) Circa il 50% dei geni di microRNA sono localizzati in regioni genomiche associate al cancro, in siti fragili o in corrispondenza di regioni comunemente delete (LOH) o amplificate ("*minimal ampliconi*") in vari tipi di neoplasie (77)
- 2) microRNA sono differenzialmente espressi nel tessuto normale rispetto al tessuto tumorale suggerendo che essi agiscano come oncogeni o oncosoppressori (78).

Infatti, fin dalla scoperta che i microRNA fossero implicati nella regolazione di processi biologici essenziali come sviluppo, differenziazione, apoptosi e proliferazione, si è subito sospettato che l'espressione dei microRNA potesse

essere deregolata nel cancro e che una loro anomala attività potesse favorire il processo di tumorigenesi.

I numerosi studi finora intrapresi illustrano come i microRNA possano agire da potenziali oncosoppressori o oncogeni. Analogamente ai geni codificanti proteine, i microRNA vengono definiti oncosoppressori quando in seguito alla loro perdita inducono o contribuiscono alla trasformazione neoplastica di una cellula normale (79); esempi di microRNA oncosoppressori, oltre al miR-15a e miR-16, sono i membri della famiglia *let-7* che risultano essere down-regolati in molti tumori come il carcinoma polmonare e della mammella, tumori diffusi soprattutto nei paesi economicamente sviluppati (80). I membri della famiglia *let-7*, infatti, inibiscono la traduzione di mRNA funzionali di oncogeni ben caratterizzati come RAS (81), HMGA2 (82) e c-myc (83) inducendo apoptosi e arresto del ciclo cellulare quando sono sovraespressi nel carcinoma polmonare, del colon e nel linfoma di Burkitt.

Inoltre è stata riscontrata anche un'azione oncogena da parte di alcuni microRNA, il miR-155, ad esempio, è incorporato in un RNA non codificante denominato BIC (B cell integration cluster) ed è localizzato sul cromosoma 21q23; un precedente studio ha illustrato come BIC cooperi con c-myc nell'oncogenesi (84). Diversi gruppi di ricerca, successivamente, hanno rivelato che il miR-155 è altamente espresso nel linfoma pediatrico di Burkitt, nella malattia di Hodgkin, nella LLC, nella AML, nel carcinoma polmonare e della mammella (78, 85).

Vi sono forti evidenze che anche il miR-21 abbia una azione oncogena: primo, questo microRNA è sovra-regolato in un ampia varietà di neoplasie ematiche e tumori solidi come AML, LLC, glioblastoma, cancro della prostata, del pancreas, stomaco, colon, fegato e mammella; secondo la sovraespressione del miR-21 nel glioblastoma blocca l'apoptosi, mentre il suo silenziamento tramite oligonucleotidi anti-senso inibisce la crescita cellulare, l'attiva delle caspasi e porta ad un aumento della morte cellulare programmata (86).

Come diviene evidente in questa trattazione in quasi tutti i tumori è stata riscontrata un'anomala espressione dei microRNA rispetto al tessuto normale avvalorando l'ipotesi che essi svolgano un ruolo cruciale nella patogenesi di tali malattie, soprattutto nel tumore del polmone, del cervello, del fegato, della mammella, della tiroide e delle cellule del sangue (87).

Tuttavia anche se la deregolazione dell'espressione dei microRNA sembra ormai consolidata nell'inizio e progressione della tumorigenesi, i meccanismi alla base della deregolazione dei microRNA nei tumori umani sono ancora largamente

sconosciuti. Crescenti studi indicano che la deregolazione trascrizionale, alterazioni epigenetiche, mutazioni, anomalie nel numero di copie del DNA e difetti nel meccanismo di biogenesi dei microRNA potrebbero contribuire all'errato funzionamento dei microRNA nei tumori umani. Una più chiara comprensione dei meccanismi coinvolti nella deregolazione dei microRNA nel cancro potrebbe contribuire enormemente allo sviluppo di nuove strategie basate sui microRNA per la diagnosi e la cura di queste neoplasie (88).

2.3 microRNA e LLC

L'alterata espressione dei microRNA nel cancro è stata per la prima volta documentata nella LLC; per anni è stato osservato che la delezione della regione 13q14 la si riscontra in più della metà dei casi di leucemia linfatica cronica a cellule B, nel 50% dei linfomi mantellari, nel 16-40% dei tumori della prostata, suggerendo che i geni oncosoppressori presenti in tale regione siano implicati nella patogenesi di questi tumori. Nel 2002 Calin ed altri identificarono due geni di microRNA, miR-15a e il miR-16-1, localizzati all'interno del locus 13q14.3 e dimostrarono che entrambi i microRNA sono deleti o down-regolati nella maggior parte dei casi di LLC (89). Successivamente Cimmino ed altri hanno mostrato che il miR-15a e il miR-16-1 possono avere come bersaglio molecolare BCL2, gene anti-apoptotico, suggerendo quindi un possibile meccanismo molecolare attraverso il quale perdendo entrambi i microRNA si può indurre lo sviluppo della LLC (90).

Profili di espressione di microRNA hanno rivelato alcuni risultati che potrebbero avere una notevole applicazione a livello clinico. Infatti, i profili di espressione dei microRNA possono essere utilizzati per distinguere le cellule B normali da quelle leucemiche e cosa più importante, nella LLC, sono associati alla prognosi, alla progressione e alla resistenza ai farmaci (91). In particolare, uno studio ha segnalato 13 microRNA in grado di differenziare la forma aggressiva e indolente di LLC (92). Un altro studio ha mostrato che il profilo di espressione di 32 microRNA è in grado di discriminare pazienti di LLC con diverse aberrazioni citogenetiche (93). Per esempio, i pazienti affetti da LLC con alti livelli del miR-21 avevano un più alto rischio di morte rispetto ai pazienti con bassi livelli di espressione (94). Allo stesso modo, anche alti livelli di espressione del miR-155 sono stati associati alla forma aggressiva di LLC (95). Recentemente è stato scoperto che l'espressione del miR-181b non solo può distinguere pazienti con una forma indolente o aggressiva di LLC, ma anche prevedere il tempo di trattamento, fungendo da

biomarker della progressione della malattia. Analizzando questi pazienti nelle varie fasi della malattia è emerso che l'espressione del miR-181b diminuisce con l'aumentare della gravità della malattia. Questi nuovi risultati evidenziano l'importanza del miR-181b in ambito clinico, suggerendo che i livelli di espressione dei microRNA possono essere utilizzati non solo per classificare i pazienti secondo la gravità della patologia, ma anche per il monitoraggio e il decorso della malattia (96). Inoltre, i microRNA possono essere utilizzati anche per predire la refrattarietà al trattamento con fludarabina dei pazienti con LLC. Per determinare se i microRNA sono direttamente coinvolti nello sviluppo della resistenza alla fludarabina, Ferracin ed altri hanno analizzato l'espressione dei microRNA, prima e dopo la terapia con fludarabina in pazienti classificati come responsivi o refrattario e hanno identificato alcuni microRNA in grado di distinguere queste due classi. Tra questi microRNA, il miR-148a, il miR-222 e il miR-21 sono risultati essere significativamente più espressi nei pazienti non responsivi sia prima che dopo il trattamento (91).

Recentemente, è stato scoperto che pazienti affetti da LLC refrattari alla fludarabina sono spesso caratterizzati da bassi livelli di espressione del miR34a e che la bassa espressione del miR-34a è associata con la resistenza alla fludarabina anche in assenza di mutazioni di *p53* (97).

In conclusione, attraverso i livelli di espressione dei microRNA è possibile distinguere le cellule B normali da quelle di LLC, discriminare le forme indolenti e aggressive di LLC, predire la progressione della malattia, e la risposta ai chemioterapici; quindi i microRNA possono essere utilizzati come marcatori dello sviluppo della LLC e di sensibilità al trattamento (91, 96).

Oltre a utilizzare i microRNA come marcatori prognostici, recentemente l'attenzione si è focalizzata sull'impatto molecolare dei microRNA deregolati nella LLC. È interessante notare che il miR-15/16, il miR-29, il miR-181 e il miR-34 sono i microRNA più frequentemente deregolati nella LLC e che tali microRNA sono in grado di regolare l'espressione genica di molteplici vie del segnale deregolate nella LLC, contribuendo a chiarire gli aspetti molecolari che portano alla insorgenza e progressione della leucemia e suggerendo il loro potenziale utilizzo come agenti o bersagli terapeutici (98).

In tabella sono riportati i principali microRNA deregolati nella LLC e i loro bersagli molecolari.

MicroRNA	Localizzazione Cromosomica	Espressione in LLC	Geni bersaglio
miRNA-155	21q21	Alta espressione in cellule con IGHV non mutata, ZAP-70 positivo e delezione in 17p13	PU.1, AID, SHIP, C/EBP β
miRNA-150	19q13	Bassa espressione in cellule con IGHV non mutata o ZAP-70 positivo	MYB
miRNA-181b	1q31	Bassa espressione in cellule con delezione in 17p13	MCL1, TCL1, BCL2
miRNA-29a/b	7q32	Bassa espressione in cellule con IGHV non mutata e ZAP-70 positivo	CDK6, TCL1, MCL1
miRNA-29c	1q32	Delezione in 17p13 e/o p53 mutato, espressione regolata dall'istone acetilasi.	CDK6, TCL1, MCL1
miRNA-223	Xq12	Bassa espressione in cellule con IGHV non mutata o ZAP-70 positivo	ND
miRNA-34a	1p36	Bassa espressione in cellule con delezione in 17p13 e/o p53 mutato	BCL2, SIRT1
miRNA-17	13q13	Bassa espressione in cellule con delezione in 17p13 e/o p53 mutato	E2F1, CDKN1A, P21
miRNA-21	17q23	Alta espressione in cellule con delezione in 17p13	BCL2
miRNA-106b	7q22	Si attiva in risposta all'inibizione dell'istone deacetilasi, facilitando l'apoptosi p-53 indipendente.	ITCH
miRNA-650	22q11	Alta espressione in cellule utilizzando la famiglia V λ per la catena leggera λ nella regione variabile delle immunoglobuline.	EBF3, ING4, CDK1
miRNA-15/16	13.14	Bassa espressione in cellule con delezione in 13p14; alta espressione in cellule con IGHV non mutata o ZAP-70 positivo; espressione regolata dall'acetilazione istonica.	CCND1, BCL2, p53

Tabella 2. microRNA deregolati nella LLC (92).

Date le informazioni finora acquisite, il nostro studio si è concentrato su due interessanti microRNA coinvolti nel processo di patogenesi della LLC: il miR-181b e il miR-34a.

2.4 Il microRNA181b

La famiglia del miR-181 è costituita dal miR-181a, miR-181b, miR-181c e miR-181d alcuni tra i primi microRNA identificati come specificamente espressi nelle cellule ematopoietiche (99). I geni umani del miR-181a e miR-181b costituiscono un *cluster* localizzato sul cromosoma 1 (miR-181a1 e miR-181b1) e uno sul cromosoma 9 (miR-181a2 e miR-181b2), mentre il cluster dei miR-181c e miR-

181d è localizzato sul cromosoma 19. I membri della famiglia miR-181 sono evolutivamente conservati in quasi tutti i vertebrati, suggerendo che questi microRNA svolgano funzioni rilevanti. Infatti, i dati finora ottenuti hanno dimostrato il ruolo fondamentale dei membri della famiglia del miR-181 nel regolare la normale differenziazione cellulare, soprattutto nelle cellule di origine ematopoietiche, comprese le cellule T, le cellule B, le cellule natural killer e megacariociti (86, 99). La famiglia del miR-181 è stata strettamente associata alla patogenesi e alla prognosi della leucemia mieloide acuta (AML). Inoltre, le informazioni finora acquisite indicano che miR-181 agisce da oncosoppressore nella patogenesi della AML e presenta un significativo impatto sulla sopravvivenza di pazienti con AML (100).

Pekarsky, inoltre ha stabilito che l'espressione di TCL1 è regolata dal miR-29 e dal miR-181, due microRNA differenzialmente espressi nella LLC. I livelli di espressione del miR-29 e del miR-181 in genere è risultata essere inversamente correlata con l'espressione di TCL1 nei campioni LLC (101).

L'attivazione dell'oncogene TCL1 è un evento fondamentale nella patogenesi della forma aggressiva di LLC. Questo oncogene è stato identificato originariamente nelle leucemie T prolinfocitiche, nelle quale appare iperespresso per effetto di inversioni e traslocazioni della regione 32.1 del cromosoma 14q. TCL1 è un promotore del pathway oncogenico PI3K- Akt, che attiva Akt, un'oncoproteina antiapoptotica, guidandola nella traslocazione nucleare dove provoca un aumento della proliferazione, inibizione dell'apoptosi e trasformazione maligna. Nel caso in cui fosse presente anche la delezione in 11q, TCL1 attiva anche il pathway NF- κ B, a causa dell'assenza dell'inibitore fisiologico di quest'ultimo, ATM, che comporta un difetto nell'apoptosi con conseguente aumento della sopravvivenza cellulare (102). Tali risultati suggeriscono che l'espressione di TCL1 nella LLC è, almeno in parte, regolata dal miR-29 e dal miR-181 e che questi microRNA possono essere dei buoni candidati come agenti terapeutici nei casi di LLC sovraespressanti TCL1.

2.5 Il microRNA34a

Il miR-34a ha suscitato un notevole interesse in quanto svolge un ruolo chiave, come oncosoppressore, in diversi tumori.

La famiglia del miR-34 comprende tre microRNA che sono codificati da due differenti geni: il miR-34a, localizzato sul cromosoma 1, è codificato da un proprio trascritto, mentre il miR-34b e il miR-34c, localizzati sul cromosoma 11, condividono lo stesso trascritto. La famiglia del miR-34 è altamente conservata tra

i vertebrati. Questi tre microRNA pur presentando diverse sequenze mature, hanno infatti le stesse sequenze *seed* e ciò potrebbe suggerire che tali microRNA possono avere gli stessi bersagli molecolari e quindi funzioni analoghe (103).

L'espressione del miR-34a può essere regolata mediante molteplici meccanismi: perdita genomica, modificazioni epigenetiche, fattori di trascrizione o da altre molecole. La perdita della regione cromosomica in cui è localizzato il gene del miR-34a è stata riscontrata in diversi tipi di tumori (104, 105), facendo supporre una sua potenziale azione oncosoppressoria.

Sebbene il meccanismo alla base della deregolazione del miR-34a nei tumori umani non è stato ancora pienamente compreso, molte evidenze suggeriscono che possa essere coinvolto anche un meccanismo epigenetico. L'ipermetilazione delle *CpG islands* nella regione promotrice del gene del miR-34a riscontrata in un varietà di tumori solidi, tra cui carcinoma della mammella, del polmone, del colon, del rene, della vescica e del pancreas infatti è risultata essere correlata all'inibizione dell'espressione del miR-34a (106).

Un altro importante regolatore dell'espressione del miR-34a è il fattore di trascrizione p53 (107). La proteina p53 regola molteplici pathway cellulari in risposta a stress genotossico e recenti studi hanno dimostrato che la sovraespressione del miR-34a è p53 dipendente in cellule umane e murine in seguito a danno al DNA. La sovraespressione del miR-34a induce apoptosi, arresto del ciclo cellulare e senescenza (108-110). Infatti, approcci bioinformatici e validazioni sperimentazioni hanno permesso l'identificazione di diversi mRNA bersaglio del miR-34a. La maggior parte di essi codificano fattori necessari per la transizione G1 / S nel ciclo cellulare (c-MYC, E2F, CDK4, CDK6), proteine anti-apoptotico (Bcl2, SIRT1) e proteine coinvolte nell'invasione (c-MET) (111).

Inoltre, il miR-34a è in grado di influenzare negativamente la vitalità delle cellule staminali tumorali e inibire la formazioni di metastasi (112, 113), promuovere la loro sensibilità alla chemio e radioterapia (103).

Infine differenti studi hanno rivelato la potenziale azione oncosoppressoria del miR-34a in diversi tipi di tumori, tra cui leucemie, epatocarcinoma, glioblastoma, carcinoma del pancreas, del polmone e del colon (114).

In particolare nella LLC sono stati riscontrati variabili livelli di espressione del miR-34a e ulteriori analisi hanno confermato che l'espressione di tale microRNA è parzialmente correlata con lo stato di p53; in pazienti con p53 mutato o del17p, corrispondenti alla forma più aggressiva di LLC, in generale presentano un

espressione più bassa del miR-34a. Inoltre, studi successivi hanno mostrato l'esistenza di una forte correlazione tra bassi livelli di miR-34a e l'alterata risposta al danno al DNA, all'apoptosi e cosa più importante la correlazione con malattia refrattaria alla fludarabina anche in assenza di delezione 17p (97, 115). Tali risultati suggeriscono che il miR-34a può svolgere un importante ruolo nella risposta al danno al DNA quindi nella terapia della LLC.

Tutte queste informazioni indicano che l'azione oncosoppressoria del miR-34a, rappresenta una significativa scoperta per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Sebbene l'azione oncosoppressoria del miR-34a sia ben confermata, topi KO per il miR-34a non sviluppano tumori, quindi la funzione oncosoppressoria del miR-34a, potrebbe essere limitata a determinati tessuti e cooperare con lesioni oncogenetiche specifiche (116).

2.6 microRNA come agenti/bersagli terapeutici

Il coinvolgimento e il ruolo dei microRNA in diverse patologie umane sta emergendo sempre più, indirizzando i nuovi studi a valutare il loro potenziale utilizzo come agenti terapeutici.

Uno dei principali vantaggi di una terapia basata sull'utilizzo dei microRNA consiste nel fatto che i microRNA sono in grado di regolare simultaneamente più pathway cellulari e ciò li rende farmaci adatti al trattamento di patologie complesse come il cancro che in genere sono associate all'alterazione di diverse vie del segnale (114).

In generale, la sovraespressione di un microRNA è ottenuta attraverso la somministrazione di oligonucleotidi sintetici microRNA specifici o la somministrazione di vettori esprimenti il microRNA di interesse. L'inibizione di un microRNA invece è ottenuta attraverso la somministrazione di un oligonucleotide anti-senso.

Il miR-122, un microRNA fegato specifico, è stato il primo microRNA utilizzato come bersaglio terapeutico. Attualmente tale molecola, nota come *Miravirsen* *SPC3649*, è in uso in uno studio clinico di fase II per il trattamento dell'infezione del virus dell'epatite C (HCV infection). In questo studio il trattamento con un oligonucleotide LNA anti-miR-122 è stato ben tollerato e ha mostrato un'attività antivirale a lungo termine (117).

Recentemente un nuovo composto, denominato MRX34, mimante l'azione del miR-34 è investigato nella sperimentazione clinica Reg. N. NCT01829971. La molecola MRX34 è un oligonucleotide a doppio filamento specifico per il miR-34

incapsulato in nanoparticelle liposomiali realizzate con lipidi anfoteri, evitando in tal modo interazioni indesiderate con le membrane cellulari grazie al suo carattere leggermente anionico nei biofluidi normali e rafforzando nel contempo la veicolazione nelle aree tumorali a causa del suo carattere cationico in ambienti a pH acido. Studi preliminari hanno dimostrato la sicurezza di tale composto in pazienti con epatocarcinoma in stadio avanzato o con altri tumori solidi con metastasi epatiche (118).

Sebbene inizialmente questi studi sono volti a valutare la sicurezza, la farmacocinetica e la farmacodinamica delle molecole veicolate, essi mettono in luce anche le principali sfide da affrontare nello sviluppo di un approccio terapeutico basato sui microRNA: 1) il sistema di veicolazione e 2) i potenziali effetti su bersagli non specifici.

La veicolazione tessuto-specifica e l'assorbimento cellulare di quantità sufficiente di oligonucleotidi sintetici per ottenere un'efficace inibizione del bersaglio molecolare è uno dei principali problemi da affrontare (114).

In conclusione, l'utilizzo dei microRNA come agenti o bersagli terapeutici risulta essere molto promettente; tuttavia occorre imparare ancora molto su questo nuovo approccio terapeutico per ottimizzare le applicazioni future.

3.MODELLO MURINO DI LLC

3.1 Topo transgenico E μ -TCL-1

Modelli murini che riproducono le neoplasie umane sono strumenti preziosi per comprendere maggiormente i meccanismi patogenetici alla base di tali neoplasie e sono essenziali per gli studi preclinici. Alcuni modelli murini sono stati modificati geneticamente in modo tale da riprodurre le alterazioni genetiche e le deregolazioni nell'espressione genica che si riscontrano nella LLC.

Tuttavia l'utilità di tali modelli nello studio della leucemia umana può essere potenzialmente ostacolato dalle differenze biologiche specie-specifiche che si riscontrano nella cellula leucemica. Ad oggi, lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento della LLC è stato limitato dalla mancanza di un modello animale adatto a valutare adeguatamente le proprietà farmacologiche rilevanti per l'applicazione clinica (119).

Recentemente Pekarsky ha sviluppato un modello murino, E μ -TCL-1, esprime il gene umano TCL1 e sviluppante una forma aggressiva di leucemia cronica a cellule B CD5+ che potrebbe essere utile per tali applicazioni. Ulteriori studi infatti suggeriscono che tale modello murino ha proprietà cliniche e risposte terapeutiche simili a quelle riscontrate nella LLC umana e quindi potrebbe costituire un utile strumento *in vivo* per lo screening di nuovi farmaci per il trattamento della LLC (120).

Inizialmente tale modello è stato generato per comprendere il ruolo di TCL1 nei linfociti B maligni, ponendo il gene umano TCL1 sotto il controllo del promotore delle immunoglobuline VH e dell'enhancer IgH-E μ (*E μ -TCL1 transgenic mice*). In età adulta questo modello sviluppa un'espansione clonale di linfociti B CD5+ nel sangue periferico, nella milza e nei linfonodi. I linfociti leucemici dei topi transgenici TCL-1 sono arrestati nella fase G0-1 del ciclo cellulare, sono cellule clonali ed esprimono CD19+ / CD5+ / IgM+, come osservato anche nella LLC umana (121). Dato che l'espressione di TCL1 è regolata dai microRNA, come il miRNA-29 e il miRNA-181, che ne bersagliano la regione 3'UTR, è stato creato un secondo modello murino transgenico E μ -TCL1 Full Length (E μ -TCL1 FL). Questo modello esprime anche esso il gene umano TCL1 nei linfociti B sotto il controllo del promotore delle immunoglobuline VH e dall'enhancer IgH-E μ , ed include oltre alla regione 5' UTR, anche la regione 3' UTR di TCL1. *In vivo* questo modello da un'espansione clonale di linfociti B CD5+/CD23+ che si accumulano nel sangue periferico, nella milza e nei linfonodi (122). Entrambi i modelli murini E μ -TCL1 e

E μ -TCL1 FL mostrano un'importante similarità biologica con la malattia umana e per tale motivo il modello E μ -TCL1 FL è stato utilizzato nei nostri studi.

Tuttavia sono stati sviluppati altri modelli murini sulla base dei pathway coinvolti nella LLC e in particolare sulla base dei microRNA deregolati. Tutti questi modelli sono caratterizzati da una diversa penetranza della malattia, dei tempi di comparsa delle cellule leucemiche circolanti; alcuni di questi modelli sono elencati nella tabella sottostante:

Mouse model	Disease penetrance	Time of appearance of circulating leukemic cells	Age of death	IG gene rearrangements
<i>mir-15a/16-1</i> ^{-/-} and <i>mir-15a/16-1</i> ^{flxed} CD19-Cre	~20% CLL ~8% MBL ~2% CD5 ⁻ NHL	12-18 mo	15-18 mo	Unmutated and stereotypic IGHV genes
14qC3-MDR ^{-/-} and MDR ^{flxed} CD19-Cre	~22% CLL ~12% MBL ~6% CD5 ⁻ NHL	6-18 mo	12-18 mo	Unmutated and stereotypic IGHV genes
14qC3-CDF ^{flxed} CD19-Cre	~50% CLL ~3% MBL	6-18 mo	12-18 mo	Unmutated and stereotypic IGHV genes
E μ -TCL1 tg	100% CLL	6 mo	12-18 mo	Unmutated IGHV genes, stereotypic IGHV and IGLV genes
APRIL tg	40% CLL	Not analyzed	12 to >15 mo	Not analyzed
BCL2 \times <i>traf2dn</i> tg	80% CLL	9-15 mo	>80% dead at 14 mo	Clonal IGHV rearrangements
ROR1 tg	5% CLL	>15 mo	>15 mo	Clonal IGHV rearrangements
E μ - <i>mir-29</i> tg	20% CLL	12-24 mo	24-26 mo	Clonal IGHV rearrangements
Vh11 \times <i>irf4</i> ^{-/-}	100% CLL (preceded by MBL in >40% cases)	5-10 mo	>9 mo	Clonal IGHV rearrangements (determined by FACS)
IgH.TE μ	100% CLL	<5 mo	Killed at 2-10 mo	Unmutated IGHV genes (preferentially Vh11) and some highly mutated

Tabella 3. Modelli murini di LLC (119).

SCOPO della TESI

Nonostante i notevoli progressi, la leucemia linfatica cronica rimane una malattia incurabile. Molteplici evidenze hanno ormai confermato il coinvolgimento dei microRNA nella patogenesi di tale leucemia.

Particolarmente interessante è risultata essere la deregolazione di due microRNA, il miR-181b e il miR-34a generalmente sottoespressi nella LLC e coinvolti nella regolazione di molteplici vie del segnale. Essendo la LLC una malattia complessa, è plausibile che una terapia diretta in modo selettivo contro molteplici vie del segnale deregolate possa apportare benefici al paziente in termini di controllo della malattia.

La capacità dei microRNA di regolare contemporaneamente molteplici bersagli molecolari, li rende potenzialmente degli attraenti agenti terapeutici.

Lo scopo di questo progetto di ricerca è porre le basi per lo sviluppo di un nuovo approccio terapeutico contro la LLC basato sull'utilizzo dei microRNA.

In particolare il nostro studio è incentrato su studi pre-clinici, condotti su un modello murino di LLC, volti ad analizzare microRNA deregolati nella LLC, le vie del segnale in cui sono coinvolti e i loro bersagli ma soprattutto a valutare il loro potenziale effetto terapeutico.

MATERIALI e METODI

4.1 Linee Cellulari e Colture primarie

Le linee cellulari umane di cellule B esprimenti il gene TCL1: DAUDI, 697, RAJI ed EHEB sono state mantenute in coltura in terreno RPMI 1640 supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), l'1% di L-glutammina e l'1% di antibiotico penicillina/streptomicina come raccomandato dalle aziende fornitrici ATCC e DSMZ. Le colture primarie di splenociti murini, invece, sono state isolate dalla milza di topi transgenici E μ -TCL-1FL malati seguendo la seguente procedura: la milza in seguito all'espanto è stata posta in tampone fosfato salino (PBS) freddo. La disaggregazione dei tessuti è stata ottenuta mediante azione meccanica esercitata sfregando la milza tra due vetrini sterili in PBS; la sospensione cellulare così ottenuta è stata raccolta e lasciata decantare per tre minuti in ghiaccio separando in tal modo eventuali residui di tessuto. La sospensione cellulare decantata è stata trasferita in un nuovo tubo da 50 ml ed è stata centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti a 4°C; in seguito gli eritrociti sono stati rimossi mediante degradazione con ammonio cloruro. I globuli bianchi sono stati lavati con PBS e filtrati mediante l'utilizzo di un filtro da 70 μ m e infine le cellule sono state contate. In base all'esperimento finale gli splenociti leucemici così ottenuti sono stati o congelati in FBS con l'aggiunta del 5% di DMSO o messi immediatamente in coltura o ulteriormente purificati utilizzando biglie magnetiche coniugate con anticorpo specifico per B220 in accordo con le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (Invitrogen, Carlsbad CA USA). Gli splenociti leucemici murini, seminati direttamente in piastre da 48 pozzetti per esperimenti di transfezione, sono stati coltivati in terreno RPMI 1640 supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), l'1% di L-glutammina e l'1% di antibiotico penicillina/streptomicina, 10mM HEPES e 1mM di sodio piruvato.

4.2 Transfezione

Le linee cellulari umane e gli splenociti leucemici murini sono stati transfettati, in base ai vari esperimenti, con 100nM di pre-miR-181b (Ambion) o con 100nM di oligonucleotide a singolo filamento specifici per i microRNA (mimic) appartenenti alla famiglia del miR-181, miR-29 o specifici per il miR-34a, per un oligonucleotide usato come controllo negativo (IDT), o con oligonucleotide antisenso anti-miR-181 o con 20nM di siRNA anti-TCL1 (Dharmacon) diluiti in terreno privo di siero Opti-MEM (Gibco). La transfezione è stata eseguita con l'ausilio del reagente

INTERFERin (Polyplus), in accordo con le indicazioni della ditta produttrice. Dopo 72 ore dalla transfezione le cellule sono state raccolte per eseguire l'estrazione delle proteine, dell'RNA e saggi di vitalità e apoptosi.

4.3 Western Blot

L'analisi di Western Blot, nel nostro studio, è stata applicata per valutare l'espressione di diverse proteine nelle linee cellulari umane e negli splenociti murini tumorali dopo 72 ore dalla transfezione con pre-miR, mimic, oligonucleotidi anti-miR, oligonucleotidi di controllo e siRNA ma anche negli splenociti murini tumorali dopo 48 ore dal trattamento *in vivo* con oligonucleotidi a singolo filamento specifici per il miR-34a. In tutti i campioni, le proteine sono state isolate mediante RIPA buffer (Radio-Immunoprecipitation Assay, Sigma-Aldrich), supplementato con inibitori delle proteasi e inibitori delle fosfatasi (Sigma-Aldrich) in accordo con il protocollo del produttore. Gli anticorpi utilizzati e le loro specifiche sono stati riportati nella tabella sottostante:

Anticorpo	Ditta	Numero catalogo
anti-human TCL1	Areta International	27D6
Akt	Cell Signaling Technology	cat. 9272
phospho-Akt	Cell Signaling Technology	cat. 4058
ERK	Cell Signaling Technology	cat. 9102
phospho-ERK	Cell Signaling Technology	cat. 9101
Bcl-2	Cell Signaling Technology	cat. 3498
Mcl-1	Cell Signaling Technology	cat. 5453
phospho-Bad	Cell Signaling Technology	cat. 9295
PARP	Novus Biologicals	cat. NB100-111
Caspase-9	Neo Markers	cat. RB1205P1
IkB α	Santa Cruz Biotechnology	cat. sc-371
anti- Cdk6	Santa Cruz Biotechnology	cat. sc-177
anti-Tubulin	Santa Cruz Biotechnology	cat. sc-9104
anti-Mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	cat. sc-2005
anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	cat. Sc-2030
Tabella 4. Anticorpi per WB analisi.		

Per la rivelazione del segnale abbiamo utilizzato due tipologie di substrato chemiluminescenti aventi diversi gradi di sensibilità Pierce ECL plus e Super Signal West Femto (Thermo scientific). L'espressione delle proteine è stata quantificata mediante scansione densitometrica delle bande (GS-710, Bio-Rad) e l'analisi è stata eseguita con l'ausilio del software Quantity One (Bio-Rad).

4.4. Saggi di Vitalità e Apoptosi

I saggi di vitalità e apoptosi sono stati condotti mediante analisi citofluorimetrica eseguita con FACSCalibur (BD Bioscience), utilizzando il software CellQuestPro (BD Bioscience).

Nel dettaglio, per il saggio apoptotico mediante FACS la marcatura delle cellule è stata eseguita nel seguente modo: dopo 72 ore dalla transfezione le cellule sono state incubate 15 minuti con anticorpo FITC-anti-mouse CD5 (BD Bioscience) poi lavate e risospese in 100 μ l di PBS contenenti 1.25 μ l di Annessina V (Ax) coniugata con APC (eBioscience) e incubate 15 minuti al buio; successivamente abbiamo aggiunto alle cellule 500 μ l di PBS e 2 μ g/ml di propidio ioduro (PI) (Sigma). La marcatura con l'anticorpo CD5 è stata effettuata solo sugli splenociti murini e soltanto le cellule risultate CD5dim sono state considerate leucemiche e riportate nell'analisi AnnessinaV/PI. Le cellule positive per AnnessinaV e negative per propidio ioduro (Ax+/PI-) sono state definite in fase precoce di apoptosi, quelle positive per entrambi le marcature (Ax+/PI+) cellule apoptotiche in fase tardiva e quelle doppiamente negative (Ax-/PI-) cellule vive.

I saggi di vitalità e apoptosi eseguiti, invece, sugli splenociti di topo dopo un breve trattamento *in vivo* con mimic specifici per diversi microRNA o anti-microRNA sono stati effettuati utilizzando un nuovo dispositivo messo a disposizione nel nostro laboratorio il Muse® Cell Analyzer (Millipore). Tale strumento è dotato di un sistema di rilevamento della fluorescenza miniaturizzato e di una tecnologia basata su un microcapillare che consente un'analisi quantitativa accurata e precisa delle cellule paragonabile ad altri sistemi citofluorimetrici. In particolare la vitalità è stata valutata mediante Muse® Count & Viability Assay Kit (Millipore Cat. No. MCH100102) che ci permette di distinguere cellule vitali e non grazie alla diversa permeabilità di due sonde leganti il DNA presenti nei reagenti; mentre per rilevare le cellule nei vari stadi di apoptosi abbiamo utilizzato Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit (Millipore Cat. No. MCH100105). Tale saggio si basa sul legame di annessina V, marcato con un fluoroforo, alla fosfatidilserina (PS). All'inizio del processo apoptotico, le molecole di PS si trasferiscono sulla superficie

esterna della membrana cellulare. Annessina V viene utilizzata per rilevare la PS sulla membrana esterna delle cellule apoptotiche mentre la sonda 7-AAD, la quale è esclusa dalla cellule vive e sane, permea nelle cellule apoptotiche in fase avanzata e nelle cellule morte.

4.5 Modello murino di LLC e trapianto singenico

Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato come modello murino di LLC il topo transgenico E μ -TCL1-FL; esso è stato generato mediante un costrutto contenente il cDNA del gene umano TCL1 sotto il controllo del promotore IgV_H specifico delle cellule B e dell'*enhancer* Ig_H-E μ (E μ -TCL1), come già descritto precedentemente (122). Una coppia di topi transgenici è stata generosamente offerta dal laboratorio del Prof. C.M. Croce; i topi FVB wild type invece sono stati acquistati presso Charles River Laboratories. Gli animali sono stati utilizzati nella sperimentazione seguendo le direttive nazionali ed europee riguardanti la sperimentazione animale (2010/63/EU), hanno avuto libero accesso a cibo e acqua, lo stabulario ha mantenuto una temperatura costante a 23°C con un ciclo giorno/notte di 12 ore ciascuno. All'età di 6 settimane i topi FVB wild type sono stati sottoposti a trapianto singenico mediante iniezione intraperitoneale (IP) di 5x10⁵ splenociti tumorali isolati da topi transgenici E μ -TCL1-FL adulti con leucemia conclamata (fig.3). L'attecchimento delle cellule leucemiche e la progressione della malattia è stato monitorato nel tempo mediante analisi citofluorimetrica (FACS) o PCR quantitativa specifica per il gene umano TCL1.

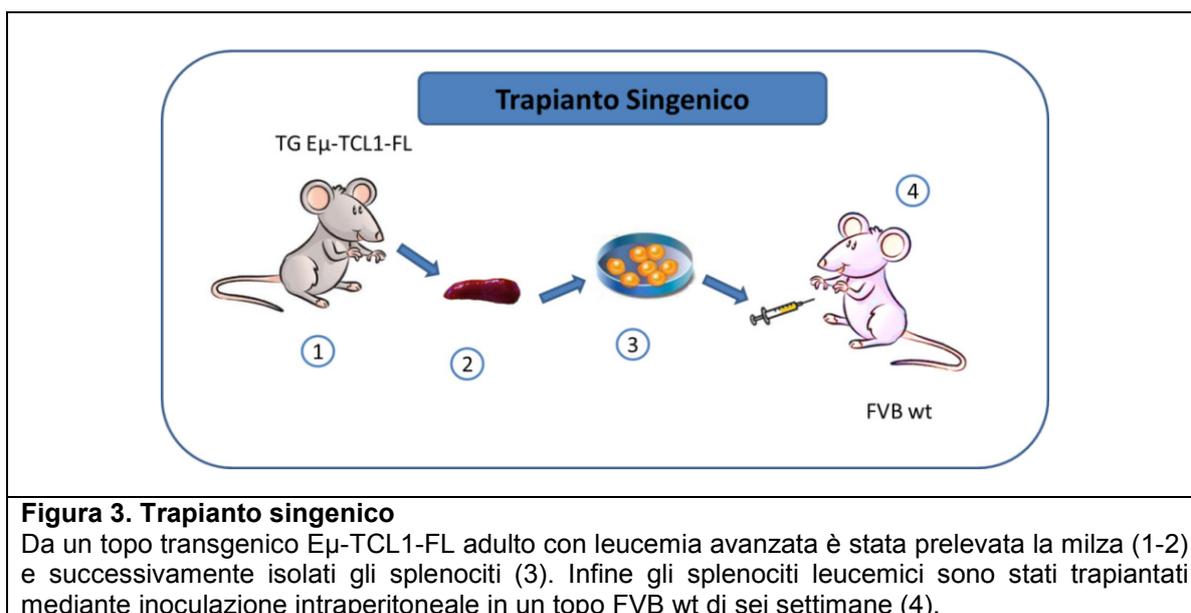


Figura 3. Trapianto singenico

Da un topo transgenico E μ -TCL1-FL adulto con leucemia avanzata è stata prelevata la milza (1-2) e successivamente isolati gli splenociti (3). Infine gli splenociti leucemici sono stati trapiantati mediante inoculazione intraperitoneale in un topo FVB wt di sei settimane (4).

4.6 Analisi Citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica eseguita con FACSCalibur (BD Bioscience), utilizzando il software CellQuestPro (BD Bioscience) è stata utilizzata anche per selezionare le cellule leucemiche murine, per monitorare la progressione della leucemia oltre che per eseguire saggi apoptotici.

L'analisi immunofenotipica delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) è stata eseguita nel seguente modo: un campione di sangue è stato prelevato dall'*orbital sinus* di topi anestetizzati (sia transgenici che trapiantati) e raccolto in tubi contenenti EDTA 0.5M, utilizzato come anticoagulante. Gli eritrociti sono stati degradati utilizzando ammonio cloruro allo 0.8% in EDTA 0.1mM (Sigma). Le PBMC sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo anti-mouse CD5 coniugato con FITC e con un anticorpo anti-mouse specifico per il marcatore di superficie B220 coniugato con PeCY5 (BD Bioscience), lavate e analizzate. I linfociti sono stati riconosciuti in base a parametri fisici e in base alla positività ai marcatori di superficie B220/CD5. Le cellule presentanti la marcatura B220+/CD5dim (regione R2) sono state definite cellule Leucemiche, quelle B220+/CD5- (regione R4) linfociti B normali e infine le cellule risultate essere B220-/CD5+ sono riconosciute come linfociti T (regione R3). La progressione della leucemia è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica in termini di espansione leucemica (EL) intesa come rapporto tra il numero di cellule leucemiche e il numero di linfociti totali ($EL=R2/R2+R3+R4$) monitorata nel tempo.

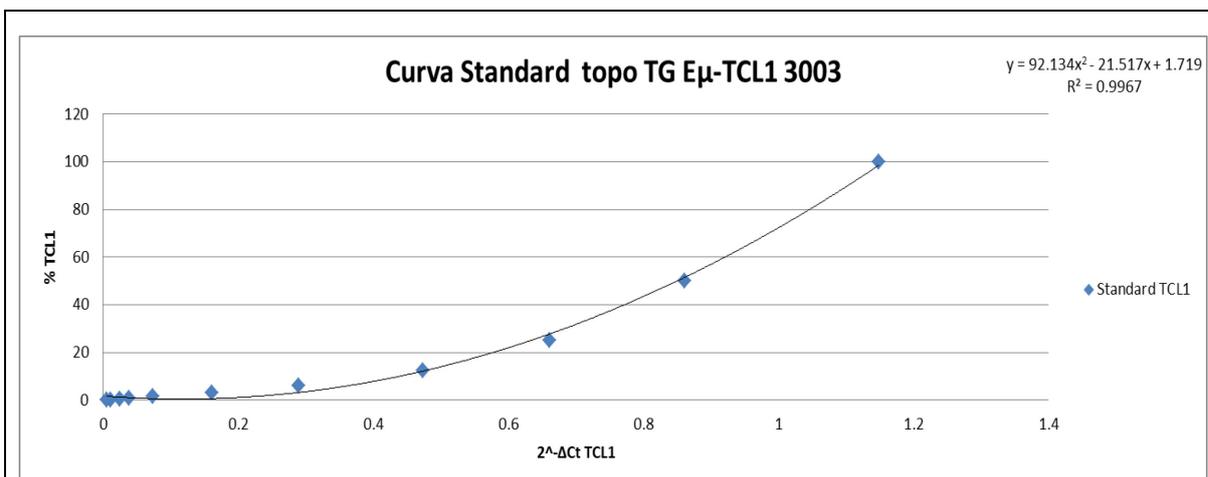
Inoltre, per determinare l'origine del clone leucemico le PBMC isolate da topi FVB trapiantati, dopo incubazione con anticorpi anti-mouse B220 e CD5, sono state marcate per 1 ora anche con l'anticorpo anti-human Tc11 coniugato con APC (eBioscience) diluito in una soluzione di permeabilizzazione contenente lo 0.1% di saponina e successivamente lavate e analizzate. In questa tipologia di campione le cellule presentanti il transgene hTCL1, sono risultate essere tutte B220+/CD5dim rispetto alla popolazione totale e riportate nei nostri grafici nella regione R2.

4.7 Real-time PCR

L'espressione del miR-181 e del miR-34a nei differenti campioni, analizzati in questa tesi, è stata quantificata mediante RT-Real Time PCR basandoci sulla tecnologia Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). I geni endogeni utilizzati come riferimento per la normalizzazione dei dati

sono: U6 nelle linee umane e SNO412 nelle cellule murine. La reazione di retrotrascrizione è stata eseguita a partire da 5 ng di RNA totale. La Real-Time PCR è stata effettuata seguendo il protocollo Taqman MicroRNA Assay indicato dalla ditta produttrice e utilizzando come sistema di rivelazione CFX Connect Real Time System (Biorad).

La PCR quantitativa è stata utilizzata anche come metodica alternativa all'analisi immunofenotipica per monitorare la progressione della leucemia nei topi FVB trapiantati con splenociti leucemici di topi transgenici E μ -TCL1-FL. Per raggiungere tale obiettivo è stato messo a punto un sistema che prevede la quantificazione del gene umano TCL1 (hTCL1) a partire da DNA genomico estratto da sangue periferico di topi FVB trapiantati nel tempo mediante Real-Time PCR, utilizzando KAPA SYBR FAST Biorad iCycler qPCR kit (KAPA Biosystem,USA) e primers specifici per il gene umano TCL1 (Forward 5'-GCTCTGGCTCTTGCTTCTTAGGC-3' Reverse 5'-CGCAAGAGCACCCGTAAGTAACTGTAAC-3') e primers specifici per il gene murino GAPDH, utilizzato come normalizzatore endogeno (Forward 5'-CCACCCAGAAGACTGTGGAT-3'/ Reverse 5'-CCCAGCTCTCCCCATACATA-3'). La reazione di PCR è stata effettuata alle seguenti condizioni: 95°C per 3 minuti seguiti da 40 cicli per 3 secondi a 95°C, 30 secondi a 58°C e infine 30 secondi a 72°C. I dati ottenuti corrispondenti al Δ Ct normalizzato sul gene di riferimento GAPDH sono stati infine interpolati su una curva standard per determinare la percentuale di cellule positive per il gene hTCL1. La curva standard è stata ottenuta analizzando mediante PCR quantitativa specifica per il gene TCL1 e GAPDH, 50ng di gDNA del topo transgenico E μ -TCL1-FL utilizzato per il trapianto singenico e diluizioni scalari di gDNA di topo WT unito a gDNA di topo transgenico E μ -TCL1-FL in modo tale da analizzare costantemente 50ng di gDNA totali. In tale curva il 100% di cellule positive per hTCL1 è determinato dal Δ Ct acquisito dal campione costituito unicamente dal gDNA di E μ -TCL1, mentre lo 0% dal campione di gDNA di topo WT come riportato in figura 4.



	% gDNA TG	% gDNA WT
Standard 1	100	0
Standard 2	50	50
Standard 3	25	75
Standard 4	12.5	87.5
Standard 5	6.2	93.8
Standard 6	3.1	96.9
Standard 7	1.5	98.5
Standard 8	0.8	99.2
Standard 9	0.4	99.6
Standard 10	0.2	99.8
Standard 11	0.1	99.9
Standard 12	0	100

Figura 4. Curva standard per il gene TCL1

Curva standard ottenuta mediante PCR quantitativa specifica per il gene TCL1 e GADPH, eseguita su 50ng di gDNA del topo transgeico E μ -TCL1-FL utilizzato per il trapianto singenico e diluizioni scalari di gDNA di topo FVB WT unito a gDNA di topo transgenico E μ -TCL1-FL in modo tale da analizzare costantemente 50ng di gDNA totali. In tale curva il 100% di cellule positive per hTCL1 è definito dal Δ Ct del campione costituito unicamente dal gDNA di E μ -TCL1-FL, mentre lo 0% dal campione di gDNA di topo WT. Sull'asse delle x è riportato il $2^{-\Delta$ Ct di TCL1, sull'asse delle y la percentuale di TCL1. In tabella è riportata la composizione degli standard in termini di percentuale di gDNA transgenico o wild type analizzato.

4.8 Trattamenti *in vivo* con microRNA o anti-microRNA

Come accennato precedentemente nei topi FVB trapiantati l'espansione leucemica è stata monitorata mediante saggi immunofenotipici e/o PCR quantitativa per il gene hTCL1 nelle cellule mononucleate del sangue periferico ogni 2-3 settimane.

I topi FVB trapiantati presentati una leucemia conclamata, con più del 30% delle cellule del sangue periferico risultate essere hTCL1 positive, sono stati utilizzati per esperimenti volti a valutare gli effetti esercitati, a breve termine, da microRNA/anti-microRNA sulla vitalità e apoptosi delle cellule leucemiche. I topi invece presentati un livello più basso di malattia (7-20% di cellule del sangue periferico positive per hTCL1) sono stati utilizzati per andare a valutare gli effetti a lungo termine del miR-181b e del miR-34a sulla progressione della leucemia e sopravvivenza. Per entrambi le tipologie di trattamento lungo/breve termine, la veicolazione di oligonucleotidi specifici per microRNA o anti-microRNA (Axolabs, Germany) *in vivo* è stata attuata mediante l'utilizzo di *in vivo-jetPEI*® (Polyplus-Transfection SA, France), un polimero cationico a base di polietilenimina lineare in grado di veicolare efficacemente acidi nucleici in diversi tessuti utilizzando diverse vie di somministrazione. Le quantità di oligonucleotide da somministrare è stata determinata in base al modello animale, la via di somministrazione e le varie raccomandazioni riportate nel protocollo "*in vivo-jetPEI*® DNA & siRNA Delivery Protocol" della ditta produttrice.

Per gli esperimenti a breve termine, i topi FVB trapiantati sono stati trattati con 100 µg di microRNA/anti-microRNA e sacrificati dopo 24h; per gli esperimenti a lungo termine, invece, i topi sono stati trattati con 80 µg di miR-181b o miR-34a o oligonucleotide di controllo due volte a settimana per tre settimane, per un totale di 6 iniezioni intraperitoneali (IP). Prima e a termine del trattamento è stato prelevato un campione di sangue periferico per valutare l'espansione delle cellule leucemiche e calcolare il rapporto tra i topi sottoposti a trattamento e i controlli.

Per quanto concerne lo studio degli effetti dei microRNA sulla sopravvivenza, il termine dell'esperimento è stato raggiunto quando i topi sono stati sacrificati poco prima della comparsa dei segni clinici, come la perdita di peso, l'interferenza con la locomozione, funzioni fisiologiche vitali, apatia o morte.

4.9 Estrazione degli acidi nucleici

L'RNA è stato estratto direttamente dalle linee cellulari umane e murine mediante Trizol seguendo le indicazioni della ditta produttrice (Invitrogen). Tuttavia l'estrazione del RNA dai linfociti murini, non è stata eseguita su sangue intero ma ha previsto prima l'isolamento dei linfociti dal sangue periferico mediante Lympholyte-M (CEDARLANE) secondo il protocollo fornito. L'estrazione del DNA genomico (gDNA) invece è stato eseguito da sangue intero o splenociti mediante l'utilizzo di QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) in accordo con le linee guida.

RISULTATI

Per poter sviluppare nuovi approcci terapeutici per la LLC basati sull'utilizzo di microRNA occorre:

- *individuare i microRNA deregolati nella LLC che potrebbero contribuire alla patogenesi molecolare di tale leucemia*
- *identificare i loro bersagli molecolari, per comprendere maggiormente in base ad essi quale/quali microRNA potrebbero in maggior misura contribuire all'insorgenza, progressione della LLC e influenzare la risposta al trattamento*
- *infine, validare mediante esperimenti in vitro e in vivo i loro effetti a livello cellulare e molecolare in modo tale da poter valutare il loro potenziale utilizzo come nuovi agenti/bersagli terapeutici.*

In un nostro recente lavoro (123), i cui risultati non verranno ampiamente discussi in tale tesi, abbiamo analizzato l'espressione di 723 microRNA in 217 casi di LLC e in varie sottopopolazioni di cellule B normali localizzate in diversi distretti dalle tonsille al sangue periferico. Grazie a tale studio abbiamo ottenuto nuove informazioni sui microRNA differenzialmente espressi nella LLC e in vari sottotipi di cellule B normali, con implicazioni anche sull'origine cellulare della leucemia. In particolare, il nostro studio ha identificato una serie di microRNA deregolati nella LLC (ad esempio miR-26a, miR-532-3p, miR-146-5p and miR-29c) che potrebbero svolgere un ruolo patogenetico e promuovere la progressione della malattia ed essere utilizzati per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sui microRNA.*

In seguito ai risultati ottenuti in questo studio, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su due interessanti microRNA:

- *il miR-181b, noto regolatore del gene TCL1*
- *il miR-34a, microRNA regolato dal gene p53*

5.1 Il miR-181b regola negativamente l'espressione dell'oncogene TCL-1 in cellule B

Studi precedenti hanno dimostrato che la sovraespressione del gene TCL-1 è correlata con un fenotipo aggressivo di LLC e in special modo con i casi presentanti la delezione 11q, stato non mutato delle IgVH e positività a ZAP70 (101, 124). Pekarsky (101), in particolare, ha sperimentato che il miR-29b e il miR-

181b potrebbero inibire specificatamente la proteina TCL-1 nella linea cellulare 293.

Il nostro primo obiettivo è stato valutare se il miR-181b e il miR-29b potessero ridurre l'espressione della proteina TCL1 in linee di cellule B tumorali umane quali Raji, DAUDI e 697, tutte caratterizzate da alti livelli di espressione endogena di TCL-1(125, 126). Inizialmente, abbiamo esteso questa prima analisi ad altri membri delle famiglie del miR-181 e del miR-29 (miR-181a, miR-181c, miR-29a e miR-29c). Tre esperimenti indipendenti sono stati eseguiti per ciascuna linea cellulare. Le cellule sono state transfettate con 100nM di oligonucleotidi a singolo filamento specifici per ciascun microRNA e dopo 72 ore i livelli della proteina TCL1 sono stati valutati mediante Western blot analisi. Le cellule transfettate con un oligonucleotide di controllo negativo (neg ctrl) sono state utilizzate come riferimento per la normalizzazione dei dati. Sebbene vi siano alcune differenze, abbiamo osservato una tendenza analoga di inibizione della proteina TCL-1 per ogni microRNA in tutte e tre le linee cellulari. In figura 5 abbiamo riportato un'immagine rappresentativa dei vari western blot eseguiti e i valori densitometrici medi delle bande ottenute da tutti gli esperimenti effettuati nelle diverse linee cellulari. I dati indicano che il miR-181b è un costante inibitore dell'espressione della proteina TCL-1, portando nelle varie linee cellulari ad una riduzione dei livelli di tale proteina di circa il 50% rispetto ai rispettivi controlli. L'analisi degli altri microRNA ha mostrato che anche il miR-181c è un forte modulatore di TCL-1 mentre, il miR-181a potrebbe regolare negativamente TCL1 in misura minore. Al contrario, i membri della famiglia del miR-29 hanno presentato un effetto debole o addirittura trascurabile, solo il miR-29b sembra in grado di indurre una lieve diminuzione della proteina TCL1 (Fig.5).

Per confermare ulteriormente l'effetto specifico del miR-181b nell'inibire l'espressione della proteina TCL1, la linea cellulare DAUDI è stata transfettata con un oligonucleotide anti-miR-181b. In seguito a tale transfezione abbiamo constatato un incremento di TCL1 a livello proteico (p value <0.05) (fig.5D). Questi risultati iniziali ci confermano che il miR-181b può essere considerato un buon regolatore dell'espressione dell'oncogene TCL-1.

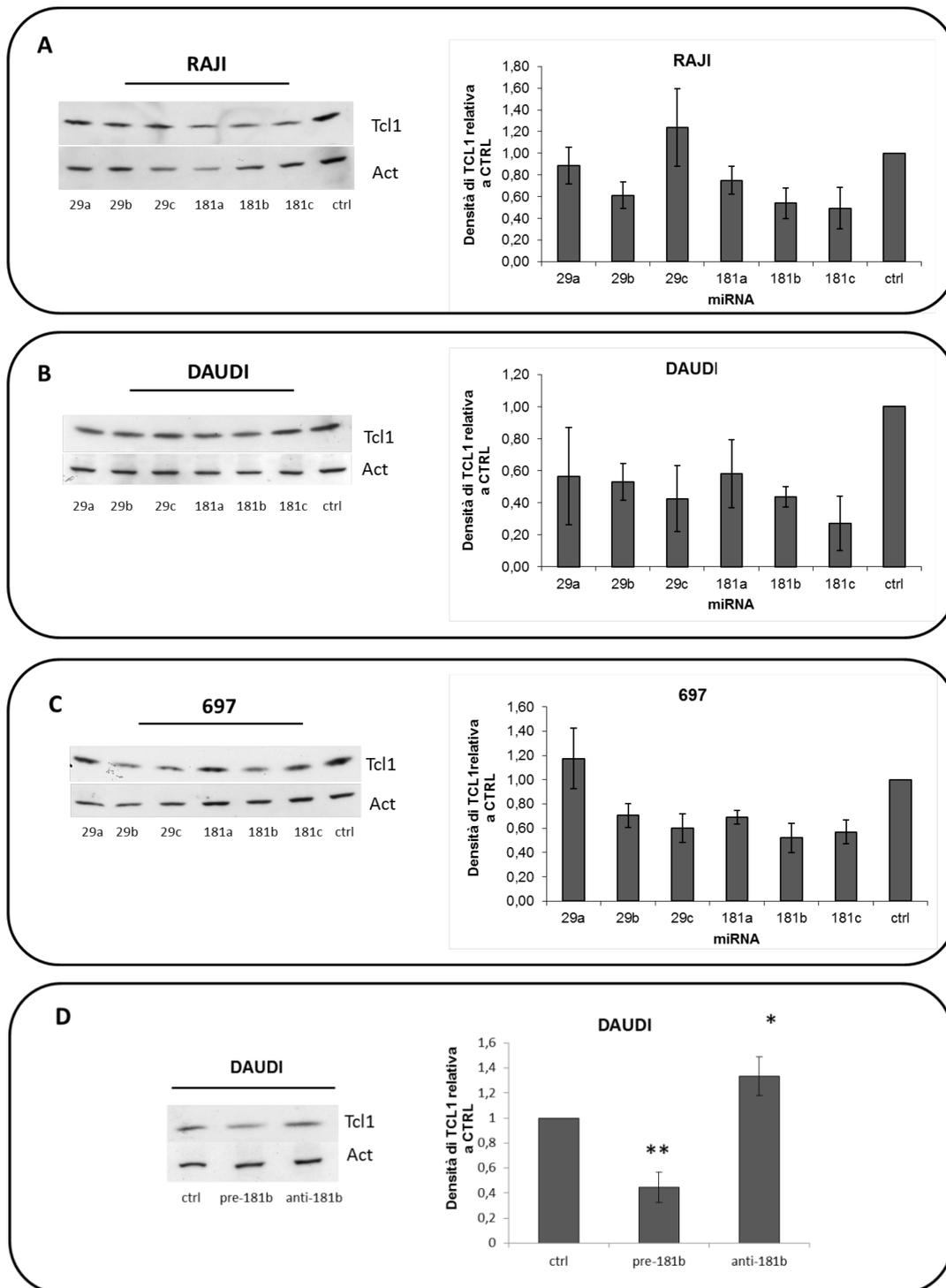


Figura 5. Modulazione del gene TCL1 mediata da microRNA in linee cellulari umane.

Analisi di espressione della proteina TCL1 mediante Western Blot eseguita su tre linee cellulari umane di cellule B Raji (A), DAUDI (B), 697(C) dopo 72 ore dalla transfezione con microRNA appartenenti alla famiglia del miR-181 e del miR-29. L'esperimento è stato eseguito tre volte per ciascuna linea cellulare, in figura sono riportate le immagini delle bande di un singolo esperimento scelto come rappresentativo per la rispettiva linea mentre i dati riportati in grafico corrispondono ai valori densitometrici medi di ciascun campione normalizzati sulle rispettive b-actine e rapportati ai controlli. Il miR-181b induce una riduzione dei livelli della proteina TCL1 di circa il 50% rispetto ai rispettivi controlli. In fig.5D la regolazione negativa della proteina TCL1 è dimostrata essere specifica del miR-181b mediante transfezione delle cellule DAUDI con anti-miR-181b (p value <0,05) e con pre-miR-181b (pvalue< 0,005).

5.2 Il miR-181b induce apoptosi e riduce la vitalità di cellule B umane e di splenociti tumorali del modello murino E μ -TCL-1FL *in vitro*

Dopo aver validato che il miR-181b è in grado di modulare l'espressione di TCL-1 in diverse linee di cellule B umane, abbiamo valutato il suo effetto biologico sulla vitalità cellulare in quanto è noto che TCL1 è un attivatore della via del segnale oncogenica PI3K-Akt e che l'oncogene *AKT* è un importante fattore regolatorio della proliferazione e sopravvivenza di varie popolazioni cellulari incluse le cellule B e T (127).

In seguito a transfezione con pre-miR-181b, abbiamo misurato l'apoptosi e la vitalità cellulare mediante il saggio basato sulla marcatura con Annessina V e Propidio Ioduro (fig.6). Nella linea cellulare Raji, il miR-181b induce un aumento delle cellule in fase precoce e avanzata di apoptosi pari a 1.5 e 1.6 volte rispettivamente (p value <0.05).

In un secondo momento, per confermare questo dato abbiamo eseguito lo stesso esperimento su un'altra linea cellulare, le EHEB. In questa linea cellulare non solo abbiamo riscontrato un maggior incremento di cellule apoptotiche sia in fase precoce che avanzata (pari a 2.5 e 1.8 rispettivamente) ma è stata rilevata anche una notevole diminuzione delle cellule vitali pari a circa al 57% rispetto alle cellule di controllo non transfettate con il miR-181b (fig.6). La linea cellulare EHEB è stata isolata da sangue periferico di un paziente affetto da LLC, quindi rappresenta un contesto cellulare più simile alla LLC rispetto alla linea cellulare RAJI e quindi le differenze riscontrate nella regolazione dell'apoptosi potrebbero essere dovute al fatto che il miR-181b è in grado di modulare altri geni, deregolati nella LLC, coinvolti nel processo apoptotico oltre a TCL1 in questa linea cellulare.

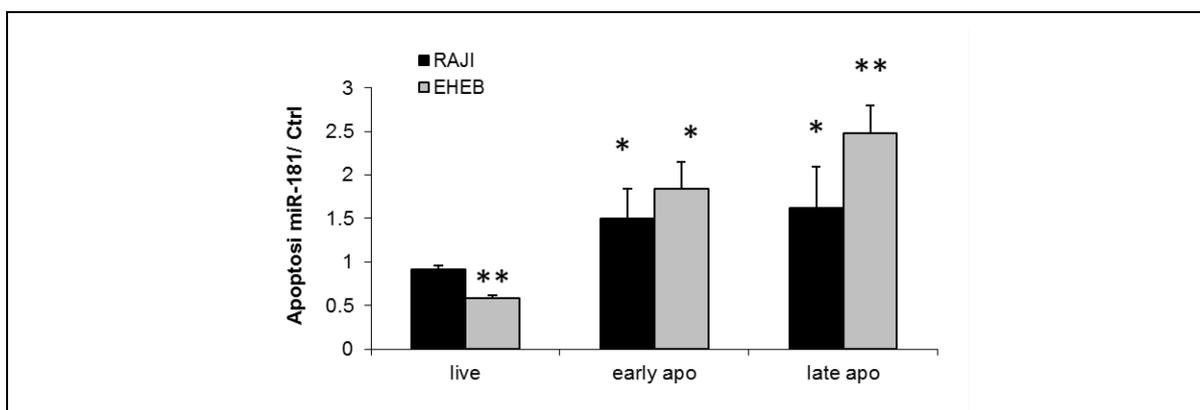


Figura 6. Attività pro-apoptotica del miR-181b in linee cellulari umane. Livelli di apoptosi delle linee cellulari Raji (nera) e EHEB (grigia) valutati dopo 72 ore dalla transfezione con miR-181b mediante analisi citofluorimetrica in seguito a marcatura con AnnessinaV e Propidio Ioduro. I valori riportati in grafico corrispondono ai valori medi del rapporto tra cellule transfettate con il miR-181 e cellule controllo. miR-181b induce un significativo aumento delle cellule in fase precoce (early apo) e avanzata (late apo) di apoptosi, (*= p value <0,05 ; **= p value <0,01).

Per testare il potenziale terapeutico del miR-181b *in vivo*, i nostri prossimi esperimenti prevedono l'utilizzo del modello murino E μ -TCL-1FL il quale sviluppa una leucemia che ben rappresenta una forma aggressiva di leucemia linfatica cronica (121, 128). Prima di iniziare la sperimentazione *in vivo* abbiamo utilizzato gli splenociti isolati da topi transgenici E μ -TCL-1FL aventi una leucemia conclamata per eseguire alcuni preliminari esperimenti *in vitro*.

Inizialmente abbiamo analizzato le cellule isolate dalla milza di topi transgenici E μ -TCL-1FL, in particolare abbiamo valutato i livelli di espressione endogena del miR-181b in diversi soggetti mediante PCR quantitativa (fig.7A) e i livelli della proteina TCL1 mediante Western blot (fig.7B). I risultati ottenuti hanno mostrato che vi è una variabilità nell'espressione del miR-181b e della proteina TCL1 nel gruppo di topi transgenici E μ -TCL-1FL analizzati, ciò rispecchia l'eterogeneità della malattia, caratteristica riscontrata anche nella leucemia linfatica cronica umana (96). Inoltre, come osservato nei pazienti affetti da LLC (101), abbiamo appurato l'esistenza di una significativa correlazione inversa tra l'espressione del miR-181b e i livelli della proteina TCL1 anche nei topi transgenici E μ -TCL-1FL ($\rho = -0.0733$ p value= 0.031), nei soggetti esprimenti alti livelli di miR-181b si riscontra un basso livello della proteina TCL1 e viceversa (fig.7C).

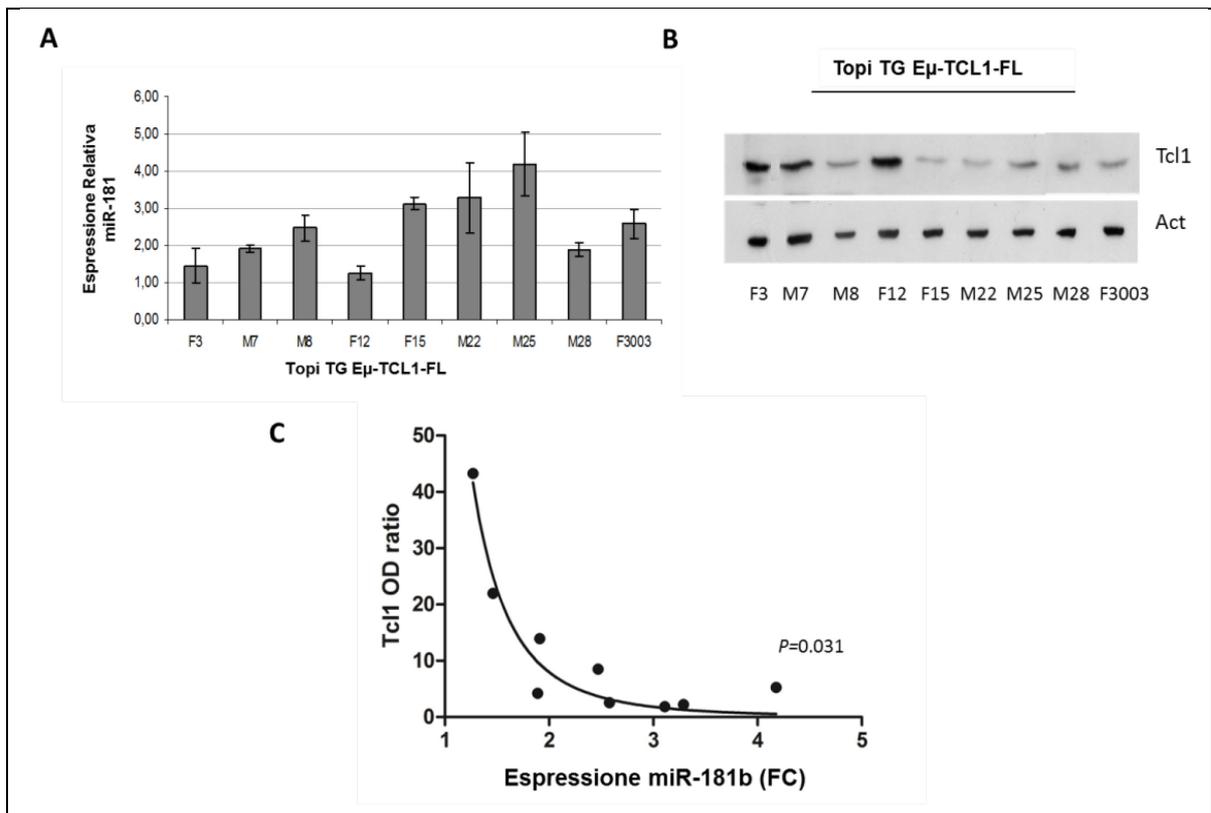


Figura 7. Analisi di espressione endogena del miR-181b e della proteina TCL1 in splenociti di topi transgenici Eμ-TCL1-1FL.

(A) Analisi di espressione relativa del miR-181b mediante Real-Time RT-PCR eseguita su RNA estratti da splenociti di topi transgenici Eμ-TCL1-1FL o wild type (wt); i valori riportati in grafico corrispondono al rapporto tra l'espressione del miR-181b nei topi transgenici e quella nei topi wt (fold change FC). (B) I livelli della proteina TCL1 sono stati analizzati negli splenociti degli stessi topi mediante Western blot analisi. (C) Per ciascun topo, l'espressione del miR-181b e i livelli di espressione della proteina TCL1 calcolati mediante analisi densitometrica e rapportati al campione con l'espressione più bassa (Tcl1 OD Ratio) sono stati riportati in grafico. Il coefficiente di correlazione di Spearman rivela l'esistenza di una correlazione inversa tra le due variabili ($\rho=-0.0733$ p value= 0.031).

Successivamente, abbiamo valutato il potenziale pro-apoptotico del miR-181b sugli splenociti di topi transgenici Eμ-TCL1-1FL aventi una leucemia avanzata con bassi livelli di miR-181b e abbiamo riscontrato effetti analoghi a quelli ottenuti nella linea cellulare umana EHEB. Il miR-181b riduce la vitalità degli splenociti leucemici murini del 50% rispetto al controllo (p value <0.01) ed è in grado di indurre un aumento dell'apoptosi pari a 1.5 (p value 0.05). Inoltre, dal confronto dell'attività pro-apoptotica del miR-181b con quella indotta da un siRNA anti-TCL1 è emerso che il siRNA anti-TCL1 riduce la vitalità e aumenta l'apoptosi degli splenociti leucemici murini in maniera meno efficiente rispetto al miR-181b sebbene entrambi siano in grado di regolare negativamente in modo analogo l'espressione di TCL1 a livello proteico (fig.8).

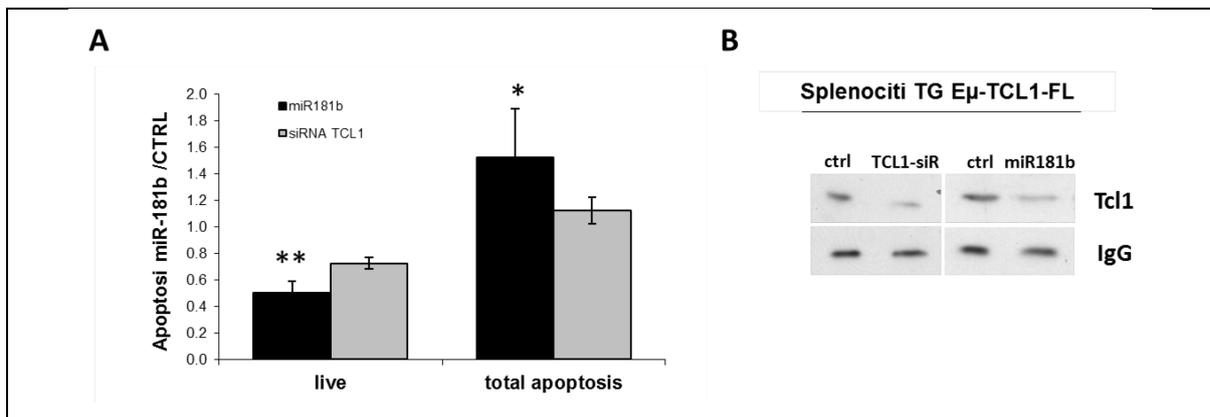
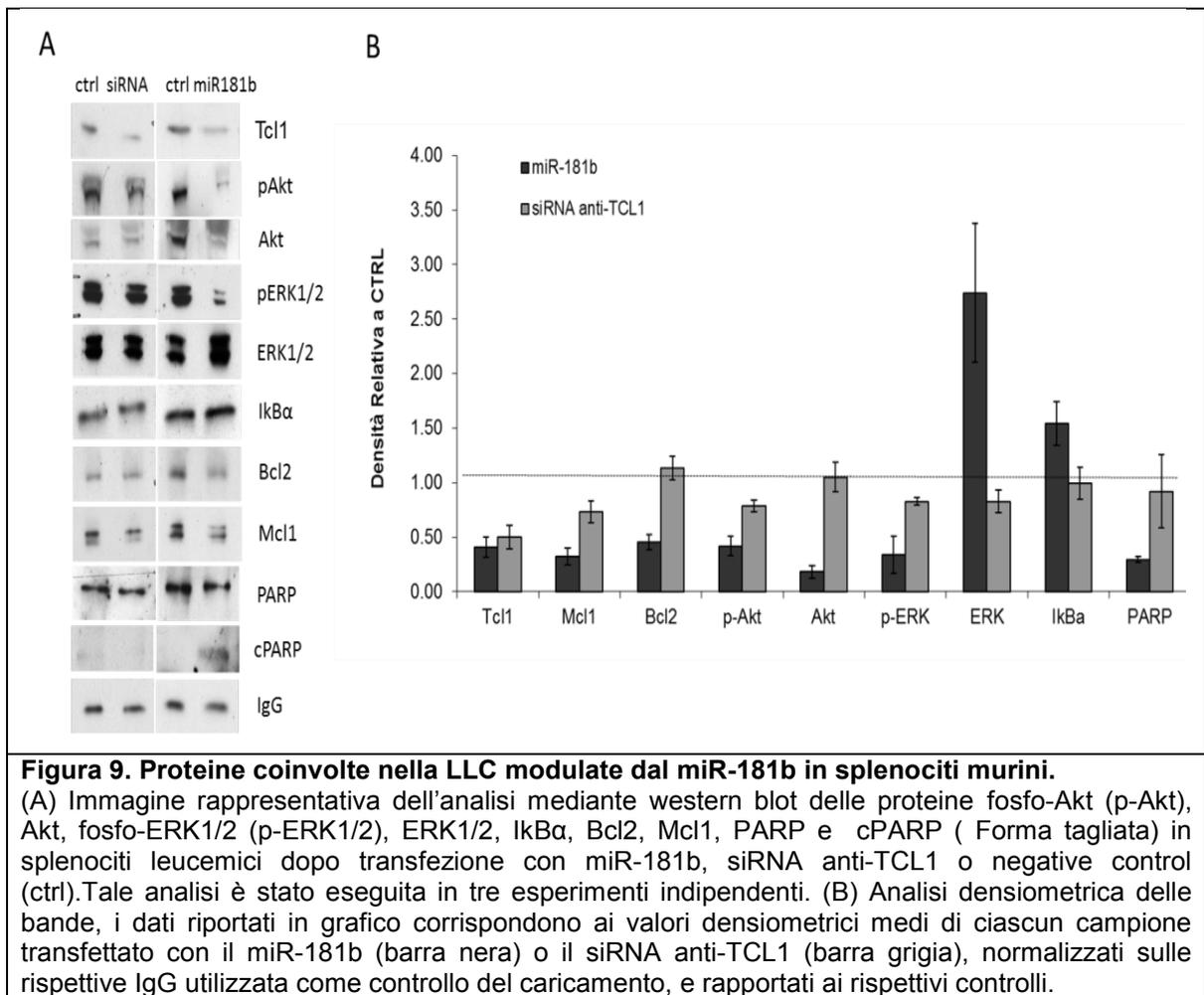


Figura 8. Attività pro-apoptotica del miR-181b in splenociti di topo transgenico Eμ-TCL1-1FL. (A) Gli splenociti murini sono stati transfettati con il miR-181b (barra nera) e un siRNA anti-TCL1 (barra grigia); i livelli di apoptosi cellulare sono stati valutati dopo 72 ore dalla transfezione mediante analisi citofluorimetrica in seguito a marcatura con AnnexinV (Ax) e Propidio Ioduro (PI). I valori riportati in grafico ottenuti da sei esperimenti indipendenti corrispondono ai valori medi del rapporto tra cellule transfettate con il miR-181b o il siRNA anti-TCL1 e cellule controllo. Il miR-181b riduce la vitalità degli splenociti leucemici murini del 50% rispetto al controllo (**p value <0.01) ed è in grado di indurre un significativo aumento dell'apoptosi (*p value 0.05). (B) Analisi mediante Western Blot dei livelli di espressione della proteina TCL1 in splenociti di topo transgenico Eμ-TCL1-1FL dopo 72 ore dalla transfezione con miR-181b, negative control, siRNA anti-TCL1.

Questi dati, quindi, dimostrano che miR-181b è in grado di indurre l'apoptosi e ridurre la vitalità delle cellule leucemiche sia di topo che umane, con addirittura un effetto maggior rispetto ad un siRNA anti-TCL1; ciò può essere dovuta all'azione pleiotropica del miR-181b, ossia alla capacità di un microRNA di agire su più geni bersagli contemporaneamente. Infine, da questi dati iniziali il topo transgenico Eμ-TCL1-1FL potrebbe essere considerato un buon modello pre-clinico adatto a testare *in vivo* il potenziale terapeutico del miR-181b.

5.3 Il miR-181b regola diverse vie dei segnali molecolari coinvolti nella LLC.

Per comprendere maggiormente le basi molecolari del potenziale ruolo antileucemico del miR-181b, abbiamo rivolto la nostra attenzione ai possibili effetti del miR-181b sul processo apoptotico e di proliferazione cellulare in quanto diversi geni bersaglio del miR-181b sono coinvolti in tali processi (TCL-1, Bcl2, Mcl1) e inoltre abbiamo valutato gli effetti esercitati dal miR-181b sulla modulazione dei principali pathways molecolari alla base del meccanismo di patogenesi della LLC. A tale scopo sono stati eseguiti una serie di Western blot per determinare i livelli di espressione di diverse proteine estratte da splenociti leucemici di topo transgenico Eμ-TCL1-1FL in seguito a transfezione con miR-181b o siRNA anti-TCL1 (fig.9).



Come accennato in precedenza, negli splenociti leucemici murine la proteina TCL1 è regolata negativamente con un'alta efficienza dal miR-181b, portando ad una riduzione di circa il 60% rispetto alle cellule di controllo; anche Mcl-1 e Bcl-2, due fattori anti-apoptotici noti per essere bersagli diretti del miR-181b (96, 129, 130), sono regolati negativamente in modo analogo dal miR-181b (riduzione di circa 70% e 50% rispettivamente) (fig.9A-B). Tuttavia, l'attivazione del processo apoptotico è stato anche studiato valutando i livelli di espressione della proteina PARP: nelle cellule transfettate con il miR-181b abbiamo constatato una riduzione della proteina PARP integra pari al 70% e in più è stata rilevata la presenza di un frammento di 85KDa corrispondente alla forma clivata della proteina PARP. Questi dati costituiscono un ulteriore conferma dell'aumento dei livelli apoptotici riscontrati in queste cellule negli esperimenti precedenti (fig.9).

Un'alterata regolazione dei *pathways* di sopravvivenza possono contribuire ad una crescita cellulare incontrollata e indurre la leucemia; per tale motivo, tre *pathways* comunemente attivati nella LLC, AKT, NF- κ B e ERK, sono stati analizzati. Tc1 è un ben noto coattivatore di AKT e infatti negli splenociti leucemici transfettati con il

miR-181b abbiamo riscontrato una riduzione della proteina AKT fosforilata pari al 60%. Analisi mediante western blot hanno inoltre evidenziato una marcata riduzione anche di fosfo-ERK (65%), infatti in letteratura è stato riportato che in diversi tumori i pathway PI3K/AKT e Ras/MEK possono influenzarsi l'uno con l'altro (*crosstalk*) (131-134).

Tuttavia esiste anche una stretta relazione tra AKT/TCL1 e NFκB (102, 135, 136), infatti nelle cellule transfettate con il miR-181b abbiamo rilevato un aumento di 1.5 volte della proteina IκBα rispetto alle cellule non transfettate, indicando una maggiore inibizione del fattore di trascrizione NF-κB (fig 9). Tutti questi esperimenti sono stati eseguiti in triplicato mostrando un'alta riproducibilità dei dati.

Confrontando l'attività esercitata dal miR-181b con quella del siRNA anti-TCL1 (Fig. 9), abbiamo notato che la proteina TCL1 è regolata negativamente in misura simile (riduzione del 50%); p-Akt e Mcl-1 sono risultati significativamente ridotti, ma in maniera sensibilmente inferiore rispetto alle cellule transfettate con miR-181b (25% e 15%, rispettivamente). I livelli di espressione delle altre proteine indagate non sono risultati modificati (fig.9). Quindi, il siRNA anti-TCL1 presenta una capacità regolatoria limitata rispetto al miR-181b, ciò potrebbe spiegare le differenze di apoptosi e vitalità cellulare mostrate in figura 8.

Infine, abbiamo studiato la modulazione degli stessi *pathways* in una linea cellulare umana di LLC, le EHEB (fig.10). In questa linea abbiamo osservato le stesse differenze riscontrate nel modello murino. Tuttavia, per monitorare l'apoptosi a livello molecolare, abbiamo esaminato i fattori pro-apoptotici BAD e Caspasi-9 invece di PARP; i ridotti livelli della proteina BAD fosforilata e l'aumento dei livelli della proteina Caspasi-9 clivata sono un indice dell'attivazione del processo apoptotico nelle cellule umane, dato riscontrato anche in figura 6.

Da questa analisi è dunque emerso che il miR-181b è in grado di svolgere diverse funzioni agendo su molteplici processi: proliferativi, apoptotici e di sopravvivenza sia nel topo che nell'uomo. Tali dati hanno fornito utili indicazioni per proseguire i nostri studi *in vivo* confermandoci che il miR-181b potrebbe essere un buon candidato per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici contro la LLC da testare sul modello murino Eμ-TCL-1FL.

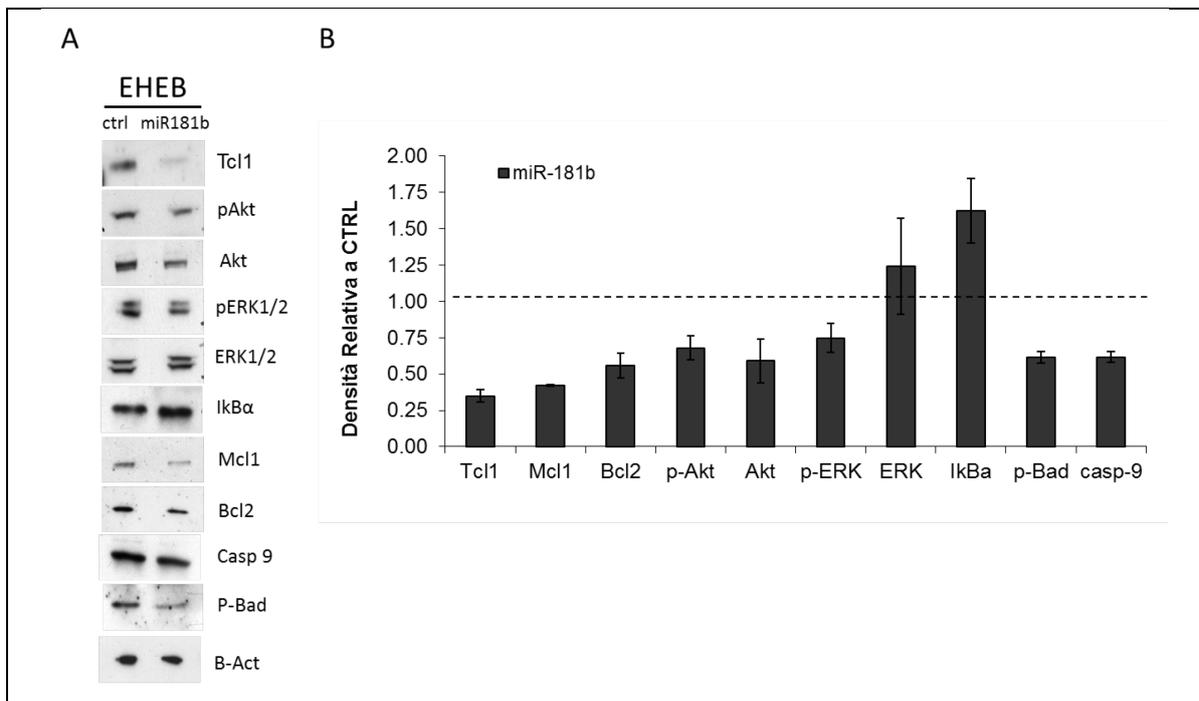


Figura 10. Proteine coinvolte nella LLC modulate dal miR-181b in linee cellulari umane. (A) Immagine rappresentativa dell'analisi mediante western blot delle proteine fosfo-Akt (p-Akt), Akt, fosfo-ERK1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, Ikb α , Bcl2, Mcl1, Caspasi9 e fosfo-Bad (pBad) nella linea cellulare umana di LLC, EHEB, dopo transfezione con miR-181b o negative control (ctrl). Tale analisi è stata eseguita in tre esperimenti indipendenti. (B) Analisi densitometrica delle bande, i dati riportati in grafico corrispondono ai valori densitometrici medi di ciascun campione transfettato con il miR-181b (barra nera), normalizzati sulle rispettive b-actina utilizzata come controllo del caricamento, e rapportati ai rispettivi controlli.

5.4 Studio della progressione della LLC in topi trapiantati con splenociti E μ -TCL1FL derivanti

Uno dei principali limiti dell'utilizzo del modello murino E μ -TCL1FL nella ricerca pre-clinica per saggiare nuovi agenti terapeutici contro la LLC è il lungo periodo di tempo che tale modello impiega per sviluppare la leucemia, allungando notevolmente i tempi della riproducibilità sperimentale.

Per tale motivo abbiamo cercato di accorciare i tempi richiesti per lo sviluppo della malattia attraverso un trapianto singenico di splenociti leucemici di topo E μ -TCL1FL in topi FVB wild-type in esperimenti ripetuti. Per valutare il decorso naturale della malattia nei topi FVB trapiantati, abbiamo monitorato costantemente 18 topi dal trapianto alla morte.

L'attecchimento si è manifestato in media dopo 2-3 mesi, portando successivamente in tutti gli animali allo sviluppo di una leucemia fatale/aggressiva. Tuttavia, questo attecchimento è avvenuto solo nel 67% dei topi (12 su 18). In questi topi, abbiamo notato un'espansione clonale delle cellule leucemiche inizialmente mediante la manifestazione di leucocitosi nel sangue periferico (Fig.11). In particolare la figura 11A mostra un significativo aumento del numero

delle cellule del sangue periferico nei topi FVB trapiantati con splenociti leucemici di topo E μ -TCL1FL in seguito ad analisi di conta cellulare eseguita nel tempo: dopo 7,11,14 settimane dal trapianto il numero dei leucociti aumenta da $4,7 \times 10^6$ - $13,1 \times 10^6$ a $19,4 \times 10^6$ cellule/ml.

Inoltre, mediante analisi di PCR quantitativa specifica per il gene TCL1 umano, abbiamo confermato che l'aumento dei leucociti corrispondeva ad un incremento delle cellule positive per il transgene TCL1. In particolare, confrontando la percentuale di cellule positive per hTCL1 nel sangue periferico dopo 11 e 7 settimane dal trapianto si è registrato un incremento pari a 45 volte (fig.11B).

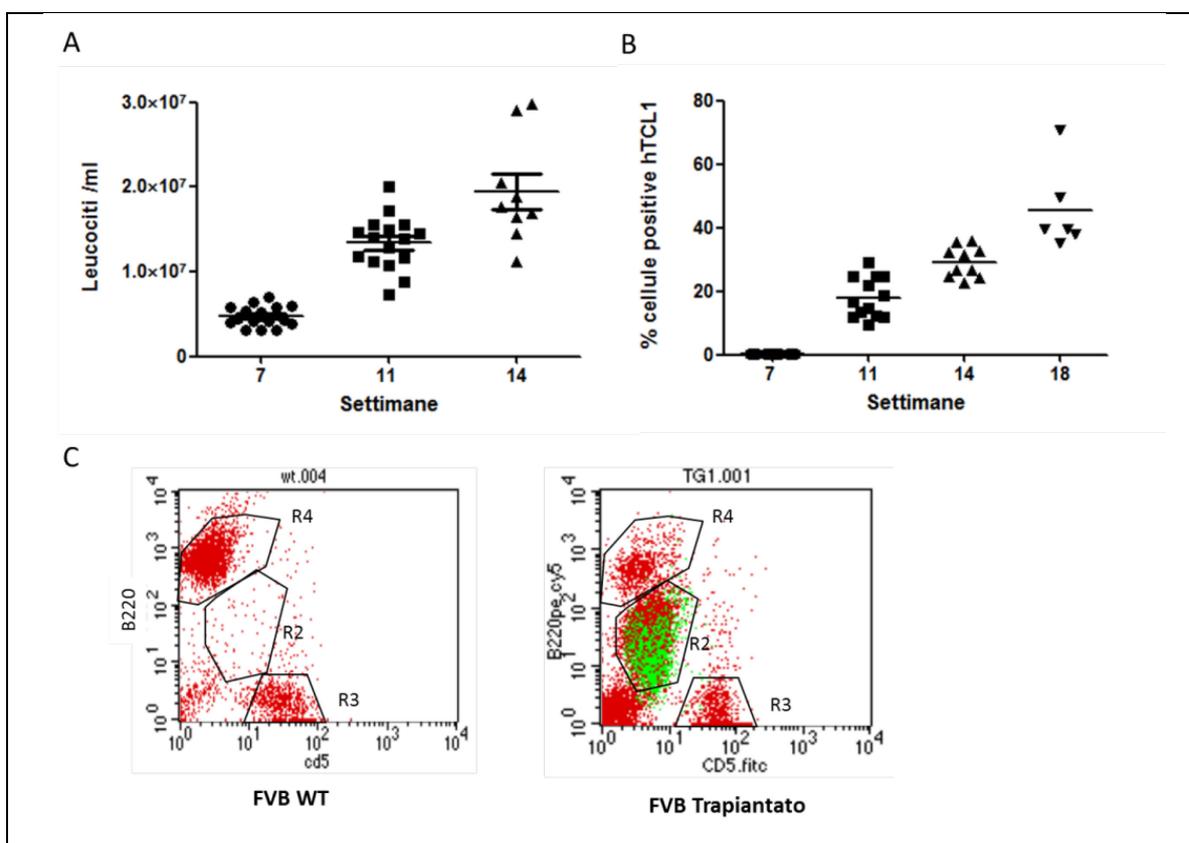


Figura 11. Monitoraggio della progressione della leucemia in topi FVB trapiantati.

In accordo con le osservazioni cliniche nei pazienti affetti da LLC, anche nei topi FVB trapiantati con splenociti leucemici di topo TG E μ -TCL1FL, si osserva un incremento del numero delle cellule del sangue periferico. (A) Conta del numero di cellule del sangue periferico dei topi FVB trapiantati, in seguito a degradazione degli eritrociti, dopo 7, 11 e 14 settimane dal trapianto. (B) Quantificazione mediante PCR quantitative del gene TCL1 umano presente nelle cellule del sangue periferico dei topi FVB dopo 7, 11, 14 e 18 settimane dal trapianto; rispettivamente 0,4%, il 18% 29% 45%. (C) Identificazione delle cellule leucemiche nel sangue periferico di topo FVB trapiantato mediante analisi di espressione dei marcatori di superficie B220 e CD5 e della proteina TCL1 mediante analisi citofluorimetrica paragonata ad un topo wild type.

La progressione della leucemia è stata monitorata nei topi FVB trapiantati anche mediante la caratterizzazione citofluorimetrica basata sui marcatori proteici di superficie B220 e CD5 dei campioni di sangue periferico (121, 122). I linfociti sono

stati selezionati sulla base di parametri fisici e le sottopopolazioni cellulari sono state individuate come segue: le cellule B leucemiche sono B220+/CD5dim (regione R2), i linfociti B normali sono B220+/CD5- (regione R4) e linfociti T sono B220-/CD5+ (regione R3). Come si può notare nella fig.11C nei topi FVB trapiantati è presente una sottopopolazione di linfociti B leucemici B220+/CD5dim. Per confermare che il clone leucemico originasse dalle cellule trapiantate, le cellule del sangue periferico dei topi FVB trapiantati dopo l'incubazione con anticorpi anti-B220 e anti-CD5 sono state marcate con un anticorpo specifico per la proteina TCL1 umana; come si può notare nella figura 11C le cellule positive per hTCL1 rientrano nella stessa regione delle cellule B220+/CD5dim (regione R2) e sono indicate con spot verdi sulla popolazione totale di linfociti (spot rossi).

L'autopsia eseguita su topi FVB trapiantati con splenociti leucemici di topo E μ -TCL1FL con leucemia conclamata ha evidenziato un ingrossamento della milza (splenomegalia a volte fino a 10 volte le dimensioni normali) e del fegato (epatomegalia) (fig.12A-B). Tutti questi risultati sono in linea con quelli osservati durante l'autopsia nei pazienti affetti da LLC (137).

Alla luce di queste considerazioni il trapianto di splenociti leucemici del topo transgenico E μ -TCL1FL in topi FVB wild-type permette di ridurre le tempistiche della sperimentazione preclinica e inoltre consente di propagare lo stesso clone leucemico in diversi topi aumentando la riproducibilità sperimentale. Tale sistema rappresenta, quindi, un utile strumento per testare farmaci/molecole che interferiscono specificamente con i meccanismi coinvolti in tale leucemia.

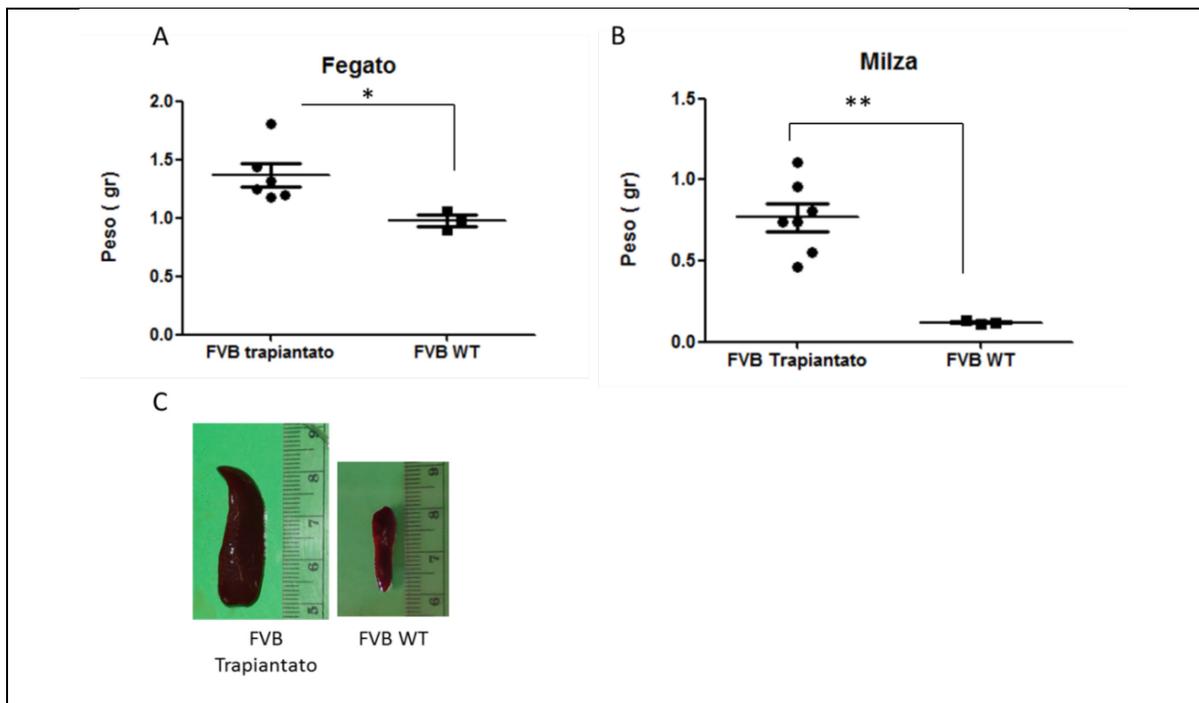


Figura 12. Autopsia di topi trapiantati con leucemia conclamata.

In seguito al trapianto degli splenociti leucemici di topo transgenico E μ -TCL1FL nei topi FVB wild type si è riscontrato un significativo ingrossamento del fegato p value 0,039 (A) e della milza p value=0.0013 (B). Immagine rappresentativa della milza di un topo FVB trapiantato e di un topo FVB wild type (C).

5.5 Veicolazione di microRNA e anti-microRNA *in vivo*

Un altro aspetto cruciale da tenere in considerazione nello sviluppo di approcci terapeutici basati su microRNA è il sistema di veicolazione, a causa della facile degradazione di oligonucleotidi a RNA da parte delle nucleasi e il limitato assorbimento cellulare.

Prima di saggiare l'effetto biologico *in vivo* del miR-181b nei topi FVB trapiantati con splenociti leucemici, abbiamo anche valutato l'efficacia del sistema di veicolazione del miR-181b in un piccolo gruppo di topi FVB WT nel tempo. A tal fine, abbiamo impiegato come veicolo un polimero cationico *jetPEI*, si tratta di un sistema semplice ma efficace, che mostra bassa tossicità ed è attualmente utilizzato in *trials* clinici di fase I e II (138).

In un primo esperimento preliminare abbiamo valutato l'espressione del miR-181-b in diversi tessuti di topi FVB WT dopo tempi relativamente brevi dalla somministrazione intraperitoneale di diverse dosi di mimic miR-181b. Dopo soli 30 minuti dalla somministrazione, abbiamo notato un notevole incremento dell'espressione del miR-181b nei diversi tessuti milza, fegato e sangue (Fig.13 A). Un esperimento analogo è stato ripetuto trattando i topi FVB WT con 100 μ g di mimic specifico per un altro microRNA generalmente sottoespresso nella LLC, il

miR-34a. Monitorando l'espressione del miR-34a per tempi maggiori abbiamo notato che il livello del miR-34a rimane superiore al normale per 2-3 giorni dopo la somministrazione (fig. 13B) e quindi abbiamo deciso di utilizzare quest'ultima dose come dosaggio per trattamenti singoli e 80 µg per trattamenti multipli.

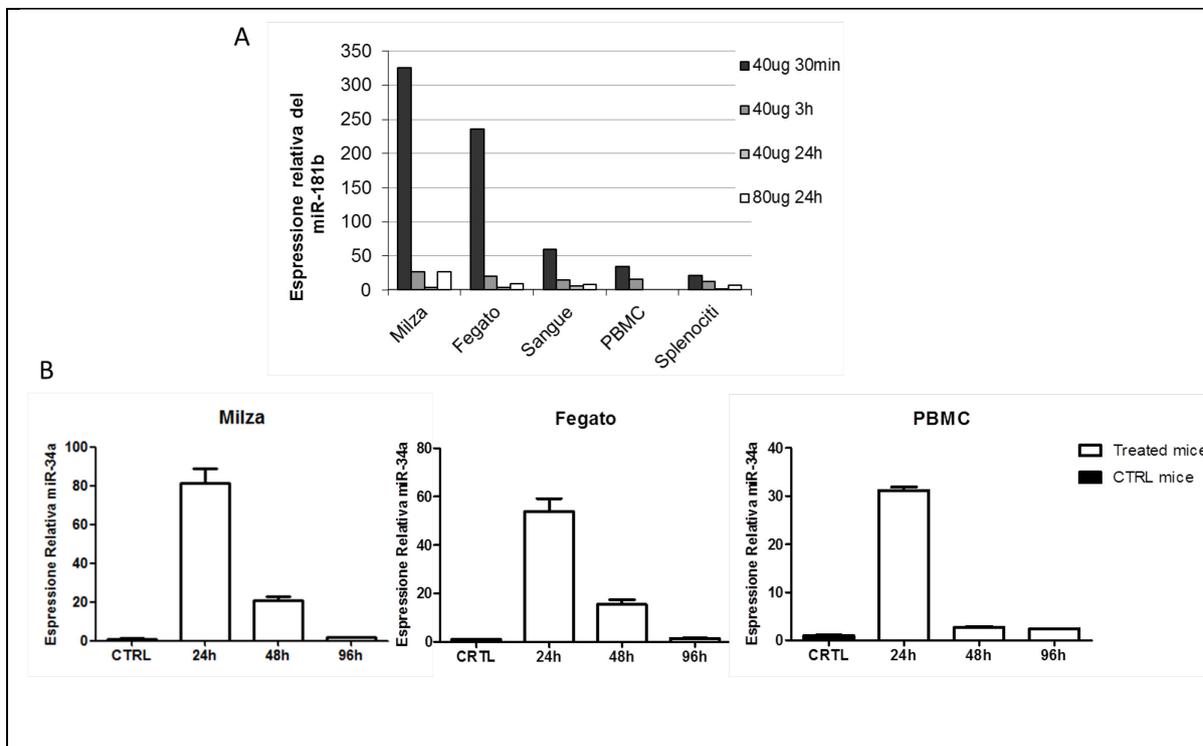


Figura 13. Valutazione efficienza del sistema di veicolazione di microRNA *in vivo*.

(A) Analisi dell'espressione del miR-181b mediante Real-Time RT-PCR eseguita su diversi tessuti di topi trattati con 40 o 80µg di mimic miR-181b somministrati mediante inoculazione intraperitoneale e sacrificati dopo 30 minuti, 3 ore e 24ore dal trattamento. (B) Analisi di espressione del miR-34a mediante Real-Time RT-PCR eseguita in diversi tessuti milza, fegato, PBMC di topi trattati con 100µg di miR-34a IP e sacrificati dopo 24, 48 e 96 ore. Tutti i dati riportati in grafico sono stati normalizzati su i livelli di espressione del gene ribosomiale SNO412 murino e rapportati ai rispettivi tessuti controllo dei topi non trattati.

5.6 Effetti a breve termine di microRNA o anti-microRNA su splenociti leucemici *in vivo*.

In vivo abbiamo inizialmente valutato l'attività biologica esercitata a breve termine da differenti microRNA solitamente deregolati nella LLC non soffermandoci unicamente sul microRNA-181b; topi FVB trapiantati e presentati una leucemia conclamata (più del 30% delle cellule del sangue periferico risultano essere hTCL1 positive) sono stati quindi trattati con 100µg di oligonucleotidi microRNA o anti-microRNA specifici (almeno 4 topi per gruppo). I topi controllo aventi un livello di malattia analogo sono stati invece trattati con un oligonucleotide di controllo negativo (ctrl neg). Dopo 24 ore dal singolo trattamento, i topi sono stati sacrificati

e gli splenociti sono stati isolati per saggiare gli effetti dei microRNA sulla vitalità e sull'apoptosi cellulare.

Come mostrato in figura 14A, una significativa riduzione della vitalità cellulare è stata osservata negli splenociti di topo trattati con oligonucleotidi specifici per il miR-29c, il miR-29c* e il miR-34a o con oligonucleotidi anti-miR-21 e anti-miR-155 rispetto ai topi controllo (valore $p < 0,05$). Per quanto concerne l'effetto di questi miRNA sull'apoptosi cellulare, mediante test basati su marcatura con AnnexinV abbiamo riscontrato che il trattamento con anti-miR-21, anti-miR-155, miR-29c, miR-29c* e miR-34a induce un significativo aumento della percentuale di cellule leucemiche apoptotiche rispetto ai topi non trattati (valore $p < 0.05$) (fig.14B). Infine, in tutti i questi esperimenti l'efficienza di veicolazione degli oligonucleotidi microRNA/anti-microRNA negli splenociti è stata sempre confermata mediante PCR quantitativa fig.14C.

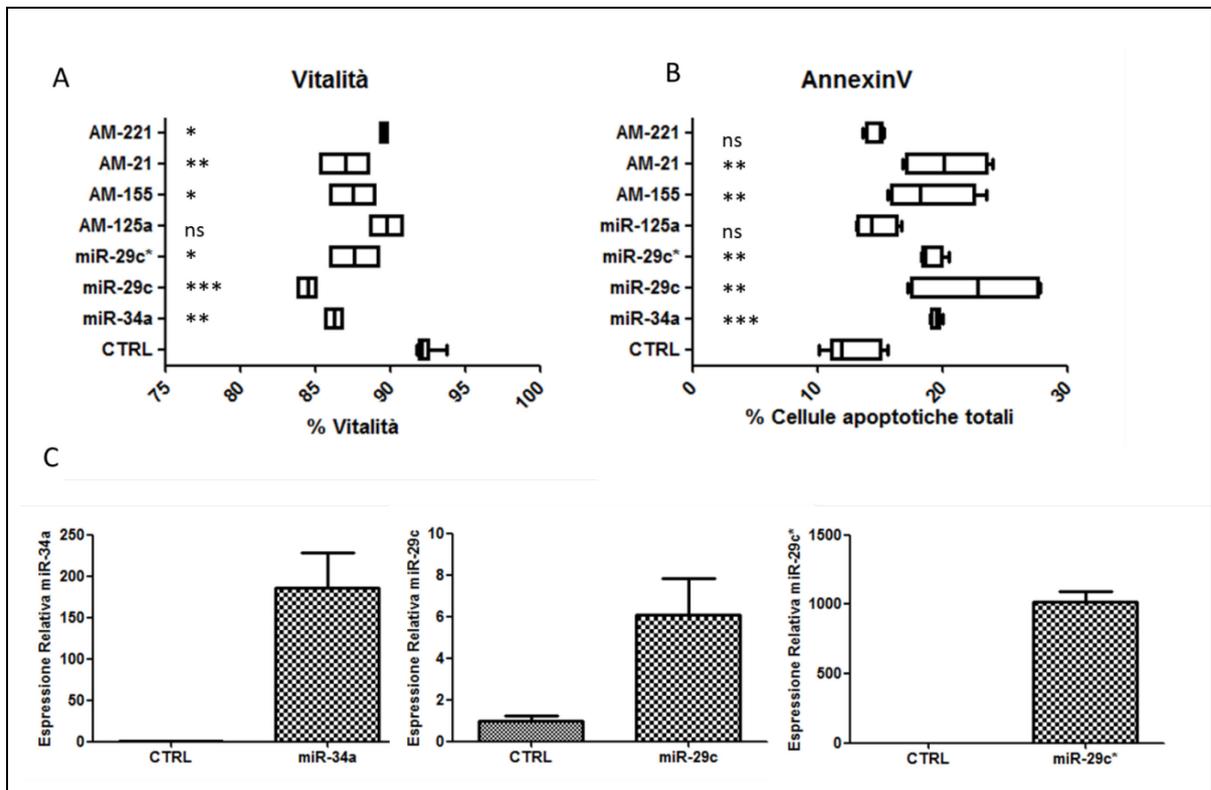


Figura 14. Effetti biologici di microRNA e anti-microRNA dopo singolo trattamento in topi con leucemia conclamata.

Topi FVB presentanti una leucemia comprovata (circa 30% delle cellule positive per hTCL1), sono stati sacrificati 24h dal singolo trattamento con microRNA o molecole anti-microRNA e gli splenociti isolati per valutare la Vitalità e l'apoptosi. (A) Saggio di vitalità eseguito mediante Muse® Count & Viability Kit, una significativa riduzione della percentuale della vitalità è stata osservata dopo trattamento con miR-29c, miR-29c*, miR-34a e anti-miR-21, anti-miR-155 ($p \text{ value} < 0.05$). (B) Saggio apoptotico eseguito mediante Muse® Annexin V & Dead Cell Kit, si osserva un incremento della percentuale delle cellule apoptotiche totali (apoptosi precoce e avanzata) dopo trattamento con anti-miR-21, anti-miR-155, miR-29c, miR-29c* e miR-34a ($p \text{ value} < 0.05$). (C) qRT-PCR, espressione relative del miR-34a, miR-29c and miR-29c* in splenociti dopo 24 ore dal trattamento.

5.7 Modulazione dei geni bersaglio del microRNA-34a *in vitro* e *in vivo*

In seguito ai risultati ottenuti in questo ultimo esperimento, ci ha particolarmente colpito l'effetto pro-apoptotico esercitato dal microRNA-34a sugli splenociti leucemici. Per tale motivo siamo andati ad analizzare anche i bersagli molecolari del microRNA-34a per comprendere maggiormente, attraverso i *pathways* molecolari in cui tale microRNA è coinvolto, quale sia il suo ruolo nello sviluppo della LLC e il suo potenziale utilizzo come agente terapeutico.

In diversi studi mediante analisi bioinformatiche o sperimentali è emerso che il miR-34 è in grado di modulare l'espressione di diversi geni bersaglio coinvolti in molteplici processi dal controllo del ciclo cellulare, l'apoptosi alla riparazione del danno al DNA tra questi possibili bersagli predetti e validati vi sono la chinasi ciclina-dipendente (CDK) 4, ciclina E2, cMet, CDK6 e Bcl-2 (107, 108, 139). Difetti nel processo apoptotico sono una delle caratteristiche principali alla base della patogenesi della LLC e generalmente alti livelli delle proteine anti-apoptotiche appartenenti alla famiglia Bcl-2 sono considerati i principali responsabili dell'inibizione dell'apoptosi nelle cellule leucemiche (140, 141).

Per poter esaminare la modulazione dei geni bersaglio del miR-34a *in vivo* e identificare i pathways coinvolti, abbiamo eseguito western blot analisi su splenociti di topi FVB trapiantati aventi una leucemia avanzata dopo duplice iniezione intraperitoneale (una ogni 48 ore) di 100 µg di mimic miR-34a o di oligonucleotide di controllo negativo. In figura 15 abbiamo mostrato che l'effetto pro-apoptotico del miR-34a riscontrato anche dopo 48h dal trattamento potrebbe essere correlato alla sottoespressione di Bcl-2 e anche alla modulazione della proteina CDK6 coinvolta nel controllo del ciclo cellulare, entrambi i quali sono bersagli validati del miR-34a.

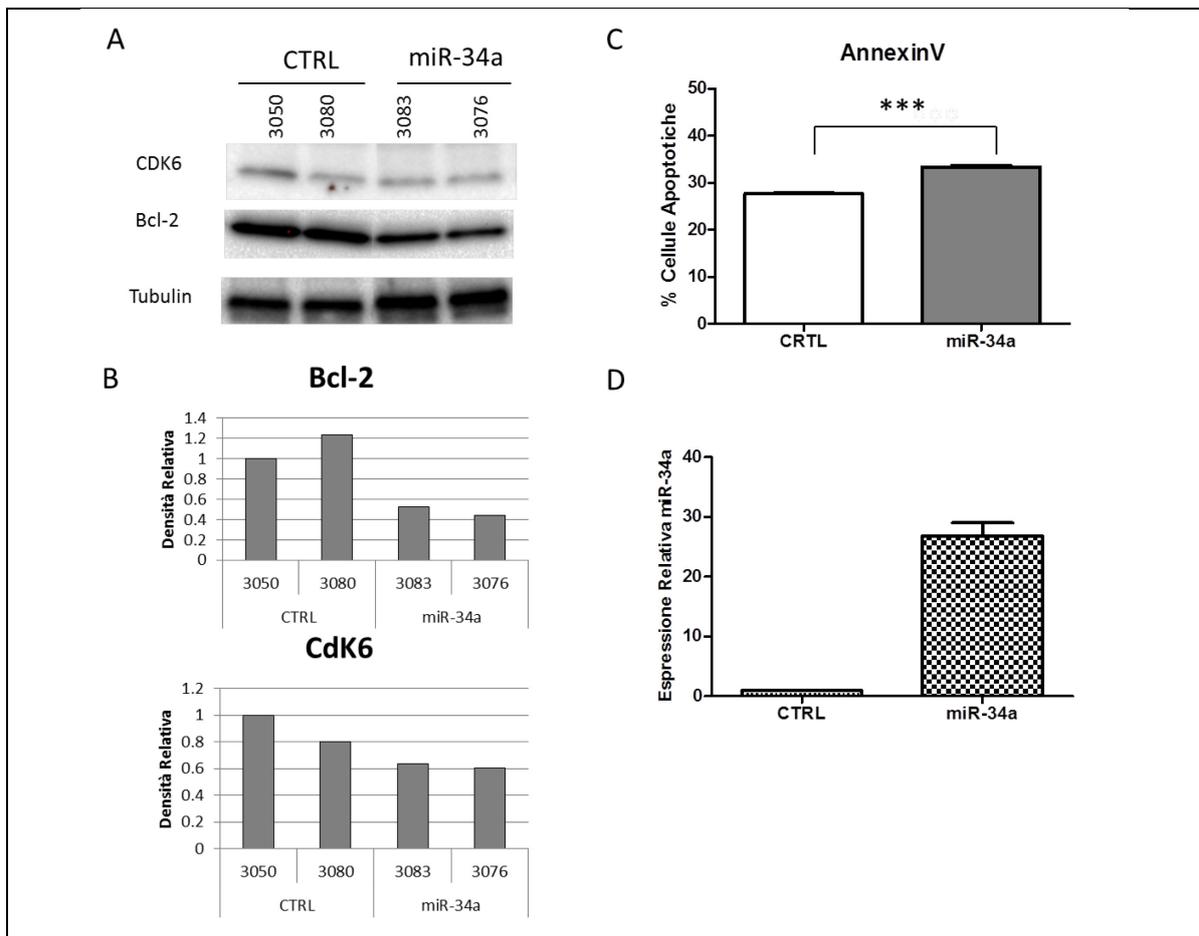


Figura 15. Modulazione dei geni bersaglio del miR-34a *in vivo*.

Topi FVB trapiantati con elevati livelli di malattia sono stati trattati con mimic miR-34a o con un oligonucleotide di controllo e sacrificati dopo 48 ore. (A) Le proteine estratte dagli splenociti dei topi trattati e di controllo sono state utilizzate per l'analisi dei livelli di espressione delle proteine BCL-2 e CDK6 mediante Western Blot. (B) Analisi densitometrica dell'espressione delle proteine BCL-2 e CDK6, i dati riportati in grafico sono stati normalizzati sulla proteina α -tubulina e rapportati ai controlli. (C) Saggio apoptotico eseguito mediante Muse® Annexin V Assay Kit su splenociti dopo 48 ore dal trattamento *in vivo* con miR-34a; si osserva un significativo incremento della percentuale delle cellule apoptotiche totali (apoptosi precoce e avanzata) dopo trattamento con miR-34a (p value < 0.05). (D) q-RT-PCR confermando l'espressione relativa del miR-34a in splenociti murini dopo 48 ore dal trattamento *in vivo*.

Tale dato è stato confermato anche mediante esperimenti *in vitro* condotti su splenociti di topo transgenico E μ -TCL1FL transfettati con 100nM di mimic miR-34a; inoltre in tale analisi è emerso anche che l'effetto pro-apoptotico del miR-34a potrebbe essere indotto dalla sottoespressione di AKT indipendentemente dall'attivazione mediata da TCL1 (fig.16).

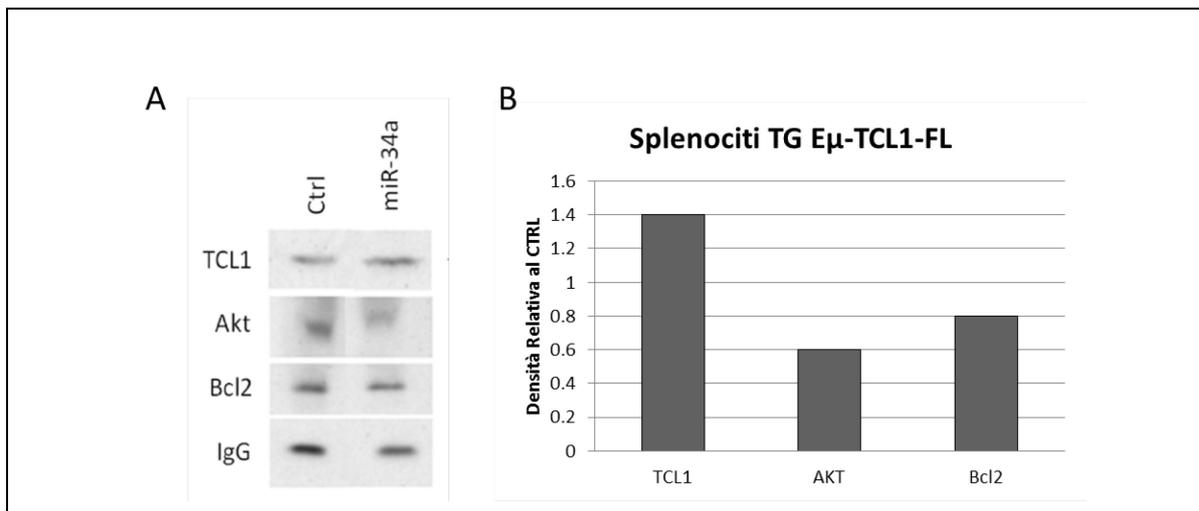


Figura 16. Modulazione dei geni bersaglio del miR-34a *in vitro*.

Splenociti isolati dalla milza di un topo transgenico Eμ-TCL1FL sono state transfettate con 100nM di pre-miR-34a o controllo negative *in vitro*. (A) Le proteine estratte da tali splenociti dopo 48 ore dalla transfezione sono state utilizzate per l'analisi mediante Western blot delle proteine Bcl-2, AKT e TCL1. (B) Analisi densitometrica, i dati riportati in grafico corrispondono al rapporto densitometrico tra il campione transfettato con il miR-34a e quello transfettato con l'oligonucleotide di controllo precedentemente normalizzati sulle rispettive IgG.

5.8 Il miR-181b e il miR-34a sono in grado di rallentare la progressione della leucemia nel modello murino.

Dato l'effetto pro-apoptotico esercitato sia dal miR-181b che dal miR-34a sulle cellule leucemiche dopo brevi trattamenti, riscontrato sia in esperimenti *in vitro* che *in vivo*, abbiamo cercato di determinare se questi due microRNA, comunemente sottoespressi nelle forme aggressive di LLC, potessero diminuire le evidenze cliniche della malattia nei topi trapiantati, andando a monitorare lo sviluppo della leucemia mediante quantificazione delle cellule leucemiche nel sangue periferico dopo trattamenti ripetuti e analisi di sopravvivenza.

Questi ultimi esperimenti riguardanti il miR-181b e il miR-34a sono stati condotti in modo indipendente e in tempi diversi.

Inizialmente ci siamo concentrati sul miR-181b, sei topi trapiantati sono stati trattati con 80μg di mimic miR-181b per tre settimane due volte a settimana, sei topi sono stati trattati con la stessa quantità di oligonucleotide di controllo negativo e sei non sono stati trattati con alcun oligonucleotide.

L'espansione leucemica (EL) è stata monitorata mediante due tecnologie, una di tipo cellulare e l'altra molecolare. Come accennato precedentemente le cellule leucemiche nel sangue periferico sono state individuate mediante analisi citofluorimetrica basata sui marcatori proteici di superficie B220 e CD5. In figura 17 abbiamo riportato le rappresentazioni citofluorimetriche delle vari tipologie di campioni, topo preleucemico (A), topo non trattato (B), topo trattato con

oligonucleotide di controllo (C-D) e infine topo trattato con miR-181b (E-F). Come si può già notare in queste immagini rappresentative nei topi FVB trapiantati e trattati con il miR-181b si riscontra una diminuzione delle cellule leucemiche B220+/CD5dim (regione R2, punti verdi) rispetto ai topi controllo o non trattati. Per ciascun topo è stato calcolato il rapporto tra l'espansione leucemica (EL) prima e dopo il trattamento, il valore medio di tale rapporto per i topi trattati è risultato essere 14, mentre per il gruppo dei controlli di 70. Quindi abbiamo riscontrato una notevole e significativa riduzione delle cellule leucemiche nei topi trattati con il miR-181b rispetto ai topi non trattati o trattati con oligonucleotide di controllo (p value 0.007 e 0.038 rispettivamente); mentre non abbiamo riscontrato alcuna differenza significativa tra i due gruppi di controllo (p value 0.37). Tale dato è stato confermato anche per mezzo di una metodica molecolare basata sulla quantificazione del gene umano TCL1, presente nelle cellule leucemiche del sangue periferico, ottenuta mediante PCR quantitativa (fig.17H); la percentuale di TCL1, indice delle cellule leucemiche, è stata determinata interpolando i dati ottenuti dai vari campioni su una curva standard in cui il 100% della positività al gene TCL1 umano è determinato dal gDNA del topo TG E μ -TCL1FL trapiantato mentre lo 0% dal gDNA di un topo FVB wt (per maggiori dettagli vedere la sezione M&M). Il delta dei campioni sottoposti a trattamento con il miR-181b ottenuto dalla differenza tra la percentuale del gene umano TCL1 presente nelle cellule dopo il trattamento e la percentuale del gene TCL1 presente nelle cellule prima del trattamento, è risultato molto inferiore di quello ottenuto nei topi non trattati o trattati con un oligonucleotide di controllo implicando quindi un significativo rallentamento nella progressione della leucemia (p value=0,0113 e 0,002 rispettivamente).

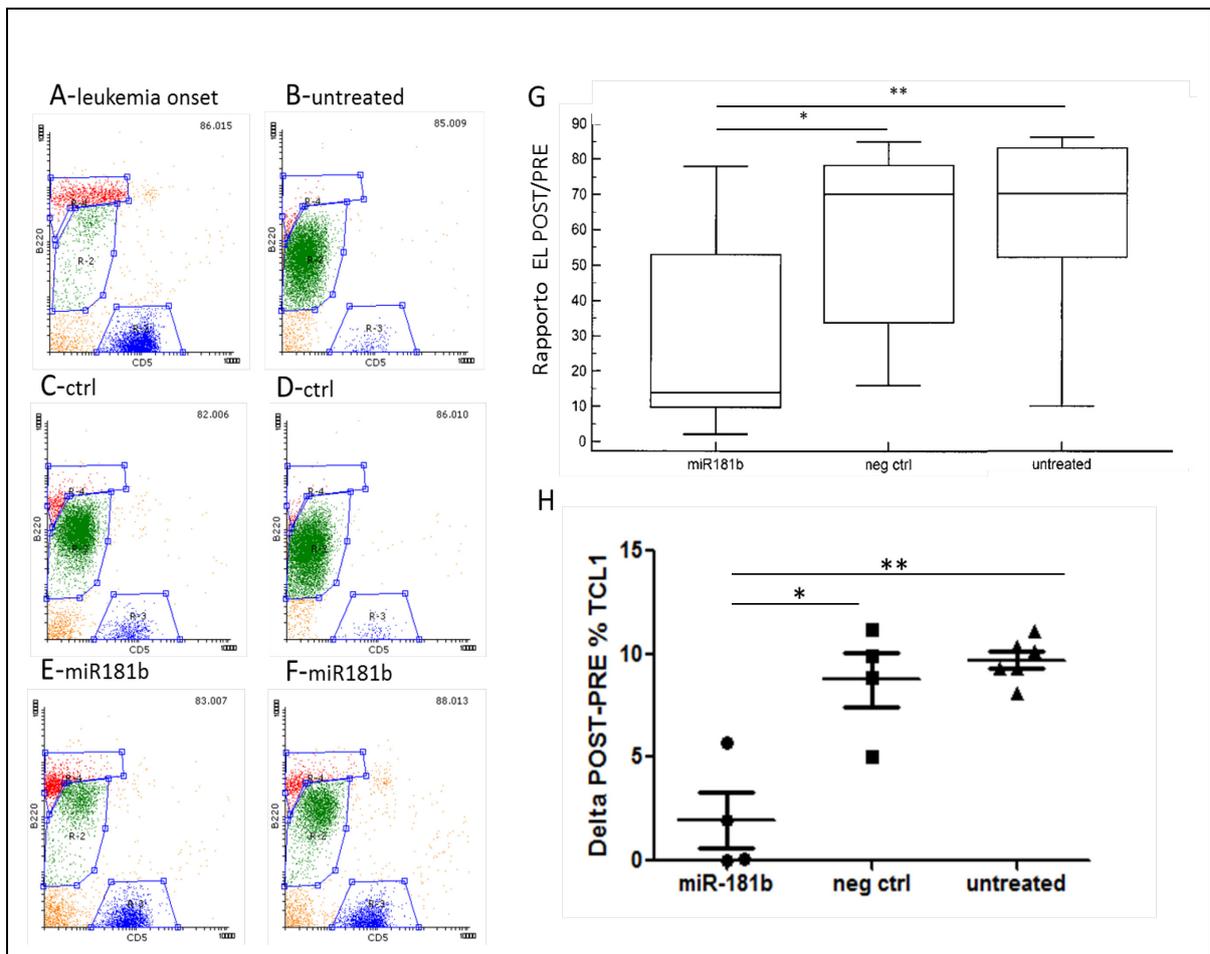


Figura 17. Il miR-181b induce un ritardo nella progressione della leucemia nei topi FVB trapiantati.

Le cellule leucemiche presenti nel sangue periferico sono state identificate sulla base dell'espressione di marcatori di superficie B220 e CD5 analizzate mediante FACS. In figura sono mostrate le immagini rappresentative di topi prima dell'insorgenza della leucemia (A), i topi non trattati (B), topi trattati con oligonucleotidi di controllo (neg Ctrl) (C-D) o topi trattati con il miR-181b (E-F). L'espansione leucemica (EL) è stata valutata come numero di cellule tumorali (R2, punti verdi) rispetto al totale dei linfociti del sangue (R2/(R2+R3+R4) dove R3 sono cellule T (punti blu) e R4 cellule B normali (punti rossi). In figura G è riportato il rapporto tra EL prima e dopo il trattamento con miR-181b o oligonucleotide di controllo monitorata mediante analisi al FACS. La riduzione dell'EL in seguito a trattamento con miR-181b è risultata statisticamente significativa rispetto ai topi trattati con neg ctrl o non trattati (* p value <0.05; ** p value <0,01). (H) Valutazione dell'espansione leucemica mediante PCR quantitativa specifica per il gene hTCL1 eseguita sul gDNA di cellule del sangue periferico di topi prima e dopo il trattamento. Sull'asse delle ordinate è riportato la differenza tra la percentuale di TCL1 dopo e prima il trattamento.

Infine, abbiamo effettuato un'analisi di sopravvivenza dei topi trattati e non trattati. Seguendo le normative nazionali ed europee sulla sperimentazione animale, il sacrificio degli animale è stato fissato al raggiungimento del livello dell'espansione leucemica pari a 70%, livello paragonabile ad uno stadio avanzato di LLC umana, in modo tale da non arrecare ulteriori sofferenze.

I dati di sopravvivenza sono stati raccolti e riportati in figura 18 sottoforma di funzione di Kaplan-Meier; la sopravvivenza dei topi trattati con miR-181b è risultata essere significativamente maggiore sia rispetto a quella dei topi non

trattati (p value 0.004) che a quella dei topi trattati con un oligonucleotide di controllo (p value 0.037); anche in questo caso non si è riscontrata alcuna differenza significativa in termini di sopravvivenza tra i due gruppi di controllo (p value 0.49).

Tutti questi dati finora ottenuti indicano che miR-181b è in grado di ridurre efficacemente l'espansione delle cellule leucemiche, con conseguente prolungata sopravvivenza.

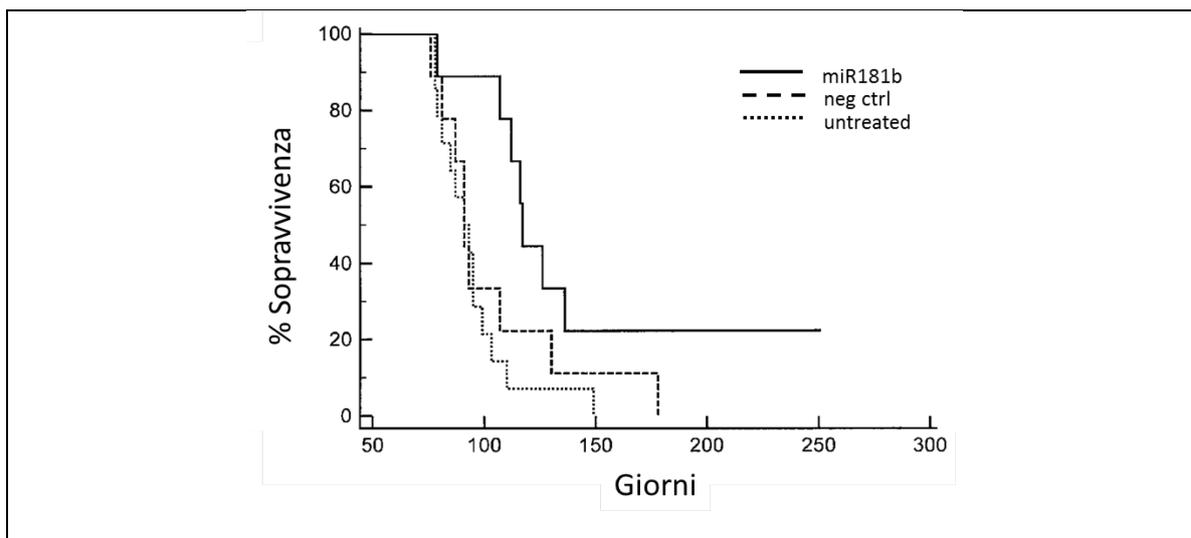


Figura 18. Il miR-181b induce un aumento della sopravvivenza.

Curva di Kaplan-Meier illustrante la percentuale di probabilità di sopravvivenza dei topi trattati con miR-181b (linea continua), neg ctrl (linea tratteggiata) o non trattati (linea tratteggiata). La sopravvivenza dei topi trattati con il miR-181b (sopravvivenza mediana 117 giorni) è risultata essere significativamente maggiore rispetto ad entrambi i controlli: topi trattati con neg ctrl sopravvivenza mediana 91 giorni (p = 0.037), topi non trattati sopravvivenza mediana 92 giorni (p = 0.004) gruppi. Tuttavia non vi era alcuna differenza significativa tra i due gruppi controllo (p = 0.49).

Esperimenti analoghi sono stati eseguiti per valutare anche l'effetto antileucemico del miR-34a. Venti topi FVB trapiantati con splenociti leucemici di topo trasgenico E μ -TCL1FL presentati uno stadio precoce della malattia, circa 7-20% di cellule positive per il gene TCL1 umano, sono stati suddivisi in due gruppi e destinati uno al trattamento con mimic miR-34a e l'altro al trattamento con un oligonucleotide di controllo con lo stesso regime di somministrazione (I.P. 80 μ g di mimic due volte a settimana per tre settimane). Prima di iniziare il trattamento e 24 ore dopo l'ultimo trattamento, abbiamo prelevato un campione di sangue dall' *orbital sinus* di ciascun soggetto per individuare le cellule leucemiche positive per il gene umano TCL1 presenti nel sangue periferico mediante PCR quantitativa. Infatti, data l'elevata riproducibilità sperimentale riscontrata negli esperimenti precedenti condotti sul miR-181b per monitorare l'espansione leucemica ottenuta sia mediate

analisi citofluorimetrica che analisi molecolare, abbiamo deciso di avvalerci in questo caso solo dell'analisi basata su PCR quantitativa.

Come mostrato in figura 19A, anche in seguito al trattamento con miR-34a abbiamo riscontrato, mediante PCR quantitativa, un significativo (p value 0.0023) ritardo nell'accumulo/proliferazione delle cellule leucemiche positive per il gene TCL1 umano nel sangue periferico e in pochi casi anche una regressione della malattia. Inoltre, abbiamo riscontrato un modesto ma significativo (p value 0.03) incremento della sopravvivenza nei topi trattati con miR-34a rispetto ai controlli (fig.19B).

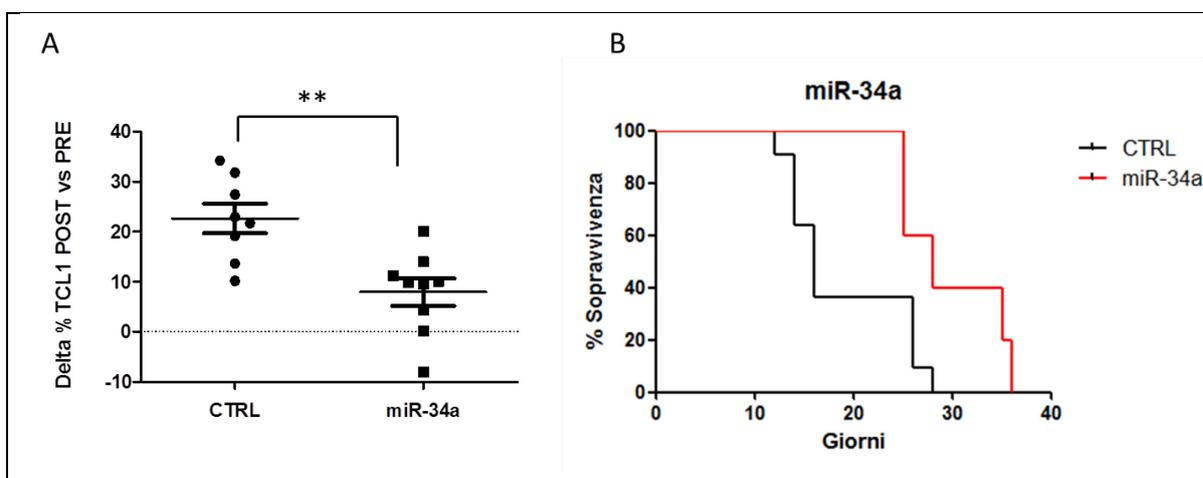


Figura 19. Il miR-34a rallenta la progressione della leucemia e incrementa la sopravvivenza.

(A) Analisi mediante PCR quantitativa per il gene TCL1 indica che ripetuti trattamenti con il miR-34a riducono significativamente l'accumulo/proliferazione delle cellule leucemiche nel sangue periferico dei topi trattati rispetto ai non trattati (p value=0.0023). (B) Curva di Kaplan-Meier illustrante la percentuale di probabilità di sopravvivenza dei topi trattati con miR-34a o con oligonucleotide di controllo (p value 0,03).

DISCUSSIONE e CONCLUSIONE

Nonostante i notevoli progressi, la LLC rimane una malattia incurabile. La terapia attuale per il trattamento della LLC consiste nell'utilizzo di agenti chemioterapici quali fludarabina, ciclofosfamide, bendamustina, clorambucil e agenti immunoterapici come gli anticorpi monoclonali alemtuzumab, rituximab e ofatumumab (24). Tuttavia, la resistenza ai farmaci chemioterapici sta emergendo come una delle principali problematiche da affrontare in una efficace gestione dei pazienti affetti da LLC (2).

Inoltre sebbene i miglioramenti conseguiti nella capacità di prevedere la prognosi di questa leucemia grazie all'utilizzo di parametri clinici, biologici e genetici ci permettano di distinguere pazienti con decorso indolente, intermedio o aggressivo con un alto rischio di sviluppare la leucemia, nonostante l'estrema eterogeneità caratteristica di tale leucemia, un'altra problematica che sta affiorando è la difficoltà nel selezionare la giusta strategia terapeutica specifica per ogni tipologia di paziente (24).

Negli ultimi decenni è emerso sempre più il coinvolgimento dei microRNA nella patogenesi e meccanismi di chemioresistenza della LLC (142), essi quindi potrebbero essere utilizzati sia come marcatori prognostici sia come bersagli/agenti terapeutici.

Nel nostro studio abbiamo utilizzato il modello murino E μ -TCL1FL che sviluppa una leucemia molto simile alla forma aggressiva di LLC umana sia in termini di immunofenotipo, antigeni di superficie e decorso clinico (120, 122) per testare la validità di una nuova strategia terapeutica contro la LLC basata sull'utilizzo del miR-181b e del miR34a.

La scelta di questi due microRNA è dovuta al fatto che essi sono risultati essere sottoespressi nelle forme aggressive di LLC (97, 101) quindi tale terapia potrebbe essere potenzialmente indirizzata a pazienti chemioresistenti caratterizzati da bassi livelli di espressione del miR-181b o del miR-34a.

Pekarsky mediante saggi di luciferasi ha dimostrato che nelle linea cellulare 293 uno dei bersagli molecolari del miR-181b e del miR-29 è l'oncogene TCL-1, gene i cui alti livelli di espressione riscontrati nei pazienti sono correlati ad un fenotipo aggressivo di LLC (101); nei nostri dati non solo abbiamo confermato la regolazione di TCL-1 da parte del miR-181b in cellule B tumorali umane più simili ad un quadro leucemico e in splenociti leucemici murini ma soprattutto abbiamo

rilevato gli effetti di tale regolazione sul processo apoptotico. I nostri dati infatti, in linea con i precedenti, hanno confermato che il miR-181b è un forte inibitore di TCL1 e inoltre hanno evidenziato che il miR-181b è in grado di indurre l'apoptosi e ridurre significativamente la vitalità delle cellule leucemiche umane (EHEB, Raji) e delle cellule leucemiche derivanti dal topo E μ -TCL1FL. L'azione anti-apoptotica esercitata dal miR-181b, inoltre, è risultata essere maggiore di quella di un siRNA anti-TCL1 (fig.6-8) ciò potrebbe essere dovuto al fatto che il miR-181b è in grado di regolare più geni anti-apoptotici contemporaneamente. Tale ipotesi infatti è stata confermata dall'analisi molecolare delle principali vie del segnale coinvolte nella leucemia linfatica cronica in seguito al ripristino di alti livelli di espressione del miR-181b. Ulteriori bersagli molecolari del miR-181b oltre al gene *TCL1* sono ad esempio le proteine anti-apoptotiche Mcl1 e Bcl2 i cui alti livelli sono generalmente riscontrati nei casi di LLC associati a meccanismi di resistenza ai chemioterapici (28, 96, 129, 143). In accordo a tali informazioni, abbiamo riscontrato una diminuzione dei livelli delle proteine TCL1, Mcl1 e Bcl2 sia nelle cellule tumorali isolate dalla milza di topi transgenici E μ -TCL1FL sia nella linea cellulare umana di LLC, EHEB trattate con il miR-181b.

Un'altra via del segnale nota per interferire indirettamente con il processo apoptotico è quella mediata da fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/AKT che porta alla fosforilazione e inattivazione di diverse proteine bersaglio rilevanti nel processo apoptotico (come ad esempio Bad) (144). Inoltre è noto in letteratura che TCL-1 è un attivatore del *pathway* PI3K/AKT in quanto induce, in seguito a processi di fosforilazione, l'attivazione e la traslocazione di AKT dal citoplasma al nucleo (145). Nella nostra analisi abbiamo riscontrato una riduzione dei livelli della proteina AKT e fosfo-AKT con conseguente riduzione dei livelli della proteina Bad fosforilata nelle cellule EHEB in seguito alla transfezione del miR-181b (fig.9); tale riduzione può essere associata all'inattivazione di TCL-1 da parte del miR-181b e giustificare quindi l'aumento dell'apoptosi riscontrata in tali cellule. Tuttavia il miR-181b è in grado di modulare altri due importanti vie del segnale: MAPK/ERK e NF κ B. ERK1/2 è un fattore chiave nella regolazione dei segnali di proliferazione mediati dal *pathway* MAPK/ERK il quale è generalmente deregolato e partecipa alla generazione di segnali mitogenici in essenzialmente tutte le neoplasie ematologiche (146). In vari modelli inoltre è stata dimostrato che l'attivazione di ERK potrebbe salvaguardare le cellule tumorali dai segnali apoptotici e indurre una rapida proliferazione (147); infine è stato anche sperimentato che i segnali

mediati da ERK sono coinvolti nei processi di chemioresistenza (148, 149). ERK1/2 non è un diretto bersaglio molecolare del miR-181b, come si evince anche nei nostri dati dalla assenza di variazione dei livelli della proteina ERK non fosforilata, tuttavia in diversi tumori è stata attestata la presenza di un'interazione tra le vie del segnale Ras/MEK/ERK e PI3K/AKT (131, 133); ciò potrebbe spiegare la marcata diminuzione dei livelli della proteina ERK1/2 fosforilata osservata sia nelle cellule murine che umane transfettate con il miR-181b.

In seguito alla transfezione del miR-181b inoltre abbiamo riscontrato un aumento dei livelli della proteina I κ B α . È ormai noto che la proteina I κ B α è un inibitore di NF κ B, un fattore di trascrizione coinvolto in una varietà di tumori sia solidi che ematologici la cui attivazione induce segnali di proliferazione e sopravvivenza (150).

I nostri dati suggeriscono che il miR-181b possa indurre l'inibizione della via del segnale mediata da NF κ B mediante un meccanismo indiretto che porta all'attivazione di I κ B. Tale meccanismo che collega il miR-181b all'attivazione di I κ B potrebbe essere mediato dalla proteina TCL1, infatti è stato ormai dimostrato che TCL1 è in grado di interagire con I κ B inducendo la sua degradazione (102, 135).

Inoltre, è noto anche che Akt è in grado di attivare IKK, un'altra proteina regolatoria coinvolta nella via del segnale di NF κ B che porta alla degradazione di I κ B (136, 151).

Alla luce di queste informazioni emerge che il miR-181b è coinvolto nella regolazione di molteplici vie del segnale rilevanti nel processo di patogenesi della LLC e che la simultanea inibizione delle vie del segnale mediate da AKT, MAPK e NF κ B attraverso la riduzione dei livelli delle proteine anti-apoptotiche quali TCL1, Bcl2 e Mcl1 potrebbe rappresentare un'ottima strategia per ottenere un maggiore effetto terapeutico. Tale idea è avvalorata anche dal fatto che molti dei nuovi farmaci messi in commercio per il trattamento della LLC hanno come bersaglio molecolare alcune di queste vie del segnale (24, 152, 153).

Un altro potenziale microRNA che potrebbe essere utilizzato come agente terapeutico contro la LLC, emerso nel nostro studio, è il miR-34a. La famiglia del miR-34, comprendente il miR-34a, b e c, ha suscitato un notevole interesse in quanto ha una funzione oncosoppressoria chiave in diverse tipologie di tumori e inoltre è un diretto bersaglio del gene *p53* (107, 139). È già stato dimostrato che in seguito alla sua sovraespressione è in grado di inibire diversi oncogeni portando ad

un aumento dell'apoptosi, arresto del ciclo cellulare e senescenza (114). Inoltre in un recente studio è emerso che bassi livelli di espressione del miR-34a riscontrati nei pazienti affetti da LLC sono associati ad un'inattivazione del gene *p53* ma anche ad una malattia refrattaria alla chemioterapia, alterata risposta al danno del DNA e resistenza all'apoptosi anche indipendentemente dalla delezione 17p e dallo stato mutazionale di *p53* (97).

Nel nostro studio abbiamo dimostrato per la prima volta che il miR-34a è in grado di incrementare i livelli apoptotici degli splenociti leucemici di topi FVB trapiantati aventi una leucemia conclamata in seguito ad un breve trattamento *in vivo* (fig 15); tale effetto potrebbe essere dovuto alla riduzione della proteina Bcl2 e non mediato direttamente da TCL1 come riscontrato nei nostri dati (fig.15-16). La maggior parte dei casi di LLC presenta alti livelli della proteina Bcl2, associati ad ipometilazione del gene *Bcl-2* (154) e tale proteina costituisce il bersaglio di una nuova classe di farmaci gli inibitori di Bcl-2 quali ABT-263 (Navitoclax) e ABT-199 (56, 57) sviluppata per il trattamento della LLC. Il vantaggio dell'utilizzo del miR-34a rispetto ad un inibitore di Bcl-2 potrebbe essere la capacità di tale agente di inibire contemporaneamente più geni coinvolti nel processo di patogenesi della LLC non solo a livello apoptotico (Bcl-2) ma anche del ciclo cellulare (CDK6). Infatti nelle nostre analisi, eseguite su splenociti leucemici murini dopo trattamento con miR-34a, abbiamo riscontrato anche una riduzione della proteina CDK6 coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare e noto bersaglio del miR-34a (108, 155).

Nel 2013 infine, il miR-34a è stato il primo microRNA ad entrare nella fase I di un trial clinico volta a valutare la sicurezza di MRX34 in pazienti con tumore primario del fegato in stato avanzato e non operabile o cancro metastatico con coinvolgimento epatico (114), le informazioni da noi ottenute incentivano ad estendere lo studio clinico anche al trattamento della LLC e non limitatamente all'epatocarcinoma.

Gli esperimenti *in vivo* condotti su topi FVB trapiantati con splenociti leucemici di topo TG E μ -TCL1FL presentanti una leucemia conclamata hanno infatti evidenziato un rallentamento nello sviluppo della leucemia. L'attività anti leucemica del miR-181b e del miR-34a è stata detectabile già dopo un trattamento di sole tre settimane per un totale di sei inoculazioni. I topi trattati hanno mostrato una riduzione nell'accumulo/proliferazione delle cellule leucemiche e un

prolungato periodo di sopravvivenza, rispetto ai topi controllo, manifestando la potenziale attività terapeutica del miR-181b e del miR-34a.

L'assenza di una regressione della malattia potrebbe essere imputato al regime terapeutico prescelto, si potrebbe pensare di programmare più cicli terapeutici o piuttosto è da imputare al sistema di veicolazione prescelto, probabilmente non sufficiente a garantire un efficace e selettivo assorbimento del microRNA da parte di tutte le cellule leucemiche.

Per i nostri studi abbiamo prescelto un semplice sistema per la veicolazione dei microRNA basato sull'utilizzo di un polimero cationico (PEI) che consentisse l'assorbimento del microRNA veicolato a livello della milza. Tale requisito è stato ritenuto essenziale in quanto la leucemia indotta da TCL1 è caratterizzata da splenomegalia, suggerendo che nella milza siano presenti centri di proliferazione da cui hanno origine le cellule leucemiche circolanti. L'inoculazione intraperitoneale di 80µg di mimic microRNA è risultata essere efficace per indurre nella milza un aumento significativo dei livelli del microRNA veicolato per un massimo di 2-3 giorni, indicando che tale lasso di tempo è il periodo massimo che dovrebbe intercorrere tra un'inoculazione e la successiva (fig.13).

Tuttavia i risultati ottenuti suggeriscono che un miglioramento nel sistema di veicolazione dei microRNA potrebbe incrementare la loro efficacia terapeutica. Nel nostro studio l'uso del PEI si è rilevato essenziale per aumentare notevolmente l'assorbimento dei microRNA a livello della milza, che altrimenti in sua assenza sarebbe stato trascurabile; ma esistono notevoli margini di progresso.

L'utilizzo di liposomi o nanoparticelle coniugate con anticorpi specifici, potrebbe incrementare notevolmente l'assorbimento e renderlo più selettivo per le cellule leucemiche. Oggi queste tipologie di approcci sono realizzabili grazie ai continui progressi tecnologici (156, 157).

La validità e riproducibilità dei dati ottenuti riguardanti il potenziale terapeutico del miR-181b e del miR-34a è avvalorata anche dal modello murino prescelto, dal suo utilizzo e dal sistema adoperato per il monitoraggio della malattia che ben rispecchia le condizioni della LLC umana.

Una delle principali applicazioni dei modelli animali di tumori umani è quello di indagare l'efficacia di nuovi approcci terapeutici prima della sperimentazione clinica sull'uomo. Tuttavia, un importante fattore da tenere in considerazione nella valutazione degli effetti di nuove terapie è l'omogeneità del *background* genetico del modello prescelto. Per questo motivo abbiamo deciso di trapiantare gli

splenociti leucemici del topo transgenico E μ -TCL1FL in topi FVB wt in modo tale da ottenere un duplice vantaggio sperimentale. Primo, ridurre le tempistiche sperimentali, in quanto il topo transgenico impiega circa un anno per sviluppare la leucemia (122). Secondo, propagare mediante trapianto singenico e successivamente trattare terapeuticamente la stessa leucemia in topi diversi ma con lo stesso *background* genetico. Tale sistema quindi, permette lo studio della stessa leucemia e costituisce un fattore necessario per la ricerca di farmaci che interferiscono specificamente con i meccanismi coinvolti nel sviluppo della LLC.

Tuttavia, l'utilizzo del modello murino E μ -TCL1FL per testare il potenziale terapeutico del miR-181b potrebbe essere messo in discussione in quanto l'effetto anti-leucemico da noi riscontrato potrebbe essere ritenuto valido solo in questo modello in quanto la leucemia è indotta da TCL1, noto bersaglio del miR-181b.

Tale ipotesi può essere facilmente confutata da diversi dati. Prima di ogni altra cosa, per dimostrare che l'effetto anti-leucemico da noi riscontrato non è dovuto solo all'inibizione di TCL1 da parte del miR-181b, nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato un siRNA anti-TCL1 che teoricamente dovrebbe produrre gli stessi risultati del miR-181b, se gli effetti osservati fossero tutti mediati dall'inibizione di TCL1. Confrontato gli effetti indotti dal miR-181b e dal siRNA anti TCL1 è emerso che il miR-181b presenta un'azione antileucemica significativamente maggiore rispetto a quella del siRNA anti-TCL1.

Inoltre, come già discusso precedentemente il miR-181b è in grado di modulare diverse vie del segnale, non solo quelle mediate dalla proteina TCL1. Al contrario, negli splenociti murini trattati con il siRNA anti TCL1 non abbiamo riscontrato lo stesso molteplice coinvolgimento di diverse vie del segnale proliferativi e apoptotici riscontrati con il miR-181b; quindi ciò potrebbe spiegare anche il minor effetto anti-apoptotico misurato.

Un altro aspetto da tenere in considerazione è che il miR-181b è sottoespresso nella LLC umana e potrebbe essere potenzialmente utilizzato come marcatore della progressione della malattia (19, 96, 123). Queste scoperte suggeriscono che la sotto-regolazione del miR-181b può essere rilevante per la patogenesi della LLC e che le diverse proteine e vie del segnale coinvolte nella deregolazione del miR-181b riportati qui e in precedenti pubblicazioni sono essenziali allo sviluppo e al mantenimento del fenotipo leucemico (129, 130, 158). In particolare nel modello murino e nell'uomo risultano modulate le stesse proteine e vie del segnale. Tenendo in considerazione tali argomentazioni possiamo ritenere che gli effetti

terapeutici indotti dal miR-181b non siano limitati alle sole cellule leucemiche del modello murino E μ -TCL1FL, ma estendibili anche all'uomo.

In conclusione, il nostro studio pone le basi per il futuro sviluppo di un nuovo approccio terapeutico per il trattamento della LLC basato sull'utilizzo del miR-181b e del miR-34a. Il ripristino dell'espressione del miR-181b e del miR-34a induce infatti un effetto pro-apototico delle cellule leucemiche e la modulazione di diverse vie del segnale generalmente deregolate nella LLC e fondamentali per lo sviluppo e progressione della leucemia. Inoltre abbiamo riconfermato che il modello murino E μ -TCL1FL presenta proprietà simili alla LLC umana e la sua validità nello studio di nuovi agenti terapeutici per il trattamento della LLC.

Nel modello murino il trattamento con il miR-181b e il miR-34a porta ad una riduzione della progressione della malattia e ad un incremento della sopravvivenza, ma non ad una remissione; ciò potrebbe essere attribuito al sistema di veicolazione, aspetto critico per lo sviluppo di un approccio terapeutico basato sui microRNA. Tuttavia, tali risultati hanno fornito utili indicazioni a proseguire i nostri studi futuri, focalizzandoci su due aspetti fondamentali: 1) valutare l'attività anti-leucemica esercitata dai microRNA in combinazione con i convenzionali chemioterapici utilizzati per il trattamento della LLC 2) sviluppare nuovi sistemi di veicolazione dei microRNA basati su nanoparticelle coniugate con anticorpi specifici e selettivi per cellule della LLC.

GLOSSARIO

Ax Annessina V

DMSO dimetilsolfossido

FSB Siero Fetale Bovino

IP iniezione intraperitoneale

LLC Leucemia Linfatica Cronica

PBS Tampone Fosfato Salino

PI Propidio Ioduro

PS fosfatidilserina

PBMCs cellule mononucleate del sangue periferico (peripheral blood mononuclear cell)

FISH ibridazione in situ fluorescente

BCR recettore delle cellule B

BTK Bruton tirosin chinasi

PI3K fosfatidil inositolo-3-fosfato

CBL Clorambucil

CR remissione completa

FDA food and drug administration

EMA European Agency for the Evaluation of Medicinal

CDC citotossicità dipendente dal complemento

ADCC citotossicità cellulare anticorpo dipendente

NK natural Killer

RISC RNA-induced silencing complex

AML leucemia mieloide acuta

HCV virus dell'epatite C

RIPA Radio-Immunoprecipitation Assay

EL espansione leucemica

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64:9-29.
2. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nature reviews Clinical oncology*. 2009;6:405-18.
3. Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia & lymphoma*. 2006;47:1477-80.
4. Zanesi N, Balatti V, Bottoni A, Croce CM, Pekarsky Y. Novel insights in molecular mechanisms of CLL. *Current pharmaceutical design*. 2012;18:3363-72.
5. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best practice & research Clinical haematology*. 2007;20:399-413.
6. Sieklucka M, Pozarowski P, Bojarska-Junak A, Hus I, Dmoszynska A, Rolinski J. Apoptosis in B-CLL: the relationship between higher ex vivo spontaneous apoptosis before treatment in III-IV Rai stage patients and poor outcome. *Oncology reports*. 2008;19:1611-20.
7. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood*. 2004;103:1202-10.
8. Nabhan C, Rosen ST. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2014;312:2265-76.
9. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363:105-11.
10. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2004;351:893-901.
11. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2005;352:804-15.
12. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000;343:1910-6.
13. Neilson JR, Auer R, White D, Bienz N, Waters JJ, Whittaker JA, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*. 1997;11:1929-32.
14. Zenz T, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. Molecular diagnostics in chronic lymphocytic leukemia - pathogenetic and clinical implications. *Leukemia & lymphoma*. 2008;49:864-73.
15. Moreno C, Montserrat E. Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: what's ready for prime time use? *Haematologica*. 2010;95:12-5.
16. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475:101-5.
17. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*. 2012;44:47-52.
18. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121:1403-12.
19. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2005;353:1793-801.
20. Dighiero G, Binet JL. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000;343:1799-801.
21. Nana-Sinkam SP, Croce CM. MicroRNA in chronic lymphocytic leukemia: transitioning from laboratory-based investigation to clinical application. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2010;203:127-33.

22. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118:4313-20.
23. Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2012;2012:88-96.
24. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood*. 2013;122:3723-34.
25. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009;114:3367-75.
26. Loeder S, Zenz T, Schnaiter A, Mertens D, Winkler D, Dohner H, et al. A novel paradigm to trigger apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*. 2009;69:8977-86.
27. Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2005;114:441-9.
28. Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*. 2008;112:3807-17.
29. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91:861-8.
30. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000;343:1750-7.
31. Johnson S, Smith AG, Loffler H, Osby E, Juliusson G, Emmerich B, et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet*. 1996;347:1432-8.
32. Lepage M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*. 2001;98:2319-25.
33. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current directions in autoimmunity*. 2005;8:140-74.
34. Hagemester F. Rituximab for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*. 2010;70:261-72.
35. Huhn D, von Schilling C, Wilhelm M, Ho AD, Hallek M, Kuse R, et al. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98:1326-31.
36. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE, et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood*. 2005;105:49-53.
37. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:1164-74.
38. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23:4079-88.
39. Eichhorst B, Fink AM, Busch R, Lange E, Koppler H, Kiehl M, et al. Chemoimmunotherapy With Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Versus Bendamustine and Rituximab (BR) In Previously Untreated and Physically Fit Patients (pts) With Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results Of a Planned Interim Trial, International, Randomized Study Of The German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood*. 2013;122.
40. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic

- leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28:1749-55.
41. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol*. 2006;177:362-71.
 42. Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*. 2002;99:3554-61.
 43. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, et al. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15:1567-74.
 44. Stilgenbauer S, Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2002;347:452-3.
 45. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*. 2004;103:3278-81.
 46. Kharfan-Dabaja MA, Anasetti C, Santos ES. Hematopoietic cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: an evolving concept. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13:373-85.
 47. Pogue SL, Kurosaki T, Bolen J, Herbst R. B cell antigen receptor-induced activation of Akt promotes B cell survival and is dependent on Syk kinase. *J Immunol*. 2000;165:1300-6.
 48. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, Lacasce A, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115:2578-85.
 49. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nature reviews Immunology*. 2003;3:317-30.
 50. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118:3603-12.
 51. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American journal of hematology*. 2013;88:803-16.
 52. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011;117:6287-96.
 53. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31:88-94.
 54. Veldurthy A, Patz M, Hagist S, Pallasch CP, Wendtner CM, Hallek M, et al. The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. *Blood*. 2008;112:1443-52.
 55. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*. 1998;16:395-419.
 56. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30:488-96.
 57. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine*. 2013;19:202-8.

58. Seymour JF, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Miller TP, et al. Updated results of a phase I first-in-human study of the BCL-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) in patients with relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31.
59. Balakrishnan K, Burger JA, Wierda WG, Gandhi V. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood*. 2009;113:149-53.
60. Chanan-Khan AA, Cheson BD. Lenalidomide for the treatment of B-cell malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26:1544-52.
61. Sher T, Miller KC, Lawrence D, Whitworth A, Hernandez-Ilizaliturri F, Czuczman MS, et al. Efficacy of lenalidomide in patients with chronic lymphocytic leukemia with high-risk cytogenetics. *Leukemia & lymphoma*. 2010;51:85-8.
62. Chen CI, Bergsagel PL, Paul H, Xu W, Lau A, Dave N, et al. Single-agent lenalidomide in the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29:1175-81.
63. Badoux XC, Keating MJ, Wen S, Lee BN, Sivina M, Reuben J, et al. Lenalidomide as initial therapy of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118:3489-98.
64. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, Ferrajoli A, et al. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12:5165-73.
65. Zent CS, LaPlant BR, Johnston PB, Call TG, Habermann TM, Micallef IN, et al. The treatment of recurrent/refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL) with everolimus results in clinical responses and mobilization of CLL cells into the circulation. *Cancer*. 2010;116:2201-7.
66. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.
67. Boehm M, Slack F. A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science*. 2005;310:1954-7.
68. Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2007;6:2127-32.
69. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends in genetics : TIG*. 2006;22:165-73.
70. Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce CM. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *Journal of cell science*. 2007;120:1833-40.
71. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10:1957-66.
72. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*. 2004;23:4051-60.
73. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003;17:3011-6.
74. Beezhold KJ, Castranova V, Chen F. Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. *Molecular cancer*. 2010;9:134.
75. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123:631-40.
76. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics*. 2005;37:495-500.
77. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:2999-3004.
78. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:2257-61.

79. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. Annual review of medicine. 2009;60:167-79.
80. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer research. 2005;65:7065-70.
81. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell. 2005;120:635-47.
82. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. Genes & development. 2007;21:1025-30.
83. Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. Cancer research. 2007;67:9762-70.
84. Tam W, Hughes SH, Hayward WS, Besmer P. Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. Journal of virology. 2002;76:4275-86.
85. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. Genes, chromosomes & cancer. 2004;39:167-9.
86. Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. Current opinion in hematology. 2008;15:352-8.
87. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Developmental biology. 2007;302:1-12.
88. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. Cell Cycle. 2008;7:2643-6.
89. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99:15524-9.
90. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102:13944-9.
91. Ferracin M, Zagatti B, Rizzotto L, Cavazzini F, Veronese A, Ciccone M, et al. MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. Molecular cancer. 2010;9:123.
92. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101:11755-60.
93. Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, Taccioli C, Costinean S, Aguda BD, et al. Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2009;114:3872-9.
94. Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. Blood. 2010;116:945-52.
95. Calin GA, Pekarsky Y, Croce CM. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Best practice & research Clinical haematology. 2007;20:425-37.
96. Visone R, Veronese A, Rassenti LZ, Balatti V, Pearl DK, Acunzo M, et al. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011;118:3072-9.
97. Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Buhler A, Kienle D, et al. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2009;113:3801-8.
98. Balatti V, Pekarky Y, Rizzotto L, Croce CM. miR deregulation in CLL. Advances in experimental medicine and biology. 2013;792:309-25.
99. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science. 2004;303:83-6.

100. Weng H, Lal K, Yang FF, Chen J. The pathological role and prognostic impact of miR-181 in acute myeloid leukemia. *Cancer genetics*. 2015.
101. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer research*. 2006;66:11590-3.
102. Gaudio E, Spizzo R, Paduano F, Luo Z, Efanov A, Palamarchuk A, et al. Tcl1 interacts with Atm and enhances NF-kappaB activation in hematologic malignancies. *Blood*. 2012;119:180-7.
103. Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? *Molecular therapy Nucleic acids*. 2014;3:e194.
104. Nagai H, Negrini M, Carter SL, Gillum DR, Rosenberg AL, Schwartz GF, et al. Detection and cloning of a common region of loss of heterozygosity at chromosome 1p in breast cancer. *Cancer research*. 1995;55:1752-7.
105. Zhang H, Zhai Y, Hu Z, Wu C, Qian J, Jia W, et al. Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nature genetics*. 2010;42:755-8.
106. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*. 2008;7:2591-600.
107. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447:1130-4.
108. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology : CB*. 2007;17:1298-307.
109. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular cell*. 2007;26:745-52.
110. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*. 2007;6:1586-93.
111. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2010;17:193-9.
112. Kim NH, Cha YH, Kang SE, Lee Y, Lee I, Cha SY, et al. p53 regulates nuclear GSK-3 levels through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells. *Cell Cycle*. 2013;12:1578-87.
113. Ahn YH, Gibbons DL, Chakravarti D, Creighton CJ, Rizvi ZH, Adams HP, et al. ZEB1 drives prometastatic actin cytoskeletal remodeling by downregulating miR-34a expression. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122:3170-83.
114. Agostini M, Knight RA. miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget*. 2014.
115. Asslaber D, Pinon JD, Seyfried I, Desch P, Stocher M, Tinhofer I, et al. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115:4191-7.
116. Concepcion CP, Han YC, Mu P, Bonetti C, Yao E, D'Andrea A, et al. Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice. *PLoS genetics*. 2012;8:e1002797.
117. Lindow M, Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *The Journal of cell biology*. 2012;199:407-12.
118. Bader AG. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Frontiers in genetics*. 2012;3:120.
119. Simonetti G, Bertilaccio MT, Ghia P, Klein U. Mouse models in the study of chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and therapy. *Blood*. 2014;124:1010-9.
120. Johnson AJ, Lucas DM, Muthusamy N, Smith LL, Edwards RB, De Lay MD, et al. Characterization of the TCL-1 transgenic mouse as a preclinical drug development tool for human chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;108:1334-8.

121. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:6955-60.
122. Efanov A, Zanesi N, Nazaryan N, Santanam U, Palamarchuk A, Croce CM, et al. CD5+CD23+ leukemic cell populations in TCL1 transgenic mice show significantly increased proliferation and Akt phosphorylation. *Leukemia*. 2010;24:970-5.
123. Negrini M, Cutrona G, Bassi C, Fabris S, Zagatti B, Colombo M, et al. microRNAome expression in chronic lymphocytic leukemia: comparison with normal B cell subsets and correlations with prognostic and clinical parameters. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014.
124. Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, et al. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia*. 2006;20:280-5.
125. Virgilio L, Narducci MG, Isobe M, Billips LG, Cooper MD, Croce CM, et al. Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:12530-4.
126. Takizawa J, Suzuki R, Kuroda H, Utsunomiya A, Kagami Y, Joh T, et al. Expression of the TCL1 gene at 14q32 in B-cell malignancies but not in adult T-cell leukemia. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1998;89:712-8.
127. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:965-1014.
128. Yan XJ, Albesiano E, Zanesi N, Yancopoulos S, Sawyer A, Romano E, et al. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:11713-8.
129. Ouyang YB, Lu Y, Yue S, Giffard RG. miR-181 targets multiple Bcl-2 family members and influences apoptosis and mitochondrial function in astrocytes. *Mitochondrion*. 2012;12:213-9.
130. Zhu DX, Zhu W, Fang C, Fan L, Zou ZJ, Wang YH, et al. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis*. 2012;33:1294-301.
131. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18:189-218.
132. Byun HJ, Hong IK, Kim E, Jin YJ, Jeoung DI, Hahn JH, et al. A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:34833-47.
133. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Basecke J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*. 2008;22:686-707.
134. Dai R, Chen R, Li H. Cross-talk between PI3K/Akt and MEK/ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced cell cycle progression and cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *International journal of oncology*. 2009;34:1749-57.
135. Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, et al. Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:19643-8.
136. Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, Vargas JA, Sanchez A, Martin-Saavedra FM, et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2004;18:1391-400.
137. Barcos M, Lane W, Gomez GA, Han T, Freeman A, Preisler H, et al. An autopsy study of 1206 acute and chronic leukemias (1958 to 1982). *Cancer*. 1987;60:827-37.

138. Bonnet ME, Erbacher P, Bolcato-Bellemin AL. Systemic delivery of DNA or siRNA mediated by linear polyethylenimine (L-PEI) does not induce an inflammatory response. *Pharmaceutical research*. 2008;25:2972-82.
139. He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer research*. 2007;67:11099-101.
140. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*. 2005;106:408-18.
141. Balakrishnan K, Gandhi V. Bcl-2 antagonists: a proof of concept for CLL therapy. *Investigational new drugs*. 2013;31:1384-94.
142. Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B cell lymphomas: How a complex biology gets more complex. *Leukemia*. 2014.
143. Faderl S, Keating MJ, Do KA, Liang SY, Kantarjian HM, O'Brien S, et al. Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia*. 2002;16:1045-52.
144. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer cell*. 2003;3:17-22.
145. Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, et al. Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:3028-33.
146. Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 2003;101:4667-79.
147. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*. 2003;17:1263-93.
148. Abrams SL, Steelman LS, Shelton JG, Wong EW, Chappell WH, Basecke J, et al. The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy. *Cell Cycle*. 2010;9:1781-91.
149. Smal C, Lisart S, Maerevoet M, Ferrant A, Bontemps F, Van Den Neste E. Pharmacological inhibition of the MAPK/ERK pathway increases sensitivity to 2-chloro-2'-deoxyadenosine (CdA) in the B-cell leukemia cell line EHEB. *Biochemical pharmacology*. 2007;73:351-8.
150. Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell death and differentiation*. 2006;13:738-47.
151. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999;401:82-5.
152. Cuneo A, Cavazzini F, Ciccone M, Daghia G, Sofritti O, Saccenti E, et al. Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high-risk subgroups. *Cancer medicine*. 2014;3:555-64.
153. Billard C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2014;5:309-25.
154. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1993;82:1820-8.
155. Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, et al. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS letters*. 2008;582:1564-8.
156. Yu B, Mao Y, Bai LY, Herman SE, Wang X, Ramanunni A, et al. Targeted nanoparticle delivery overcomes off-target immunostimulatory effects of oligonucleotides and improves therapeutic efficacy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121:136-47.
157. Yu B, Mao Y, Yuan Y, Yue C, Wang X, Mo X, et al. Targeted drug delivery and cross-linking induced apoptosis with anti-CD37 based dual-ligand immunoliposomes in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Biomaterials*. 2013;34:6185-93.
158. Pallasch CP, Patz M, Park YJ, Hagist S, Eggle D, Claus R, et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114:3255-64.