



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

**XXV CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO**

indirizzo

GENETICO MOLECOLARE

**Identificazione e analisi funzionale delle mutazioni
rilevate nel gene *ANKRD26* responsabili di una nuova
forma di piastrinopenia ereditaria**

Settore disciplinare

MED/03 Genetica Medica

Dottoranda:

Chiara Gnan

Coordinatore:

Prof. Alessandro Ventura

Supervisore di tesi:

Prof. Anna Savoia

**Anno Accademico
2011/2012**

Sommario

Riassunto	3
1. Introduzione	5
1.1 Piastrinopenie	6
1.2 Trombocitopenia ereditaria con volume piastrinico normale	8
1.3 Il gene <i>ANKRD26</i>	9
2. Scopo	11
2.1 Scopo	12
3. Materiali e Metodi	13
3.1 Amplificazione e analisi di sequenza del 5'UTR del gene <i>ANKRD26</i>	14
3.1.1 Reazione di PCR	14
3.1.2 Analisi di sequenza dei prodotti di PCR	15
3.1.3 Digestione	15
3.1.4 Marcatura	15
3.1.5 Purificazione	16
3.1.6 Sequenziamento	16
3.2 Estrazione RNA con TRIZOL e RT-PCR	17
3.2.1 Estrazione RNA con TRIZOL	17
3.2.2 Reazione di retrotrascrizione	18
3.2.3 PCR Multiplex <i>ANKRD26</i> e <i>GAPDH</i>	19
3.3 Clonaggi molecolari e mutagenesi sito specifica	20
3.3.1 Clonaggio molecolare in Topo Cloning	20
3.3.2 Reazione di PCR per generare il frammento WT	21
3.3.3 Reazione di ligasi vettore Topo Cloning ed inserto	22
3.3.4 Clonaggio Molecolare in pGL3-Basic	23
3.3.5 Mutagenesi sito specifica	26
3.4 Linee cellulari	28
3.4.1 Trasfezione in cellule HeLa	28
3.4.2 Differenziamento della linea cellulare DAMI	29
3.4.2.1 Analisi citofluorimetrica con Ab CD61 e IgG1 Isotipico	30
3.4.2.2 Analisi ciclo cellulare con Propidio	30
3.4.2.3 Colorazione MAY-GRUNWALD GIEMSA	30

3.4.2.4	Trasfezioni nelle cellule DAMI	30
3.4.3	Saggio di luciferasi	30
3.4.4	Analisi bioinformatica	33
3.4.5	Saggi EMSA	33
3.4.5.1	Preparazione estratti nucleari	33
3.4.5.2	Marcatura delle sonde oligonucleotidiche	36
3.4.5.3	Preparazione gel di acrilamide al 5%	38
3.4.5.4	Saggio EMSA/Supershift	38
4.	Risultati e Discussione	40
4.1.	Identificazione delle varianti patogenetiche	41
4.2	Caratterizzazione del fenotipo clinico della malattia	43
4.3	Studi di espressione in linee cellulari umane	45
4.4	5'UTR ANKRD26: conservazione e analisi bioinformatica	47
4.5	Studi di espressione della luciferasi in HeLa	48
4.6	Differenziamento delle DAMI e caratterizzazione	50
4.7	Studi di espressione della luciferasi in DAMI	51
4.8	Saggi di mobilità elettroforetica (EMSA)	53
5.	Conclusioni	61
5.1	Conclusioni	62
	Bibliografia	63

Riassunto

La Trombocitopenia 2, anche definita come ANKRD26-Related Disease (ANKRD26-RD), rientra fra le nuove forme di piastrinopenie ereditarie recentemente caratterizzate. Si tratta di una trombocitopenia non sindromica a trasmissione autosomica dominante causata da mutazione nel gene *ANKRD26*. Fra le diverse caratteristiche cliniche spicca un'aumentata incidenza di sviluppare leucemie fra i pazienti affetti.

Data l'associazione con il cancro, si rileva la necessità da una parte di migliorare la diagnosi delle diverse forme per comprenderne il meccanismo patogenetico e dall'altra di caratterizzare il fenotipo clinico della malattia indagando sul ruolo delle mutazioni a carico di *ANKRD26* nell'alterare la produzione di piastrine e nello sviluppo di neoplasie.

Abbiamo, pertanto, analizzato *ANKRD26* in una casistica di pazienti piastrinopenici privi di una diagnosi identificando diverse mutazioni in eterozigosi, tutte localizzate nella regione 5' non tradotta del gene.

I pazienti affetti presentano una piastrinopenia moderata; i sintomi più comuni sono petecchie, ecchimosi, epistassi e menorragia. È stata evidenziata una diminuzione degli alfa granuli e un aumento della trombopoietina sierica. Nel midollo è stata osservata un'importante dismegacariocitopenia.

E' emerso infine, dagli studi fin qui condotti, una correlazione tra ANKRD26-RD e la leucemia: infatti l'incidenza di sviluppare leucemia acuta, nei pazienti con ANKRD26-RD, è di 167 casi su 100000 un'incidenza più alta che nel resto della popolazione stimata fra i 3,4 e 6,6 casi su 100000 (National Cancer Institute).

Per quanto riguarda la ricerca volta a definire i meccanismi patogenetici della malattia, abbiamo ipotizzato che le mutazioni, vista la loro localizzazione in una regione regolatrice, alterassero i meccanismi di controllo dell'espressione di *ANKRD26* durante la megacariocitopenia. Come primo passo, abbiamo eseguito un'analisi bioinformatica per ricercare eventuali fattori di trascrizione che riconoscono la regione delle mutazioni. L'analisi ha evidenziato un sito di legame per il fattore RUNX1. Successivamente abbiamo eseguito dei saggi di luciferasi attraverso i quali abbiamo dimostrato come le mutazioni determinino un aumento statisticamente significativo dell'attività di luciferasi almeno in cellule megacarioblastiche, DAMI, che possono essere differenziate in megacariociti. Infine abbiamo confermato mediante saggi EMSA l'interazione della regione delle mutazioni con il fattore RUNX1 predetto dal programma bioinformatico. Per due mutazioni (c.-128G>A e c.-119C>A), inoltre, abbiamo individuato un altro fattore di trascrizione HMGA1a non predetto dall'analisi bioinformatica.

Infine studi di espressione su CD34⁺ e CD41⁺ hanno mostrato che *ANKRD26* è maggiormente espresso nelle cellule staminali CD34⁺ ed è meno espresso nei megacariociti CD41⁺, lasciandoci ipotizzare che durante il processo di differenziamento ci sia una riduzione dei livelli di espressione del gene.

Tutti questi dati ci suggeriscono, quindi, che il 5'UTR sia coinvolto nella regolazione di *ANKRD26*. Saranno avviate, pertanto, nuove indagini volte ad caratterizzare ulteriormente i meccanismi mediante i quali le mutazioni interferiscono con il controllo dell'espressione, permettendoci di comprendere l'eziopatogenesi e la caratterizzazione della ANKRD26-RD.

1 Introduzione

1.1 Piastrinopenie

Si parla di piastrinopenia (o trombocitopenia) quando il numero delle piastrine circolanti nel sangue è inferiore a $150.000/\text{mm}^3$ [1]. Queste piccole cellule anucleate del sangue, prodotte nel midollo osseo dai megacariociti, giocano un ruolo fondamentale nel processo dell'emostasi: in seguito a trauma vascolare, cambiano forma, rilasciano il contenuto dei loro granuli e si aggregano formando il cosiddetto tappo emostatico primario, che ha la funzione di impedire la fuoriuscita di sangue dai vasi sanguigni [2].

Una bassa concentrazione plasmatica di piastrine, o un deficit nella loro funzione, si traduce in sanguinamenti eccessivi, come emorragie muco cutanee, sanguinamenti dal naso, menorragia e sanguinamenti gastrointestinali occulti [1].

Le piastrinopenie sono un insieme eterogeneo di malattie, la cui natura è, generalmente, di difficile comprensione. La diminuzione del numero di piastrine può essere causata da numerosi fattori: acquisiti o ereditari. Nella maggior parte dei casi la piastrinopenia è un disordine acquisito, rari sono invece i pazienti che ne soffrono fin dalla nascita [3]. Negli ultimi anni, tuttavia, il numero di sospette piastrinopenie ereditarie è andato via via crescendo grazie anche all'introduzione della conta piastrinica elettronica nella routine diagnostica [1].

Nell'ambito delle forme ereditarie si osserva una considerevole varietà sia dal punto di vista clinico (forme sindromiche e non sindromiche) che genetico (forme autosomiche dominanti e recessive; X-linked). Il capitolo delle piastrinopenie ereditarie è quindi in continua espansione e sempre più diversificato.

Ad oggi si conoscono piastrinopenie associate ad un basso numero di piastrine circolanti deficienti di una proteina funzionale, come la Wiskott-Aldrich sindrome (WAS), la X-linked thrombocytopenia (XLT) e la MYH-9 related disorder: nelle prime due vi è un deficit della proteina WASP, coinvolta nella formazione dello citoscheletro [4]; nella terza riscontriamo un difetto nella catena pesante della miosina non muscolare di classe II [1].

Altre piastrinopenie sono causate da mutazioni a carico di geni codificanti per le glicoproteine di membrana GPIIb α , GPIIb e GPIIX, come la Bernard Soulier [5] e la Platelet-type von Willebrand disease [6]. In altre, il problema risiede nell'inabilità dei megacariociti di maturare o produrre piastrine in numero sufficiente a causa di fattori di trascrizione alterati coinvolti nella megacariocitopoiesi (Jacobsen Syndrome, Paris-Trousseau thrombocytopenia, GATA1-related thrombocytopenia)[1].

Alcune originano per difetti della via di segnalazione (Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia e Familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy) [1].

Oltre alle piastrinopenie sopradescritte, grandi sforzi sono stati recentemente dedicati alla caratterizzazione di nuove forme. Infatti, sono state individuate mutazioni a carico dei geni che codificano per il recettore del fibrinogeno (ITGA2/ITGB3) come responsabili della trombocitopenia associata a ITGA2/ITGB3 [7] [8] [9] [10] [11], del gene *FLNA* per la trombocitopenia associata a *FLNA* [12], del gene *CYCS* responsabile della Trombocitopenia 4 [13], del gene *NBEAL2* responsabile della Gray platelet syndrome [14] [15] [16] [17].

Tra le nuove forme identificate è stata infine caratterizzata grazie al lavoro di questa tesi la Trombocitopenia 2, che abbiamo scoperto essere associata a mutazioni nel gene *ANKRD26* [18] [19].

Le forme di piastrinopenia ereditaria, data la crescente diffusione, stanno assumendo una maggior importanza, tanto che il riscontro della natura ereditaria risulta essere essenziale per una diagnosi e un corretto trattamento del paziente al fine di evitare allo stesso pesanti e inutili interventi terapeutici [20]. Considerata l'eterogeneità di queste patologie, per agevolare il percorso diagnostico e il successivo trattamento clinico, nel 2003 è stato proposto dal "Gruppo studio piastrine italiano" un algoritmo diagnostico basato su due livelli di analisi con il quale è possibile riconoscere tutte le forme note [21]. La sua applicazione consente, però, solo nel 50% dei casi di raggiungere una diagnosi che è sempre poi confermata a livello molecolare; nel restante 50% si tratta di forme non ancora ben caratterizzate sia a livello clinico che molecolare.

Dopo una prima distinzione fra forme ereditarie sindromiche e non sindromiche, uno dei parametri più importanti e semplici sul quale si basa l'algoritmo diagnostico è il volume piastrinico medio (medium platelet volume, in sigla MPV). In base al MPV, le piastrinopenie sono suddivise in macropiastrinopenie ($MPV > 8 \mu m$), micropiastrinopenie ($MPV < 4 \mu m$), e normopiastrinopenie ($4 \mu m < MPV < 8 \mu m$).

Nonostante vi possano essere delle misure di volume borderline e misure sottostimate dal contatore elettronico, il volume piastrinico, che è costante per ogni forma di malattia, può essere valutato tramite osservazione al microscopio di strisci di sangue periferico [4].

La maggior parte delle piastrinopenie ereditarie è caratterizzata da MPV aumentato e in minor misura da volume piastrinico normale, mentre solo due sono le forme note con piastrine di volume inferiore alla norma [4].

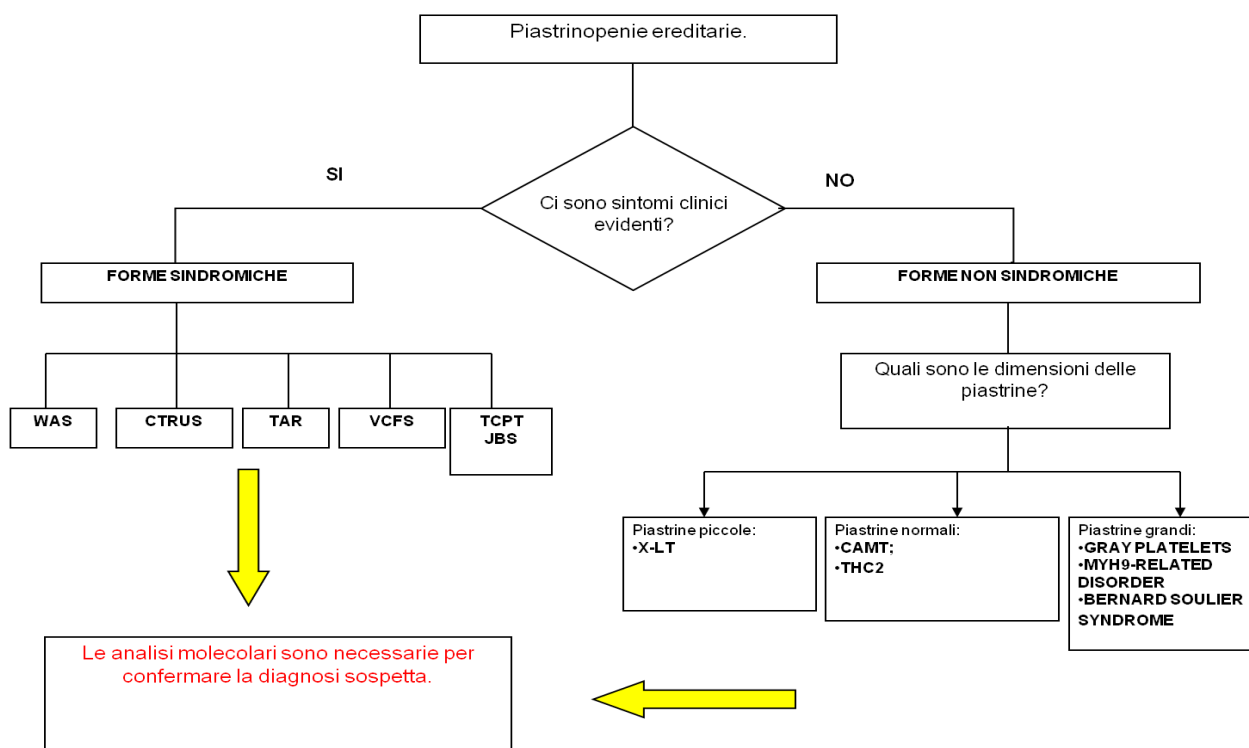


Figura 1: Algoritmo diagnostico per l'identificazione delle piastrinopenie ereditarie.

1.2 Trombocitopenia ereditaria con volume piastrinico normale

Nel 1999 Savoia e colleghi descrissero un'ampia famiglia italiana nelle quale segregava una trombocitopenia con ereditarietà autosomica dominante, caratterizzata da moderata piastrinopenia, normale morfologia delle piastrine e megacariociti midollari nella norma.

In seguito ad analisi di linkage il gene fu mappato sul cromosoma 10p11.2-12, la regione identificata misurava circa 6 cM ed era compresa tra i marcatori D10S586 e il D10S1639 [22]. Nel 2000 un altro gruppo, in maniera indipendente, mappò, in seguito all'analisi condotta su una famiglia americana, il gene responsabile della piastrinopenia nella stessa regione sul cromosoma 10 [23]. Nel 2003 si identificarono due mutazioni missense a carico del gene MASTL e del gene ACBD5, rispettivamente nella famiglia americana [24] e in un'altra famiglia italiana [25]. Nel 2009 uno studio condotto in Zebrafish mise in evidenza una correlazione tra knockdown transiente del gene MASTL e riduzione dei trombociti circolanti [26]. Sempre nello stesso anno il Prof. Balduini dell'Università di Pavia raccolse il DNA dei probandi di 4

famiglie, in cui segregava una forma di trombocitopenia a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da moderata piastrinopenia con sintomi lievi, nelle quali era stato escluso il coinvolgimento di geni già noti. Dopo aver verificato la segregazione del locus *THC2* nelle 4 famiglie e aver ridotto la regione candidata nella quale si localizzava il gene malattia, il nostro gruppo, in collaborazione con il gruppo del Prof. Seri di Bologna, ha selezionato, in base al pattern di espressione e alla funzione accertata o presunta sulla base dei domini proteici, i primi geni, presenti nella regione, da sottoporre allo screening. I geni scelti erano potenzialmente implicati nei processi di differenziamento dei megacariociti e nella produzione delle piastrine, tra cui citochine, fattori di trascrizione, componenti del citoscheletro.

La ricerca di mutazioni ci ha permesso di identificare 4 differenti singole sostituzioni nucleotidiche in eterozigosi in un breve stretch di 19 nucleotidi nella regione *5'untranslated region* (UTR) del gene *ANKRD26* [19]. Una di queste varianti, la c.-134G>A, è stata ritrovata, poi, anche nella famiglia in cui era stata originariamente descritta la mutazione a carico del gene *ACBD5* [22] [19] [25].

Successivamente lo screening, condotto grazie a questa tesi, in un'ampia casistica di pazienti ha permesso di scoprire altre mutazioni, sempre localizzate nel 5'UTR del gene *ANKRD26* [18], portando così il numero di mutazioni fino ad oggi individuate a 12, e di caratterizzare il fenotipo clinico della malattia stessa [19] [18]. All'interno delle singole famiglie, queste varianti segregano con la malattia confermando, a livello genetico, la loro patogenicità [19].

1.3 Il gene *ANKRD26*

Il gene *ANKRD26* è un gene poco caratterizzato, di cui non si conosce ancora né la funzione né il pattern di espressione. È il precursore di un'intera famiglia di geni primato-specifici chiamata POTE genes (Prostate-, Ovary-, Testis-, e placenta- Expressed genes) [27], la cui espressione si ritrova in molti tipi di tumori [28] e nelle cellule staminali embrionali mentre nei tessuti adulti è limitata a prostata, ovaio, placenta e testicolo [29]. Questa famiglia genica codifica per proteine costituite da un dominio aminotermine ricco di cisteine, seguito da ripetizioni di anchirina ed eliche di spectrina [30]. La loro funzione biologica non è ancora chiara, anche se l'elevata espressione negli spermatozoi primari in apoptosi ne suggerisce un possibile coinvolgimento nell'induzione della morte cellulare programmata [31].

Come gli altri membri della famiglia, anche *ANKRD26* presenta ripetizioni di anchirina ed eliche di spectrina, ma manca del dominio ricco di cisteine alla terminazione amminica [30]. Nell'uomo si ritrova nei megacariociti e, in maniera minore, nelle cellule eritroidi [32]. È stato osservato che l'inattivazione in

omozigosi del gene *Ankrd26* nel topo, porta l'animale a sviluppare insulino resistenza, gigantismo e obesità grave [33], mentre la sua conta piastrinica rientra nella norma. Questo fenotipo patologico si discosta molto dal fenotipo che le mutazioni nel 5'UTR provocano nell'uomo, lasciando presupporre che i meccanismi patogenetici nella ANKRD26-related disease siano da associare a un effetto di acquisizione delle mutazioni. A sostegno poi di questa ipotesi nel 2003, nell'ambito del progetto HUMAN GENOME PROJECT, si è completato il sequenziamento del genoma umano di James D. Watson, uno degli scopritori della struttura del DNA nel 1953: dal sequenziamento è emerso che il famoso biologo molecolare possiede una delezione di 31,5Kb riguardante gli ultimi sei esoni del gene *ANKRD26*, e ciò non ha però mostrato avere alcuna ricaduta sulla sua salute [34].

Il gene *ANKRD26* è composto da 34 esoni ed il suo messaggero misura 7,5 Kb. La proteina, di cui si conoscono tre isoforme, è costituita da 1709 aminoacidi e contiene 5 ANKrepeats e cinque domini coiled coil. Il ruolo funzionale di questo gene risulta tuttora ignoto. Per questa ragione sono necessarie ulteriori indagini per esaminare il ruolo di *ANKRD26*, l'effetto patogenetico delle mutazioni individuate e spiegare quindi i meccanismi molecolari che influenzano la produzione di piastrine nei pazienti affetti da ANKRD26-RD.

2 Scopo

2.1 Scopo

Le piastrinopenie ereditarie sono un gruppo di malattie eterogeneo. La formulazione di un algoritmo diagnostico [21] ha consentito la raccolta di un numero sempre crescente di pazienti caratterizzati in modo omogeneo. Ad oggi ben 15 forme di piastrinopenie ereditarie sono descritte in letteratura, diverse però rimangono ancora poco caratterizzate dal punto di vista clinico e molecolare e diventa quindi fondamentale studiarle e descriverle. Proprio all'interno di questo filone di ricerca si colloca il lavoro di questa tesi che, facendo seguito alla identificazione delle prime mutazioni nel gene *ANKRD26*, si pone i seguenti obiettivi:

1. Definire le caratteristiche cliniche e molecolari di questa nuova forma di piastrinopenia ereditaria studiando le famiglie con mutazioni in questo gene.
2. Studiare l'effetto patogenetico delle mutazioni fino ad oggi identificate nel 5'UTR del gene, valutandone, in considerazione della loro localizzazione in una regione di regolazione, il ruolo nel controllo della trascrizione del gene stesso.

I risultati di questa tesi contribuiranno a caratterizzare meglio questa nuova forma di piastrinopenia ereditaria grazie sia all'identificazione di eventuali nuove mutazioni sia agli studi molecolari che intraprenderemo per comprendere i meccanismi patogenetici implicati in questa malattia.

3 Materiali e Metodi

3.1 Amplificazione e analisi di sequenza del 5'UTR del gene ANKRD26

3.1.1 Reazione di PCR

Per la casistica di pazienti analizzata lo screening del 5'UTR del gene ANKRD26 è stato effettuato grazie ai seguenti primers:

ANKRD26 1F 5'-CATGGAGCACACTTGACCAC-3'

ANKRD26 1R 5'-TACTCCAGTGGCACTCAGTC-3'

Per ogni campione è stato utilizzato il seguente protocollo di reazione della polimerasi (PCR):

Reagente	Quantità (µl)	Concentrazione finale
DNA 100ng/µl	1,5	6 ng/µl
Primer 1F 10µM	1,25	0,5µM
Primer 1R 10µM	1,25	0,5µM
2X KAPA2G Fast Hot Start ReadyMix 2X	12,5	1X
DMSO 100%	1	4%
H ₂ O	7,5	
Volume totale	25	

Tabella 1: Composizione della soluzione per la reazione di amplificazione utilizzando DNA genomico.

Ogni reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:

- Attivazione della polimerasi 95°C per 2'
- 30 cicli di amplificazione suddivisi in:
 - Denaturazione a 95°C per 10''
 - Annealing alla temperatura prevista dalla coppia di primers utilizzata per 15''
 - Estensione a 72°C per 2'
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 1'

I prodotti sono stati sottoposti a elettroforesi su gel d'agarosio al 1% in tampone di TBE 1X per verificare la corretta altezza dei prodotti amplificati mediante il confronto con un marcatore.

3.1.2 Analisi di sequenza dei prodotti di PCR

Gli stessi prodotti di PCR sono stati preparati per il sequenziamento attraverso una procedura a quattro fasi.

3.1.2.1 Digestione

Il primo passaggio di questa procedura a 4 step prevede il trattamento dei prodotti di PCR con Esonucleasi I e Fosfatasi Alcalina. Questi due enzimi digeriscono, rispettivamente, i frammenti genici a singola elica e i dNTPs residui dalla reazione di PCR.

Reagente	Volume (μ l)
Prodotto PCR	5
Exosap	2
Volume totale	7

Tabella 2: Composizione della soluzione per la reazione di digestione enzimatica.

- Attivazione enzimatica a 37°C per 15’;
- Inattivazione enzimatica a 85°C per 15’.

3.1.2.2 Marcatura

La seconda fase prevede una reazione di marcatura dei prodotti di PCR.

E’ una reazione molto simile alla PCR da cui si ottengono frammenti marcati di lunghezza diversa. Si utilizza una miscela contenente Ampli Taq DNA polimerasi, dNTPs normali e dNTPs marcati: questi ultimi sono sprovvisti dell’ossidrilico al 5’, pertanto quando vengono incorporati nella catena di DNA nascente ne impediscono l’allungamento.

Il ciclo termico della reazione è così strutturato:

- Attivazione della polimerasi presente nella mix a 96°C per 1’
- 26 cicli suddivisi in:
 - Denaturazione a 96°C per 10’’
 - Appaiamento a 50°C/55°C per 6’’
 - Estensione a 60°C per 1’30’’

La temperatura di appaiamento sarà di 50°C se la temperatura di annealing dei primers utilizzati nella PCR è inferiore o uguale a 60°C, a 55°C se la temperatura di annealing dei primers è superiore o uguale a 60°C.

Reagente	Quantità (μl)	Concentrazione finale
Prodotto di PCR 100 ng/μl	10	50ng/μl
BigDye Terminator3.1	1,5	
Buffer BigDye 5X	2,5	0,6X
Primer 10μM	2,5	1,25μM
H ₂ O	4	
Volume totale	20	

Tabella 3: Composizione della soluzione per la reazione di marcatura.

3.1.2.3 Purificazione

I prodotti della marcatura sono stati purificati utilizzando il kit BigDye Xterminator™ Purification kit (Applied Biosystems).

Reagente	Quantità (μl)
Prodotto di PCR	10
Soluzione SAM	45
Resina BigDye Xterminator	10
Volume totale	65

Tabella 4: Composizione della soluzione di purificazione.

Per permettere alla resina in soluzione di entrare in contatto con i prodotti marcati, la soluzione di purificazione è stata messa in agitazione per 30'. Successivamente il tutto viene centrifugato a 1000 rpm per 2' ed il prodotto di PCR è così pronto per essere caricato nel sequenziatore automatico.

3.1.2.4 Sequenziamento

Il sequenziatore automatico presenta un sistema a 16 capillari riempiti con un particolare polimero che funziona da matrice di separazione nella corsa elettroforetica dei campioni (AB3130cl Applied Biosystem). Il sistema capillare è formato da tre parti: la cella di rilevazione, la barra di caricamento e gli elettrodi dei

capillari. La cella di rilevazione colloca i 16 capillari nella posizione corretta per l'eccitazione da parte del laser; la barra di caricamento, invece, sostiene i capillari e funziona da catodo durante l'elettroforesi.

I campioni vengono caricati simultaneamente all'interno dei capillari e separati elettroforeticamente migrando attraverso il polimero del capillare. Quando il DNA passa attraverso la cella di rilevazione, un raggio laser illumina entrambi i lati dei 16 capillari ed eccita i cromofori legati ai frammenti genici. La fluorescenza emessa è catturata dalla camera CCD che la converte in segnale elettrico, poi processato dal computer. I dati così ottenuti vengono visualizzati mediante elettroferogrammi in cui ad ogni picco di un certo colore corrisponde una specifica base. In questo modo dalla sequenza dei picchi si risale alla sequenza delle basi azotate del frammento analizzato.

Per visualizzare su computer gli elettroferogrammi forniti dal sequenziatore, abbiamo utilizzato i programmi "Chromas Lite 2.0", "FinchTV" o "SeqMan". Utilizzando tali programmi abbiamo analizzato ed allineato le sequenze relative agli individui affetti e ai loro familiari ed abbiamo confrontato queste con le sequenze corrispondenti presenti nella banca dati NCBI Entrez Nucleotide.

3.2 Estrazione RNA con TRIZOL e RT-PCR

3.2.1 Estrazione RNA con TRIZOL

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule utilizzando il reagente TRIZOL (Invitrogen). A 5×10^6 cellule è stato aggiunto 1ml di TRIZOL e lasciato incubare per 5' a temperatura ambiente, per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Per ogni ml di TRIZOL sono stati addizionati 200 μ l di cloroformio. Le provette sono state invertite per 15'' e lasciate ad incubare per 2'-3'. I campioni sono stati centrifugati a 13000rpm per 15' a 4°C. Questa centrifugazione permette di separare la miscela in tre parti: una fase rosa più bassa, un'interfase e una fase superiore acquosa. I residui di RNA rimangono nella fase acquosa, alla quale dopo esser stata recuperata sono stati aggiunti 0,5ml di isopropanolo per far precipitare l'RNA. I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 10' e centrifugati a 13000rpm per 15' a 4°C. L'RNA precipitato, invisibile prima della centrifugazione, forma un pellet. Rimosso il surnatante, il pellet di RNA è stato lavato più volte con 1ml di etanolo al 75%. Terminato l'ultimo lavaggio tutto l'etanolo è stato rimosso e il pellet è stato fatto asciugare in ghiaccio. Quindi è stato risospeso in H₂O DEPC (AMBION) ed è stata determinata la concentrazione mediante spettrofotometro ND-1000 (Celbio) e alcuni μ l sono stati caricati sul gel di agarosio 1%.

3.2.2 Reazione di retrotrascrizione

La reazione di retrotrascrizione in vitro consente di convertire una molecola di RNA in una molecola più stabile, il cDNA. La molecola ottenuta può essere quindi impiegata in successivi esperimenti di PCR. Per la sintesi del cDNA si procede utilizzando il kit "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit" (Roche).

È stata preparata la soluzione (A) di reazione che è stata posta prima a 65°C per 10', quindi per 1' in ghiaccio.

Reagente	Quantità (µl)	Concentrazione finale
RNA totale 1µg/µl	2	100 ng/µl
Oligo dT (50pmol/ µl)	1	2,5pmol/µl
Random Esameri (600pmol/ µl)	2	60pmol/µl
H ₂ O	
Volume totale	13	

Tabella 5: Composizione della soluzione (A) per la reazione di retrotrascrizione.

In seguito si aggiungono 7 µl della soluzione (B) per arrivare ad un volume finale di 20 µl.

Reagente	Quantità (µl)	Concentrazione finale
Transcriptor reverse Transcriptase Reaction Buffer 5X	4	1X
Inibitore dell'RNASI (40U/ µl)	0,5	20U
dNTPs (10mM)	2	1mM
Trascrittasi inversa (20U/µl)	0,5	10U
Volume totale	7	

Tabella 6: Composizione della soluzione (B) per la reazione di retrotrascrizione.

Il ciclo termico della reazione è:

- 25°C per 10'
- 50°C per 60'

L'enzima è poi inattivato a 85°C per 5'.

3.2.3 PCR Multiplex ANKRD26 e GAPDH

Per la reazione di co-amplificazione del gene *ANKRD26* e del gene *GAPDH* abbiamo utilizzato i seguenti primers che generano dei frammenti di 576 nucleotidi per *GAPDH* e 283 nucleotidi per *ANKRD26*.

	Primer Forward (F) 5'->3'	Primer Reverse (R) 5'->3'
<i>GAPDH</i>	5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3'	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'
<i>ANKRD26</i>	5'-GACCGAGATCTCGGCAAG-3'	5'-CAGCACCATGTTCTAGCAG-3'

Tabella 7: Sequenza dei primers utilizzata per amplificare *GAPDH* e *ANKRD26* in cDNA di uomo

È stata eseguita una reazione di co-amplificazione grazie all'enzima Fast Start High Fidelity (Roche).

Reagente	Quantità (µl)	Concentrazione finale
cDNA	1,6	
Buffer 10X+MgCl ₂	5	1X
DMSO100%	0,5	1%
dNTPs 2,5mM	8	0,4mM
Oligo ANKRD26 F 10µM	1	0,2µM
Oligo ANKRD26 R 10µM	1	0,2µM
Fast Start High Fidelity 5U/µl	0,5	2,5U
Oligo GAPDH F 10µM	0,6	0,12mM
Oligo GAPDH R 10µM	0,6	0,12mM
H ₂ O	31,2	
Volume totale	50	

Tabella 8: Composizione della soluzione per la reazione di co-amplificazione di *ANKRD26* e *GAPDH*.

La reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:

- Attivazione della polimerasi 95°C per 2'
- 35 cicli di amplificazione suddivisi in:
 - Denaturazione a 95°C per 30''
 - Annealing a 59°C per 45''
 - Estensione a 72°C per 2'
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 7'

I prodotti sono stati sottoposti a elettroforesi su gel d'agarosio al 1% in tampone di TBE 1X per verificare la corretta altezza dei prodotti amplificati mediante il confronto con un marcatore. Successivamente le bande di *ANKRD26* sono state quantificate rispetto a quelle di *GAPDH* grazie al programma ImageJ.

3.3 Clonaggi molecolari e mutagenesi sito specifica

3.3.1 Clonaggio molecolare in Topo Cloning

Il clonaggio è stato effettuato utilizzando il protocollo Topo TA Cloning (Invitrogen), che consente di inserire rapidamente un prodotto di PCR in un vettore plasmidico. Il vettore plasmidico, fornito con il kit, risulta linearizzato e presenta una singola Timidina (T) protrudente al 3' al fine di consentire la ligazione specifica del prodotto di PCR con il vettore stesso. Questo è reso possibile dal fatto che la Taq polimerasi, durante il processo di amplificazione, aggiunge al prodotto di PCR una singola deossiadenosina al 3'. Inoltre il vettore è legato covalentemente alla Topoisomerasi I, che catalizza il processo di ligazione riducendo il tempo necessario a 5 minuti per ampliconi di dimensioni standard. Per ogni trasformazione è necessaria un'aliquota di cellule chimicamente competenti (TOP10, DH5 α).

Questo vettore presenta:

- Cassetta di resistenza per l'ampicillina e la kanamicina
- Sequenze per i promotori per l'RNA polimerasi T7 e SP6 rispettivamente a monte e a valle del sito di policlonaggio
- Sequenza per il primer M13 Forward e Reverse
- Il sito di policlonaggio è all'interno del gene che codifica per LacZ.

Il vettore pCRII-TOPO (Invitrogen) presenta all'interno del sito di policlonaggio la sequenza del gene lacZ, che codifica per l'enzima β -galattosidasi. Se il frammento si inserisce correttamente nel vettore plasmidico, questo va' ad alterare l'open reading frame del gene codificante per la β -galattosidasi e le

colonie di E. Coli appaiono bianche, viceversa, se il vettore mantiene integro il gene per la β -galattosidasi le colonie appariranno blu in presenza del substrato X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galattoside).

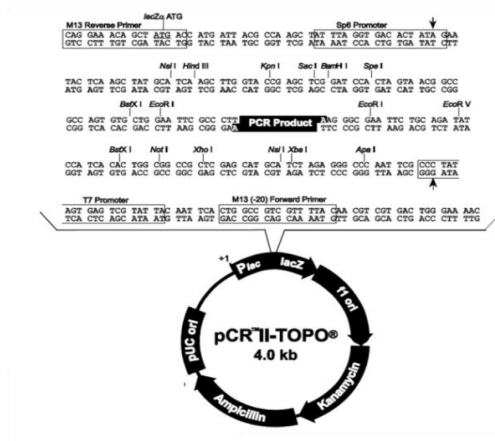


Figura 2: Rappresentazione della mappa del vettore Topo Cloning utilizzato.

3.3.2 Reazione di PCR per generare il frammento WT

Il frammento genico che è stato clonato all'interno del vettore Topo Cloning è un frammento di 730 paia di basi di cui 574 del promotore e 156 nucleotidi del 5'UTR. Il frammento wild type è stato amplificato mediante reazione di PCR su DNA genomico di un controllo sano (tabella 9). I primers utilizzati per l'amplificazione sono: ANKRD26 PROM F 5'-CATAAGGCTGGGCCAAAGG-3' ANKRD26 PROM R 5'-CTTCAGAGACACCTCATGTC-3'.

Reagente	Quantità (μ l)	Concentrazione finale
DNA 100ng/ μ l	1,5	6ng/ μ l
Primer ANKRD26 PROM F 10 μ M	1	0,4 μ M
Primer ANKRD26 PROM R 10 μ M	1	0,4 μ M
Buffer 10X	2,5	1X
dNTPs 2,5mM	2	0,2mM
MgCl ₂ 25mM	1,5	1,5mM
Taq Gold 5U/ μ l	0,5	2,5U
H ₂ O	15	
Volume totale	25	

Tabella 9: Composizione della soluzione per la reazione di amplificazione utilizzando DNA genomico.

Ogni reazione di PCR è stata sottoposta al seguente ciclo termico:

- Attivazione della polimerasi 96°C per 12'
- 30 cicli di amplificazione suddivisi in:
 - Denaturazione a 96°C per 30''
 - Annealing a 60°C per 45''
 - Estensione a 72°C per 1'
- Inattivazione della polimerasi 72°C per 10'

3.3.3 Reazione di ligasi vettore Topo Cloning ed inserto

Dopo aver controllato la regione amplificata mediante sequenziamento, i prodotti di PCR sono stati clonati in pCRII-TOPO. La reazione di ligasi è stata lasciata reagire per 5' a temperatura ambiente prima di essere posta in ghiaccio.

Reagente	Quantità reazione (µl)
Prodotto di PCR	1-4
Soluzione salina	1
Vettore pCRII-TOPO	1
H ₂ O
Volume totale	6

Tabella 10: Composizione della soluzione per la reazione di ligazione tra inserto e Topo Cloning.

Si aggiungono 5µL della reazione di ligazione, ad un'aliquota di cellule competenti (50µL) e si mescola delicatamente. Le cellule vengono incubate in ghiaccio per 30'. A questo punto viene favorita la trasformazione con uno shock termico ponendo le cellule in un bagnetto termico a 42°C per 30''.

Si trasferisce velocemente la provetta in ghiaccio e si aggiungono 250µL di SOC medium a temperatura ambiente. Si pone, quindi, la provetta in agitazione a 200rpm per 1h a 37°C. E' possibile, quindi piastrare 10-50µL della trasformazione, in piastre LB Agar, precedentemente preparate con un antibiotico e contenenti X-GAL (40mg/ml). Le piastre vengono incubate a 37°C per tutta la notte. In genere l'efficienza del clonaggio risulta piuttosto elevata, si ottengono centinaia di colonie e, tra queste, è possibile selezionare solo le colonie bianche, relative alle cellule che contengono il vettore con inserto.

3.3.4 Clonaggio Molecolare in pGL3-Basic

Si è scelto come gene reporter la luciferasi. Abbiamo quindi utilizzato il vettore pGL3-Basic (Promega) portante l'inserto da testare. Questo vettore presenta:

- Cassetta di resistenza per l'ampicillina,
- Gene codificante luciferasi firefly,
- Sequenza segnale di poliadenilazione per SV40,
- Sito di policlونaggio a monte del gene codificante la luciferasi.

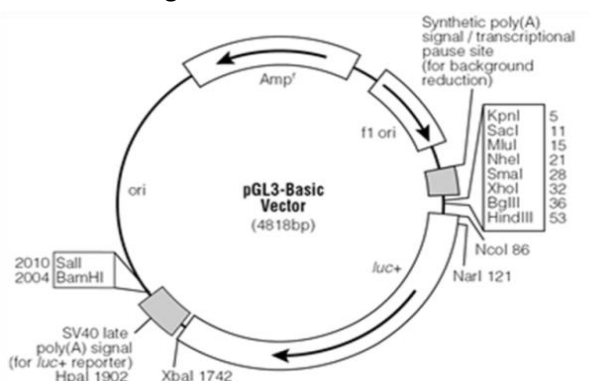


Figura 3: Rappresentazione della mappa del vettore pGL3 Basic utilizzato.

Quindi dopo aver verificato l'orientamento dell'inserto nel Topo Cloning, il costrutto wild type pCRII-TOPO e il vettore pGL3 Basic sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione XhoI e HindIII per 2h a 37°C. Enzimi, questi, presenti con un unico sito di taglio sia nel pGL3 Basic che nel Topo Cloning e non presenti all'interno dell'inserto da clonare. L'utilizzo di due enzimi differenti permette la formazione di estremità sticky sul frammento e quindi di orientare l'inserto all'interno del vettore pGL3 Basic.

Reagente	Volume (μl)	Concentrazione finale
DNA 1μg/μl	4	50ng/μl
Buffer NEB 2 10X	8	1X
Hind III 20U/μl	1	20U
Xho I 20U/μl	1	20U
BSA 10X	8	1X
H ₂ O	58	
Volume totale	80	

Tabella 11: Composizione della soluzione di digestione per il clonaggio dell'inserto in pGL3 Basic.

Al termine della digestione enzimatica tutto il prodotto della digestione è stato caricato sul gel d'agarosio 1% e successivamente sono state isolate le bande corrispondenti all'inserto wild type e al vettore pGL3 Basic mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Sono state effettuate, quindi, due reazioni di ligasi Over Night a 16°C in parallelo: una in presenza dell'inserto di interesse e del vettore pGL3 Basic e una del solo vettore privo di inserto così da valutare la bontà della digestione/ligazione.

Reagente	Volume (µl)	Concentrazione finale
pGL3 Basic 25ng/µl	1	2,5ng/µl
Buffer T4 Ligasi 10X	1	1X
T4 Ligasi 20U/µl	1	20U
H ₂ O	7	
Volume totale	10	

Tabella 12: Composizione della soluzione per la reazione di ligasi del solo vettore pGL3 Basic.

Reagente	Volume (µl)	Concentrazione finale
pGL3 Basic 25ng/µl	1	2,5ng/µl
DNA inserto 10ng/µl	5	5ng/µl
Buffer T4 Ligasi 10X	1	1X
T4 Ligasi 20U/µl	1	20U
H ₂ O	2	
Volume totale	10	

Tabella 13: Composizione della soluzione per la reazione di ligasi tra inserto e pGL3 Basic.

I prodotti di ligazione sono stati trasformati in cellule DH5α e facendoli crescere in piastre LB-Agar.

È stata osservata quindi la differenza fra il numero di colonie trasformate con il vettore che presenta l'inserto e quelle trasformate con il solo vettore richiuso.

Le colonie selezionate sono state fatte crescere in 100ml di LB Broth per una notte e successivamente il DNA plasmidico è stato purificato grazie al protocollo MIDI Prep Kit (Qiagen): quindi è stata valutata la presenza dell'inserto mediante digestione analitica a 37°C per 30', utilizzando gli stessi enzimi utilizzati nel

clonaggio. Dopo il controllo della digestione enzimatica i vettori contenenti l'inserto sono stati marcati, purificati e successivamente sequenziati.

Reagente	Volume (μ l)	Concentrazione finale
DNA 1 μ g/ μ l	1	100ng/ μ l
Buffer NEB2 10X	1	1X
BSA 10X	1	1X
Hind III 20U/ μ l	0,5	10U
Xho I 20U/ μ l	0,5	10U
H ₂ O	6	
Volume totale	10	

Tabella 14: Composizione della soluzione di digestione analitica per verificare la presenza dell'inserto.

Il procedimento prevede che il DNA plasmidico sia sottoposto ad una reazione di marcatura seguita da una purificazione, prima di essere caricato nel sequenziatore automatico. La reazione di marcatura è sotto riportata.

Reagente	Volume(μ l)	Concentrazione finale
DNA plasmidico 100 ng/ μ l	1,5	15ng/ μ l
BigDye Terminator3.1	0,5	
Buffer BigDye 5X	2	1X
Primer 2 μ M	2,5	0,5 μ M
H ₂ O	3,5	
Volume totale	10	

Tabella 15: Composizione della soluzione per la reazione di marcatura dei plasmidi.

Il ciclo termico della reazione è invece strutturato come quello impiegato per la marcatura dei prodotti di PCR (paragrafo 3.1.2.2 Marcatura)

3.3.5 Mutagenesi sito specifica

La mutagenesi sito-specifica è una valida tecnica utilizzata per inserire una mutazione puntiforme in un determinato sito di una sequenza ed è stata sfruttata per ricreare le mutazioni di nostro interesse nel frammento wild type incorporato nel vettore plasmidico Topo Cloning. Questa procedura prevede l'annealing dei primers (contenenti la mutazione puntiforme da inserire) nel vettore in cui è presente l'inserito wild type da mutagenizzare mediante reazione di PCR. I primers utilizzati (tabella 16) hanno una lunghezza compresa fra le 25-45 basi e presentano al centro della sequenza una delle mutazioni di interesse ed hanno una temperatura di melting maggiore o uguale ai 78°C.

Mutazione	Primer Forward (F) 5'->3'	Primer Reverse (R) 5'->3'
c.-134 G>A	5'-CTTGCTTGGTAACCCGGAAGGAGAGATTGGAAACCGC-3'	5'-GCGGTTTCCAATCTCTCCTCCGGGTTACCAAGCAAG-3'
c.-128 G>A	5'-ACCCGGAGGGAGAAATTGGAAACCGCG-3'	5'-GCGGTTTCCAATTTCTCCCTCCGGGT-3'
c.-126 T>G	5'TAACCCGGAGGGAGAGAGGTGGAAACCGCGAGTTT-3'	5'-AAACTCCGCGTTTCCACTCTCTCCCTCCGGGTTA-3'
c.-119 C>A	5'-GAGGGAGAGATTGGAAAACGCGGAGTTTCCTTGG-3'	5'-CCAAAGGAAACTCCGCGTTTCCAATCTCTCCCTC-3'
c.-116 C>T	5'-GAGATTGGAAACCGTGGAGTTTCCTTGG-3'	5'-CCAAAGGAAACTCCACGGTTTCCAATCTC-3'

Tabella 16: Primers utilizzati per le reazioni di mutagenesi. In rosso la mutazione da inserire.

Per ogni campione, sono state trattate 4 diverse concentrazioni di DNA plasmidico: 10-20-50-100ng/μl.

Il programma per ogni reazione di PCR è stato il seguente:

- Attivazione della Taq Fusion a 98°C per 1'
- 18 cicli di amplificazione suddivisi in:
 - Denaturazione a 95°C per 30"
 - Annealing a 55°C per 1'
 - Allungamento a 68°C per 5'
- Inattivazione dell'enzima a 72°C per 7'

Reagenti	Volume (μ l)	Concentrazione finale
DNA 10-20-50-100ng/ μ l	1	0,2-0,4-1-2ng/ μ l
Buffer fusion 5X	10	1X
dNTPs 2,5mM	4	0,2mM
Primer Forward 10 μ M	1	0,2mM
Primer reverse 10 μ M	1	0,2mM
Taq Fusion 2U/ μ l	0,5	1U
H ₂ O	32,5	
Volume totale	50	

Tabella 17: Composizione della soluzione per la reazione di mutagenesi.

L'alta fedeltà della DNA polimerasi utilizzata e i pochi numeri di cicli di PCR aumentano l'efficienza di introdurre solo la mutazione di interesse e diminuiscono la probabilità di generare mutazioni random durante la reazione.

Al termine della reazione di PCR, i prodotti sono stati digeriti con 1 μ l di endonucleasi DpnI (10U/ μ l) a 37°C per 1h. Questo enzima è in grado di discriminare fra filamenti di DNA metilato e non metilato (target sequence: 5'-GmATC-3') e digerire quindi il DNA template: in questo modo sono selezionati solo i neofilamenti di DNA con la mutazione inserita. Per controllo, sono stati caricati 2 μ l di ogni campione su gel d'agarosio 1%. Dopo aver osservato la corsa elettroforetica, sono stati trasformati 5 μ l di ogni preparazione concentrata 50ng. Le colonie selezionate sono state inoculate in 100ml di LB Broth e lasciate crescere a 37°C per una notte in agitazione. Per la purificazione del DNA plasmidico è stato sfruttato il Midiprep Kit (Qiagen).

La digestione plasmidica è stata sequenziata ed è stato controllato, quindi, che l'assetto degli SNP dei diversi costrutti mutagenizzati fosse identico a quello dell'inserito wild type e che nessun'altra mutazione fosse stata inserita se non quella desiderata. Gli inserti sono stati clonati in pGL3 Basic come precedentemente spiegato (paragrafo 3.3.4 Clonaggio Molecolare in pGL3-Basic).

3.4 Linee cellulari

Abbiamo utilizzato due linee cellulari differenti: HeLa e DAMI.

Le HeLa sono una linea cellulare tumorale isolata da cancro della cervice uterina. Queste cellule sono coltivate in un terreno di coltura DMEM (Dulbecco's modified Eagles's medium-Sigma) supplementato con siero fetale bovino al 10% (Sigma), con penicillina-streptomicina (Sigma) ed L-glutamina (Sigma). Le condizioni di crescita ottimali sono: 37°C e 5% di CO₂.

Le DAMI una linea megacarioblastica in sospensione che può mimare in vitro il differenziamento megacariocitario. Queste cellule trattate con trombopoietina (TPO) ed esteri del forbolo (PMA) mutano la loro crescita e iniziano ad aderire alla plastica differenziandosi in megacariociti. Queste cellule sono coltivate in un terreno di coltura RPMI (Invitrogen) supplementato con siero fetale bovino al 10% (Sigma), con penicillina-streptomicina (Sigma) ed L-glutamina (Sigma). Le condizioni di crescita ottimali sono: 37°C e 5% di CO₂.

3.4.1 Trasfezione in cellule HeLa

Con il termine trasfezione si intende l'introduzione di DNA esogeno, clonato in specifici vettori di espressione, in cellule eucariotiche mediante varie tecniche (elettroporazione, precipitazione CaPO₄, lipidi cationici, infezione virale o microiniezione) al fine di ottenere l'espressione del gene reporter nelle cellule.

I costrutti plasmidici, una volta creati, sono stati trasfettati in modo transiente sfruttando il protocollo FuGENE HD kit (Promega) in cellule HeLa. I costrutti plasmidici generati esprimenti la luciferasi firefly sono stati co-trasfettati con un altro vettore: il pRL, contenente il gene reporter di controllo codificante per la Renilla, posto sotto il controllo del promotore costitutivo SV40.

Questo vettore presenta:

- Cassetta di resistenza per l'ampicillina,
- Gene codificante luciferasi renilla,
- Sequenza segnale di poliadenilazione per SV40,
- Promotore costitutivo per SV40.

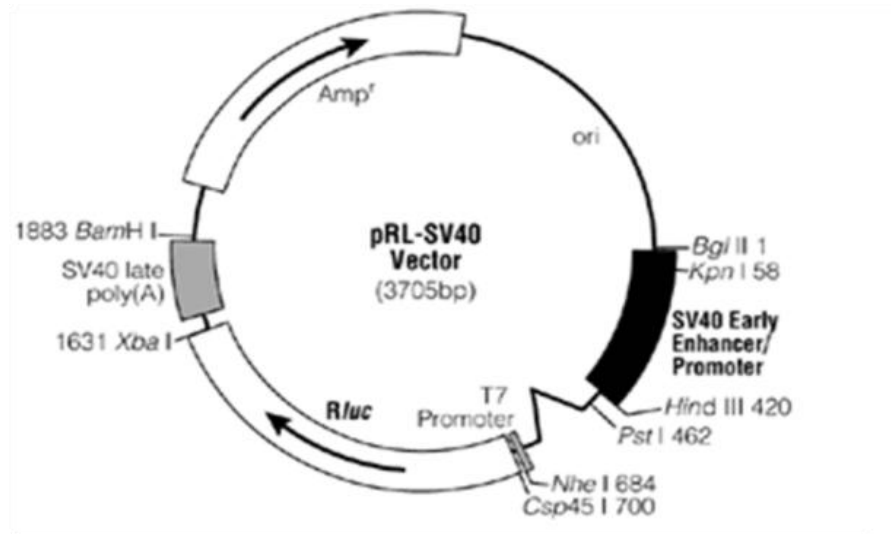


Figura 4: Rappresentazione della mappa del vettore pRL-SV40 utilizzato.

Secondo protocollo, il giorno prima della trasfezione 3×10^5 cellule sono state piastrate in 6-well con 3ml di mezzo completo, e sono state lasciate crescere in incubatore a 37°C con 5% di CO_2 . Il giorno successivo sono stati diluiti $2\mu\text{g}$ di DNA plasmidico (composto da 30ng di pRL e 1970ng di costrutto plasmidico) in $155\mu\text{l}$ di terreno DMEM non completo. Alla soluzione sono stati aggiunti $9,9\mu\text{l}$ di FuGENE. Il tutto è stato lasciato 5' a temperatura ambiente per permettere la formazione dei complessi e quindi distribuito goccia a goccia sulle cellule. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C , è stato eliminato il mezzo, ed è stato eseguito un lavaggio con 3ml di PBS 1X. Successivamente sono stati addizionati alle cellule $250\mu\text{l}$ di PLB (Passive Lysis Buffer 1X Promega) e sono state raccolte mediante scraping. Il lisato è stato centrifugato a 800rpm per 30'' a 4°C per rendere più omogenea la sospensione. Quindi il surnatante ottenuto è stato utilizzato per il saggio di luciferasi.

3.4.2 Differenziamento della linea cellulare DAMI

Secondo protocollo di differenziamento 1×10^6 cellule DAMI sono state seminate in piastre da 10 cm con 15 ml di mezzo completo RPMI a cui si addiziona TPO alla concentrazione finale di 10ng/ml e PMA alla concentrazione finale di 100nM per indurre il differenziamento. Dopo due giorni di differenziamento i megacariociti ottenuti sono stati caratterizzati mediante:

1. Analisi citofluorimetrica (aumento di un marcatore di membrana CD61 l'integrina beta 3; analisi con il propidio per valutare l'aumento del DNA presente nel nucleo)
2. Colorazione citologica (May Grunwald Giemsa)

3.4.2.1 Analisi citofluorimetrica con Ab CD61 e IgG1 Isotipico

Sono state prelevate 1×10^6 cellule suddivise in due provette per citofluorimetro e sono state centrifugate a $300 \times 10'$. Dopo aver eseguito due lavaggi in PBS 1X, al primo fondello di cellule sono stati addizionati $10 \mu\text{l}$ di anticorpo anti-Human CD61 FITC (eBioscience) e $5 \mu\text{l}$ di Mouse IgG1 K Isotype Control FITC (eBioscience) al secondo pellet cellulare. Le cellule sono state quindi lasciate al buio per 20' a temperatura ambiente. Poi è stato eseguito un lavaggio in PBS 1X e quindi le cellule sono state fissate con $500 \mu\text{l}$ di etanolo freddo al 70% per un ora a 4°C . Quindi prima di acquisirle al citofluorimetro sono state nuovamente lavate in PBS 1X.

3.4.2.2 Analisi ciclo cellulare con Propidio

1×10^6 cellule sono state lavate in PBS 1X, quindi centrifugate a $300 \times 10'$. Eliminato il surnatante e aggiunto 1ml di etanolo al 70% freddo le cellule vengono gentilmente risospese. Sono state lasciate ad incubare 1h a 4°C quindi sono state lavate in PBS 1X. Successivamente sono stati addizionati $100 \mu\text{l}$ di RNase per 5' a temperatura ambiente. Quindi sono stati aggiunti $400 \mu\text{l}$ di propidio (Sigma) per 30' a temperatura ambiente, quindi le cellule sono state acquisite al citofluorimetro.

3.4.2.3 Colorazione MAY-GRUNWALD GIEMSA

Per la colorazione MAY-GRUNWALD GIEMSA sono necessarie 1×10^5 cellule che vengono centrifugate a $350 \text{rpm} \times 5'$ per posizionarle sul vetrino. Dopo averle fissate sono state colorate con May Grunwald 1:2 per 5'-10'. Quindi sono state decolorate in acqua corrente e sono state colorate con Giemsa 1:40 per 20'.

3.4.3 Trasfezioni nelle cellule DAMI

Secondo il protocollo di trasfezione le cellule DAMI differenziate e non (2×10^6 cellule) sono state raccolte e centrifugate a 90g per 10' a temperatura ambiente. Quindi il pellet è stato risospeso con $100 \mu\text{l}$ di Nucleofector Solution kit C (LONZA) nei quali sono stati diluiti $2 \mu\text{g}$ totali di DNA (composto da 30ng di pRL e 1970ng di costrutto plasmidico). Dopo aver mescolato i $100 \mu\text{l}$ sono stati trasferiti nelle cuvette. Le cuvette una alla volta sono state poste nel nucleofector ed è stato correttamente utilizzato il programma X-005. Dopo l'avvenuta trasfezione la cuvetta è lasciata per 10' a temperatura ambiente, quindi sono stati aggiunti $500 \mu\text{l}$ di mezzo completo per risospesare le cellule e distribuirle nelle piastre.

3.4.4 Saggio di luciferasi

I sistemi reporter sono ampiamente utilizzati per studiare l'espressione genica eucariotica, ed in genere, per una maggior accuratezza sperimentale, vengono utilizzati reporter duplici. Per reporter duplici

s'intende l'espressione contemporanea di due diversi enzimi reporter in un unico sistema, nel nostro caso la luciferasi firefly e la luciferasi renilla.

L'espressione della luciferasi firefly, il cui gene si trova nei costrutti plasmidici creati, è direttamente correlata all'effetto delle condizioni sperimentali; l'attività del secondo reporter co-trasfettato, la luciferasi renilla, è valutata per avere invece un controllo interno del sistema.

L'attività del reporter sperimentale è infatti paragonata e normalizzata in base all'attività del reporter controllo in modo da minimizzare la variabilità sperimentale causata, ad esempio, dall'efficienza di trasfezione o della lisi cellulare.

I due enzimi utilizzati possiedono due substrati completamente diversi. Ciò rende possibile la discriminazione delle rispettive reazioni di bioluminescenza. La luciferasi firefly è una proteina monomerica di 61kDa che catalizza, in presenza di Mg^{2+} , ATP e O_2 , l'ossidazione della luciferina. La luciferasi renilla è, invece, una proteina monomerica da 36kDa che utilizza come substrato O_2 e Coelenterazina.

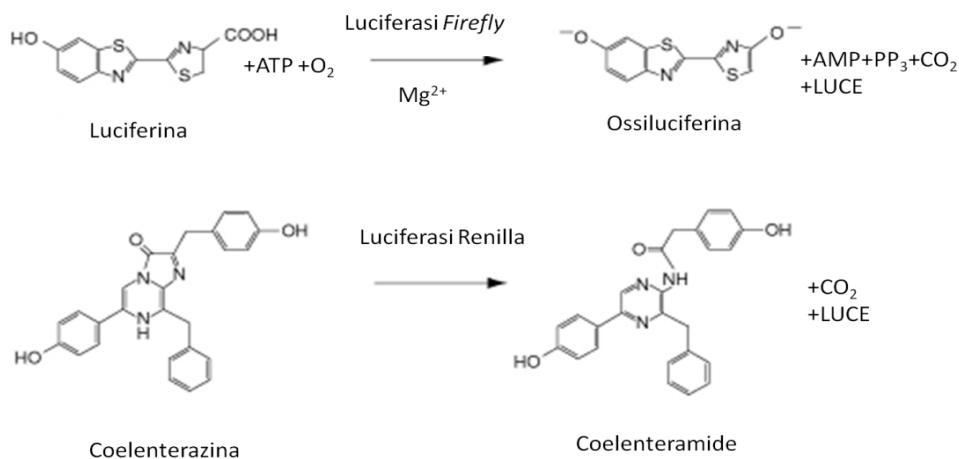


Figura 5: Reazioni di bioluminescenza delle luciferasi Firefly e Renilla.

L'espressione della luciferasi firefly e della luciferasi renilla è stata valutata mediante il protocollo Dual-Luciferase Reporter (DLR) Assay System (Promega), che prevede la quantificazione prima della luminescenza prodotta dalla luciferasi firefly, poi della luciferasi renilla.

A $50\mu l$ di LARII (Luciferase Assay Reagent II), dispensati precedentemente nelle apposite cuvette per luminometro, sono stati aggiunti $10\mu l$ di lisato, mescolando lisato e substrato spipettando delicatamente.

La cuvetta quindi è stata posta nel luminometro (TD-20/20 single tube Luminometer Turner designs) per la lettura della prima bioluminescenza (firefly).

Immediatamente dopo la quantificazione dell'attività della luciferasi firefly, sono stati aggiunti alla sospensione 50µl del reagente Stop&Glo. Il tutto è stato vortexato per 5". Quindi è stata eseguita la seconda lettura (renilla) al termine della quale lo strumento ha fornito i valori delle luminescenze rilevate ed il rapporto fra le due (attività luciferasi firefly / attività luciferasi renilla).

Per ogni lisato le letture sono state effettuate in triplicato e ne sono state calcolate la media dei valori di attività di luciferasi, la varianza e la deviazione standard del rapporto luminescenza luciferasi firefly / luminescenza luciferasi renilla. I dati ottenuti sono stati poi elaborati in grafici in cui è stata riportata il rapporto fra i valori medi delle letture dei diversi costrutti e quelli del vettore plasmidico pGL3 Basic.

In totale abbiamo effettuato tre diversi saggi di luciferasi. I dati collezionati sono poi stati analizzati nel seguente modo: delle tre relazioni fra le medie dei rapporti attività luciferasi firefly/luciferasi renilla ne è stata calcolata la relativa media, deviazione standard e varianza.

Successivamente, per valutare se la variazione di espressione constatata negli esperimenti con i campioni mutagenizzati fosse significativa rispetto all'attività rilevata per il costrutto wild type, abbiamo comparato le relazioni mediante il Test di Student.

Si tratta di un test statistico di significatività che confronta le medie di due o più gruppi di dati, assumendo come ipotesi che non esista alcuna differenza tra i gruppi fatta eccezione del parametro considerato. Se questa ipotesi è valida, significa che le eventuali differenze osservate nei campioni non sono attribuite al solo caso, ma al parametro in oggetto. La probabilità di commettere un errore nel respingere tale ipotesi viene definita livello di significatività del test. Questa probabilità, chiamata valore P (o p value), viene in genere fissata al valore di 0,05: l'ipotesi formulata cioè ha una probabilità di essere errata inferiore o uguale al 5%. Tale valore indica il minimo livello di significatività per il quale l'ipotesi viene rifiutata: se il test fornisce un p value inferiore al livello di significatività del test l'ipotesi è accettata, altrimenti viene rigettata.

Nella sperimentazione di cui sopra sono stati rispettati i parametri previsti nell'applicazione del Test di Student sia in relazione alla distribuzione normale dei dati che in relazione alla raccolta in modo indipendente delle osservazioni.

Nel nostro studio quindi è stata assunta come ipotesi che vi fosse una differenza d'espressione genica fra il costrutto wild type ed ogni costrutto mutato e ne è stata calcolata la significatività. Abbiamo confrontato le relazioni indipendenti e normalizzate di ogni costrutto mutato con quelle del wild type

applicando un Test di Student a due code tenendo conto della varianza ineguale fra le due popolazioni di dati confrontate.

3.4.4 Analisi bioinformatica

Tutte le mutazioni studiate sono localizzate in un breve stretch di nucleotidi al 5'UTR del gene *ANKRD26*, regione in cui vi sono sequenze target per fattori di regolazione dell'espressione genica, fra cui fattori di trascrizione. Per questo motivo, abbiamo sottoposto la sequenza di 156 paia di basi del 5'UTR wild type ad un'indagine bioinformatica per verificare la presenza di eventuali siti di legame per fattori di trascrizione. L'analisi è stata eseguita attraverso la piattaforma <http://bio.chip.org/mapper>.

Mapper è una piattaforma computazionale per l'identificazione di siti di legame dei fattori di trascrizione in diversi genomi. Esso utilizza una tecnica che combina i database TRANSFAC e JASPAR, due banche dati che raccolgono diverse sequenze nucleotidiche in grado di legare fattori di trascrizione in vitro.

3.4.5 Saggi EMSA

La tecnica Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) è uno dei saggi più utilizzati per studiare l'interazione tra proteina e DNA. Tale metodica si basa sul principio per cui il DNA diminuisce la propria mobilità elettroforetica quando è legato ad una proteina. Il saggio viene eseguito in elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni non denaturanti.

3.4.5.1 Preparazione estratti nucleari

Gli estratti nucleari utilizzati per i saggi EMSA sono lisati di DAMI a 2 giorni dall'inizio del differenziamento. I lisati nucleari sono stati preparati grazie alle seguenti soluzioni:

SOLUZIONE A:

Reagente	Volume	Concentrazioni
Hepes 1M pH7.9	500 µl	10mM
KCl 250mM	2 ml	10mM
MgCl ₂ 2M	38 µl	1,5mM
EGTA 0,1M	50 µl	0,1mM
DTT 1M	5 µl	0,1mM
PMSF 100mM	250 µl	0,5mM
H ₂ O milliQ	47ml e 157µl	
Totale	50 ml	

Tabella 18: Miscela della soluzione A

Il ditioneitolio (DTT) e il fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) vengono aggiunti al momento dell'utilizzo delle soluzioni.

SOLUZIONE B:

Reagente	Volume	Concentrazione
Hepes 1M pH7.9	500 μ l	10mM
NaCl 5M	4 ml	400mM
MgCl ₂ 2M	38 μ l	1,5mM
EGTA 0,1M	50 μ l	0,1mM
DTT 1M	5 μ l	0,1mM
PMSF 100mM	250 μ l	0,5mM
Glicerolo 100%	2 ml e 500 μ l	5%
H ₂ O milliQ	42ml e 657 μ l	
Totale	50 ml	

Tabella 19: Miscela soluzione B

Le cellule ancora adese alle piastre sono state lavate 2 volte in PBS 1X freddo. Successivamente sono state raccolte mediante scraping e pellettate a 800g per 5'a 4°C. Il pellet è stato risospeso in 2ml di PBS 1X e trasferito in una eppendorf quindi ricentrifugato.

Successivamente è stato risospeso in 2 volumi di soluzione A (nel nostro caso il pellet corrispondeva circa a 300 μ l e quindi sono stati utilizzati 600 μ l di soluzione A). La risospensione cellulare è stata fatta passare per 10 volte in una siringa da 1ml con un ago 25 gauge precedentemente raffreddata a 4°C per permettere la rottura delle cellule. Quindi la sospensione cellulare è stata centrifugata a 4°C a 2000rpm per 10' per separare i nuclei dal citoplasma. Il pellet infatti sarà costituito dai nuclei, il surnatante dalle proteine citoplasmatiche. Sono state raccolte anche le proteine citoplasmatiche e sono state aliquotate in differenti eppendorf.

Il pellet nucleare è stato risospeso e quindi sono stati aggiunti 2 volumi di soluzione A. Quindi è stato centrifugato a 2000rpm per 10' ed è stato eliminato il surnatante (citoplasma diluito). Al pellet è stato aggiunto un volume di soluzione B, in questo caso, 300 μ l ed è stato lasciato in agitazione nel termoblocco a 4°C a 400rpm per 30' per favorire l'estrazione proteica. Quindi è stato centrifugato a 20000rpm o 50000g per 30' a 4°C. Il surnatante è stato aliquotato 10 μ l per eppendorf e congelato immediatamente in azoto e conservato a -80°C.

Gli estratti nucleari sono stati quantificati mediante colorazione in BLUE Comassie in gel di Tris-Tricina al 15% .

Stock Running

Reagente	Quantità	Concentrazioni
Stock Running Tris-Tricina 15%	3 ml e 110 μ l	9%
Acrilamide 40%	1 ml e 870 μ l	15%
APS 25%	20 μ l	0,1%
TEMED	4 μ l	
Totale	5ml	

Tabella 20: Miscela di reazione per Stock Running

Stock Stacking

Reagente	Quantità	Concentrazioni
Stock Stacking 5%	871 μ l	4%
Acrilamide 40%	125 μ l	5%
APS 25%	4 μ l	0,1%
TEMED	2 μ l	
Totale	1ml	

Tabella 21: Miscela di reazione per Stock Stacking

È stato preparato il solvente campione: blu di bromofenolo SDS2X a cui è stato aggiunto DTT in rapporto 1:5 con il quale l'estratto nucleare è stato diluito 1:1 ed è stato bollito per 3' per ridurre i ponti disolfuro. La corsa viene effettuata in Anode Buffer 1X e Catode Buffer 1X, applicando una differenza di potenziale ai due poli della cella elettroforetica. La stessa avviene in due fasi distinte:

- Accumulo delle proteine all'interfaccia stacking-running 20mA per 30';
- Corsa e quindi separazione delle proteine a 5mA per 45'.

La colorazione del gel con Blue Coomassie permette di visualizzare le proteine e di valutare quantitativamente le proteine separate purchè si disponga di un'opportuna curva di calibrazione costruita mediante l'utilizzo di una proteina a concentrazione nota.

Come campione di riferimento è stato considerato un estratto precedentemente quantificato concentrato 1,7µg/µl. Questo estratto è stato diluito a 0,5µg/µl e sono stati caricati sul gel diverse concentrazioni crescenti (0,5µg = 1µl; 1µg = 2µl; 2µg = 4µl; 4µg = 8µl; 6µg = 12µl) in maniera da creare una retta di taratura con cui quantificare il nostro estratto nucleare. Del nostro estratto nucleare sono stati caricati 1, 2, 4 µl. Quindi il gel è stato fatto correre per 30' a 20mA per accumulare le proteine nell'interfaccia tra stacking e running. La corsa è poi stata fatta a 50mA per 45'. Quindi il gel è stato posto nella soluzione di fissaggio Blue Coomassie (Blue R-250) in agitazione per l'intera notte. Il giorno seguente il gel è stato lavato con H₂O milliQ quindi è stato decolorato in una soluzione di acido acetico al 10%. Successivamente è stata acquisita l'immagine mediante uno scanner grazie al software LAB SCAN IMAGE. Le bande degli estratti sono state elaborate grazie al software LAB2D e i valori sono stati riportati in un foglio Excel ed elaborati in una retta lineare di interpolazione, quindi sono stati calcolati i µg dell'estratto nucleare di nostro interesse (2 µg/µl).

3.4.5.2 Marcatura delle sonde oligonucleotidiche

Per ottenere una sonda a doppia filamento radiomarcata si parte da due oligonucleotidi a singolo filamento e solo quello meno ricco in GC al 5' verrà marcato secondo la reazione riportata nella tabella 22.

Reagente	Volume (µl)	Concentrazione
DNA (single strand 10pmoli/ µl)	1	0,5pmoli/µl
T4-PNK chinasi 10U/µl	1	10U
T4-PNK Buffer 10X	2	1X
H ₂ O	12	
γ ³² P-ATP (3000Ci/mmol)	4	
Totale	20	

Tabella 22: Miscela di reazione per la marcatura con fosforo radioattivo degli oligonucleotidi

La mix, alla quale è stato aggiunto per ultimo il fosforo radioattivo, è stata posta per 60' a 37°C: la stessa è stata poi bollita per 2' per inattivare la T4-PNK chinasi (Epicentre), aggiungendo 2,2 µl di una soluzione NaCl 3M. È stato successivamente introdotto il filamento complementare in volume doppio rispetto al primo filamento (2µl): il tutto è stato fatto bollire per 10'. Quindi la mix è stata fatta raffreddare in acqua molto lentamente per far avvenire l'annealing specifico fra i due filamenti. Dopo circa 3 ore, quando la reazione è risultata completamente fredda, è stato necessario rimuovere l'ATP in eccesso presente nella provetta. Sono state impiegate delle colonnine cromatografiche MicroBioSpin 30 (BioRad). Le colonne sono state precedentemente equilibrate con una soluzione TEN Buffer (10mM Tris HCl pH7.5; 1mM di EDTA pH8; 100mM NaCl). La stessa soluzione, utilizzata per equilibrare le colonne, è stata addizionata (circa 80µl di TEN Buffer) alla mix della reazione di marcatura (20 µl), portando così la reazione a circa 100 µl totali. Tutte le miscele sono state quindi aggiunte alla colonnine che sono state centrifugate per 4' a 3400rpm. La resina della colonna lascia passare il DNA marcato e trattiene l'ATP in eccesso. Il DNA duplex marcato alla concentrazione di 0,1pmoli/µl è stato trasferito in una nuova provetta con il tappo a vite ed è stato posto a -20°C. Nella tabella 23 sono riportate tutte le sequenze dei primers utilizzati per creare le sonde a doppio filamento.

Nome sonda	Primer Forward (F) 5'->3'	Primer Reverse (R) 5'->3'
ANKRD26wt	5'-GGAGGGAGAGATTGGAAACCGCGGAGTTTC-3'	5'-GAAACTCCGCGGTTTCCAATCTCTCCCTCC-3'
C+ RUNX1	5'-GTTTCCGCACCGCAGTTCCTCGG-3'	5'-CCGAGGAACTGCGGTGCGGAAAC-3'
C- RUNX1	5'-GTTTCCGCATTTTTGTTCTCGG-3'	5'-CCGAGGAACAAAAATGCGGAAAC-3'
ANKRD26-134G>A	5'-GGAAGGAGAGATTGGAAACCGCGGAGTTTC-3'	5'-GAAACTCCGCGGTTTCCAATCTCTCTTCC-3'
ANKRD26 128G>A	5'-GGAGGGAGAAATTGGAAACCGCGGAGTTTC-3'	5'-GAAACTCCGCGGTTTCCAATTCTCCCTCC-3'
ANKRD26-127A>G	5'-GGAGGGAGAGGTTGGAAACCGCGGAGTTTC-3'	5'-GAAACTCCGCGGTTTCCAACCTCTCCCTCC-3'
ANKRD26-119C>A	5'-GGAGGGAGAGATTGGAAAACCGCGGAGTTTC-3'	5'-GAAACTCCGCGTTTTCCAATCTCTCCCTCC-3'
ANKRD26 118C>A	5'-GGAGGGAGAGATTGGAAACAGCGGAGTTTC-3'	5'-GAAACTCCGCTGTTTCCAATCTCTCCCTCC-3'
RUNX1A	5'-GTAACCCGGAGGGAGAGATTGG-3'	5'-CCAATCTCTCCCTCCGGGTAC-3'
RUNX1B	5'-GAAACCGCGGAGTTTCCTTTGG-3'	5'-CCAAAGGAAACTCCGCGGTTTC-3'

Tabella 23: Sequenze dei primers utilizzati come sonde per EMSA. In rosso evidenziata la base mutata.

3.4.5.3 Preparazione gel nativo di acrilamide al 5%

Per il saggio EMSA sono stati utilizzati dei gel di acrilamide da 31 pozzetti alla concentrazione del 5%.

Reagente	Volume	Concentrazioni
Acrilamide/bis Acrilamide 40%	12,5ml	5%
TBE 5X	10ml	0,5X
H ₂ O milliQ	77,5ml	
APS 25%	300µl	0,075%
TEMED	120µl	
Totale	100ml	

Tabella 24: Miscela di reazione per la preparazione del gel di acrilamide al 5%.

I gel sono stati lasciati a polimerizzare a temperatura ambiente per un'intera notte. Il giorno successivo sono stati fatti percorrere in TBE 0,5X per 16 ore a 4°C a 75V.

3.4.5.4 Saggio EMSA/Supershift

Il protocollo per la reazione di legame Proteine/DNA e per l'eventuale saggio di supershift con anticorpo e/o siero è riportato nella tabella 25.

Reagente	Volume (µl)	Concentrazioni
Buffer RUNX1 10X+DTT	2	1X
BSA 10mg/ml	1	0,5µg/µl
Glicerolo 100%	2	10%
Poli dG & dC	1,5	
SONDA 0,1pmoli/µl	1	0,005pmoli/µl
Estratto nucleare 0,2 µg/µl	5	1µg
H ₂ O milliQ	...	
Ab/IgG	1 - 2 - 4	0,5µg-1µg-2µg
Totale	20	

Tabella 25: Miscela di reazione per la reazione di legame proteina/DNA e anticorpo e/o siero.

Il Buffer RUNX1 10X, utilizzato, è composto da:

Reagente	Volume	Concentrazioni
Hepes 1M pH7.9	150µl	3mM
Triton 100%	25µl	0,05%
MgCl ₂ 2M	1,25ml	50mM
H ₂ O milliQ	48ml 575µl	
Totale	50ml	

Tabella 26: Miscela del buffer RUNX1.

Dopo aver preparato la mix di reazione sono state aggiunte le diverse sonde. Il tutto viene aliquotato in pozzetti di una piastra (microtiter) a cui sono stati addizionati i microlitri dell'estratto nucleare e nel caso del saggio di supershift i microlitri dell'anticorpo specifico o dell'anticorpo aspecifico IgG. La piastra è stata tenuta per 20' a 4°C per far avvenire il legame tra proteine/DNA/ ed eventualmente anticorpo. Sempre in camera fredda è stato caricato il gel quindi la corsa è stata condotta per 1h e 45' a 300V in TBE 0,5X. Terminata la corsa il gel è stato fissato in acido acetico al 10% per 20', quindi lavato in H₂O milliQ per 2'-3' ed essiccato su carta 3MM imbevuta di H₂O milliQ. Il gel dopo l'essiccazione è stato posto all'interno di una cassetta apposita ed esposto ad una lastra. Il giorno seguente la lastra è stata sviluppata.

Gli anticorpi anti-HMGA1a e anti-RUNX1 (Santa Cruz) e i sieri pre-immuni (anti-rabbit e anti-goat) sono stati quantificati mediante western blot confrontandoli con dei sieri rispettivamente anti-rabbit e anti-goat precedentemente quantificati (8µg/µl anti-rabbit e 1µg/µl anti goat).

4 Risultati e Discussione

4.1 Identificazione delle varianti patogenetiche

Le prime mutazioni identificate in *ANKRD26*, c.-134G>A, c. -128G>A, c.-127A>T e c.-118C>T, tutte localizzate nella regione 5'UTR del gene [19], erano sostituzioni nucleotidiche in eterozigosi, non presenti nei database pubblici e in 100 cromosomi di controllo.

Avendo a disposizione un'ampia casistica di pazienti piastrinopenici che, nonostante le accurate indagini previste dall'applicazione dell'algoritmo diagnostico, sono rimasti privi di una diagnosi, abbiamo analizzato il 5'UTR del gene *ANKRD26* in 155 pazienti, di cui 88 con piastrine dal volume aumentato e 67 pazienti con un volume normale. Mentre non abbiamo riscontrato alcuna mutazione nei casi con piastrine di volume aumentato, abbiamo, invece, identificato mutazioni, tra cui 8 nuove alterazioni, in 25 pazienti con piastrine di volume normale, indicando come questa caratteristica possa rappresentare un aspetto distintivo della malattia. L'analisi di segregazione nelle famiglie dei 25 probandi ci ha permesso di verificare la completa penetranza della malattia: le specifiche mutazioni erano presenti in tutti gli individui affetti (N. 36) ma non in quelli sani (N. 12)

Dodici sono, quindi, le mutazioni fino ad oggi identificate: sono tutte localizzate in una corta regione di 22 nucleotidi del 5'UTR del gene *ANKRD26* (Figura 6 e Tabella 27).

In particolare, diverse mutazioni possono colpire la stessa posizione: A>T o A>G in posizione -127 e C>A o C>T in posizione -118. Mentre alcune mutazioni sono state identificate in una sola famiglia, altre sono presenti in più nuclei familiari apparentemente non imparentati. La mutazione c.-128G>A è quella più frequente, essendo stata identificata in 7 probandi.

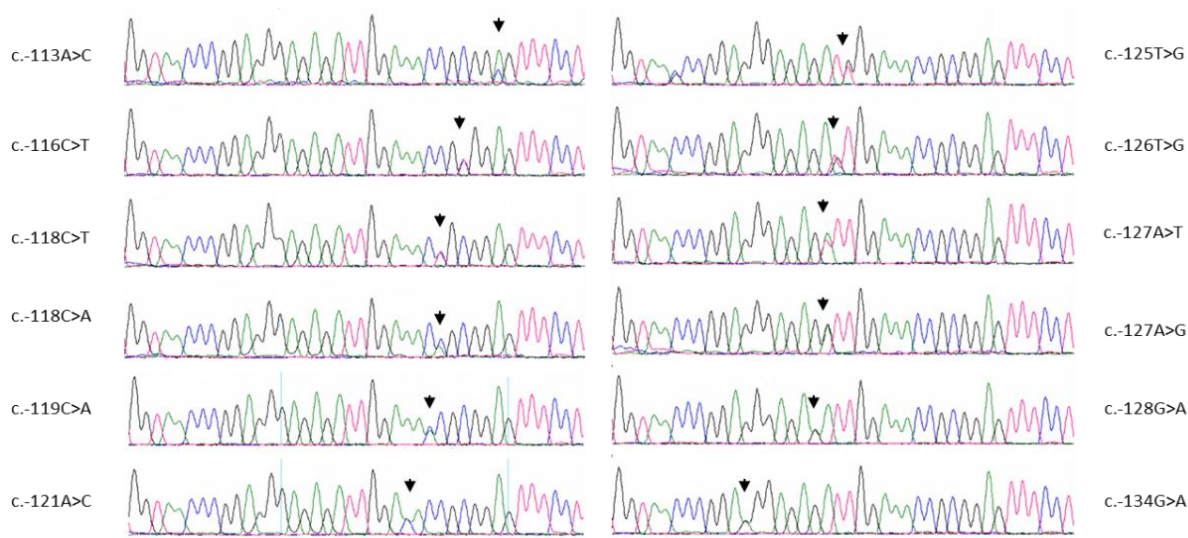


Figura 6: Elettroferogrammi che mostrano le 12 sostituzioni in eterozigoti fino ad oggi identificate nel 5'UTR del gene *ANKRD26*.

Famiglia	Affetti	Sani	Mutazioni
1	2	0	c.-134G>A
2	2	0	c.-134G>A
3	1	0	c.-128G>A
4	1	0	c.-128G>A
5	2	0	c.-128G>A
6	6	3	c.-128G>A
7	1	0	c.-128G>A
8	3	0	c.-128G>A
9	2	1	c.-128G>A
10	2	0	c.-127A>T
11	1	1	c.-127A>T
12	1	0	c.-127A>G
13	9	5	c.-127A>G
14	3	0	c.-127A>G
15	3	0	c.-126T>G
16	2	0	c.-125T>G
17	2	0	c.-125T>G
18	3	0	c.-121A>C
19	1	0	c.-119C>A
20	4	0	c.-118C>A
21	2	0	c.-118C>A
22	1	0	c.-118C>T
23	2	0	c.-118C>T
24	2	1	c.-116C>T
25	3	1	c.-113A>C
TOTALE	61	12	

Tabella 27: Elenco delle 12 sostituzioni nucleotidiche evidenziate nel 5'UTR del gene *ANKRD26* in 25 famiglie. Sono riportati il numero dei soggetti affetti (compresi i 25 probandi) e di quelli sani all'interno delle diverse famiglie.

4.2 Caratterizzazione del fenotipo clinico della malattia

Grazie alla casistica fino a qui raccolta, è stato possibile definire le caratteristiche di questa nuova forma di piastrinopenia. ANKR26-RD si manifesta, nella maggior parte dei casi con una piastrinopenia moderata (concentrazione piastrinica nel sangue compresa fra $10 \times 10^9/L$ e $20 \times 10^9/L$) e solo in alcuni pazienti la conta piastrinica è inferiore a $10 \times 10^9/L$. I sintomi più comuni consistono in petecchie, ecchimosi, epistassi e menorragia.

Le piastrine presentano volume normale ($4 \mu m < MPV < 8 \mu m$) senza particolari difetti nella morfologia o nella funzionalità. Mediante immunofluorescenza è stata, però, osservata una riduzione di α -granuli (granuli secretori contenenti Trombospondina-1), difetto che, tuttavia, non è presente in tutti i pazienti e dunque non strettamente associato alla piastrinopenia (Figura 7).

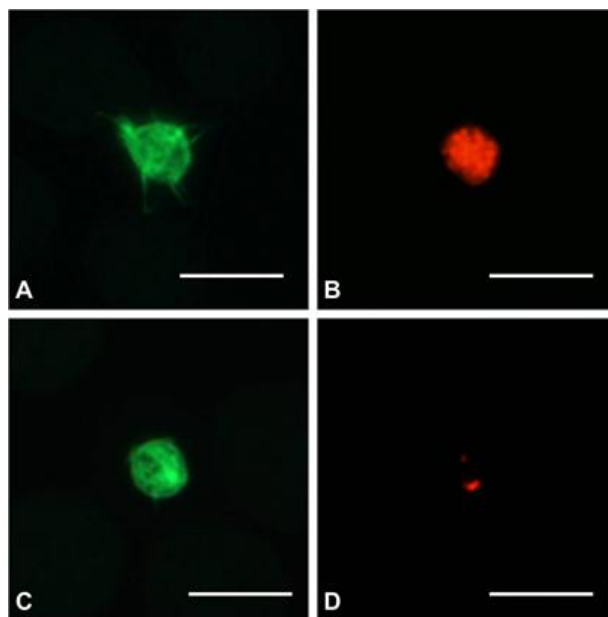


Figura 7: Strisci di sangue periferico da controllo sano e paziente affetto da ANKRD26-RD. Le piastrine sono state identificate mediante anticorpo contro F-actina (verde) mentre gli α -granuli con anticorpo contro la proteina P12 TSP1 (rosso).
(A-B) Piastrina da soggetto di controllo con normale contenuto in α -granuli.
(C-D) Piastrina di un paziente affetto da ANKRD26-RD con due granuli TSP1 +.
La barra di scala rappresenta $5 \mu m$. [35].

L'analisi in citofluorimetria delle glicoproteine di membrana [(GPIIIa (CD61) GPIIb (CD41) GPIX (CD42a)] ha mostrato un'espressione variabile anche se non ci sono evidenze circa difetti consistenti nell'aggregazione piastrinica. È emerso, invece, che i pazienti ANKRD26-RD possiedono dei livelli sierici di trombopoietina (TPO) maggiori rispetto ai controlli sani di ben sette volte [35]. La trombopoietina è il principale fattore di

crescita che regola la proliferazione e la maturazione dei megacariociti [36]. Inoltre è noto che i livelli di TPO sono inversamente correlati alla massa dei megacariociti [37]. Perciò i livelli della TPO nella ANKRD26-RD sono giustificati da ciò che emerge dall'analisi del midollo osseo dei pazienti, da cui si evince un'importante dismegacariocitopoiesi, con numerosi piccoli megacariociti distrofici ad ogni stadio di maturazione (Figura 8).

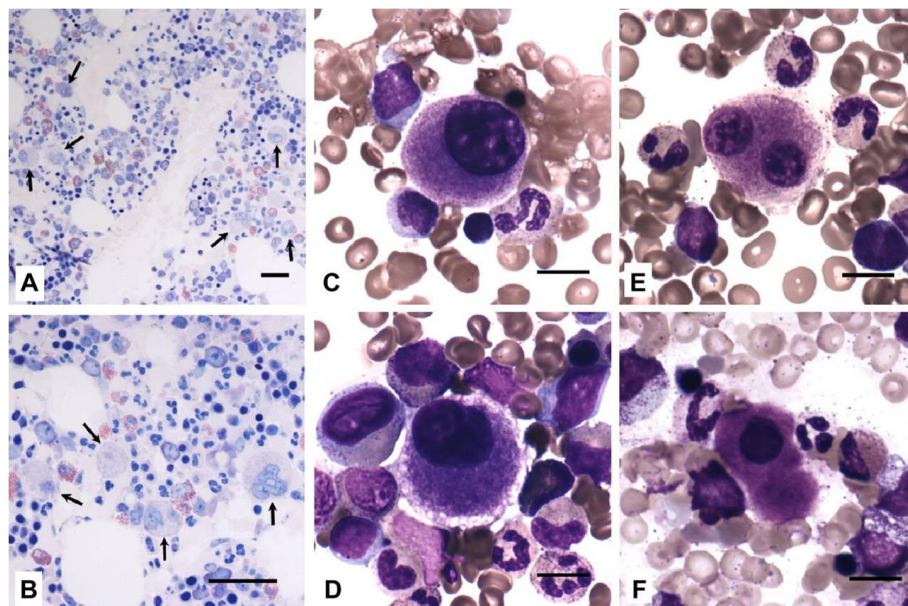


Figura 8: Strisci di midollo osseo da pazienti affetti da ANKRD26-RD.

- (A-B) Biopsia trattata con colorazione ematossilina-eosina in cui si denotano cellule normali con un maggior numero di megacariociti (frecce). La barra di scala rappresenta 50µm.
- (C-D-E-F) Strisci di midollo osseo trattati con colorazione May-Grünwald-Giemsa in cui i megacariociti presenti sono distrofici con nuclei ipolobulati e una piccola quantità di un citoplasma eosinofilo. La barra di scala rappresenta 10µm. [35].

Dagli studi clinici, inoltre, emerge un'importante correlazione tra ANKRD26-RD e leucemia. Considerando i soli soggetti con ANKRD26-RD accertata, l'incidenza di leucemia acuta è di 167 casi su 100.000: un'incidenza più alta che nel resto della popolazione, stimata fra i 3,4 e 6,6 casi su 100.000 (National Cancer Institute, <http://seer.cancer.gov/statistics/>). Ci sono casi di leucemie croniche mieloidi o linfatiche, o sindromi mielodisplastiche.

Il possibile ruolo di ANKRD26 nella carcinogenesi è sostenuto da alcuni dati della letteratura. Il primo descrive una mutazione somatica *missense* (p.K1300N) nella regione codificante del gene ANKRD26 in un paziente con la leucemia mieloide acuta [38]; la seconda evidenza è che ANKRD26 è *up-regolato* durante il silenziamento del *tumor suppressor* RARRES1 (*Retinoic acid receptor responder protein 1*). Sahab e colleghi

hanno, infatti, dimostrato che il silenziamento di RARRES1 in cellule immortalizzate di una linea epiteliale prostatica provoca una diversa espressione proteica di una serie di proteine tra cui ANKRD26 rispetto alle cellule in cui il fattore non è stato silenziato facendo emergere che la proteina ANKRD26 è up-regolata [39].

Tuttavia per il numero ristretto di casi fino ad oggi studiati non possiamo stabilire in modo significativo che le mutazioni a carico del gene *ANKRD26* predispongano allo sviluppo di leucemie acute o di altri tumori del sangue. Sono necessarie pertanto altre indagini volte ad aumentare la casistica e studiare il ruolo del gene nei meccanismi molecolari implicati nella carcinogenesi.

Questi dati, clinici e molecolari, che descrivono questa nuova forma di piastrinopenia ereditaria sono stati oggetto di una recente pubblicazione [18].

4.3 Studi di espressione in linee cellulari umane

Come precedentemente accennato, scarse sono le informazioni su *ANKRD26* compreso il pattern di espressione nei diversi tessuti. Sappiamo che nell'uomo il gene è espresso a livello dei megacariociti [32], ma nulla sappiamo circa l'espressione in altre linee cellulari umani o tessuti. L'analisi semi-quantitativa che abbiamo condotto tramite RT-PCR su RNA di diverse linee cellulari umane ha mostrato che il gene è espresso uniformemente, anche se a livelli basali (35 cicli di PCR) in HeLa, nei linfoblasti, e in diverse linee di leucemie (Jurkatt, K562 e DAMI) (Figura 9).

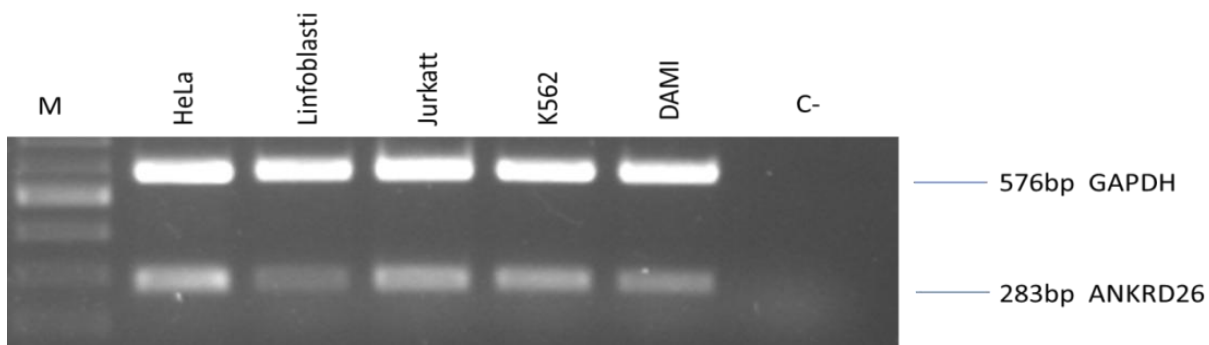


Figura 9: RT-PCR multiplex semiquantitativa. Co-amplificazione del gene *housekeeping GAPDH* (576bp) e del gene *ANKRD26* (283bp) in diverse tipi di cellule (HeLa, Linfoblasti, Jurkatt, K562, DAMI). Si può osservare come l'espressione del gene *ANKRD26* sia presente nelle diverse linee cellulari anche se a livelli basali.

In particolare, un'attenta analisi delle sole cellule della linea ematopoietica ha mostrato che l'espressione del gene è molto debole, rilevabile solo con 35 cicli di amplificazione, nei megacariociti (CD41+)(Figura 10 lane 3) ed è invece maggiormente espressa nelle cellule CD34+ e nelle BFU-E (Figura 10 lanes 1 e 2). Sulla base di questi dati abbiamo ipotizzato che i livelli di espressione del gene *ANKRD26* diminuiscano col procedere della megacariopoiesi e che le mutazioni interferiscano con questo processo di silenziamento.

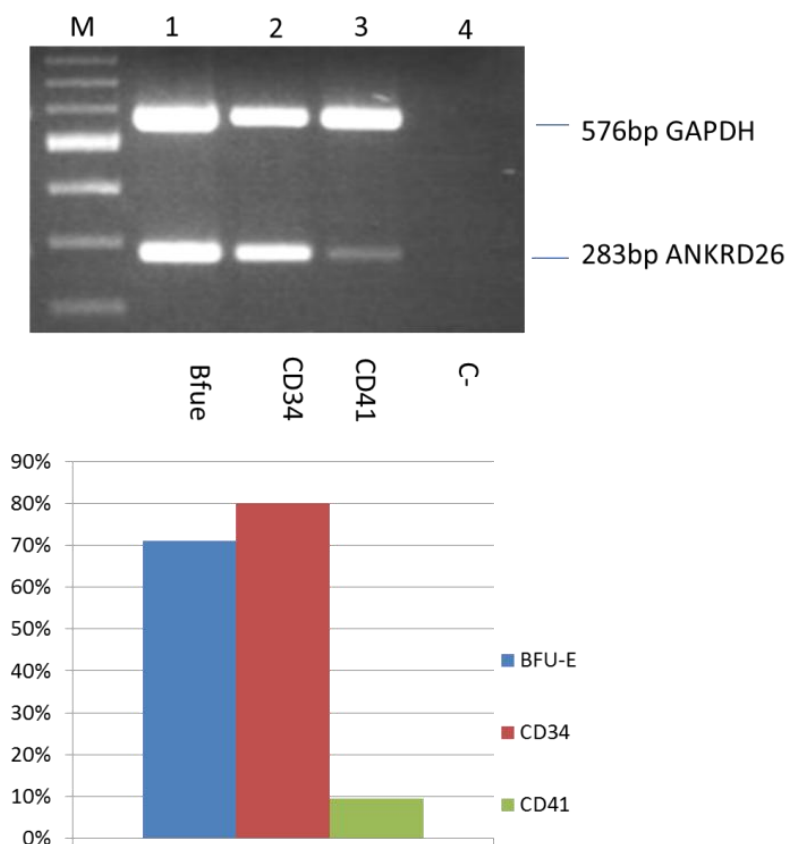


Figura 10: RT-PCR multiplex semiquantitativa. Co-amplificazione del gene *housekeeping GAPDH* (576bp) e del gene *ANKRD26* (283bp) in diverse tipi di cellule (BFUE, CD34⁺, CD41⁺). Si può osservare come l'espressione del gene *ANKRD26* diminuisca nelle cellule maggiormente differenziate CD41⁺ rispetto alle cellule BFUE e CD34⁺. Quantificazione delle bande di *ANKRD26* rispetto a *GAPDH* con ImageJ ed elaborazione dei dati in percentuale.

La Trombocitemia essenziale (MIM#187950) rappresenta un esempio di come un meccanismo analogo a questo è in grado di causare una patologia. Kondo e colleghi descrissero, infatti, una famiglia con trombocitemia, nella quale gli affetti presentavano livelli sierici di TPO significativamente elevati se comparati ai livelli presenti nei soggetti sani. Essi analizzarono il gene TPO, codificante per la trombopoietina, ed identificarono una delezione di un singolo nucleotide nel 5'UTR del gene, 43

trascrizione RUNX1 (Figura 12). RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) è un fattore di trascrizione che forma con la proteina CBF β un complesso eterodimerico il quale permette di aumentare la stabilità del legame del dominio RUNT di RUNX1 con il DNA. RUNX1 è coinvolto nella regolazione della differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche in cellule mature del sangue [41]. A carico del gene sono note traslocazioni cromosomiche [42], mutazioni puntiformi [43] e amplificazioni [44] associate a diversi tipi di leucemie. Un dato di particolare interesse è che mutazioni in RUNX1 sono responsabili di una piastrinopenia ereditaria la quale mostra una predisposizione alla leucemia mieloide acuta (FPD-AML, Familial Platelet Disorders and predisposition to Acute Myelogenous Leukemia) [45]. Pertanto diventa fondamentale approfondire questo possibile legame fra la regione delle mutazioni e *RUNX1*.

```

                                     A           T           A
                                     AGGG       C  AT
ACTTGTGTCTAGCGGGATCGCTTGCTTGGTAACCCGGAGGGGAGAGATTGGGAAACCG
T   C
CGGAGTTTCCTTTGGGAGGCTGCGGCCAGCCGGGGCTGACTTGTTATGTTGGGCTC

CGGAGGCCGTTA

```

Figura 12: Rappresentazione schematica del 5'UTR con indicate le mutazioni in azzurro e sottolineato il motivo di legame di RUNX1 individuato dal programma. In una parte della regione mutata il programma ChipMapper2 riconosce una breve sequenza per il legame di RUNX1.

Il programma riconosce la sequenza consensus minima 5'-PuACCPuCA-3' per RUNX1 [46], come mostrato in figura 12, ed estende di ulteriori tre basi il sito di legame per questo fattore (AACCGCGGA).

Questo ci suggerisce come le sequenze riconosciute dai fattori di trascrizione possano, probabilmente, differire in realtà un po' anche dalla sequenza canonica. Proprio per questo motivo non possiamo escludere che ci siano siti di legame per altri elementi regolatori ancora non evidenziati dal programma bioinformatico.

4.5 Studi di espressione della luciferasi in HeLa

Per indagare quindi il ruolo del 5'UTR nel controllare l'espressione genica, abbiamo clonato una regione di 730 bp del promotore di *ANKRD26* contenente anche 156 bp del 5'UTR, a monte del gene reporter della luciferasi (firefly) del vettore pGL3 Basic. La regione wt e mutata sono state clonate in direzione sia 5'>3' (sense) sia 3'>5' (antisense) rispetto al gene reporter per analizzare anche un'eventuale attività bidirezionale del promotore. Per valutare l'efficienza di transfezione i costrutti sono stati cotrasfettati con un altro vettore per l'espressione di un'altra luciferasi, la renilla, posta invece sotto il controllo del

promotore costitutivo dell'SV40. In questo modo è stato possibile paragonare i dati ottenuti dalle letture dell'attività della luciferasi-firefly con quelli ottenuti dall'attività della luciferasi-renilla e minimizzare così la variabilità sperimentale.

I primi esperimenti eseguiti in HeLa hanno mostrato che l'attività di luciferasi aumentava in presenza delle mutazioni (c.-128G>A e c.-116C>T) per quanto riguarda i costrutti in cui l'inserito era clonato in sense e diminuiva quando l'inserito era clonato in antisense (Figura 13). In entrambi i casi anche se l'aumento o la riduzione non sono risultati statisticamente significativi, questa regione sembra avere un'attività regolatoria bidirezionale almeno nelle cellule HeLa. Se questi dati fossero confermati in altre linee cellulari potremmo ipotizzare che le mutazioni possano alterare non solo l'espressione di *ANKRD26* ma anche quella di altri geni vicini.

Le HeLa (cellule tumorali della cervice uterina) però non rappresentano il modello cellulare ideale nel quale studiare mutazioni responsabili di una piastrinopenia. Per questa ragione abbiamo deciso di eseguire lo stesso studio in una linea cellulare con caratteristiche simili alla linea megacariocitaria: le DAMI. Queste cellule, infatti, trattate opportunamente differenziano in megacariociti diventando un buon modello nel quale studiare l'effetto delle mutazioni e valutare l'eventuale attività bidirezionale del promotore.

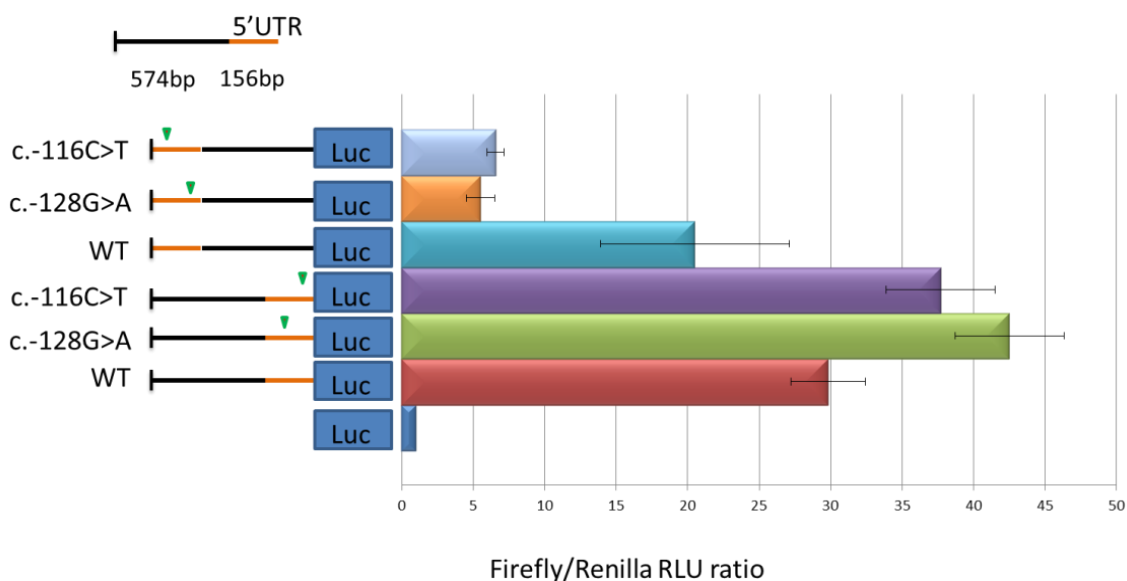


Figura 13: Rappresentazione schematica dei tre saggi di luciferasi condotti in HeLa. Sono stati trasfettati 2 costrutti mutati c.-128G>A e c.-116C>T e un costrutto wt. Gli inserti di 730bp sono stati clonati in sense e in antisense rispetto al gene per la luciferasi. Per ogni lisato le letture sono state effettuate in triplicato e nel grafico sono riportate i rapporti fra i valori medi delle letture dei diversi costrutti e quelli del vettore plasmidico senza promotore (pGL3 Basic). È riportata inoltre la deviazione standard.

4.6 Differenziamento delle DAMI e caratterizzazione

Visto l'effetto delle mutazioni sull'attività della luciferasi in HeLa, abbiamo riprodotto gli stessi esperimenti utilizzando una linea cellulare megacariocitaria: le DAMI. Dopo due giorni di trattamento con TPO e Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) le cellule assumono caratteristiche tipiche dei megacariociti. Come si può osservare dall'analisi in citofluorimetria (Figura 14 A) le DAMI differenziate appaiono molto più granulose rispetto alle non trattate. Si osserva un aumento dell'integrina beta 3 (CD61) sulla superficie delle cellule rispetto a quelle non trattate (Figura 14 B). Inoltre, mentre le DAMI non differenziate hanno un contenuto di DNA 2N o 4N (rosso), quelle sottoposte al differenziamento per 6 o per 9 giorni con TPO e PMA (blu,arancione) sono 8N (picco più alto), ma anche 16 e 32N (Figura 14 C).

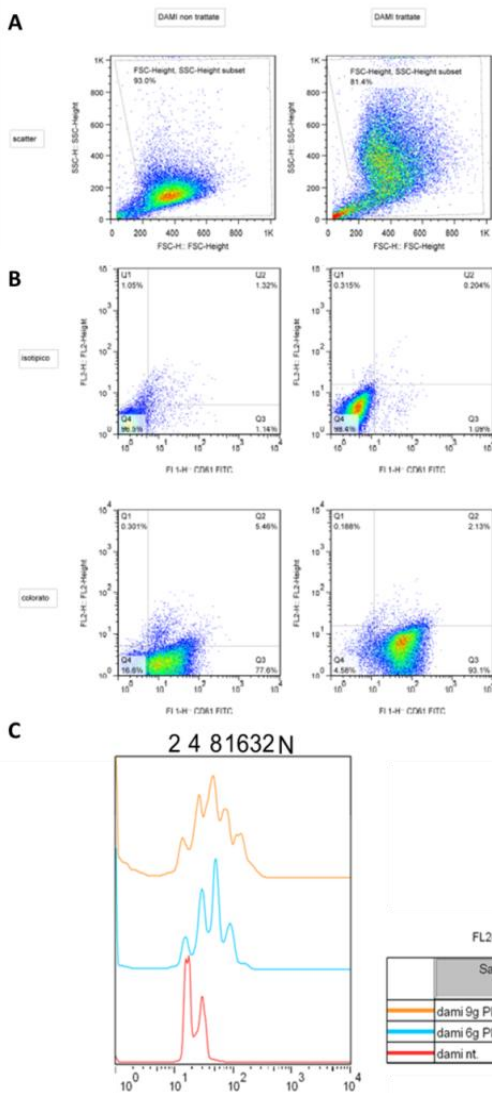


Figura 14:

Analisi citofluorimetria delle cellule DAMI.

A- Scatter delle DAMI non trattate e delle DAMI dopo 2 giorni di differenziamento trattate con TPO e PMA. Si può osservare nelle DAMI trattate soprattutto un aumento della granulosità (aumento degli eventi lungo l'asse Y).

B- Dotplot delle DAMI non trattate e delle DAMI dopo 2 giorni di differenziamento trattate con TPO e PMA. Le cellule sono state trattate con anticorpo specifico contro l'integrina beta 3 e un anticorpo aspecifico IgG. Si può osservare l'incremento dell'integrina beta 3 di membrana osservando uno spostamento della nuvola degli eventi. Si deve confrontare le cellule trattate con TPO e PMA e colorate con l'anticorpo specifico (dotplot in basso a destra) con il dotplot delle cellule non trattate e colorate con l'anticorpo specifico (dotplot in basso a sinistra).

C- Analisi con il propidio ioduro. Misurazione della quantità di DNA presente nelle cellule non trattate e trattate per 6 e 9 giorni con TPO e PMA. Si può osservare come nelle cellule trattate vi sia un aumento considerevole della quantità di DNA (8N, 16N fino a 32N).

Anche in colorazione May Grunwald Giemsa, le cellule mostrano caratteristiche simili a quelle dei megacariociti per la dimensione cellulare e presenza di nuclei polilobulati (Figura 15). Le caratteristiche osservate indicano come il differenziamento delle DAMI in vitro rappresenti un buon modello di riproduzione della maturazione dei megacariociti risultando perciò utile agli scopi di questo progetto.

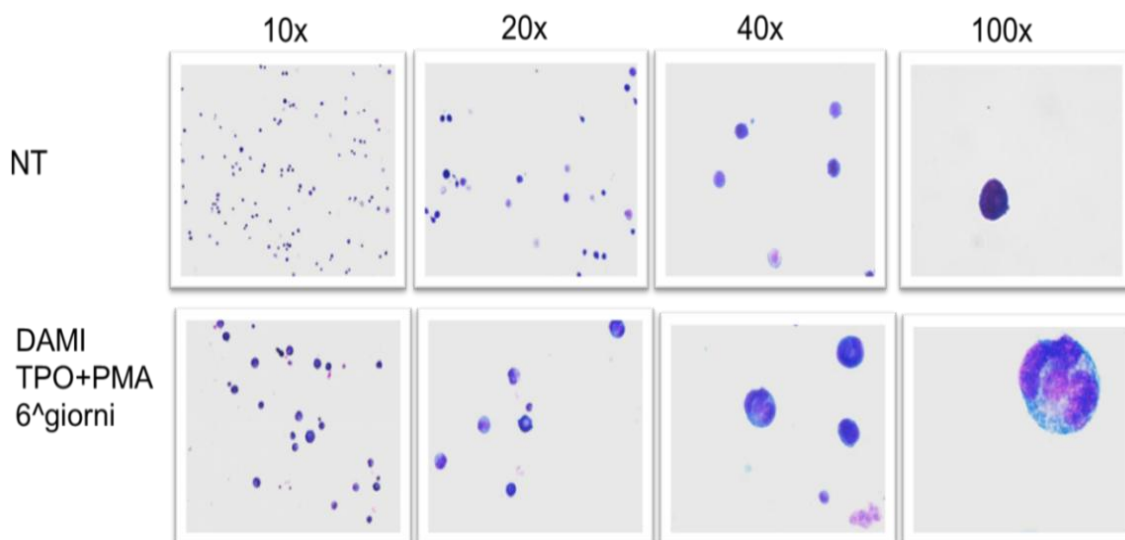


Figura 15: Cellule DAMI non trattate e trattate fino a 6 giorni di differenziamento colorate con May Grunwald Giemsa. Vari ingrandimenti dai quali si può osservare l'aumento della dimensione cellulare durante il differenziamento e la presenza di nuclei polilobulati nelle cellule differenziate.

4.7 Studi di espressione della luciferasi in DAMI

Nelle cellule DAMI, abbiamo, innanzitutto, valutato l'attività bidirezionale del promotore di *ANKRD26*. Contrariamente a ciò che abbiamo osservato nelle cellule HeLa, gli inserti clonati in antisense non inducono alcuna attività di luciferasi; l'attività, infatti, è paragonabile a quella ottenuta con il vettore di controllo in cui il gene della luciferasi è privo di promotore. Solo i costrutti nei quali la regione di 730 nucleotidi (wt o mutata) è clonata in sense sono in grado quindi di produrre un'attività (Figura 16).

Questi dati ci suggeriscono che le mutazioni possano alterare l'espressione del gene *ANKRD26* durante la megacariopoiesi.

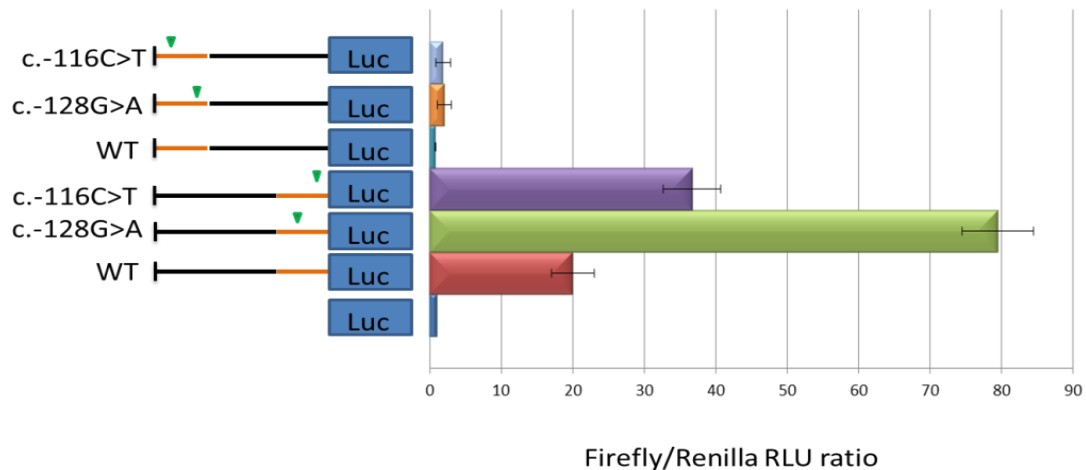


Figura 16: Rappresentazione schematica dei tre saggi di luciferasi condotti in DAMI a due giorni di differenziamento.

Sono stati trasfettati 2 costrutti mutati c.-128G>A e c.-116C>T e un costrutto wt.

Gli inserti di 730bp sono stati clonati in sense e in antisense rispetto al gene per la luciferasi.

Per ogni lisato le letture sono state effettuate in triplicato e nel grafico sono riportate i rapporti fra i valori medi delle letture dei diversi costrutti e quelli del vettore plasmidico senza promotore (pGL3 Basic).

È riportata inoltre la deviazione standard.

Considerando solo i costrutti in cui l'inserto è clonato in sense, abbiamo valutato l'attività di luciferasi degli inserti wt mutati alle posizioni c.-134G>A, c.-128G>A, c.-126T>G, c.-119C>A, c.-116C>T in cellule DAMI non differenziate (barre BLU) e differenziate (barre ROSSE) (Figura 17). Come nelle cellule HeLa si conferma un aumento statisticamente significativo dell'attività di ciascun costrutto mutato rispetto al controllo wt sia nelle cellule non differenziate che in quelle differenziate, fatta eccezione per il costrutto c.-126T>G nelle cellule non differenziate. Anche se l'aumento dei costrutti mutati sembra più pronunciato nelle cellule differenziate, questo incremento non raggiunge la significatività statistica se confrontato a quello ottenuto dal medesimo costrutto nelle cellule non differenziate.

Anche il livello di attività delle sequenze wt rimane costante tra cellule differenziate o meno, nonostante un trascurabile aumento nelle cellule più mature. Non riusciamo però ad apprezzare, in questo sistema, la diminuzione dell'attività nei megacariociti, come atteso dallo studio di espressione condotto nelle cellule CD34⁺ e CD41⁺ molto probabilmente perché le DAMI essendo già dei megacarioblasti esprimono il CD41⁺ e hanno già ridotto l'espressione di *ANKRD26*.

Se valutiamo, invece, l'aumento dell'attività dei costrutti mutati rispetto al wt, che solo nel modello delle DAMI risulta essere sempre statisticamente significativo, avvaloriamo la nostra ipotesi iniziale che le

mutazioni interferiscono con il processo di silenziamento del gene molto probabilmente alterando i siti di legame per fattori che reprimono la trascrizione del gene durante la megacariocitopoiesi.

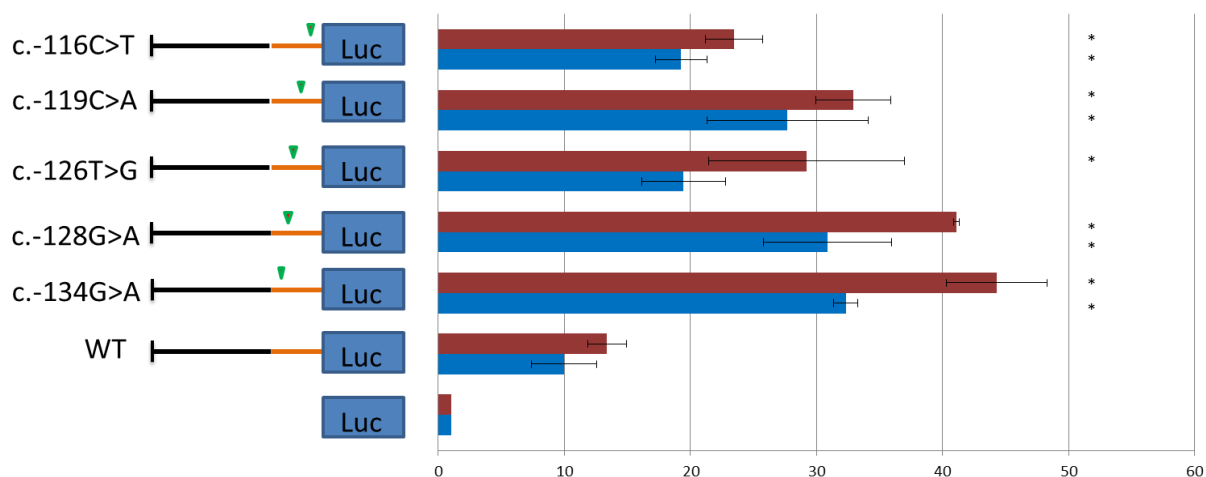


Figura 17: Rappresentazione schematica dei tre saggi di luciferasi condotti in DAMI non differenziate (barre BLU) e in DAMI a due giorni di differenziamento (barre ROSSE).

Sono stati trasfettati 5 costrutti mutati: c.-134G>A, c.-128G>A, c.-126T>G, c.-119C>A e c.-116C>T e un costrutto wt.

Gli inserti di 730bp sono stati clonati solo in sense rispetto al gene per la luciferasi.

Per ogni lisato le letture sono state effettuate in triplicato e nel grafico sono riportate i rapporti fra i valori medi delle letture dei diversi costrutti e quelli del vettore plasmidico senza promotore (pGL3 Basic).

È riportata inoltre la deviazione standard. Infine l'asterisco mostra i valori per i quali otteniamo una significatività statistica.

4.8 Saggi di mobilità elettroforetica (EMSA)

Per identificare gli eventuali fattori che si legano alla regione 5'UTR mutata abbiamo condotto saggi di mobilità elettroforetica (EMSA).

In collaborazione con il professor Manfioletti e il dottor Sgarra dell'Università di Trieste abbiamo, in una prima fase, messo a punto le condizioni sperimentali, usando una sonda di 30 bp della regione di interesse nella versione sia wt che mutata (c.-128G>A). Dall'analisi sono emersi differenti complessi. Uno di questi molto probabilmente rappresenta l'interazione con RUNX1, mostrando una mobilità elettroforetica simile a quella ottenuta con una sonda specifica utilizzata come controllo [47] (Figura 18 A lane 3). La mutazione, però, sembra non interferire con il legame di questo fattore vista la presenza della banda con intensità paragonabile al controllo.

Notiamo tuttavia una importante differenza: la comparsa di una banda con la sonda mutata non presente nella corsa di quella wt (Figura 18 A lanes 1,2) (Figura 18 B lanes 3,4).

Vista la mobilità elettroforetica di questa nuova banda abbiamo ipotizzato l'interazione di HMGA1a con la sonda c.-128G>A. Per dimostrare questa interazione, abbiamo eseguito saggi di supershift dove osserviamo la scomparsa della banda in presenza di concentrazioni crescenti dell'anticorpo (Figura 18 B lanes 5, 6, 7). La banda invece permane usando concentrazioni crescenti di un anticorpo aspecifico (Figura 18 B lanes 8, 9, 10). Con la sonda wt invece non osserviamo variazioni nella formazione o scomparsa di alcuna banda (Figura 18 B lanes 11, 12, 13 e 14, 15, 16). In accordo con questi dati, la sostituzione di una G con una A in posizione -128 genera una sequenza consensus (AAATT) per HMGA1a.

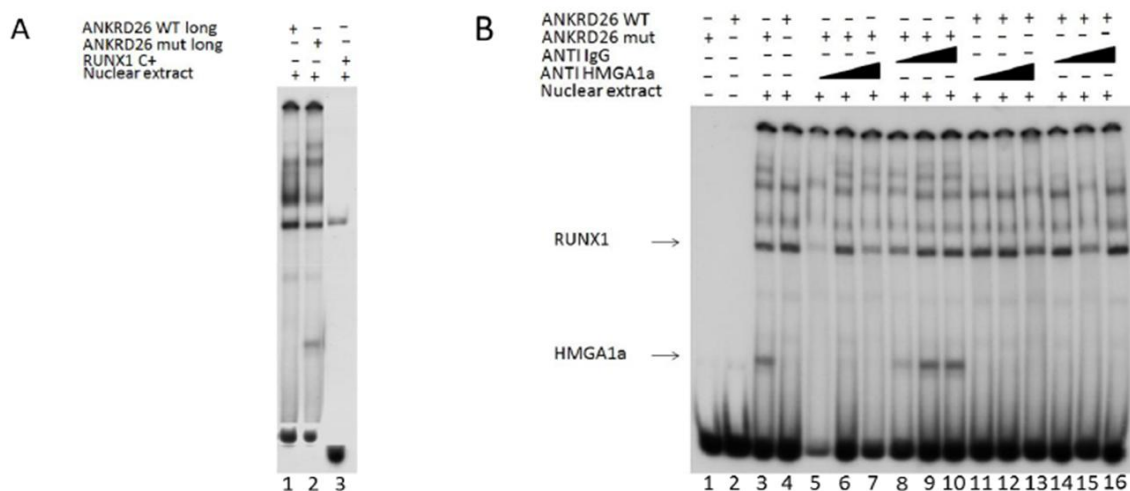


Figura 18: Rilevamento dell'interazione DNA-proteina mediante saggio di mobilità elettroforetica e supershift.

- A.** Estratti nucleari di cellule trattate con DAMI TPO e PMA sono stati incubati con sonde di DNA wild type e mutato (c.-128G> A) costituite da 27 nucleotidi della 5'UTR e con una sonda RUNX1 di 23 nucleotidi utilizzata come controllo positivo.
Lanes 1 e 2 sonda wt e mutata in presenza di estratto nucleare. Si evidenziano diversi complessi.
Lane 3, RUNX1 sonda di DNA che mostra solo un complesso. La dimensione di questo complesso non è influenzata dalla mutazione.
- B.** Estratti nucleari di cellule DAMI trattate con TPO e PMA sono stati incubati con sonde di DNA wild type e mutato (c.-128G> A) costituito da 27 nucleotidi del 5'UTR.
Lane 1, DNA mutato sonda senza estratto nucleare, lane 2, sonda di DNA wt privo di estratto nucleare, lanes 3 e 4 sonde wt e mutata con estratto nucleare: si evidenziano diversi complessi, lanes 5, 6 e 7 sonda mutata: le bande (freccia) della proteina HMGA1a scompaiono utilizzando con 0,375, 0,75 e 1,5µg di anticorpo HMGA1a mentre nelle lanes 8, 9 e 10 le proteine non scompaiono con 0,375, 0,75 e 15µg di IgG non specifico. Lanes 11, 12 e 13 sonda wt non mostra supershift con 0,375, 0,75 e 1,5µg di anticorpi HMGA1a, lanes 14, 15 e 16, sonda wt con 0,375, 0,75 e 1,5µg di IgG non specifico.

Definite le condizioni di EMSA e identificati due potenziali fattori di interazione, abbiamo verificato l'effetto delle altre mutazioni, tra cui c.-134G>A, c.-127A>G, c.-119C>A, c.-118C>A (Figura 19).

Tutte queste sonde generano gli stessi complessi ottenuti con la sonda wt incluso quello putativo con RUNX1. Solo la sonda c.-119C>A evidenzia una banda più bassa, alla stessa altezza anche se meno intensa,

del complesso generato dal legame di HMGA1a alla sonda c.-128G>A (Figura 19 lanes 18, 19, 20). Anche in questo caso, la mutazione c.-119C>A genera una sequenza (AAAAC) simile a quella consensus per HMGA1a (AAATT). E' molto probabile che in questo caso la minore intensità della banda sia dovuta ad una minore affinità di legame di HMGA1a. Possiamo, pertanto, ipotizzare che l'interazione di HMGA1a possa interferire con i meccanismi di controllo dell'espressione di *ANKRD26* almeno in presenza delle mutazioni c.-128G>A e c.-119C>A.

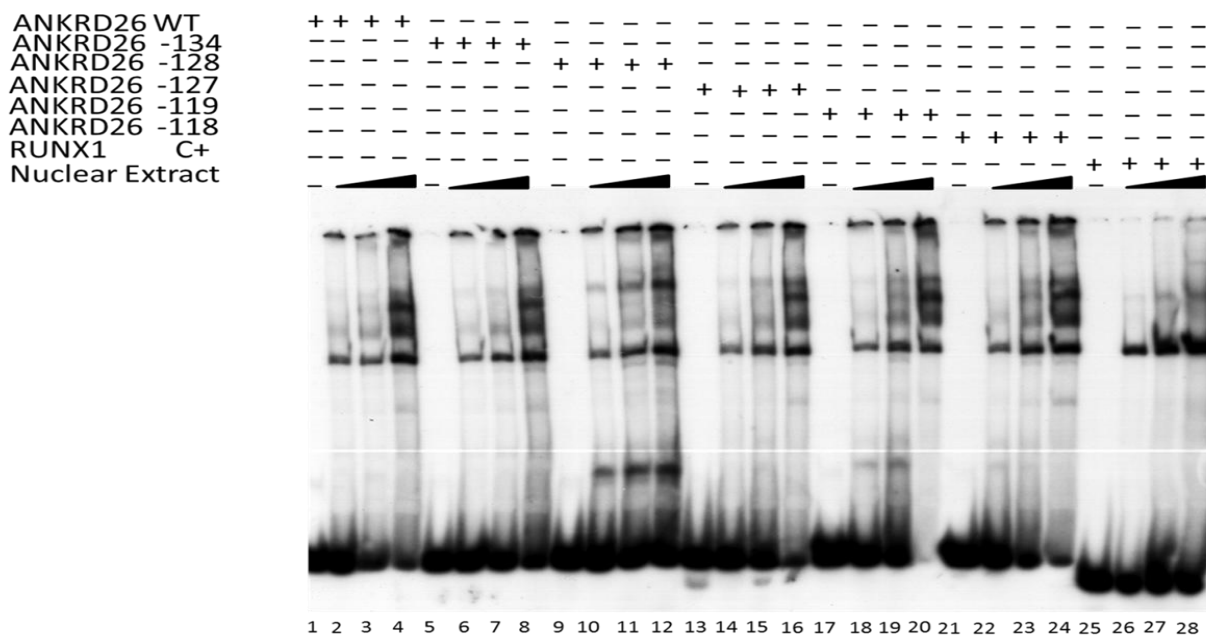
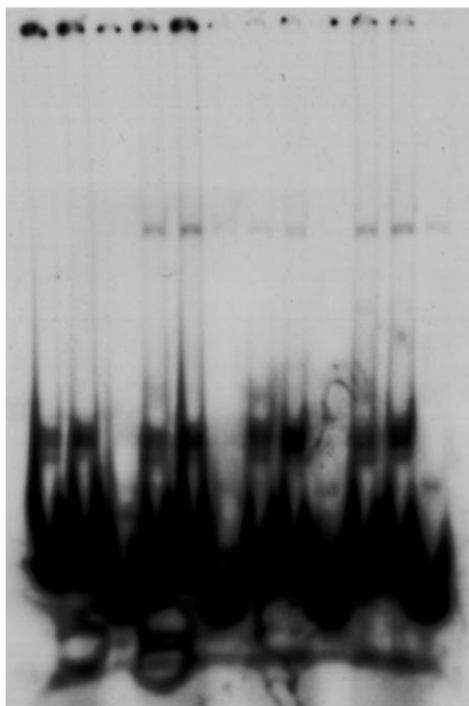


Figura 19: Rilevamento dell'interazione DNA-proteina mediante saggio di mobilità elettroforetica. Estratti nucleari di cellule trattate con DAMI TPO e PMA sono stati incubati con sonde di DNA wild type e mutato (c.-134G>A, c.-128G>A, c.-127A>G, c.-119C>A, c.-118C>A) costituite da 27 nucleotidi della 5'UTR e con una sonda RUNX1 di 23 nucleotidi utilizzata come controllo positivo. Lanes 1, 2, 3 e 4 sonda wt priva di estratto nucleare e con concentrazioni crescenti di estratto (0,5-1-2µg). Lanes 5, 6, 7 e 8 sonda mutata c.-134G>A priva di estratto nucleare e con concentrazioni crescenti di estratto (0,5-1-2µg). Lanes 9, 10, 11 e 12 sonda mutata c.-128G>A priva di estratto nucleare e con concentrazioni crescenti di estratto (0,5-1-2µg). Lanes 13, 14, 15 e 16 sonda mutata c.-127A>G priva di estratto nucleare e con concentrazioni crescenti di estratto (0,5-1-2µg). Lanes 17, 18, 19 e 20 sonda mutata c.-119C>A priva di estratto nucleare e con concentrazioni crescenti di estratto (0,5-1-2µg). Lanes 21, 22, 23 e 24 sonda mutata c.-118C>A priva di estratto nucleare e con concentrazioni crescenti di estratto (0,5-1-2µg). Lanes 25, 26, 27 e 28 sonda RUNX1 priva di estratto nucleare e con concentrazioni crescenti di estratto (0,5-1-2 µg). Si evidenziano diversi complessi. Lanes 26, 27 e 28, RUNX1 sonda di DNA che mostra solo un complesso. La dimensione di questo complesso presente con tutte le altre sonde non è influenzata dalle diverse mutazioni. Lanes 10, 11 e 12 (sonda c.-128G>A) e lanes 18 e 19 (sonda c.-119C>A) si evidenzia un complesso più basso non presente quando si utilizza la sonda wt.

Per quanto riguarda il potenziale legame di RUNX1 è interessante sottolineare la costante interazione del fattore con il DNA indipendentemente dalla sonda wt o mutata analizzata. Per questo motivo, abbiamo cercato di confermare il legame del fattore di trascrizione con un saggio di supershift. Solo in particolari condizioni utilizzando, cioè, una concentrazione molto bassa di estratto nucleare (0,125µg) e un'alta concentrazione di anticorpo specifico (6µg) fatto reagire prima di aggiungere la sonda alla reazione, si riesce a sequestrare RUNX1 impedendone il legame alla sonda sia wt che mutata (c-128G>A) oltre che all'oligo usato come controllo positivo (Figura 20 lanes 7, 8, 9). Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che RUNX1 è ampiamente presente nell'estratto nucleare delle cellule DAMI (si noti l'intensità della banda che appare nelle lastre Figure 18 e 19) oltre che dall'alta affinità con la quale questo fattore interagisce con le sonde. E' anche possibile che l'anticorpo commerciale utilizzato non presenti un'elevata specificità per l'epitopo N-terminale di RUNX1 contro cui è diretto. Per questa ragione sarà opportuno confermare i dati di supershift utilizzando un anticorpo che riconosca un dominio alternativo del fattore.

ANKRD26 mut	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ANKRD26 WT	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
C R+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
ANTI IgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ANTI RUNX1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Nuclear extract	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Figura 20:

Rilevamento dell'interazione DNA-proteina mediante saggio di mobilità elettro-foretica.

Estratti nucleari di cellule trattate con DAMI TPO e PMA sono stati incubati con sonde di DNA wild type e mutato (c.-128G>A) costituite da 27 nucleotidi della 5'UTR e con una sonda RUNX1 di 23 nucleotidi utilizzata come controllo positivo.

Lanes 1, 2 e 3: le tre sonde prive di estratto nucleare.

Lanes 4, 5 e 6: le diverse sonde in presenza di 0,125µg di estratto nucleare.

Lanes 7, 8 e 9: le tre sonde con 0,125µg di estratto nucleare e 6µg di anticorpo specifico anti RUNX1.

Lanes 10, 11 e 12: le tre sonde con 0,125µg di estratto nucleare e 6µg di anticorpo aspecifico IgG.

Appurato il legame di RUNX1 con il DNA, non riusciamo ancora spiegare come le mutazioni determinino un aumento di attività della luciferasi. Se per c.-128G>A e c.-119C>A possiamo proporre che l'interazione di HMGA1a destabilizzi l'architettura del complesso che regola la trascrizione di *ANKRD26*, risulta più difficile fare ipotesi per le altre mutazioni. Tuttavia anche per esse dovremmo ipotizzare un analogo meccanismo. Il fatto di non osservare variazioni nei complessi potrebbe dipendere dalle condizioni sperimentali non idonee per rilevare potenziali alterazioni strutturali o conformazionali del sistema di trascrizione. Non possiamo, tuttavia, escludere l'ipotesi che l'aumento dell'attività di luciferasi possa dipendere non tanto da un aumento della trascrizione quanto da un'alterazione nel processo di traduzione oppure che la regione mutata corrisponda al sito di riconoscimento di un microRNA che regolerebbe i livelli di mRNA con meccanismi post-trascrizionali [48] [49].

Ritornando, tuttavia, all'ipotesi iniziale di un coinvolgimento delle mutazioni nella trascrizione stiamo lavorando sull'ipotesi della presenza di più di un sito RUNX1 nella regione 5'UTR mutata che non viene predetto dal programma bioinformatico perché si discosta dalla sequenza consensus PuACCPuCA. Che le sequenze consensus dei siti di legame dei fattori di trascrizione non siano sempre conservate è noto da molto. Nell'ambito di quelle che legano RUNX1, infatti, è stato recentemente dimostrato che anche il sito ACCCCA lega RUNX1 regolando l'espressione di *α1b*, un noto fattore del processo di differenziazione megacariocitaria [50]. Nel 2005, inoltre, si è identificata nel promotore del plasminogeno una sequenza simile e palindromica a quella del sito di legame di RUNX1 [51]. Infine è recente la scoperta che questo fattore, in forma di eterodimero, si lega al DNA attraverso il dominio RUNT che riconosce la sequenza 5'-TGTGNNN-3' (5'-TGTGTCA-3' o 5'-TGTGTTT-3') [52].

Per questa ragione riconsiderando la regione delle mutazioni nel 5'UTR del gene (Figura 21) ipotizziamo che nella regione a monte del sito predetto, nella quale ci sono le mutazioni dal nucleotide -134 al -125, possa esserci un altro sito di legame per RUNX1. Questo ci permetterebbe di spiegare perché utilizzando la sonda di 30 bp in presenza delle diverse mutazioni non riusciamo ad apprezzare la perdita della banda di RUNX1 o di quelle dei complessi più alti.

```

                                A           T           A
                                AGGG      C AT
ACTTGTGTCTAGCGGGATCGCTTGCTTGGTAACCCGGAGGGAGAGATTGGAAACCG
T C
CGGAGTTTCCTTTGGGAGGCTGCGGCCAGCCGGGGCTGACTTGTTATGTTGGGCTC
CGGAGGCCGTTA

```

Figura 21: Sequenza dell'inizio del 5'UTR con indicate le mutazioni in azzurro e sottolineato in nero il motivo di legame predetto dal sito bioinformatico per *RUNX1*. In giallo e in rosso dalla posizione -135 alla -125 la regione in cui ipotizziamo ci possa essere un altro sito di legame per *RUNX1*.

Per iniziare a validare l'ipotesi della presenza di almeno due siti che legano RUNX1 abbiamo disegnato nuove sonde specifiche per i due ipotetici siti RUNX1A e RUNX1B (Figura 22 sonde in viola).

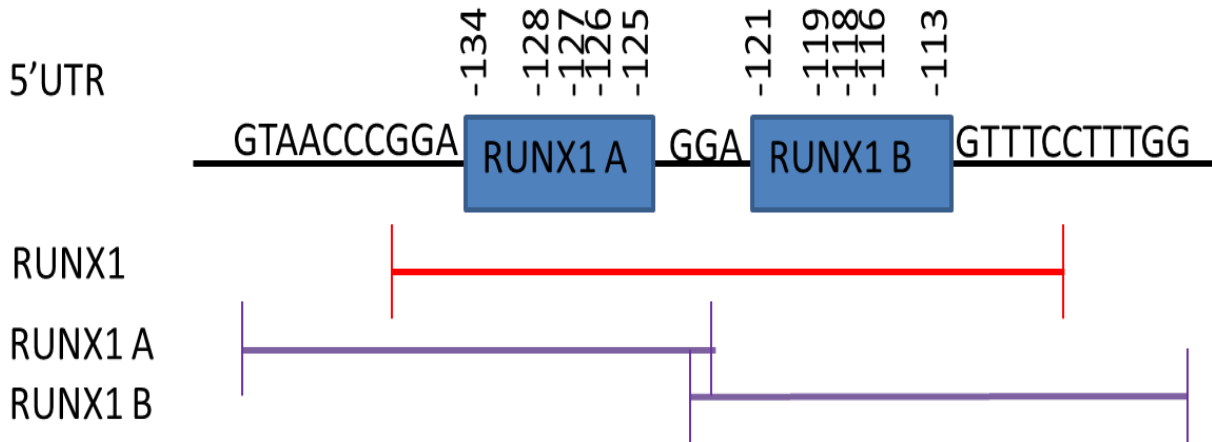


Figura 22: Sequenza della regione delle mutazioni.

Sono evidenziati i due siti di legame per *RUNX1*: RUNX1A ipotizzato e RUNX1B identificato dal programma bioinformatico.

Sono riportate nei due siti le posizioni delle mutazioni.

Sono poi evidenziate le sonde utilizzate. La sonda rossa RUNX1 di 30 nucleotidi comprendente i due siti RUNX1A e RUNX1B e in viola le due sonde con i siti per *RUNX1* suddivisi.

Dati preliminari suggeriscono che indipendentemente dall'utilizzo della sonda RUNX1A e RUNX1B osserviamo una sola banda con la stessa mobilità elettroforetica del complesso ottenuto con la sonda controllo, che presenta un solo sito di legame per questo fattore di trascrizione, o con la sonda wt di 30 nucleotidi. Le tre bande con mobilità elettroforetica minore che si ottengono con la sonda di 30 bp, non sono presenti con le sonde RUNX1A e RUNX1B. La presenza di RUNX1 in tutti i complessi è confermata da saggi di competizione: utilizzando, infatti, la sonda non marcata del controllo positivo, a diverse concentrazioni, notiamo che tutte le bande, non solo la banda "a" ma anche le bande "b" e "c" scompaiono, indicando che ad esse è legato RUNX1 (Figura 23 B lanes 1 e 2). Utilizzando, invece, la sonda non marcata del controllo negativo per RUNX1, dove il sito di legame è stato completamente modificato, il fattore RUNX1 non viene sequestrato e si osservano tutti i complessi anche alla concentrazione maggiore di competitore (Figura 23 B lanes 3 e 4). Sulla base di tutte queste osservazioni riteniamo che la banda "a" rappresenti un complesso con una sola molecola RUNX1 legata, la banda "b" e "c" rispettivamente con due e tre molecole.

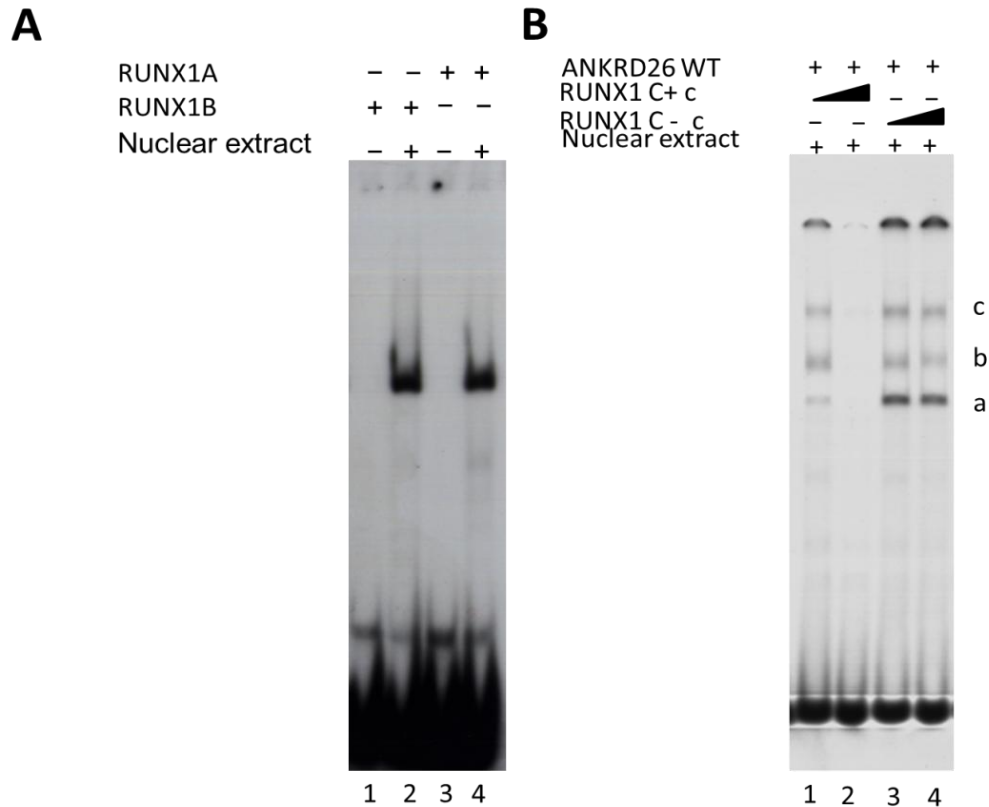


Figura 23: Rilevamento dell'interazione DNA-proteina mediante saggio di mobilità elettroforetica.

- A. Estratti nucleari di cellule trattate con DAMI TPO e PMA sono stati incubati con sonde di DNA costituite da 21 nucleotidi della regione 5'UTR RUNX1A e RUNX1B.
Lanes 1 e 3 le due sonde prive di estratto nucleare.
Lanes 2 e 4 le diverse sonde in presenza di 0,25µg di estratto nucleare.
- B. Estratti nucleari di cellule trattate con DAMI TPO e PMA sono stati incubati con la sonda di DNA costituita da 30 nucleotidi della regione 5'UTR (sonda rossa) in presenza della sonda controllo positivo RUNX1 "fredda" non marcata e della sonda controllo negativo RUNX1 a diverse concentrazioni.
Lanes 1 e 2 la sonda wt in presenza di estratto nucleare (1 µg) e con concentrazioni crescenti della sonda controllo positivo non marcata.
Lanes 3 e 4 la sonda wt in presenza di estratto nucleare e con concentrazioni crescenti della sonda controllo negativo non marcata. "a", "b" e "c" i diversi complessi che si formano con la sonda.

Se questi dati saranno confermati, estenderemo i saggi EMSA utilizzando la sonda precedentemente usata di 30 bp RUNX1 in cui ciascun sito (o entrambi) sarà completamente distrutto o alterato dalle mutazioni identificate nei pazienti. Valuteremo così la formazione dei complessi DNA-proteina e identificheremo l'effetto delle mutazioni sulla loro formazione.

Concludendo quindi, grazie ai saggi EMSA abbiamo confermato che la sequenza del 5'UTR del gene *ANKRD26* dove sono localizzate le mutazioni identificate in pazienti con ANKRD26-RD lega RUNX1. E' noto come RUNX1 controlli l'espressione di molti geni che svolgono un ruolo determinante nella produzione e funzione piastrinica, tra cui la lipossigenasi 12, la miosina 9 e 10, la proteina chinasi C- θ e il fattore piastrinico 4 [53] [54] [55] [56] [47], suggerendo quanto sia importante approfondire il suo ruolo in ANKRD26-RD.

Rimane, tuttavia, da stabilire quale sia l'effetto delle mutazioni. In presenza di c.-128G>A, c.-119C>A si forma una banda più bassa dovuta al legame con HMGA1a che potrebbe quindi alterare l'architettura del complesso di trascrizione di *ANKRD26*. Le proteine HMGA sono "fattori architettonici" che modificano la struttura della cromatina e che vengono riattivate in molti tumori, tra cui le leucemie [57].

E' importante ricordare che non solo alterazioni in RUNX1 determinano una piastrinopenia con predisposizione alla leucemia, ma che anche i pazienti con mutazioni in *ANKRD26* sono a rischio di sviluppare tumori del sangue. Purtroppo rimane aperta la questione del ruolo delle altre mutazioni nel determinare l'aumento di attività osservata nei saggi di luciferasi.

5 Conclusioni

5.1 Conclusioni

ANKRD26-RD è una nuova forma ereditaria di piastrinopenia che grazie a questo lavoro di tesi è stata caratterizzata sia a livello clinico che molecolare. Si tratta di una forma non sindromica a trasmissione autosomica dominante, con piastrine di volume normale e aumentata incidenza nello sviluppo di leucemie nei pazienti affetti [35]. Le mutazioni sono state identificate a carico del 5'UTR del gene *ANKRD26*. Alla luce di questa associazione con il cancro e della non meno importante necessità di migliorare la diagnosi delle piastrinopenie ereditarie, emerge la necessità di indagare su quali siano i meccanismi patogenetici attraverso i quali le mutazioni identificate alterino la produzione di piastrine e inducano la carcinogenesi.

In questa tesi abbiamo, perciò, trattato due aspetti: lo studio di nuove famiglie che ci ha permesso di caratterizzare la malattia stessa e l'analisi funzionale delle mutazioni per comprendere i meccanismi patogenetici implicati nella malattia.

Abbiamo, pertanto, analizzato una casistica di pazienti con diagnosi sospetta, riscontrando sostituzioni in eterozigosi, solo in pazienti con volume normale delle piastrine, portando a 12 il numero delle mutazioni finora identificate, tutte a carico del 5'UTR del gene *ANKRD26* [19] [18]

Vista la localizzazione delle mutazioni, è stato ipotizzato che il loro effetto fosse quello di alterare l'espressione dell'*ANKRD26*. Come primo passo per comprenderne l'effetto patogenetico, abbiamo eseguito un'analisi bioinformatica identificando RUNX1 come possibile fattore di regolazione per la presenza di un possibile sito di legame nella regione mutata. In seguito saggi con un gene reporter hanno dimostrato come le mutazioni determinino un aumento statisticamente significativo della sua attività almeno in DAMI, cellule che possono essere differenziate in megacariociti. Infine abbiamo confermato mediante saggi EMSA l'interazione della regione delle mutazioni con RUNX1 e con HMGA1a in presenza di due mutazioni c.-128G>A e c.-119C>A. Infine dati preliminari ci hanno portato a supporre la presenza di due siti di legame per RUNX1, ipotesi che sarà oggetto di ulteriori approfondimenti volti a definire l'effetto delle mutazioni sul controllo dell'espressione di *ANKRD26*.

Bibliografia

1. Balduini, C.L. and A. Savoia, *Genetics of familial forms of thrombocytopenia*. Hum Genet, 2012. **131**(12): p. 1821-32.
2. Broos, K., et al., *Platelets at work in primary hemostasis*. Blood Rev, 2011. **25**(4): p. 155-67.
3. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelet formation*. Semin Hematol, 2010. **47**(3): p. 220-6.
4. Balduini, C.L., A. Iolascon, and A. Savoia, *Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy*. Haematologica, 2002. **87**(8): p. 860-80.
5. Lopez, J.A., et al., *Bernard-Soulier syndrome*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4397-418.
6. Nurden, A.T. and P. Nurden, *Inherited thrombocytopenias*. Haematologica, 2007. **92**(9): p. 1158-64.
7. Ghevaert, C., et al., *A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the alphaIIb beta3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3407-14.
8. Gresele, P., et al., *Dominant inheritance of a novel integrin beta3 mutation associated with a hereditary macrothrombocytopenia and platelet dysfunction in two Italian families*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 663-9.
9. Jayo, A., et al., *L718P mutation in the membrane-proximal cytoplasmic tail of beta 3 promotes abnormal alpha IIb beta 3 clustering and lipid microdomain coalescence, and associates with a thrombasthenia-like phenotype*. Haematologica, 2010. **95**(7): p. 1158-66.
10. Kunishima, S., et al., *Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the alphaIIb beta3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia*. Blood, 2011. **117**(20): p. 5479-84.
11. Nurden, A.T., et al., *Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models*. Blood, 2011. **118**(23): p. 5996-6005.
12. Nurden, P., et al., *Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome*. Blood, 2011. **118**(22): p. 5928-37.
13. Morison, I.M., et al., *A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia*. Nat Genet, 2008. **40**(4): p. 387-9.
14. Kahr, W.H., et al., *Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome*. Nat Genet, 2011. **43**(8): p. 738-40.
15. Gunay-Aygun, M., et al., *Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4990-5001.
16. Albers, C.A., et al., *Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome*. Nat Genet, 2011. **43**(8): p. 735-7.
17. Bottega, R., et al., *Correlation between platelet phenotype and NBEAL2 genotype in patients with congenital thrombocytopenia and alpha-granule deficiency*. Haematologica, 2012.
18. Noris, P., et al., *Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families*. Blood, 2011. **117**(24): p. 6673-80.
19. Pippucci, T., et al., *Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(1): p. 115-20.
20. Balduini, C.L. and A. Savoia, *Inherited thrombocytopenias: molecular mechanisms*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(5): p. 513-23.
21. Balduini, C.L., et al., *Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine*. Haematologica, 2003. **88**(5): p. 582-92.
22. Savoia, A., et al., *An autosomal dominant thrombocytopenia gene maps to chromosomal region 10p*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(5): p. 1401-5.

23. Drachman, J.G., G.P. Jarvik, and M.G. Mehafeff, *Autosomal dominant thrombocytopenia: incomplete megakaryocyte differentiation and linkage to human chromosome 10*. *Blood*, 2000. **96**(1): p. 118-25.
24. Gandhi, M.J., C.L. Cummings, and J.G. Drachman, *FLJ14813 missense mutation: a candidate for autosomal dominant thrombocytopenia on human chromosome 10*. *Hum Hered*, 2003. **55**(1): p. 66-70.
25. Punzo, F., et al., *A mutation in the acyl-coenzyme A binding domain-containing protein 5 gene (ACBD5) identified in autosomal dominant thrombocytopenia*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(9): p. 2085-7.
26. Johnson, H.J., et al., *In vivo inactivation of MASTL kinase results in thrombocytopenia*. *Exp Hematol*, 2009. **37**(8): p. 901-8.
27. Bera, T.K., et al., *POTE, a highly homologous gene family located on numerous chromosomes and expressed in prostate, ovary, testis, placenta, and prostate cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(26): p. 16975-80.
28. Bera, T.K., et al., *POTE paralogs are induced and differentially expressed in many cancers*. *Cancer Res*, 2006. **66**(1): p. 52-6.
29. Bera, T.K., et al., *Selective POTE paralogs on chromosome 2 are expressed in human embryonic stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2008. **17**(2): p. 325-32.
30. Hahn, Y., et al., *Duplication and extensive remodeling shaped POTE family genes encoding proteins containing ankyrin repeat and coiled coil domains*. *Gene*, 2006. **366**(2): p. 238-45.
31. Liu, X.F., et al., *A primate-specific POTE-actin fusion protein plays a role in apoptosis*. *Apoptosis*, 2009. **14**(10): p. 1237-44.
32. Macaulay, I.C., et al., *Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins*. *Blood*, 2007. **109**(8): p. 3260-9.
33. Bera, T.K., et al., *A model for obesity and gigantism due to disruption of the Ankrd26 gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(1): p. 270-5.
34. Wheeler, D.A., et al., *The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing*. *Nature*, 2008. **452**(7189): p. 872-6.
35. Noris P, P.S., Seri M, Pecci A, Gnan C, Loffredo G, Pujol-Moix N, Zecca M, Scognamiglio F, De Rocco D, Punzo F, Melazzini F, Scianguetta S, Casale M, Marconi C, Pippucci T, Amendola G, Notarangelo LD, Klersy C, Civaschi E, Balduini CL, Savoia A, *Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families*. *Blood* 2011.
36. Thon JN, I.J., *Platelet formation*. *Semin Hematol.*, 2010. **47**(3): p. 220-6.
37. Ichikawa, N., et al., *Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura*. *Thromb Haemost*, 1996. **76**(2): p. 156-60.
38. Mardis ER, D.L., Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley T.J., *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(11): p. 1058-66.
39. Sahab ZJ, H.M., Zhang L, Cheema AK, Byers SW., *Tumor Suppressor RARRES1 Regulates DLG2, PP2A, VCP, EB1, and Ankrd26*. *J Cancer*, 2010. **1**: p. 14-22.

40. Kondo, T., et al., *Familial essential thrombocythemia associated with one-base deletion in the 5'-untranslated region of the thrombopoietin gene*. *Blood*, 1998. **92**(4): p. 1091-6.
41. Okuda T, v.D.J., Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR., *AML1, the Target of Multiple Chromosomal Translocations in Human Leukemia, Is Essential for Normal Fetal Liver Hematopoiesis*. *Cell*, 1996. **84**(2): p. 321-30.
42. Lutterbach B, H.S., *Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation*. *Gene.*, 2000. **245**(2): p. 223-35.
43. Osato, M., *Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia*. *Oncogene*, 2004. **23**(24): p. 4284-96.
44. Roumier C, F.P., Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C., *New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies*. *Leukemia*, 2003. **17**(1): p. 9-16.
45. Michaud J, W.F., Osato M, Cottles GM, Yanagida M, Asou N, Shigesada K, Ito Y, Benson KF, Raskind WH, Rossier C, Antonarakis SE, Israels S, McNicol A, Weiss H, Horwitz M, Scott HS., *In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis*. *Blood*, 2002 **99**(4): p. 1364-72.
46. Melnikova, I.N., et al., *Sequence specificity of the core-binding factor*. *J Virol*, 1993. **67**(4): p. 2408-11.
47. Aneja, K., et al., *Mechanism of platelet factor 4 (PF4) deficiency with RUNX1 haplodeficiency: RUNX1 is a transcriptional regulator of PF4*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(2): p. 383-91.
48. Orom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. *Mol Cell*, 2008. **30**(4): p. 460-71.
49. Zhou, X., et al., *Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence*. *Genetica*, 2009. **137**(2): p. 159-64.
50. Elagib, K.E., et al., *RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation*. *Blood*, 2003. **101**(11): p. 4333-41.
51. Kopf, E. and R. Miskin, *A RUNX/AML-binding motif residing in a novel 13-bp DNA palindrome may determine the expression of the proximal promoter of the human uPA gene*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(9): p. 2057-64.
52. Bowers, S.R., et al., *Runx1 binds as a dimeric complex to overlapping Runx1 sites within a palindromic element in the human GM-CSF enhancer*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(18): p. 6124-34.
53. Kaur, G., et al., *RUNX1/core binding factor A2 regulates platelet 12-lipoxygenase gene (ALOX12): studies in human RUNX1 haplodeficiency*. *Blood*, 2010. **115**(15): p. 3128-35.
54. Jalagadugula, G., et al., *Regulation of platelet myosin light chain (MYL9) by RUNX1: implications for thrombocytopenia and platelet dysfunction in RUNX1 haplodeficiency*. *Blood*, 2010. **116**(26): p. 6037-45.
55. Antony-Debre, I., et al., *MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations*. *Blood*, 2012. **120**(13): p. 2719-22.
56. Jalagadugula, G., et al., *Platelet protein kinase C-theta deficiency with human RUNX1 mutation: PRKCQ is a transcriptional target of RUNX1*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(4): p. 921-7.
57. Pierantoni, G.M., et al., *High-mobility group A1 proteins are overexpressed in human leukaemias*. *Biochem J*, 2003. **372**(Pt 1): p. 145-50.